

MINISTÉRIO DA SAÚDE

MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Salix alba* (SALGUEIRO
BRANCO)

Organização: Ministério da Saúde

Fonte do recurso: DIREB-002-FIO-13

Brasília

2015

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore e ramos de <i>Salix alba</i>	1
Figura 2	Mapa da distribuição geográfica da espécie vegetal.....	2
Figura 3	Aspectos macroscópicos e microscópicos em <i>Salix alba</i> L conforme Farmacopeia Brasileira.....	6
Figura 4	Estrutura química dos componentes químicos majoritários presentes na espécie <i>Salix alba</i> . Adaptado de WHO, 2009.....	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Limites microbiológicos recomendados para plantas medicinais (Adaptado de Araújo e Baubi, 2012).....	9
Tabela 2 Resumo das atividades descritas em estudos farmacológicos in vitro envolvendo a espécie vegetal Salix alba encontrados na literatura pesquisada.....	31
Tabela 3 Resumo das atividades descritas em estudos farmacológicos in vivo envolvendo a espécie vegetal Salix alba encontrados na literatura pesquisada.....	44
Tabela 4 Formas farmacêuticas de Salix alba obtidas a partir da literatura pesquisada.....	55

ABREVIATURAS

AAPH - 2,2-azobis(2-amidinopropano) diidrocloreto

AAS - Ácido acetilsalicílico

AChE - Acetilcolinesterase

AINES - Anti-inflamatórios não-esteroidais

Anvisa – Agência nacional de Vigilância Sanitária

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CLAE/HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ High Performance Liquid
Cromatography

COX- cicloxigenase

DCFH-DA - 2,7-diacetato de diclorofluorosceína

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EMeA - European Medicines Agency

EPO - European Patent Office

GSH - Glutathiona

HLE - elastase

HSP-47 - Heat Shock Protein

ICAM-1 - Molécula de Adesão Intracelular

IC₅₀ – Índice de Inibição 50%

IL - interleucina

IN - Instrução Normativa

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

I.P. - Intraperitoneal

IPNI - International Plant Names Index

JPO - Japan Patent Office

LPS - lipopolissacarídeos

MDA - Malondialdeído

MF - Medicamentos Fitoterápicos

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NF- κ B - Fator Nuclear kappa B

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PTF - Produtos Tradicionais Fitoterápicos

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

Rename - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SOD - Superóxido dismutase

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

USPTO - U.S. Patent and Trademark Office

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

V.O. - Via oral

WHO - World Health Organization

WIPO - World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

1 IDENTIFICAÇÃO	1
1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA	1
1.2 SINONÍMIA BOTÂNICA	1
1.3 FAMÍLIA	1
1.4 FOTO DA PLANTA	1
1.5 NOMENCLATURA POPULAR	2
1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	2
1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS	2
2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS	3
2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL	3
2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	3
2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	3
2.3.1 Descrição microscópica do pó	5
2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES	7
3 INFORMAÇÕES DE CONTROLE DE QUALIDADE	7
3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL	7
3.1.1 Caracteres organolépticos	7
3.1.2 Requisitos de pureza	7
3.1.2.1 Perfil de contaminantes comuns	7
3.1.2.2 Microbiológico	7
3.1.2.3 Teor de umidade	9

3.1.2.4 Metal pesado	9
3.1.2.5 Resíduos químicos	10
3.1.2.6 Cinzas.....	10
3.1.3 Granulometria	10
3.1.4 Prospecção fitoquímica	10
3.1.5 Testes físico-químicos	10
3.1.6 Testes de identificação	10
3.1.7 Testes de quantificação	11
3.1.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	11
3.2 DERIVADO VEGETAL	12
3.2.1 Descrição	12
3.2.2 Método de obtenção	12
3.2.3 Caracteres organolépticos	15
3.2.4 Testes de identificação	15
3.2.5 Testes de quantificação	16
3.2.5.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não.....	16
3.3 PRODUTO FINAL	16
3.3.1 Forma farmacêutica	16
3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica	17
4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA	17
4.1 USOS POPULARES / TRADICIONAIS	17
4.2 PRESENÇA NA NOTIFICAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS	17
4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS	19

4.3.1 Estudos toxicológicos	19
4.3.1.1 Toxicidade aguda	19
4.3.1.2 Toxicidade subcrônica	19
4.3.1.3 Toxicidade crônica	20
4.3.1.4 Genotoxicidade	20
4.3.1.5 Sensibilização dérmica	21
4.3.1.6 Irritação cutânea	21
4.3.1.7 Irritação ocular	21
4.3.2 Estudos farmacológicos	21
4.3.2.1 Ensaios <i>in vitro</i>	21
4.3.2.2 Ensaios <i>in vivo</i>	40
4.3.2.3 Ensaios <i>ex vivo</i>	43
4.4 ESTUDOS CLÍNICOS	47
4.4.1 Fase I	47
4.4.2 Fase II	48
4.4.3 Fase III	50
4.4.4 Fase IV	51
4.4.5 Estudos observacionais	51
4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO	52
4.5.1 Vias de Administração	52
4.5.2 Dose Diária	52
4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo)	52
4.5.4 Período de Utilização	53
4.5.5 Contra Indicações	53

4.5.6 Grupos de Risco.....	53
4.5.7 Precauções de Uso	53
4.5.8 Efeitos Adversos Relatados	53
4.5.9 Interações Medicamentosas	53
4.5.9.1 Descritas	53
4.5.9.2 Potenciais	54
4.5.10 Informações de Superdosagem	54
4.5.10.1 Descrição do quadro clínico	54
4.5.10.2 Ações a serem tomadas	55
5 INFORMAÇÕES GERAIS	55
5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS /FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA..	55
5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS.....	56
5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO	57
5.4 ROTULAGEM	57
5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS	57
5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL.....	57

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA

Salix alba L. (1).

1.2 SINONÍMIA BOTÂNICA

A busca por sinônimos foi realizada nas bases de dados Flora do Brasil, Tropicos e International Plant Names Index (IPNI), porém não foram identificadas sinonímias botânicas para a espécie *Salix alba* (1-3).

1.3 FAMÍLIA

Saliaceae (4).

1.4 FOTO DA PLANTA



Figura 1 Árvore (Fonte: MOBOT (5)) e ramos de *Salix alba* L. (Fonte: Tropicos (3))

1.5 NOMENCLATURA POPULAR

Salgueiro branco (4).

1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Salix alba é uma espécie nativa da região central e Sul da Europa, Ásia Central e nordeste da África. Ela foi levada aos Estados Unidos nos idos de 1700 por imigrantes europeus e se disseminou em diversas partes da América (5-8).

As espécies de *Salix* estão localizadas preferencialmente em regiões temperadas do hemisfério Norte e crescem preferencialmente em regiões úmidas (6).

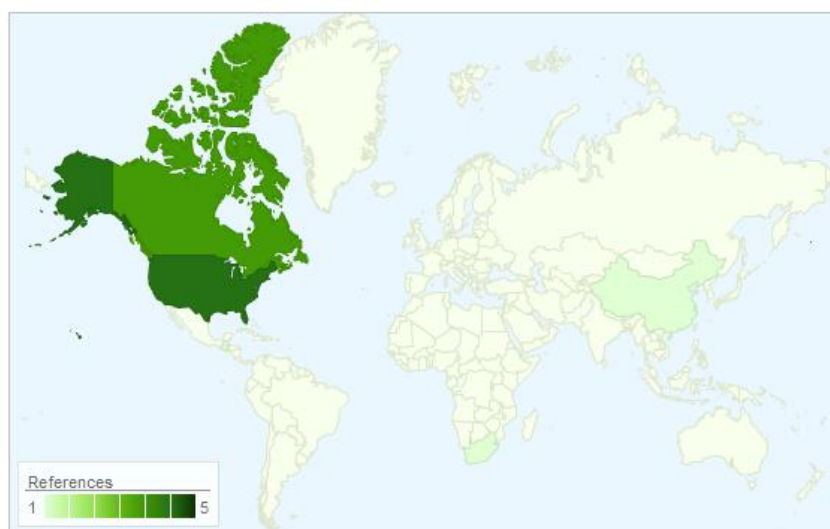


Figura 2 Mapa da distribuição geográfica da espécie vegetal (Fonte: Tropicos (3))

1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS

O gênero *Salix* contempla mais de 400 espécies, distribuídas principalmente na América do Norte, Europa e China. As espécies do gênero não são comumente encontradas em regiões tropicais, havendo apenas três espécies nativas das Américas Central e do Sul (8).

Outras espécies correlatas ao gênero e também utilizadas com fim medicinal são *Salix daphnoides*, *Salix fragilis* e *Salix purpurea* (7, 9-12). Estudos filogenéticos indicam que a *S. fragilis* é derivada dos progenitores de *S. alba*, o que pode ser indicado pela semelhança genética entre as espécies (13).

2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS

As espécies de *Salix* são caracterizadas por árvores de até 25 metros com folhas decíduas, normalmente pecioladas, simples, lineares a ovaladas com margens inteiras a serradas. As inflorescências são pequenas e podem emergir antes, ao mesmo tempo ou após as folhas. Já as flores são individuais e não apresentam pétalas. Possui frutos capsulados com muitas sementes (7).

Salix alba caracteriza-se por ser uma árvore grande com tronco curto, com ramos de coloração marrom-amarelados, folhas elípticas e lanceoladas, acuminadas e serradas, com pelos seríceos e coloração acinzentada. Os frutos são capsulados e possuem inúmeras sementes (7).

2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL

A parte utilizada como droga vegetal é a casca obtida dos ramos jovens (4).

2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a parte da planta utilizada com fins medicinais constitui-se da casca inteira ou fragmentada (1 a 2 cm de espessura), obtida de ramos jovens, com dois a três anos. Macroscopicamente os fragmentos se caracterizam por serem irregulares coriáceos, flexíveis, alongados e levemente acanalados, de comprimento, largura e espessura variados. Sua superfície externa é reluzente e lustrosa, lisa ou estriada de coloração castanho-escura. Já a superfície interna é finamente estriada longitudinalmente, fibrosa e parda (4, 7, 9).

2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a casca tem coloração castanho-escura e é amarelada em algumas porções quando vista frontalmente. As células do súber apresentam diferentes formas, geralmente poligonais, de paredes retilíneas e muitas vezes alongadas. O colênquima possui células achatadas e de paredes espessadas. Em secção transversal, o córtex possui cutícula extremamente espessada e a porção externa da casca pode apresentar diferentes organizações estruturais: 1) primeira camada epidérmica, uniestratificada, com células

quadrangulares pequenas, de paredes espessas, seguida por cinco a seis camadas de colênquima tabular, de células alongadas, dispostas tangencialmente, de paredes espessas e com cloroplastídios, seguido por parênquima com células de variadas formas e de paredes espessas; 2) camada epidérmica externa, com as mesmas características da descrita anteriormente, seguida pelo colênquima formado por células pequenas, arredondadas e de paredes espessas, seguido por parênquima com células também arredondadas e de paredes espessas; 3) revestimento externo formado por periderme, abrangendo diferente número de camadas, seguidas por parênquima com células arredondadas e de paredes espessas. O parênquima cortical externo é sempre formado por várias camadas de células, normalmente quadrangulares a retangulares, ou poligonais a arredondadas, de paredes espessadas, com poucos espaços intercelulares, muitos cloroplastídios e muitos cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas, raros monocristais e cristais prismáticos. Agrupamentos de células pétreas são pouco comuns neste tecido, raras são essas células isoladas e as contendo compostos fenólicos. O parênquima cortical interno possui células de diferentes formas, maiores espaços intercelulares e menor quantidade de cristais e de cloroplastídios. Mais internamente, as células mostram maior irregularidade de forma, maiores espaços intercelulares, paredes muito espessadas, pontoadas e mais retilíneas. Agrupamentos geralmente circulares, de fibras lignificadas são abundantes e estão distribuídos aleatoriamente neste parênquima onde, muito raramente, ocorrem agrupamentos de células pétreas. O câmbio é formado por poucas camadas celulares, com células de pequenas dimensões e achatadas tangencialmente, tanto as fusiformes quanto as radiais. O tecido adjacente internamente ao câmbio, contém grande quantidade de grãos de amido. Raios parenquimáticos são formados por células de diferentes formas, alongadas verticalmente, de paredes espessas e contendo cloroplastídios. Entre esses raios, ocorrem células parenquimáticas de forma irregular, de paredes espessadas, sem cloroplastídios e de maior volume do que aquelas distribuídas junto ao câmbio. Células floemáticas pequenas, ricas em compostos fenólicos, são acompanhadas por agrupamentos de fibras lignificadas, alinhados horizontalmente e por células parenquimáticas, de paredes espessas, com cloroplastídios e dispostas tangencialmente. Idioblastos contendo compostos fenólicos são comuns junto ao câmbio interno. Este tecido delimita internamente a casca e é formado por células de paredes delgadas e reduzido número de camadas. Geralmente é de difícil observação devido a suas características e sua posição limítrofe. Em secção longitudinal, as características do súber e da região cortical externa são similares às descritas para a secção transversal. A região cortical

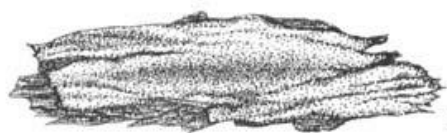
interna mostra raios parenquimáticos muitas vezes alargados, fibras e células parenquimáticas de paredes espessas (Figura 2) (4).

2.3.1 Descrição microscópica do pó

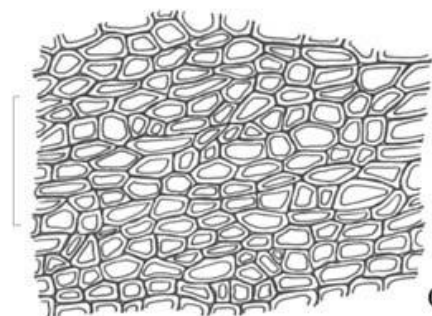
São características do pó da casca de *Salix alba* a coloração castanho-pálida; a presença de fragmentos de súber, em vista frontal; fragmentos de parênquima, com células de paredes espessadas, em vista frontal; fibras isoladas ou porções de seus agrupamentos, em secção longitudinal; fragmentos de parênquima cortical com células de forma poligonal e de paredes espessas, com cristais do tipo drusas, em secção transversal; porção de fibras associadas a idioblastos cristalíferos, em secção longitudinal; fragmentos de parênquima com células de paredes espessadas, com distribuição radial e com porções de câmbio; fragmentos de câmbio, em secção transversal; cristais de oxalato de cálcio dos tipos monocristais, cristais prismáticos e drusas, isolados (4).



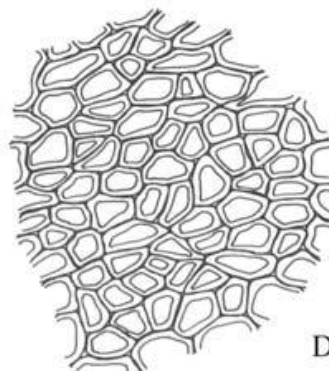
A



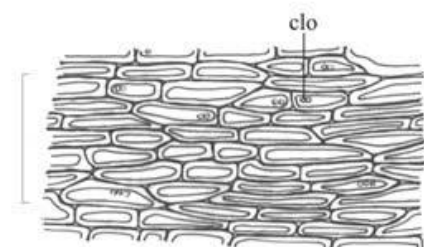
B



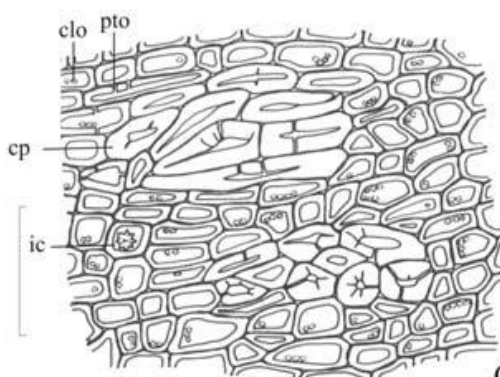
C



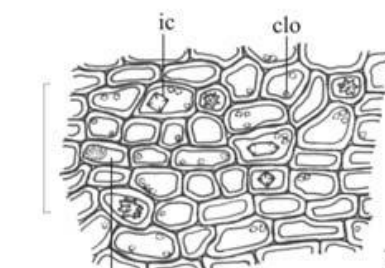
D



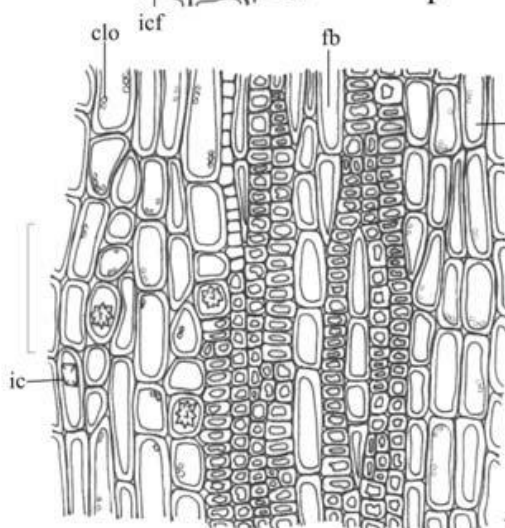
E



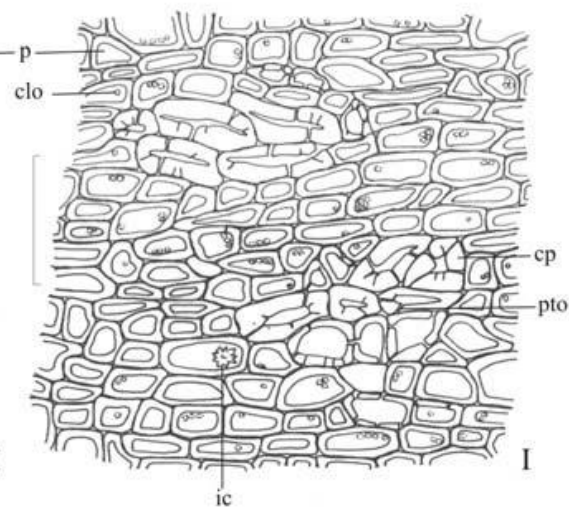
G



F



H



I

Figura 3 Aspectos macroscópicos e microscópicos em *Salix alba* L conforme Farmacopeia Brasileira (4). A – aspecto geral de porção da superfície externa da casca, em vista frontal. B – aspecto geral de porção da superfície interna da casca, em vista frontal. C – detalhe do súber, na região de coloração marrom, em vista frontal. D – detalhe do súber, na região de coloração amarelada, em vista frontal. E – porção de colênquima em secção transversal; cloroplastídio (clo). F – detalhe de porção do parênquima, mostrando idioblastos cristalíferos com monocristais, cristais prismáticos e drusas, e com compostos fenólicos, em secção transversal; idioblasto contendo compostos fenólicos (icf); cloroplastídio (clo); idioblasto cristalífero (ic). G – detalhe de porção do parênquima, mostrando agrupamento de células pétreas, em secção transversal; cloroplastídio (clo); célula pétrea (cp); idioblasto cristalífero (ic); pontoação (pto). H – detalhe de porção do córtex, em secção longitudinal; cloroplastídio (clo); fibra (fb); idioblasto cristalífero (ic); parênquima (p). I – detalhe de porção do córtex, mostrando o parênquima e células pétreas em secção longitudinal; cloroplastídio (clo); célula pétrea (cp); idioblasto cristalífero (ic); parênquima (p); pontoação (pto).

2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES

Diferentemente da Farmacopeia Brasileira, na Farmacopeia Europeia a descrição da casca de *Salix* utilizada como droga vegetal consiste em mais de uma espécie do gênero, contemplando também *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill. e *S. fragilis* L, as quais são caracterizadas por possuírem pelo menos 1,5% de derivados salicílicos totais em sua composição (9, 12). A Farmacopeia Brasileira recomenda a identificação da espécie vegetal por meio de cromatografia em camada delgada utilizando sílica-gel (4).

3 INFORMAÇÕES DE CONTROLE DE QUALIDADE

3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL

3.1.1 Caracteres organolépticos

A droga vegetal é inodora com sabor adstringente e marcadamente amargo (4, 7).

3.1.2 Requisitos de pureza

3.1.2.1 Perfil de contaminantes comuns

Segundo a Farmacopeia Brasileira e a monografia da Organização Mundial de Saúde (OMS), a droga vegetal deve possuir no máximo 3% de ramos com diâmetro superior a 10 mm e no máximo 2% de outros materiais estranhos (4, 7).

3.1.2.2 Microbiológico

Não há descrição de controle microbiológico específico para *Salix alba* na Farmacopeia Brasileira ou Europeia (4, 9). No entanto, na monografia da OMS para o salgueiro há referência aos limites de contaminação microbiológica determinados pelo guia da OMS para controle de qualidade de plantas medicinais (7, 14).

De acordo com o guia da OMS, é natural a presença de fungos e bactérias no material vegetal, principalmente devido a fonte, colheita e manejo. A presença de *Escherichia coli* e *Salmonella spp* indicam baixa qualidade de produção e colheita, o que pode ser evitado implantando-se boas práticas de cultivo.

Mais recentemente, um estudo de Parthik e colaboradores analisou os guias da OMS e os contaminantes potencialmente perigosos em plantas medicinais, em relação ao controle microbiológico, os autores descrevem o limite de material microbiológico de acordo com o material vegetal utilizado e o diferencia em extrato bruto, material que foi pré-tratado ou para uso tópico e material para uso interno (15).

O livro “Latest Research into Quality Control” possui um capítulo destinado ao controle microbiológico em plantas medicinais, no qual há um quadro comparativo entre os limites de agentes microbiológicos determinados pelas Farmacopeias brasileira, americana, europeia e guia da OMS. O quadro comparativo foi adaptado e está apresentado abaixo (16).

Tabela 1 Limites microbiológicos recomendados para plantas medicinais (Adaptado de Araújo e Baubi, 2012 (16)).

	Farmacopeia Brasileira	Farmacopeia Americana	Farmacopeia Europeia	Guia OMS
Bactérias aeróbicas	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷	NI
Fungos	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	10 ⁵
Enterobactérias e outras bactérias Gram negativas	10 ⁴	10 ³	NI	NI
<i>E. coli</i>	Ausência	Ausência	10 ⁴	10 ⁴
<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência	NI	NI

Farmacopeia Brasileira: valor representa droga vegetal na qual será adicionada água fervente antes do uso. Farmacopeia Americana: Valor representa droga vegetal seca ou em pó na qual será adicionada água fervente antes o uso; Farmacopeia Europeia: produtos com uma ou mais de uma droga vegetal (inteira, rasurada ou em pó) na qual será adicionada água fervente antes do uso. Guia OMS: valor representa matéria vegetal bruta a ser processada. NI: Limites não informados. Valores descritos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g.

3.1.2.3 Teor de umidade

Segundo a Farmacopeia Brasileira o teor de umidade máximo para *Salix alba* é de 11%. De acordo com a Farmacopeia Europeia essa porcentagem deve ser determinada em 1000 g de pó da planta por secagem em forno a 100° C por duas horas (4, 9).

3.1.2.4 Metal pesado

A Farmacopeia Brasileira não determina valores mínimos de metais, tampouco a Farmacopeia Europeia ou a monografia da OMS para a espécie vegetal, neste último há referência ao guia da OMS para determinação dos limites máximos de metais em plantas medicinais (4, 7, 9).

O guia da OMS, por sua vez, determina que o limite máximo de metais tóxicos deve ser calculado em concordância com o limite máximo tolerado para ingestão diária e esse deve ser estabelecido com base regional ou nacional. A recomendação da OMS para chumbo e cádmio, por exemplo, é de no máximo 10 e 0,3 mg/ kg, respectivamente (14).

Kalny e colaboradores (2012) determinaram o conteúdo de microelementos e metais tóxicos em plantas medicinais e fitoterápicos comercializados na Polônia, dentre eles a casca do salgueiro e encontrou alta concentração de cádmio (1,0 mg/ kg) na droga vegetal (17).

3.1.2.5 Resíduos químicos

Não há descrição específica na Farmacopeia Brasileira sobre resíduos químicos, já a monografia da OMS para a casca de *Salix* possui recomendação de não exceder o limite máximo de aldrin e dieldrin em 0,05 mg/ kg. Para outros praguicidas há a indicação de consultar os limites descritos no guia da OMS (4, 7, 9, 14).

3.1.2.6 Cinzas

A proporção máxima de cinzas descritas tanto na Farmacopeia Brasileira quanto na Europeia e na monografia da OMS é de 10% (4, 7, 9, 14).

3.1.3 Granulometria

A granulometria para a espécie *Salix alba* não está descrita na Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Europeia ou monografia da OMS para a espécie vegetal (4, 7, 14). Entretanto, há uma descrição genérica no guia da OMS para plantas medicinais que define o pó de acordo com o tamis pelo qual ele passa por completo, variando entre grosso e muito fino (14).

3.1.4 Prospeção fitoquímica

A espécie possui salicina, sua principal característica, além de ser rica em glicosídeos fenólicos, flavonoides e macroelementos, como K, Ca e Mg (7, 9, 11).

3.1.5 Testes físico-químicos

Não há descrição de testes físico-químicos específicos para a espécie na literatura utilizada.

3.1.6 Testes de identificação

A Farmacopeia Brasileira define como proceder a identificação de *Salix alba* e define o método de cromatografia em camada delgada (CCD) como de escolha. Para isso utiliza-se sílica-gel GF254, com espessura de 250 µm, como fase estacionária e mistura de acetato de etila, metanol e água (77:13:10) como fase móvel. Aplica-se, separadamente, em forma de banda, 10 µL de cada uma das Soluções (1), (2) e (3), preparadas recentemente, como descrito a seguir.

Solução (1): aquecer 0,5 g da amostra pulverizada (500 μm), com 10 mL de metanol, em banho-maria, sob refluxo, a aproximadamente 50 °C por 10 minutos. Esfriar e filtrar. Solução (2): adicionar a 5 mL da Solução (1), 1 mL da solução de carbonato de sódio anidro 50 mg/mL. Aquecer em banho-maria a, aproximadamente 60 °C, sob refluxo, por 10 minutos. Esfriar e filtrar. Solução (3): dissolver 2 mg de salicina em 1 mL de metanol. Desenvolve-se, então, o cromatograma. Remove-se a placa e deixa-se secar ao ar. Em seguida, nebulizar a placa com solução de ácido sulfúrico 5% (v/v) em metanol e deixar em estufa entre 100 °C e 105 °C, durante 10 a 15 minutos. O cromatograma obtido com a Solução (3) apresenta, no terço médio, uma mancha violeta-avermelhada correspondente a salicina (R_f aproximadamente 0,40). No cromatograma obtido com a Solução (1), a mancha de salicina aparece com uma intensidade fraca à média. No cromatograma obtido com a Solução (2) a mancha correspondente a salicina aparece mais intensa e, sobre ela, aparece uma mancha (salicortina) e, às vezes, duas manchas fracas (tremulacina), de cor violeta-avermelhada. Nos cromatogramas das Soluções (1) e (2) podem aparecer outras manchas de cores azul, amarelo e marrom (4).

3.1.7 Testes de quantificação

Segundo a Farmacopeia Brasileira o doseamento da salicina para a espécie *Salix alba* deve ser realizado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). Para isso, recomenda-se utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 270 nm; pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada, coluna de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica octadecilsilanizada (4 μm), mantida a temperatura ambiente; fluxo da fase móvel de 1 mL/minuto. Fase móvel: mistura de acetonitrila, água e ácido trifluoracético (3:97:0,05). Solução amostra: pesar exatamente, cerca de 0,3 g da droga seca e moída (355 μm) juntar 25 mL de metanol e aquecer sob refluxo, durante 30 minutos. Esfriar e filtrar. Retomar o resíduo com 25 mL de metanol e tratar como descrito anteriormente. Reunir os filtrados e evaporar sob vácuo até secura. Retomar o resíduo com 2 mL de metanol, adicionar 2 mL de hidróxido de sódio 0,1 M e aquecer em banho-maria, sob refluxo, durante 1 hora a 60 °C, aproximadamente, com agitação frequente. Esfriar, adicionar 0,25 mL de ácido clorídrico M e completar a 5 mL com uma mistura de metanol e água (50:50). Solução padrão: dissolver 10 mg de salicina em 10 mL de acetonitrila. Soluções para curva analítica: diluir alíquotas de 40, 45, 50, 55 e 60 μL da Solução padrão a 100 μL com Fase móvel, de modo a obter concentrações de 0,40 mg/ mL, 0,45 mg/ mL, 0,50 mg/ mL, 0,55 mg/ mL e 0,60 mg/ mL.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL das Soluções para curva analítica e da Solução amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção é de aproximadamente 6 minutos para a salicina. Calcular o teor de salicina na amostra a partir da equação da reta obtida com a curva analítica. O resultado é expresso pela média das determinações em gramas de salicina por 100 gramas da droga (%), considerando o teor de água (4).

3.1.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

A Farmacopeia Brasileira descreve apenas a salicina como componentes químicos majoritários presentes no salgueiro-branco, o qual consiste no composto ativo e está presente na proporção de 0,5 a 1,5%. Já a monografia da OMS para o salgueiro relata outros glicosídeos fenólicos, como a salicortina, a fragilina, a populina e, além dos seguintes compostos: triandrina, vimalina, flavonoides e taninos. As estruturas salicina, salicortina e fragilina estão apresentadas na figura 3 (4, 7).

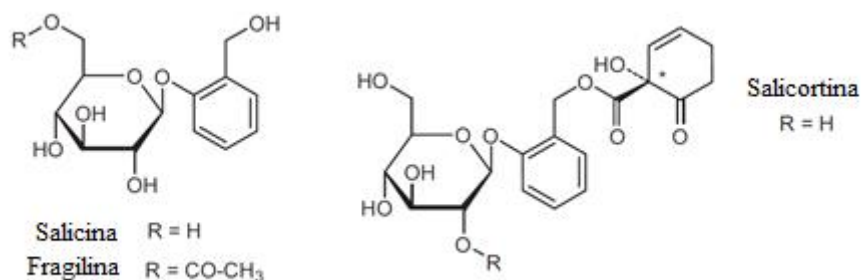


Figura 4 Estrutura química dos componentes químicos majoritários presentes na espécie *Salix alba*. Adaptado de WHO, 2009 (7).

3.2 DERIVADO VEGETAL

3.2.1 Descrição

Não há monografias para os derivados vegetais de *Salix alba* nos compêndios oficiais, dessa forma podem ser empregados os métodos utilizados para a droga vegetal ou os métodos descritos em trabalhos científicos, que no geral utilizaram os mesmos critérios empregados para droga vegetal, os quais são utilizados nesta monografia.

3.2.2 Método de obtenção

Foram estudados 25 artigos científico que descreveram a utilização de derivado vegetal de *Salix alba*, descreveram os derivados como extrato alcoólico, extrato aquoso, extrato metanólico, extrato seco, extrato bruto, extratos utilizando acetona, clorofórmio e hexano como solventes.

Em 1972, Toman e colaboradores relataram o isolamento de galactanas a partir da casca de *Salix alba* com sucesso mediante a extração com benzeno-etanol (1:3) por 30 h e posterior deslignificação com 80% de etanol (18). Em 1975 o mesmo grupo utilizou 600 g da casca de *Salix alba* obtida a partir de ramos jovens par ao isolamento de pectina, a qual foi extraída com água a temperatura ambiente (19).

Para avaliar a presença de polifenóis e sua relação com atividade antimicrobiana, Raiciu e colaboradores utilizou matéria vegetal fresca triturada, a qual sofreu maceração por 4-5 dias em frascos âmbar com etanol 90%. Em seguida foi adicionada uma mistura de água e glicerina para que o volume final fosse 20 vezes a massa inicial da planta. A maceração continuou com a solução de álcool e glicerol por mais 3 semanas (20).

A atividade antimicrobiana, junto às atividades antioxidante e citotóxica presentes nos compostos fenólicos de *Salix alba* foi analisada pelo grupo de Sulaiman, o qual utilizou a o pó da casca e extração com etanol fervente em Soxhlet por 7 h. A solução foi filtrada utilizando vácuo e o filtrado foi evaporado utilizando evaporador a vácuo a 40°C (21).

A obtenção dos extratos aquosos de *Salix alba* foi realizada de forma semelhante, variando de acordo com o objetivo do estudo. Em 1974, Kompantsev *et al.* Descreveram a obtenção de glicosídeos fenólicos a partir da extração de 4,0 kg de ramos jovens de salgueiro branco com água aquecida a 90-95°C por uma hora, três vezes (22).

A fim de obter compostos fenólicos a partir da casca de *Salix alba*, o grupo de Harbourne realizou a extração utilizando apenas 2,5 g da matéria vegetal e 100 mL de água destilada a 100°C por 20 minutos, com agitação, seguido de filtração e resfriamento com gelo (23). Drummond e colaboradores utilizaram uma modificação da metodologia de Harbourne, partindo de 7,5 g da casca de *Salix alba* adicionados de 100 mL de água a 90°C por 15 minutos a fim de também obterem compostos fenólicos (24).

Para o isolamento de taninos foram utilizadas as folhas da espécie vegetal, que foram secas por congelamento e extraídas em Soxhlet com a utilização de hexano a fim de remover lipídeos e substâncias lipofílicas, em seguida os taninos foram extraídos do resíduo resultante por uma mistura de acetona e água (7:3) (25).

A análise de taninos também foi realizada a partir da extração de folhas por Muetzel e colaboradores, em 2006. As folhas foram secas por congelamento ou em forno a 60°C por 2 h e em seguida pulverizadas, então 1 g do pó foi extraído com 100 mL de acetona 70% por duas vezes por 20 minutos em banho ultrassônico (26).

A extração metanólica também foi utilizada por Du et al., a fim de se isolar lignanas provenientes de *S. alba*. Para isso, 1000 g da casca seca da espécie vegetal foi pulverizada e extraída sucessivamente com metanol e éter a temperatura de 40 a 60°C e posteriormente evaporada. O resíduo foi então digerido utilizando-se acetato de etila (27).

O grupo de Poblócka-Olech descreveu a extração metanólica de *Salix alba* em três estudos analisados, enquanto no primeiro o objetivo foi isolar glicosídeos fenólicos, incluindo salicina, dentre outros, no segundo o composto químico isolado foi a procianidina, já no terceiro o objetivo foi isolar fenóis simples. Nas três publicações o processo de extração foi descrito partindo-se do pó da casca da droga vegetal, que extraído exaustivamente com metanol a 60°C (28-30). Jazayeri e colaboradores, com a finalidade de avaliar a atividade anticolinesterásica do extrato de algumas plantas utilizadas como medicinais no Irã, também utilizou a metodologia da extração metanólica de *Salix alba*, semelhante ao descrito acima; de acordo com a publicação, um grama do pó da casca da planta foi extraído por maceração sob agitação a temperatura ambiente com metanol aquoso (20 mL; 1:1 v/v) por 24 horas (31). A quantificação de salicina em diferentes espécies do gênero *Salix* foram analisadas por Kenstavičienė et al. também após a extração utilizando metanol, de acordo com a metodologia do trabalho 50 mL de metanol foi adicionado a 0,5 g do pó da casca de *Salix alba* e a mistura foi aquecida em um condensador de refluxo por 30 minutos, posteriormente resfriada e filtrada (6).

A obtenção do extrato seco de *S. alba* foi descrita por Oberprieler e colaboradores para o isolamento de compostos fenólicos e análise taxonômica por meio de perfil genético. Segundo a metodologia do estudo, após a coleta do material as cascas da espécie vegetal foram congeladas a -80°C. Após 9 meses, o material sofreu secagem utilizando sílica-gel (100 mg), o

qual foi adicionado de 1,5 mL de metanol e homogeneizado em banho ultrassônico por 5 minutos, 3 vezes (32).

Em alguns estudos, os extratos foram obtidos comercialmente e não há descrição da metodologia de extração (10, 33-39).

Diferentemente dos outros derivados vegetais descritos acima, Pinto et al utilizaram o pólen de abelhas proveniente de *S. alba* a fim de isolar principalmente flavonoides, para isso foi utilizado 1 g de pó de pólen foi homogeneizado e misturado à 9 mL de etanol 70%, colocado em papel alumínio e deixado à temperatura ambiente por 72 h, o qual foi denominado extrato 1. Esse extrato foi centrifugado por 31 min a 4°C e 11000 rpm, o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 1,5 mL e estocado a -20°C. Para a hidrólise 1 mL do sobrenadante do extrato 1 foi adicionado de 4 mL de ácido clorídrico 2 M e aquecido até fervura por 30 min. Após o resfriamento a mistura foi extraída 3 vezes com dietiléter e a fase éter foi coletada e evaporada, o resíduo foi solubilizado em 1 mL de etanol 96%, filtrado (0,22 mm) e estocado a -20°C, o extrato etanólico a 96% foi denominado extrato 2 (40).

3.2.3 Caracteres organolépticos

Dentre os artigos analisados os quais relatavam a utilização ou extração de derivados vegetais, o único que relatou a análise de caracteres organolépticos para o controle de qualidade do derivado vegetal foi o grupo de Raiciu et al (20). Segundo o trabalho, ao final do processo de obtenção do derivado foram observados odor, sabor e cor.

3.2.4 Testes de identificação

Conforme já citado, o principal constituinte químico obtido a partir da *Salix alba* é a salicina, no geral os métodos de isolamento e identificação do composto se dão CCD, de acordo com recomendação da Farmacopeia Brasileira para a droga vegetal ou por HPLC para identificação e quantificação, conforme orientação da Farmacopeia Europeia (4, 9).

Enquanto a identificação da salicina no extrato aquoso de *Salix alba* por meio de CCD foi descrita em 1983 (35), outros trabalhos mais recentes utilizaram HPLC tanto para a salicina (6, 29) quanto para glicosídeos fenólicos em geral (30, 32).

Du et al. (2005) descreveram o isolamento de salicina e amigdalina por um método semi-industrial de cromatografia a baixa rotação utilizando uma bobina preenchida com a fase estacionária composta por metil-tert-butil-éter e butanol (1:3) saturado com metanol e água (1:5) e fase móvel composta por metanol e água (1:5) saturado com metil-tert-butil-éter e butanol (1:3). Dessa forma foi possível a dissolução de 500 g de salicina em 5 L de fase móvel e obteve-se uma pureza de 87,6% (36).

Tanto Muetzel *et al.*, em 2006, quanto Sulaiman e colaboradores, em 2013, relataram a determinação de fenóis no extrato de *Salix alba* por espectrofotometria pelo método de Folin-Ciocalteu (21, 26).

3.2.5 Testes de quantificação

Agnolet e colaboradores (2012) validaram a quantificação da salicina por HPLC utilizando detector de malha de diodo, coluna C₁₈ como fase estacionária e fase móvel constituída por solução de metanol, água e ácido fórmico com eluição em gradiente. O método mostrou precisão, exatidão, linearidade e limites de detecção e quantificação satisfatórios (10).

3.2.5.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

De forma semelhante à droga vegetal o principal constituinte químico relatado entre os derivados vegetais de *Salix alba* é a salicina, composto ativo da espécie (6, 10, 22, 23, 29, 35, 36, 39). São também relatados outros fenóis como salidroside, piceina, helicina, triandrina, populina e tremulacina (29). No entanto, o mais comum é o relato da presença de polifenóis ou fenóis totais nos derivados, sem especificar o composto (20, 21, 23, 24, 26, 30, 32).

Os taninos também foram descritos como constituintes dos compostos (20, 23, 25, 26), especialmente as procianidinas, que são descritos como potenciais antifúngicos (25, 28).

3.3 PRODUTO FINAL

3.3.1 Forma farmacêutica

No momento, há um único fitoterápico presente no mercado nacional contendo *Salix alba*, que possui a associação de três espécies vegetais: *Passiflora incarnata*, *Salix alba* e *Crataegus oxyacantha*. O medicamento é utilizado a fim de diminuir sintomas de ansiedade e

insônia, principalmente devido às propriedades sedativas, antiespasmódicas e ansiolíticas da *Passiflora incarnata*. O fitoterápico é apresentado na forma de comprimidos revestidos e cada comprimido contém em sua composição 100 mg de extrato seco de *Salix alba*, 30 mg de extrato seco de *Crataegus oxyacantha* e 100 mg *Passiflora incarnata* (41).

No mercado europeu, especialmente na Polônia, há outros fitoterápicos contendo a espécie vegetal, como o Rutinosal[®], também comercializado na forma de comprimidos com associação de 300 mg de *Salix*, 20 mg de *Rutosidum* de 40 mg de vitamina C; e o Salicortex[®], comprimidos com 330 mg da *Salix*. Os medicamentos são indicados, respectivamente, para resfriados e dores de cabeça (17).

Agnolet et al. (2012) relataram e utilização de cápsulas contendo extrato de *S. alba* compradas em farmácias da Dinamarca, porém o trabalho não apresenta maiores detalhes sobre o fitoterápico (10). Hoffman e colaboradores (2002) também descreveram utilizar comprimidos contendo extrato seco de *Salix alba*, comprados em farmácias locais de Nova Iorque (NY, Estados Unidos) sem descrever nome comercial ou composição do medicamento (42).

3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica

Como não há monografias nas Farmacopeias sobre fitoterápicos contendo *Salix alba* e também não foram encontrados, na literatura pesquisada, testes específicos de controle de qualidade, sugere-se a realização de testes gerais para produtos finais presentes na Farmacopeia Brasileira, como peso, dureza, friabilidade, desintegração, dissolução, uniformidade de doses unitárias, pH, densidade, volume e teste de gotejamento (4).

4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA

4.1 Usos populares e/ou tradicionais

Os primeiros achados descrevendo os efeitos terapêuticos de extratos da casca de salgueiro foram descritos pro Hipócrates, há aproximadamente 2400 anos, ele recomendava mascar as folhas de salgueiro para analgesia em crianças. Estudos subsequentes descreveram os efeitos analgésicos das folhas de salgueiro, como os relatos de Diocorides, um cirurgião

grego que atuou em Roma no ano 75 a.C., e os relatos de Galen, um médico romano que descreveu as propriedades antipiréticas e anti-inflamatórias das folhas do salgueiro (43).

Atualmente, o uso popular do salgueiro, especialmente do salgueiro branco continua disseminado no Brasil e no mundo. A espécie vegetal é conhecida por suas atividades analgésicas, com atuação principalmente contra os sintomas de dores nas costas, artrite, dores reumáticas, além das atividades atipiréticas e anti-inflamatórias. Os efeitos da droga vegetal parecem estar diretamente relacionados à presença da salicina, pró-droga do ácido acetil-salicílico (6, 10, 41).

4.2 Presença em normativas sanitárias brasileiras

No ano de 2014 a ANVISA publicou a RDC nº 26 a qual regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF), além de revogar a RDC 14/2010. (44-46).

Junto à RDC supracitada, foi publicada a Instrução Normativa nº 2, de 13 de maio de 2014 (IN 2/2014), que publicou a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado", na primeira encontra-se a espécie *Salix alba* (45). As informações referentes à espécie estão descritas a seguir:

Nomenclatura botânica - *Salix alba* L., *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill., *S. fragilis* L.

Nome popular - Salgueiro branco

Parte usada - Casca

Padronização/Marcador - Salicina

Derivado vegetal - Extratos

Indicações/Ações terapêuticas - Antitérmico, anti-inflamatório e analgésico

Dose Diária - 60 a 240 mg de salicina

Via de Administração - Oral

Restrição de uso - Venda sem prescrição médica

4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS

4.3.1 Estudos toxicológicos

4.3.1.1 Toxicidade aguda

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.3.1.2 Toxicidade subcrônica

Apenas um estudo sobre toxicidade subcrônica foi encontrado, o qual aborda toxicidade reprodutiva de um fitoterápico que além de *Salix alba*, contém extrato de *Passiflora incarnata* e *Crataegus oxycantha*, e é utilizado com a indicação de sedativo e hipnótico (47).

Para tanto, o estudo utilizou 21 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, com peso superior a 220 g e suas ninhadas. As ratas fêmeas foram colocadas com ratos machos e assim que detectada a cópula foi considerado o dia 0 da gestação. A partir de então os animais passavam a receber diariamente a preparação fitoterápica (n = 11 fêmeas) ou veículo (n = 10 fêmeas) até o final da gestação. As ratas foram avaliadas durante a gestação, além disso, foi avaliada a prole quanto à mortalidade e ao desenvolvimento. A dosagem utilizada nos animais foi correspondente à dose terapêutica proposta para seres humanos (adulto de 70 kg), que é de 4 drágeas/dia, o que resulta em um total de 400 mg do extrato de *Passiflora incarnata*, 120 mg do extrato de *Crataegus oxycantha* e 400 mg do extrato de *Salix alba*, assim sendo os animais receberam as dosagens aproximadas de 6 mg.kg⁻¹, 2 mg.kg⁻¹ e 6 mg.kg⁻¹ de cada um dos extratos, respectivamente. Para os ensaios de toxicidade decidiu-se por aplicar uma dose 10 vezes maior que a os humanos, ou seja, 60 mg.kg⁻¹, 20 mg.kg⁻¹ e 60 mg.kg⁻¹ das plantas mencionadas, respectivamente (47).

O dia 0 de gestação foi contado a partir da cópula e durante os 21 dias subsequentes foi administrada a dose supracitada do fitoterápico por via oral (gavagem). Diariamente foram avaliados o desenvolvimento ponderal e o consumo de água e ração, alterações de comportamento, consciência e disposição, avaliação da atividade do sistema locomotor, musculatura esquelética e reflexos e avaliação da atividade autonômica. No dia do parto e a partir de então, foram avaliados o número e a massa corporal dos filhotes, número de natimortos, mortes de perinatais, alterações macroscópicas externas nos filhotes, desenvolvimento ponderal individual dos filhotes até o desmame, avaliação das características de desenvolvimento geral como: descolamento das orelhas, erupção dos incisivos, aparecimento dos pelos, abertura do canal aditivo, abertura dos olhos e descida dos testículos.

No desmame foram avaliados a massa corporal das ratas lactantes e dos filhotes, o número de filhotes desmamados, a massa dos órgãos dos filhotes (fígado e rins), o aspecto visual das demais vísceras (coração, pulmões, útero, ovários, trato gastrointestinal) (47). De acordo com os resultados observados pelo estudo não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o fitoterápico e o grupo controle (que recebeu apenas veículo) no desenvolvimento das ratas durante a gestação, tampouco no desenvolvimento da sua prole, o que permite concluir que há ausência de toxicidade reprodutiva do extrato de *Salix alba*, mesmo utilizando uma dose dez vezes maior que a utilizada terapeuticamente em humanos (47).

4.3.1.3 Toxicidade crônica

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.3.1.4 Genotoxicidade

Entre os estudos analisados, apenas um deles avaliou a genotoxicidade induzida por *Salix alba*. Entretanto, diferentemente de outros estudos, o produto analisado não foi o extrato da planta, mas sim dois extratos etanólicos (70 e 96%) obtidos a partir do pólen de abelhas proveniente de *Salix alba*, o qual pode estar presente em suplementos alimentares. Para a avaliação da genotoxicidade, foi utilizado o ensaio do micronúcleo. A anti-genotoxicidade foi avaliada mediante a avaliação da proteção do extrato frente à indução de genotoxicidade por três quimioterápicos que agem por mecanismos celulares diferentes: bleomicina, mitomicina C e vincristina. O material celular utilizado para os ensaios foi obtido a partir da coleta de sangue periférico heparinizado de três voluntários saudáveis, não fumantes, do sexo masculino. Após 72 horas de incubação dos linfócitos estimulados, obtidos a partir do sangue periférico na presença do extrato de pólen de abelha obtido de *Salix alba*, a contagem de micronúcleos não aumentou significativamente, ao contrário do observado na presença de bleomicina, utilizada como controle positivo. Esse resultado indica que o extrato não foi capaz de induzir genotoxicidade (40).

Por outro lado, a capacidade do pólen e dos dois extratos etanólicos em proteger contra a mutagênese induzida pelos quimioterápicos em três diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) foi apresentada como resultado do estudo (40). O extrato etanólico a 70% foi capaz de evitar a genotoxicidade induzida pela bleomicina nas três concentrações testadas. A toxicidade induzida pela vincristina também foi evitada pelas três concentrações testadas, porém, nesse

caso, o extrato que apresentou resultado significativo foi o extrato etanólico a 96%. Já a presença de micronúcleos induzidas por mitomicina C foi significativamente menor nas três concentrações do pólen de abelha e do extrato etanólico a 70%. A diferença entre os resultados dos extratos se dá pela diferente concentração de compostos fenólicos de acordo com a forma e o solvente de extração. Os resultados apresentados exploram não só a ausência de genotoxicidade do pólen e dos extratos, mas também seu potencial em atuarem como protetores frente à toxicidade de agentes quimioterápicos (40).

4.3.1.5 Sensibilização dérmica

Dado não encontrado na literatura pesquisada. A ausência desse tipo de estudo justifica-se pela utilização preferencialmente por via oral de formulações contendo a espécie vegetal.

4.3.1.6 Irritação cutânea

Dado não encontrado na literatura pesquisada. A ausência desse tipo de estudo justifica-se pela utilização preferencialmente por via oral de formulações contendo a espécie vegetal.

4.3.1.7 Irritação ocular

Dado não encontrado na literatura pesquisada. A ausência desse tipo de estudo justifica-se pela utilização preferencialmente por via oral de formulações contendo a espécie vegetal.

4.3.2 Estudos farmacológicos

4.3.2.1 Ensaio *in vitro*

Os ensaios farmacológicos realizados *in vitro* foram os mais expressivos dentre os ensaios não clínicos. Quinze diferentes estudos testaram as propriedades farmacológicas da espécie *Salix alba* frente a bactérias, fungos e culturas de diferentes tipos celulares. As atividades farmacológicas que se destacaram foram a atividade anti-inflamatória e a atividade antioxidante, as quais se relacionam. Foram também observadas as atividades antimicrobiana, antiestrogênica e antiproliferativa. Todas elas seguem listadas no quadro 2.

Como esperado, pelo uso tradicional da espécie vegetal, uma das atividades mais testadas foi a atividade anti-inflamatória. Assim como o ácido salicílico e outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), esperava-se que o extrato vegetal de *Salix alba* também

atuasse principalmente inibindo as cicloxigenases (COX), enzimas essenciais para síntese das prostaglandinas a partir da liberação do ácido araquidônico pelas fosfolipases da membrana celular. Entretanto, os estudos discutidos abaixo evidenciaram mecanismos anti-inflamatórios muito mais complexos, ativados pelos extratos vegetais, o que pode ser explicado em parte pela presença de outros compostos ativos além dos salicilatos (48).

A inflamação é um processo complexo e natural em resposta a uma série de agentes hostis aos quais os mamíferos estão expostos, como parasitas, microorganismos, agentes tóxicos e danos físicos. Como resposta a esses agentes, são liberadas citocinas pelos macrófagos e leucócitos, entre as quais se destacam o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) (49, 50).

Fiebich e colaboradores (2004) analisaram o efeito do extrato etanólico da planta em monócitos primários de humanos. Os ensaios avaliaram a atividade das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e liberação da prostaglandina E₂ (PGE₂) mediada pela COX-2. Para isso foi utilizado o extrato comercial 1520L (Plantina GmbH, Munique, Alemanha), descrito como efetivo no combate a dores por ensaios clínicos e já comercializado na Alemanha, o qual possui indicação contra dor reumática, febre e dores de cabeça. Os monócitos foram pré-incubados com o extrato em concentrações variando entre 10 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a fim de se determinar o IC₅₀ com base em uma regressão linear. Os resultados obtidos foram comparados com padrões de salicina e salicilatos, além de um análogo do refocoxib (L745337). Foi demonstrado que são necessárias concentrações superiores a cem vezes do extrato etanólico de *Salix alba* quando comparado ao análogo sintético do anti-inflamatório para inibir 50% da liberação da PGE₂, o que corresponde a dose utilizada do extrato (1600 mg) quando comparado ao fármaco (12,5 mg). Por outro lado, as doses testadas do extrato vegetal não demonstraram capacidade de inibição da COX-1 ou da COX-2 (34).

Um estudo avaliou a atividade anti-inflamatória, também representada pela inibição da COX-1 e COX-2 e da 5-lipoxigenase (5-LOX) em granulócitos humanos, além da elastase (HLE) em leucócitos humanos (39). Para isso, foram utilizadas cinco frações do extrato aquoso de *Salix* STW 33-I. Os extratos foram separados de acordo com a polaridade, utilizando-se sequencialmente tolueno (fração A), acetato de etila (fração B), butanol (fração C) e etanol (fração D), além do extrato aquoso (fração E). A Fração A apresentou pequena quantidade de salicina (0,4%) e indicou altas concentrações de polifenóis indeterminados; a Fração B apresentou concentração de salicina de 9%, além da presença de polifenóis e flavonoides; as

Frações C e D foram as que apresentaram maiores concentrações de salicina (23,6 e 25,2, respectivamente), além da presença de flavonoides; já na Fração E foram detectados 10,3% de salicina e proantocianidinas. De acordo com os resultados apresentados pelos autores, houve uma grande diferença no perfil inibitório das ciclooxigenases de acordo com as frações. As frações que apresentaram maiores inibições para COX-1, COX-2 e 5-LOX foram as frações A e B, exatamente aquelas com baixas concentrações de salicina, constituídas principalmente por polifenóis. Já a inibição da elastase foi mais pronunciada utilizando-se a fração E, com concentrações intermediárias de salicina, no entanto com presença de polifenóis e proantocianidinas (39).

Outro grupo publicou, posteriormente, a avaliação do mesmo extrato aquoso de *Salix* comercializado (STW 33-I) (51), o qual foi separado em frações de acordo com a metodologia utilizada por Nahrstedt e colaboradores (2007), obtendo-se as seguintes concentrações de salicina: 0,5% para Fração A; 1% para Fração B; 34,1% para Fração C; 37,5% para Fração D e 14,9% para Fração E. Nesse estudo, a atividade anti-inflamatória dos extratos foi avaliada em células mononucleares ativadas com lipopolissacarídeos (LPS), o qual ativa a liberação de citocinas inflamatórias por meio da expressão do TNF- α , do óxido nítrico (NO) e a síntese de prostaglandinas pela atividade da COX-1 e da COX-2 em monócitos. De forma semelhante ao resultado descrito anteriormente, a Fração E foi a que inibiu a expressão dos marcadores inflamatórios COX-2 e TNF- α de forma mais expressiva e significativa, juntamente com o extrato aquoso STW 33-I, sendo a inibição da COX-2 da ordem de 30-55% e a do TNF- α da ordem de 75-85%, resultados semelhantes aos encontrados ao tratar as células com diclofenaco de sódio e ácido acetil salicílico. Ademais, tanto o extrato quanto a Fração E foram capazes de reduzir significativamente o aumento da formação de NO. Além disso, foi avaliado o efeito do extrato STW 33-I na translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, a qual foi evitada pela presença do extrato de forma similar ao tratamento das células com diclofenaco (51).

Knuth e colaboradores, em 2011(52), isolaram o glicosídeo fenólico salicortina a partir da casca de *Salix alba* a fim de avaliar a expressão de ICAM-1 induzido por TNF- α em células endoteliais humanas (HMEC-1). Como resultado, foi observado que a presença da salicortina diminuiu a expressão do ICAM de maneira dose-dependente entre 10 e 75 μ M. A concentração de 50 μ M reduziu a expressão do marcador (52,4%), enquanto a salicina e o ácido salicílico não apresentaram redução significativa (52).

A atividade anti-inflamatória do extrato de *Salix alba*, entre outras espécies, foi também avaliada por meio da ativação do NF- κ B induzida por IL-1 β em um modelo *in vitro* de condrócitos caninos (38). Essa ativação parece estar relacionada ao efeito inflamatório observado na osteoartrite. O extrato, na concentração de 10 μ g/ mL, se mostrou capaz de evitar mecanismos inflamatórios. Sob condições experimentais houve inibição da citotoxicidade induzida pelo IL-1 β (avaliada pelo ensaio do MTT), além de antagonizar a regulação positiva da COX-2 por prevenir a degradação do I κ B α e a ativação do NF- κ B. Ademais, as células tratadas com o extrato botânico se rediferenciaram em condrócitos e produziram uma matriz cartilaginosa, indicando o potencial terapêutico do extrato vegetal para tratamento da osteoartrite (38).

A atividade anti-inflamatória do extrato de salgueiro branco e seus principais polifenóis (quercetina, apigenina e ácido salicílico) também foi avaliada pelo grupo de Drummond (2013) por meio das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α em uma linhagem celular de leucemia monocítica humana denominada THP1. Em concentrações de 10 mM tanto a apigenina quanto a quercetina foram capazes de reduzir a IL-6 significativamente, já o TNF- α foi reduzido significativamente frente a concentrações de 10 mM de apigenina e 25 mM de quercetina. Em comparação a outras espécies vegetais testadas (camomila e ulmeira), o salgueiro apresentou maior atividade anti-inflamatória por diminuir em maior proporção a atividade da IL- e do TNF- α (24).

A atividade anti-inflamatória e antioxidante de *Salix alba* foi avaliada (37), utilizando neutrófilo de ovinos, mediante imunomodulação realizada por essas células. Os neutrófilos são responsáveis pela resposta imune inata e são ativados por um mecanismo que envolve fases distintas: rolagem, ativação, adesão e transmigração. Eles atuam na defesa contra bactérias e parasitas, além disso, atuam também na ativação de mecanismos anti-inflamatórios. A atividade do extrato e hidroetanólico de *Salix alba* e de outras espécies vegetais foi avaliada por meio da viabilidade dos neutrófilos, pelo ensaio de adesão e pela produção do radical superóxido (53). A viabilidade dos neutrófilos foi inibida de maneira dose-dependente pelo extrato e a inibição alcançou aproximadamente 65% com a concentração mais alta testada (60 μ g/ mL). Ademais, o extrato de *S. alba* também bloqueou fortemente a adesão dos neutrófilos e a produção do radical livre superóxido, com uma IC₅₀ de apenas 17,77 μ g/ mL e 55,94 μ g/ mL, respectivamente. O estudo relacionou os resultados obtidos à eficiente atividade anti-inflamatória do extrato, o qual possivelmente se deve à presença de flavonoides e compostos fenólicos no extrato hidroetanólico analisado (37).

Entre todos os estudos analisados, têm-se em comum que o extrato de *Salix alba* apresentou atividade anti-inflamatória satisfatória em diferentes modelos *in vitro*. Em relação ao mecanismo de ação antiinflamatório, ressalta-se não apenas o mecanismo direto, por meio da ativação via citocinas, mas também as vias que ativação pelos mecanismo de estresse oxidativo, uma vez que a salicina nem sempre foi composto responsável pela atividade anti-inflamatória, mas também outros compostos presentes no extrato, como os polifenóis, que possuem reconhecida atividade antioxidante.

Outra importante atividade relatada foi a atividade antioxidante, a qual também pode estar relacionada à ativação de mecanismos inflamatórios. A produção exacerbada de radicais livres está envolvida na mediação do processo inflamatório por meio da ativação do NF- κ B e do TNF- α .

Kong e colaboradores (2014) publicaram recentemente, entre outros achados, a influência da salicina na geração de radicais livres (54). Para isso, eles utilizaram cultura de células originadas da veia endotelial do cordão umbilical humano (células ECV304), as quais foram analisadas por microscopia de fluorescência após incubação com peróxido de hidrogênio (indutor de estresse oxidativo) e 2,7-diacetato de diclorofluorosceína (DCFH-DA). A intensidade da fluorescência é proporcional à produção de radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio, e essas possuem um importante papel na angiogênese tumoral e regulam as vias de sinalização intracelular, que ativa mecanismos inflamatórios. De acordo com os resultados observados, a salicina na dose de 2 mM reduziu significativamente a formação de radicais livres induzida por H₂O₂ (54).

O grupo de Nahrsted, além de avaliar a atividade antiinflamatória das 5 frações do extrato de *Salix alba*, conforme citado anteriormente, também avaliou a capacidade das frações em inibir a formação de radicais livres induzidos por 2,2-azobis(2-amidinopropano) diidrocloreto (AAPH) ou pela reação xantina-xantina oxidase (39). Esta atividade foi mais pronunciada nas frações A e B, ricas em polifenóis e flavonoides, o que corrobora com a informação de que a ação do extrato não se deve apenas ao princípio ativo salicina, mas ao conjunto de compostos presentes na planta, destacando-se os flavonoides e polifenóis (39).

Cinco diferentes extratos comerciais de *Salix alba* foram avaliados quanto à atividade antioxidante (10), sendo eles de duas amostras de extrato hidroalcoólico, de uma amostra da casca seca utilizada para decocção e de duas amostras de extrato seco comercializadas na forma de cápsulas. As amostras foram solubilizadas em metanol na mesma concentração final (30 mg/

mL, com utilização de 30 µL da solução) e posteriormente foi analisada a quantidade de salicina em cada uma por HPLC. A atividade antioxidante foi verificada pela capacidade de redução do radical livre ABTS^{•+}, utilizando HPLC acoplado a malha de diodos (HPLC-PDA). Como resultado, foi observado que a concentração de salicina nos extratos variou consideravelmente, entre 1,68% e 25,59%, com maiores concentrações de salicina para as preparações comercializadas na forma de cápsulas. Além disso, o *fingerprint* das preparações demonstrou presença de outros compostos como catequina, sirigenina, triangina e ácido benzoico. Dentre as preparações, o extrato hidroalcoólico e o extrato seco para decocção foram os que apresentaram melhor atividade sequestradora de radicais livres, o que se deve principalmente a presença de catequina (10).

Também em 2012, o grupo de Jukic publicou um estudo relatando as propriedades dos extratos de plantas medicinais utilizadas na Croácia, incluindo a *Salix alba*, e testou sua atividade antioxidante. Neste estudo, a atividade antioxidante foi avaliada por dois diferentes métodos, pelo sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e pela redução do complexo de íon férrico a íon ferroso por antioxidantes. Entre as 16 espécies nativas analisadas, o extrato de *Salix alba* foi o que demonstrou melhor atividade antioxidante de acordo com as duas metodologias. Em linha com os estudos já citados, essa atividade também foi relacionada à presença de fenóis totais, uma vez que esta espécie apresentou a maior quantidade de fenóis totais entre as avaliadas (55). Metodologia semelhante foi utilizada pelo grupo de Sulaiman, que também avaliou o sequestro do radical DPPH pelo extrato de *Salix alba*, de acordo com os resultados desse estudo a capacidade de sequestro do radical livre alcançou 80% na concentração de 100 µg/ mL do extrato etanólico da planta. Nesse caso, mais um autor relata a correlação entre a alta concentração de glicosídeos fenólicos e a capacidade de sequestrar radicais livres (21).

Em resumo, pode-se inferir que os extratos de *Salix alba* possuem considerável capacidade antioxidante relatada por diversos autores, utilizando diferentes métodos, e que esta capacidade pode também influenciar na atividade anti-inflamatória relatada pela espécie vegetal, pois consiste em um importante sinalizador dos mecanismos intracelulares responsáveis pela resposta inflamatória. Ademais, essa atividade não parece estar relacionada apenas à concentração de salicina presente em cada extrato, mas também a presença de outros compostos, entre os quais se destacam os fenóis.

O mesmo trabalho de Sulaiman e colaboradores (21), descrito anteriormente por avaliar a atividade antioxidante, avaliou as atividades antimicrobiana e antiproliferativa do extrato de *S. alba*. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a cepas bacterianas e de um fungo, foram elas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* (fungo). A avaliação foi realizada utilizando placa de ágar, e as concentrações do extrato etanólico de *S. alba* utilizadas foram de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/ mL e a zona de inibição foi avaliada após incubação *overnight* das placas. Os resultados mostraram maior halo de inibição para *Candida albicans* tratada com extrato de *S. alba* na concentração de 80 mg/ mL. Além disso, todas as concentrações testadas apresentaram halo de inibição significativo para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. O crescimento de *E. coli* e *K. pneumoniae* não foi afetado por nenhuma das concentrações testadas. Já a atividade antiproliferativa foi avaliada pela viabilidade celular de uma linhagem de células humanas derivada de leucemia promielóide, HL-60. As células (densidade de $1,5 \times 10^5$ células) foram incubadas com concentrações entre 1 e 10 µg/ mL e a viabilidade foi avaliada por azul de Trypan após 12 e 24 horas de incubação. A viabilidade foi diminuída de maneira dose dependente, a morte das células tumorais tratadas com extrato etanólico de *S. alba* chegou a 84% ao se utilizar a concentração de 10 µg/ mL após 24 horas. No entanto, a viabilidade celular nesse estudo não foi avaliada em outras linhagens de células não tumorais, ficando evidenciado apenas o potencial antiproliferativo contra HL-60, porém sem se evidenciar o potencial tóxico para células não-tumorais (21).

O artigo publicado pelo grupo de Raiciu (2010) também avaliou a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Salix alba* e outras espécies vegetais contra quatro diferentes bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*) e dois fungos (*Aspergillus niger* e *Candida albicans*). Após 24 a 48 horas da incubação dos micro-organismos com uma concentração correspondente a 0,5 da escala de MacFarland com diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 do extrato vegetal nos ágares adequados para o crescimento de cada micro-organismo, os halos de inibição foram analisados e não houve nenhuma indução da inibição de crescimento das bactérias e dos fungos, diferentemente do observado por Sulaiman et al. (2010). Destaca-se, porém, a diferença no tipo de extrato utilizado, o que pode resultar na presença de diferentes compostos. No caso do estudo de Raiciu e colaboradores (20), foi descrita a presença de salicosídeos, ácido cumárico, ácido ferrúlico, quempeferol e taninos no extrato de *Salix alba*.

A atividade do extrato seco de *Salix alba* solubilizado em NaCl 0,9% também foi avaliada frente à cepa de *E. coli* pelo grupo de Souza (2009), porém com outra abordagem. Nesse estudo, o extrato vegetal foi testado com o objetivo de avaliar a redução dos efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pelo cloreto estanhoso (SnCl_2), uma vez que este é utilizado como agente redutor a fim de se obter o radioisótopo tecnécio-99, utilizado em radioterapia. Em humanos, esses efeitos incluem irritação da mucosa e da pele e em animais foi relatado estímulo ou depressão do sistema nervoso central, o objeto de estudo foram bactérias, pois o SnCl_2 parece ser capaz de causar danos ao DNA, sendo considerado um potencial agente genotóxico, o que pode ser atribuído ao aumento na produção de radicais livres. Os resultados compararam grupos que receberam apenas SnCl_2 (25 $\mu\text{g}/\text{mol}$) e grupos que receberam SnCl_2 e extrato de *Salix alba* (25 $\mu\text{g}/\text{mol}$ e 11,6 mg/mL , respectivamente) após incubação *overnight*. Observou-se que a presença do extrato vegetal não foi capaz de impedir a morte das bactérias induzida pelo SnCl_2 , por outro lado também não interferiu na curva de crescimento da *E. coli* por si só. O estudo, por sua vez apresentou resultado de apenas uma concentração do extrato e não avaliou o resultado em células humanas, o que levaria a um resultado que melhor permitiria inferir sobre a proteção contra os danos relacionados à radioterapia (33).

Outra atividade avaliada por dois diferentes artigos para o extrato de *Salix alba* foi a atividade anticolinesterásica (31, 55). Ambos levaram em consideração as plantas locais, porém em países distintos, Croácia e Irã. A busca por compostos que inibam a atividade da acetilcolinesterase justifica-se pela relação que parece haver entre um dos mecanismos patofisiológicos da doença de Alzheimer e a diminuição dos níveis de acetilcolina em algumas áreas do cérebro. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise metabólica da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, desta forma, a inibição da atividade da AChE pode levar a um aumento na intensidade e na duração das sinapses colinérgicas, possibilitando uma estratégia no combate à Doença de Alzheimer. Os resultados observados em ambos os estudos estão descritos nos parágrafos seguintes. (31, 55).

A fim de avaliar o potencial do extrato de plantas medicinais comumente utilizadas na Croácia com potencial para o tratamento da doença de Alzheimer, foi avaliada não apenas a atividade antioxidante do extrato de *S. alba*, mas também sua capacidade em inibir a atividade da AChE (55). Os resultados mostraram que, entre as espécies analisadas, apenas o extrato metanólico de *Salix alba* apresentou atividade considerável na inibição da AChE, a qual

alcançou 50,8% de inibição na concentração de 1 mg/ mL do extrato. Para os outros extratos de plantas analisados, a inibição foi inferior a 20% (55).

Da mesma forma, em busca de uma estratégia proveniente de planta medicinal que poderia ser utilizada no combate à Doença de Alzheimer, um estudo avaliou a capacidade de inibição da AChE dos extratos metanólicos de dezoito plantas utilizadas no Irã (31) .

Nos dois estudos citados acima (31, 55) foi utilizado o método de Ellman e os resultados obtidos foram semelhantes. No estudo mais recente (31), a concentração do extrato de *Salix alba*, necessária para inibir 50% das enzimas (IC_{50}), foi de aproximadamente 990 $\mu\text{g/ mL}$, o que os autores consideram como uma concentração alta. Nesse caso, outras plantas medicinais que apresentaram resultados mais satisfatórios como *Camellia sinensis* (IC_{50} 5,96 $\mu\text{g/ mL}$), *Citrus aurantifolia* (IC_{50} 19,57 $\mu\text{g/ mL}$), *Zizyphus vulgaris* (IC_{50} 24,37 $\mu\text{g/ mL}$), *Brassica nigra* (IC_{50} 84,30 $\mu\text{g/ mL}$) e *Rosa damascena* (IC_{50} 93,10 $\mu\text{g/ mL}$), não foram analisadas no estudo de Jukic e colaboradores (2012) (31, 55).

Apesar de não estar relacionado entre os usos populares da planta, o grupo de Nizard publicou, em 2004 (56), um trabalho descrevendo influência do extrato de *Salix alba* na produção de colágeno e modulação de fibroblastos derivados de células dérmicas cultivadas a partir da doação de pacientes jovens e idosos que passaram por cirurgia plástica. As células foram cultivadas e foi avaliada a expressão da “heat shock protein” (HSP-47), proteína que interage com o pró-colágeno de células. Com o avanço da idade, a expressão dessa proteína diminui, o que é caracterizado pela compactação do colágeno e aspecto envelhecido da pele. Para o ensaio, as células foram incubadas com 2% do extrato de *Salix alba*, por 6 horas. De acordo com os resultados, o tratamento com extrato vegetal aumentou significativamente a expressão da HSP-47 em células de doadoras idosas (70 anos), porém não alterou a expressão em células provenientes de jovens (20 anos) sugerindo que o extrato pode atuar na proteção contra a degradação da HSP-47 e de outras proteínas, provavelmente influenciada pela capacidade de sequestrar radicais livres e melhorar a influência do envelhecimento no aspecto da pele, sendo assim, um produto de interesse a ser explorado no campo dermatológico (56).

O estudo de Pinto e colaboradores (40), já citado anteriormente por avaliar a atividade antígeno-tóxica, destaca-se por utilizar o extrato obtido a partir do pólen de abelha de *Salix alba*, e não o extrato proveniente da casca de salgueiro, como a maioria dos outros. O trabalho aparece também nesta seção por avaliar a atividade antiestrogênica do extrato do pólen utilizando a cepa RMY326 do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que contém receptor para estrógeno humano. Os

dois extratos avaliados (extrato etanólico a 70% - extrato 1; extrato etanólico a 96% - extrato 2) não mostraram aumento significativo na atividade estrogênica. Por outro lado, a inibição da atividade da β -galactosidase se deu de maneira dose-dependente para os dois extratos com inibição mais pronunciada para a concentração de 660 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato 2. A atividade antiestrogênica do pólen da espécie vegetal foi descrita pelos autores como característica da grande concentração de flavonoides na planta. O fato de não apresentar atividade estrogênica (atua como um efetivo inibidor de estrógeno) permite que o pólen obtido a partir de *Salix alba* seja de ingestão segura, uma vez que não seria um promotor para o câncer de mama, além de possibilitar seu emprego na quimioprevenção para cânceres dependente de estrógeno (de mama, por exemplo) em casos de risco aumentado pela ingestão de compostos com atividade estrogênica agonista (40).

Tabela 2 Resumo das atividades descritas em estudos farmacológicos in vitro envolvendo a espécie vegetal *Salix alba* encontrados na literatura pesquisada.

Ref.	Atividade	Extrato	Concentração	Metodologia	Material	Quantidade	Parâmetros observados	Resultado Observado
Atividade anti-inflamatória								
34	Atividade anti-inflamatória	Extrato aquoso	10 - 500 µg/mL	A atividade antiinflamatória in vitro do extrato etanólico de <i>Salix 1520L</i> foi avaliado como descrito anteriormente pelos autores e utilizado para incubação dos monócitos e avaliação dos parâmetros inflamatórios.	Monócitos humanos primários	N.D.	Atividade da COX1, COX-2, IL-1 e IL-6	Os resultados demonstraram que a atividade anti-inflamatória do extrato está relacionada a inibição PGE2. A atividade das enzimas COX não foram significativamente alteradas, entretanto houve indução das IL-1 e IL-6.
39	Atividade anti-inflamatória	Frações do extrato aquoso STW 33-I	A estimativa do EC50 para o extrato de acordo com os testes para o extrato foi de 100 µg/mL para COX-1, 800 µg/mL para COX-2, 30 µg/mL para 5-LOX e 60 µg/mL para HLE.	O efeito inibitório do extrato e das diferentes frações foi observado nas cicloxigenases COX-1 e COX-2 e na lipoxigenase 5-LOX. A expressão de genes mediadores de inflamação foi avaliada pela de apoptose de monócitos estimulados por LPS.	N.D.	N.D.	Inibição de COX-1, COX-2 e 5-LOX	A maior inibição da COX foi observada para a fração A (COX-1) e fração B (COX-2 e 5-LOX). A apoptose foi inibida significativamente pelo extrato e pela fração E, de modo similar ao diclofenaco (dado não apresentado em gráfico, não descreve a concentração).

51	Atividade anti-inflamatória	Extrato comercial de <i>Salix</i>	0,1 a 10 g/ mL	Além do extrato foram obtidas 5 frações do mesmo com diferentes polaridades: FrA (0.5%), B(13%), C(34.1%), D(37.5%), utilizando, respectivamente, tolueno, acetato de etila, butanol, etanol e a última fração utilizando água: Fr E (14.9%)	Células mononucleares obtidas do sangue periférico de voluntários humanos	N.D.	Expressão de TNF α , produção de nitrito, apoptose, localização intracelular do NF- κ B	O extrato de STW33-I possui ação anti-inflamatória tanto sobre os monócitos não ativados como sobre macrófagos induzidos. A atividade foi significativa para os ensaios testados apenas na maior concentração 10 μ g/ mL tanto para o extrato como para suas frações.
52	Atividade anti-inflamatória	O glicosídeo fenólico salicortina foi isolado a partir do extrato da casca de salgueiro. Não foi descrita a forma de obtenção do extrato.	10, 25, 50 e 75 μ M	As células foram tratadas com salicortina e 30 minutos após foram adicionados 10 μ de TNF- α a fim de ativar a expressão do ICAM-1. Em seguida as células foram incubadas com FITC marcado com anticorpo anti-ICAM-1, após 20 minutos a intensidade da fluorescência foi medida por citometria de fluxo.	Células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1)	Até confluência	Degradação da salicortina e inibição da ICAM-1	A salicortina diminuiu a expressão de ICAM-1 de maneira dose-dependente.
38	Atividade anti-inflamatória	Extrato líquido	10 μ g/ mL	Condrócitos cultivados em meio com ausência de soro (passagem 2, cultivadas em 3% soro fetal de bezerro) foram tratadas com os extratos (10 μ g/ mL) sozinhas por 24 h (pré-tratamento) e em seguida com uma combinação de extratos botânicos (10 μ g/ mL) e IL-1 β (10 ng/ mL)	Condrócitos de cães foram isolados das articulações de cachorros submetidos a cirurgias ortopédicas na clínica de cirurgia veterinária da Universidade	0,1 \times 10 ⁶ cells/ mL	Ensaio de MTT, imunofluorescência e western-blotting e microscopia eletrônica	O extrato se mostrou condroprotetor evitando mecanismos inflamatórios. Sob condições experimentais houve inibição do IL-1 β , além de antagonizar a regulação positiva do MMP-9, MMP-13 e COX-2. A IL-1 β , induziu a ativação do NF- κ B e a degradação do I κ B α foi inibida pelo extrato, as células tratadas com o extrato botânico se rediferenciaram em

				pelas 48h seguintes em cultura.	Ludwig-Maximilian-University, em Munique, Alemanha.		condrócitos e produziram uma matriz cartilaginosa.	
24	Atividade anti-inflamatória	Extrato aquoso	0-50 μ M	As células foram tratadas inicialmente com os fenóis isolados de apigenina, quercetina e ácido salicílico a fim de estabelecer a concentração dose-resposta. Após a obtenção desses dados as células foram tratadas com as mesmas concentrações dos extratos contendo os polifenóis.	Células THP1 e linfócitos B humanos	4 x 10 ⁴ / mL para as células THP1, os linfócitos foram utilizados apenas para o ensaio do cometa	Viabilidade celular (MTT), determinação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e genotoxicidade (ensaio do cometa)	Os extratos testados apresentaram não apenas atividade anti-inflamatória ao diminuir a expressão das citocinas avaliadas, mas também mostraram-se não-citotóxicos e apresentaram atividade antioxidante. Dentre os extratos testados (camomila, ulmeira e salgueiro branco) o de salgueiro branco apresentou mais potente atividade anti-inflamatória, diminuindo em maior proporção a atividade da IL-6 e do TNF- α .
37	Atividade anti-inflamatória	Extrato reconstituído de <i>S. alba</i>	2,3; 6,7; 20,0; 60,0; 180,0 μ g/ mL	Antes dos experimentos os extratos aquosos foram dissolvidos em água na concentração de 25 mg/ mL e os extratos etanólicos dissolvidos em DMSO na concentração de 50 mg/ mL. Todas as soluções foram esterilizadas utilizando filtros de 0,22 μ m. Pequenas alíquotas foram estocadas no escuro a -20°C para posterior realização dos experimentos.	Neutrófilos obtidos de ovelhas	2 x 10 ⁶ / mL	Ensaio de viabilidade, ensaio de adesão e produção de superóxido	Os extratos hidroetanólicos de <i>Salix alba</i> reduziram a atividade dos neutrófilos de maneira dose-dependente, com uma redução maior que 60% na maior dose. O extrato de <i>S. alba</i> não apenas diminuiu a adesão dos neutrófilos como também diminuiu a produção de superóxido. O extrato possui alta atividade anti-inflamatória sobre os neutrófilos de ovelhas.

Atividade antioxidante								
54	Atividade antioxidante	Foi utilizada salicina isolada obtida comercialmente (Sigma-Aldrich)	1 ou 2mM de salicina	Células venosas endoteliais originadas do cordão umbilical humano (ECV304) foram cultivadas em meio adequado e posteriormente utilizadas para o ensaio de migração, de crescimento em tubo e de estresse oxidativo.	Células venosas endoteliais originadas do cordão umbilical humano (ECV304)	Até confluência	Migração celular, crescimento em tubo e de estresse oxidativo e western-blotting para os seguintes anticorpos: anti-pERK, anti-ERK, anti-pAKT, anti-AKT e anti- α -tubulina.	A presença de salicina diminuiu a atividade angiogênica das células endoteliais (por diminuir a formação tubular e a migração) e inibiu a formação de ERO por meio da via ERK.
39	Atividade antioxidante	Frações do extrato aquoso STW 33-I	A estimativa do EC50 para o extrato foi de 100 μ g/ mL para COX-1, 800 μ g/ mL para COX-2, 30 μ g/ mL para 5-LOX e 60 μ g/ mL para HLE	Formação de radicais livres induzidos por AAPH ou pela reação da xantina/xantina-oxidase.	N.D.	N.D.	Produção de radical livre.	Os radicais livres foram inibidos pelas frações A e B na concentração de 2 μ g/ mL. De acordo com o estudo, os polifenóis, e não apenas a salicina, apresentam contribuição significativa para os efeitos do extrato de <i>Salix</i> .

10	Atividade antioxidante	Extratos comerciais	30 mg/ mL	As amostras foram dissolvidas em metanol: água (1:1) na concentração final de 30 mg/ mL, o volume utilizado para injeção foi de 30 µL	Radical livre ABTS+	2,5 µM de ABTS	Diminuição do perfil do radical livre ABTS na NMR	As amostras apresentaram 6 diferentes substâncias potencialmente sequestradoras de radicais livres, entre elas a salicina. Nenhuma atividade antioxidante foram observadas para as amostras 5 e 6, enquanto a amostra 3 foi a que apresentou melhor perfil antioxidantes/sequestrador de radical livre.
54	Atividade antioxidante	Extrato (metanol, acetato de etila e clorofórmio)	1 mg/ mL	O extrato de várias plantas utilizando os solventes metanol, clorofórmio e acetato de etila foram submetidos a avaliação dos parâmetros descritos	DPPH, íon férrico	N.D.	Atividade antioxidante e (sequestro de DPPH e de íon férrico - FRAP)	Nesse estudo o extrato metanólico de <i>Salix alba</i> foi o que apresentou maior quantidade de fenóis totais e de sequestro de íon férrico. Apenas não teve alta atividade antioxidante no que concerne ao sequestro do DPPH.
21	Atividade antioxidante	Extrato etanólico	Sequestro de radicais livres: 10, 50, 100 µg/ mL;	Dosagem espectrofotométrica do DPPH	DPPH	Sequestro de radicais livres: DPPH 60 µM); atividade antimicro-biana; atividade antiproliferativa	Sequestro do DPPH	O sequestro de radical livre se deu de maneira dose-dependente.

Atividade antimicrobiana								
21	Atividade antimicrobiana	Extato etanólico	10, 20, 40, 60, 80 mg/ mL;	Método da difusão em ágar	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida albicans</i>	0,4-0,5 da escala McFarland de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida albicans</i>	Inibição do crescimento das cepas dos microorganismos listados	A atividade antimicrobiana variou, enquanto o crescimento da <i>K. pneumoniae</i> não foi afetado pelo extrato, as outras cepas foram afetadas em graus diferentes.
20	Atividade antimicrobiana	Extrato aquoso	Diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 do extrato 5%	Método difusiométrico - microorganismos crescem em um meio padrão contendo concentrações decrescentes da amostra teste (extratos)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 e <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; e 2 fungos: <i>Aspergillus niger</i> e ATCC 16404, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10 ⁷ unidades formadoras de colônias, correspondendo a turbidez de 0.5 na escala Mac Farland.	Crescimento microbiano nas placas de Petri	O extrato de <i>Salix alba</i> não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações testadas e em nenhum dos microorganismos

33	Proteção contra morte de <i>E. coli</i> induzida por SnCl ₂	ND	11,6 mg/ mL	116 mg extrato seco foram diluídos em 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%) , a solução foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e foi utilizado o sobrenadante. A amostra foi dividida em 3 grupos: (i) SnCl ₂ (25 µg/ mL), (ii) SnCl ₂ (25 µg/ mL) + extrato de <i>Salix alba</i> (11.6 mg/ mL) e (iii) extrato de <i>Salix alba</i> (11.6 mg/ mL).	Cultura de <i>E. coli</i> na fase de crescimento exponencial.	10 ⁸ células/ mL, foi utilizado 1mL	Sobrevivência das bactérias	A presença do extrato de <i>Salix alba</i> não protegeu as bactérias contra a morte induzida pelo SnCl ₂
----	--	----	-------------	--	---	--	-----------------------------	---

Inibição da acetilcolinesterase

31	Inibição da acetilcolinesterase	Extrato reconstituído de <i>S. alba</i>	100 µg/mL	Um grama do pó de cada planta testada foi extraído por maceração sob agitação a temperatura ambiente com metanol aquoso (20 mL; 1:1 v/v) por 24 h. Posteriormente o macerado foi filtrado e a camada orgânica foi destilada a baixa pressão e a 25°C e congelada até secagem . O extrato cru foi armazenado a -20°C até a realização das análises.	Enzima acetilcolinesterase	0,22U/ mL de enzima	Inibição da acetilcolinesterase pelo método de Ellman	O extrato de <i>Salix alba</i> não apresentou inibição satisfatória da acetilcolinesterase, com uma IC ₅₀ de 989,1 ± 4,29 µ/ mL. Logo, o extrato não seria promissor para o tratamento da Doença de Alzheimer, como proposto pelo estudo.
----	---------------------------------	---	-----------	--	----------------------------	---------------------	---	--

54	Inibição da acetilcolinesterase	Extrato (metanol, acetato de etila e clorofórmio)	1 mg/ mL	O extrato de várias plantas utilizando os solventes metanol, clorofórmio e acetato de etila foram submetidos a avaliação dos parâmetros descritos	Enzima acetilcolinesterase	-	Atividade da acetilcolinesterase	Nesse estudo o extrato metanólico de <i>Salix alba</i> foi o que apresentou maior quantidade de fenóis totais, de inibição da acetilcolinesterase.
Atividade antiproliferativa								
21	Atividade antiproliferativa	Extrato etanólico	1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/ mL	Viabilidade das células HL-60	Células HL-60	1,5x10 ⁵ células HL-60	Viabilidade e células das células HL-60	A viabilidade das células HK-60 também se deu de maneira dose-dependente.
Ativação da produção de colágeno								
56	Ativação da HSP-47 na produção de colágeno	Extrato de <i>Salix alba</i> aquoso comercial	2% (v/v)	Células dermais foram doadas por pacientes de cirurgia plástica (lifting facial) entre 20 e 70 anos; também foram utilizados fibroblastos que cresceram em meio adequado com 2% de Astressyl por 6 h. A proteína HSP-47 foi detectada por citometria de fluxo.	Fibroblastos e células dérmicas	10 ⁶ células	Citometria de fluxo para HSP-47	A proteína HSP-47 tem propriedades pró-colágeno e foi induzida em células tanto de doadoras de 20 quanto de 70 anos na presença do extrato aquoso comercial. Em células de pacientes idosas o aumento tornou a ativação semelhante ao controle das pacientes com 20 anos.
Atividade antiestrogênica								

40	Atividade estrogênica e antiestrogênica	Extrato etanólico de pólen de <i>Salix alba</i>	0,001 a 1mM	A linhagem de fungo que expressa estrógeno com uma sequência que codifica a enzima β -galactosidase teve a indução da transcrição induzida, detectada e quantificada por espectrofotometria.	Fungo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem RMY326 contendo receptor de estrógeno humano	Crescimento até OD600 menor que 0,1 nm	Atividade antiestrogênica	As concentrações testadas para o extrato de pólen de <i>Salix alba</i> apresentaram um ligeiro aumento na inibição da produção de estrógeno, sendo a atividade mais significativa a do extrato 2 na concentração de 660 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
----	---	---	-------------	--	---	--	---------------------------	---

Ref. = Número correspondente à referência; N.D.= Não descrito

4.3.2.2 Ensaio *in vivo*

De acordo com os artigos levantados, cinco estudos testaram as atividades farmacológicas do extrato de *Salix alba in vivo*. Em sua maioria foram estudos utilizando ratos como modelos animais (39, 47, 57, 58). Apenas um estudo (54) utilizou camundongos. De forma semelhante ao observado pelos estudos *in vitro*, a atividade mais avaliada foi a atividade anti-inflamatória, conforme será apresentado a seguir na tabela 3.

A utilização do extrato comercial STW-33I em dois modelos *in vivo* de inflamação utilizando ratos da linhagem Wistar macho adultos, foi avaliada (57). Os modelos utilizados foram o da “bolsa de ar de 6 dias” representando inflamação aguda e o de artrite induzida por adjuvante, representando a inflamação crônica. Para o primeiro, os ratos receberam uma injeção com 20 mL de ar em suas costas subcutaneamente no dia 1. Dois dias depois, foram injetados mais 10 mL (dia 3) de ar no mesmo local, o que foi repetido no dia 5. No dia 6, foram injetados 2 mL de uma solução 1% de carragenina na bolsa de ar. Trinta minutos antes de receber a injeção de carragenina, os animais receberam o tratamento oral com extrato de *Salix alba* (50 e 150 mg/ kg), celecoxib (5 mg/ kg), ácido acetilsalicílico – AAS (150 mg/ kg) ou veículo (controle). Como resultado, observou-se que tanto os dois antiinflamatórios testados quanto o extrato vegetal inibiram o desenvolvimento de exsudato inflamatório, além de ser eficiente na inibição da expressão da IL-1, IL-6 e TNF- α , em todos os casos a dose de 150 mg/ kg do extrato vegetal foi mais efetiva que a dose de 50 mg/ kg. De forma semelhante ao ácido acetilsalicílico, o tratamento com *Salix alba* mostrou níveis significativamente menores (80-90%) de PGE2 que nos animais que receberam apenas veículo. Já em relação à atividade das enzimas COX-1 e COX-2, o extrato inibiu a atividade de ambas de forma semelhante ao AAS, enquanto o celecoxib inibiu apenas a atividade da COX-2, como esperado. Os efeitos agudos também foram avaliados por meio de sinalizadores de estresse oxidativo, com os níveis da glutathiona (GSH), do malondialdeído (MDA) e da enzima superóxido dismutase (SOD). Os resultados mostraram que os níveis de GSH dobraram ao ser utilizado o extrato, indicando melhora na proteção antioxidante natural, além da diminuição do MDA em torno de 20%, indicando diminuição da peroxidação lipídica induzida por radicais livres e aumento da atividade da SOD, ou seja, potencial para o sequestro de radicais livres. Esses resultados não foram compartilhados pelos anti-inflamatórios sintéticos testados (AAS e celecoxib). Já o modelo de artrite, utilizado para simular inflamação crônica em ratos, foi realizado por meio da inoculação na região subplatar da pata posterior direita dos ratos de 0,1 mL de adjuvante de Freund completo, ou seja, contendo *Mycobacterium tuberculosis* inativado pelo calor. Os grupos para tratamento consistiram nos mesmos utilizados para o modelo de inflamação aguda (50 mg/ kg de *Salix*

alba; 150 mg/ kg de *Salix alba*, 5 mg/ kg de celecoxib; 150 mg/ kg de AAS; veículo; todos via oral), no entanto, realizado por sete dias consecutivos. Os resultados para o modelo crônico foi semelhante ao agudo, com inibição da ciclooxigenases COX-1 e COX-2 de maneira equivalente ao AAS e com resultado um pouco melhor expressão do TNF- α para os animais tratados com o extrato vegetal na maior concentração (150 mg/ kg de *Salix alba* - 62%) quando comparado ao AAS (45%). Ademais, a expressão das interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) também foi significativamente menor nos grupos tratados com o extrato quando comparado ao controle, a dose de 150 mg/ kg do extrato teve resultado semelhante ao AAS e ao celecoxib. Da mesma forma que o apresentado para resultados do modelo agudo, o extrato mostrou-se capaz de proteger contra o estresse oxidativo por meio dos marcadores já citados (57).

O trabalho de Nahrstedt e colaboradores (2007), já citado por seus resultados *in vitro*, também avaliou a atividade anti-inflamatória do extrato comercial de *Salix alba* STW 33-I e suas frações em ratos, comparando-o ao AAS. A metodologia utilizada para inflamação aguda foi a indução de edema de pata utilizando carragenina e para inflamação crônica o modelo de artrite induzida por adjuvante. Para o modelo de edema houve redução significativa quando comparado ao controle para todas as doses testadas (50, 100 e 150 mg/ kg), sendo a dose de 150 mg/ kg a que apresentou resultado mais semelhante ao grupo tratado com 150 mg/ kg de AAS. Ao se analisar as frações do extrato em relação ao desenvolvimento do edema, as frações A e E foram as que apresentaram melhores resultados, similares ao extrato STW 33-I e condizentes com o apresentado nos resultados dos ensaios *in vitro*. No mesmo trabalho os pesquisadores mostraram o efeito da dose de 150 mg/ kg do extrato na resposta a dor pelo teste de Randall-Sellitto, sendo o resultado similar para o extrato e o AAS, com rápido início da analgesia (39).

Um artigo mais recente de Bucolo relacionou a atividade antiinflamatória e antioxidante do extrato fortificado de *Salix alba*, *Ginkgo biloba* e frutas vermelhas com o efeito sobre a retinopatia diabética induzida por estreptozotocina em atos da linhagem Sprague-Dawley. Os animais tiveram a retinopatia diabética induzida com uma dose única de estreptozotocina 60 mg/ kg, após 24 apenas os animais que apresentaram glicose sanguínea superior a 250 mg/ dL seguiram nos ensaios. O tratamento foi realizado com uma suspensão contendo uma mistura de extratos que incluía 150 mg/ kg de *Salix alba*, 300 mg/ kg de ácido α -lipóico, 100 mg/ kg de extrato de frutas vermelhas e 65 mg/ kg de *Ginkgo biloba* por 10 dias. Após o tratamento foram analisadas as citocinas TNF- α , VEGF e as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), este último como marcador de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento como extrato fortificado conteve o aumento dos marcadores

de inflamação: TNF- α e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) na retina dos animais e impediu a peroxidação lipídica quando comparado ao grupo com retinopatia, porém não-tratado, sugerindo uma nova indicação de tratamento para a mistura do extrato de plantas testado (58).

Já o grupo de Kong (2014) relacionou a atividade antioxidante do extrato de *Salix alba* com o potencial de inibir angiogênese tanto em modelo *in vitro* quanto *in vivo*. Para o modelo animal foram utilizados camundongo da linhagem Balb/c com tumor induzido por células RENCA (linhagem celular derivada de carcinoma renal de camundongo), após 7 dias da indução do tumor os animais receberam tratamento com 10 mg/ kg de salicina ou veículo (grupo controle) uma vez ao dia por sete dias, foram então avaliados a progressão do tumor, sua imuno-histoquímica, a produção de espécies reativas de oxigênio, além da angiogênese avaliada por “brotamento da aorta”. Os resultados mostraram um volume tumoral significativamente menor no grupo tratado com salicina e uma diminuição da vascularização do tumor, o que indica uma menor angiogênese, o que foi confirmado por uma diminuição da expressão de CD31, um marcador específico para células endoteliais, e pela redução na formação de microvasos em anéis de aorta. O estudo concluiu pela capacidade da salicina em diminuir a angiogênese em um modelo tumoral *in vivo*, sugerindo a atividade antitumoral como mais uma atividade a ser explorada pelo extrato vegetal de *Salix alba* além do clássico efeito anti-inflamatório (54).

Uma atividade diferente da comumente relacionada ao extrato de *Salix alba* foi avaliada por Mello e colaboradores (47), uma vez que testaram a eficácia de um produto fitoterápico comercializado no Brasil, o qual possuía em sua composição extrato seco de *Passiflora incarnata* (maracujá; 100 mg/ cápsula), extrato seco de *Salix alba* (salgueiro; 100 mg/ cápsula) e extrato de *Crataegus oxycantha* (crataegus; 30 mg/ cápsula). O teste de eficácia foi realizado em ratos Wistar machos, os quais receberam dosagem do fitoterápico condizente com a dosagem utilizada para seres humanos, o que corresponde a 6 mg/ kg de *Passiflora incarnata*, 6 mg/ kg de *Salix alba* e 2 mg/ kg de *Crataegus oxycantha*. Uma hora após a administração do fitoterápico por via oral, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, sendo cada animal colocado no centro da arena. Foram avaliados a frequência de locomoção, os movimentos de exploração e o tempo para perda e recuperação do reflexo após a administração de pentobarbital sódico 35 mg/ kg (temo de anestesia). Quando comparado ao grupo controle, o grupo que recebeu o tratamento apresentou diminuição significativa da locomoção e da atividade exploratória, 34,6 e 34,5%, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos para o tempo de perda do reflexo após a administração do pentobarbital, porém, o tempo de recuperação do reflexo aumentou no grupo tratado, além de apresentar um aumento na duração

do sono em aproximadamente 20%. Os resultados confirmam a eficácia do produto fitoterápico comercializado como sedativo e hipnótico, o que se deve principalmente ao efeito sedativo da *Passiflora incarnata*.

4.3.2.3 Ensaio *ex vivo*

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

Tabela 3 Resumo das atividades descritas em estudos farmacológicos in vivo envolvendo a espécie vegetal *Salix alba* encontrados na literatura pesquisada.

Ref.	Atividade	Extrato/ forma farmacêutica	Dose administrada	Metodologia	Espécie	Parâmetros observados	Resultado
57	Anti- inflamatória e antioxidante	Extrato comercial STW-33I	Grupo 1: 50 mg/ kg; Grupo 2: 150 mg/ kg (V.O.)	Inflamação aguda – método da bolsa de ar de 6 dias: injeção de 20 mL de ar nas costas dos ratos no dia 1, nos dias 3 e 5 foram injetados mais 10 mL de ar e no sexto dia 2 mL de solução de carragenina 1%; inflamação crônica - modelo de artrite: injeção de 0,1 mL de adjuvante de Freund com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inativa na pata	Ratos Wistar machos (n=15 por grupo)	Citocinas (TNF α e IL-1 e IL-6), atividade de COX 1 e 2, MDA e GSH no sangue e atividade da SOD.	Inibição da formação do exudato inflamatório, menor expressão das citocinas e inibição da COX 1 e da COX 2. Parâmetros oxidativos (MDA e GSH) melhores nos grupos que utilizaram o extrato. Atividade anti-inflamatória satisfatória nas 2 concentrações do extrato testadas para os dois modelos de inflamação.
39	Anti- inflamatória e inibição da dor	Extrato comercial STW 33-I e suas frações.	50, 100 e 150 mg/ kg (V.O.)	Teste Randall-Sellitto e indução de edema de pata induzido por bolsa de ar e carragenina	Ratos	Inibição de dor pelo teste Randall-Sellitto	A concentração de STW 33-I 150 mg/ kg apresentou resultado tanto para inibição da dor quanto para redução do edema semelhante ao AAS 150 mg/ kg (referência). As outras concentrações também inibiram o edema de forma significativa (50 e 100 mg/ kg), porém com menos eficiência; a única fração que não inibiu o edema de forma significativa quando comparado ao extrato foi a fração C (flavonoides).

587	Anti-inflamatória, antioxidantes e prevenção da retinopatia diabética	Extrato fotificado de <i>red berry</i> , <i>Ginkgo biloba</i> e de <i>Salix alba</i>	150 mg/ kg (I.P.)	A diabetes foi induzida com uma injeção única de estreptozotocina 60 mg/kg e os grupos receberam os tratamentos com os extratos fortificados por 10 dias consecutivos. Após os 10 dias os animais foram sacrificados e amostras de retina e sangue foram coletadas a fim de avaliar as citocinas TNF- α e VEGF e a peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS.	Ratos Sprague - Dawley machos (n=8-10 por grupo)	Citocinas VEGF e TNF- α por meio de ensaio de ELISA nas amostras de retina e peroxidação lipídica por meio do ensaio de TBARS no plasma.	O extrato não interferiu na glicemia dos ratos diabéticos, porém a perda de peso foi menor. Os níveis de TNF- α , VEGF e peroxidação lipídica foram menores nos animais tratados com extrato, indicando menos inflamação, e sugerindo que pode ser útil no tratamento da retinopatia.
54	Inibição do crescimento tumoral e angiogênese	Salicina isolada	10 mg/ kg (i.p.)	Camundongos Balb/c machos com 6 semanas foram injetados via subcutânea com 2×10^6 células de linhagem de carcinoma renal (células RENCA) misturados com 0,1 mL de Matrigel e um tumor foi induzido por camundongo. Após 7 dias de crescimento do tumor os camundongos receberam salicina (10 mg/ kg, I.P.) ou volume igual de salina uma vez por dia por uma semana.	Camundongos Balb/c macho (n=4 por grupo)	Crescimento do tumor); imunohistoquímica para CD-31; angiogênese	No modelo animal a salicina suprimiu o crescimento do tumor e a angiogênese significativamente.

47	Eficácia do fitoterápico para indução e melhora da qualidade do sono	Fitoterápico (<i>Passiflora incarnata</i> 100 mg, <i>Salix alba</i> 100 mg e <i>Crataegus oxycantha</i> 30 mg/cápsula)	6 mg/ kg de Passiflora e Salix e 2 mg/ kg de Crataegus (v.o.)	Uma hora após a administração da formulação fitoterápica (n = 11 animais) ou veículo (n = 10 animais) cada animal foi submetido ao teste de campo aberto. Imediatamente após o teste em campo aberto, os animais receberam por via intraperitoneal (I.P.) uma dosagem de 35 mg.kg ⁻¹ de pentobarbital sódico, avaliando-se o tempo para a perda do reflexo de endireitamento e o tempo até a recuperação do reflexo (tempo de anestesia).	Ratos Wistar machos (n=21)	Teste de campo aberto e tempo de anestesia	A eficácia do fitoterápico foi mostrada pela diminuição significativa na atividade de locomoção de aproximadamente 34,6% e, redução significativa da atividade exploratória de aproximadamente 34,5%. O tempo até a perda do reflexo de endireitamento não diferiu entre os grupos, porém, o tempo de recuperação do reflexo aumentou significativamente no grupo tratado com o fitoterápico. O aumento da duração do sono no grupo tratado com o fitoterápico foi de aproximadamente 20% em comparação com o grupo controle.
----	--	---	---	--	----------------------------	--	---

4.4 ESTUDOS CLÍNICOS

4.4.1 Fase I

Um estudo de farmacocinética do extrato de *Salix alba* foi realizado a fim de se verificar a presença de catecol, já descrito com atividade anti-inflamatória, como metabólitos de fase II (59). Para isso, foram selecionados dez voluntários sadios que se alimentaram 19 a 24 horas antes da administração do extrato vegetal apenas de alimentos pobres em polifenóis. A oito desses voluntários (4 homens e 4 mulheres) foi administrada uma dose oral de extrato de *Salix*, contendo um total de salicina correspondente a 240 mg, por meio de quatro comprimidos contendo 60 mg de salicina. Dois dos voluntários não receberam o extrato a fim de se avaliar o efeito da dieta na concentração plasmática de catecol. Amostras de sangue de todos os voluntários foram coletadas imediatamente antes e após 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 horas da ingestão do extrato. Os metabólitos foram quantificados por HPLC. A quantificação do extrato administrado aos voluntários apresentou como resultado doses de 89,8 μmol (9,9 mg) de catecol livre; 346,6 μmol (147,0 mg) de salicortina; 21,4 μmol (11,3 mg) de tremulacina. A análise do soro dos voluntários, após seu processamento com enzimas a fim de se clivar os conjugados de fase II, mostrou o pico de concentração de catecol após 1,2 horas da ingestão do extrato, com concentração de 13,3 μM (1,5 mg/ L). Já para o ácido salicílico, o pico de concentração foi detectado após 2,7 horas. No geral, não houve detecção de catecol 10 horas após a administração do extrato, tampouco nas amostras de soro analisadas sem a presença das enzimas sulfatase e β -glicuronidase. No entanto, ao se adicionar apenas sulfatase, os resultados mostraram predominância do sulfato de catecol em relação ao catecol livre ou ao glicuronídeo de catecol, indicando predominância do sulfato de catecol como metabólito *in vivo*, o que sugere a importância do composto na atividade anti-inflamatória do extrato (59).

Outro estudo de ensaio clínico de fase I envolvendo a espécie vegetal *Salix alba* avaliou a toxicidade do fitoterápico, o qual, conforme Knuth e colaboradores (59), possui em sua composição não apenas o salgueiro, mas também maracujá e crataegus (41). Seu uso é indicado para diminuição dos sintomas de ansiedade e insônia. Foram selecionados para o estudo 24 voluntários sadios do sexo masculino, que receberam ambulatorialmente dois comprimidos revestidos do fitoterápico por via oral, duas vezes ao dia (dose máxima diária indicada pelo fabricante da formulação), durante 28 dias ininterruptos. Cada comprimido continha em sua composição 100 mg de extrato seco de *Salix alba*, 30 mg de extrato seco de *Crataegus*

oxyacantha e 100 mg *Passiflora incarnata*. Os voluntários foram orientados a relatar qualquer efeito adverso, os quais foram classificados quanto à intensidade (leve, moderado e severo) e quanto à causalidade (não relacionada, desconhecida, possível ou sim). De acordo com os resultados observados, a formulação foi bem tolerada por todos os voluntários, com relato de alguns efeitos adversos, sendo os mais relatados sonolência, cefaleia, febre, mialgia, epigastralgia, insônia, *rash* cutâneo, dor torácica e agitação; dentre esses, apenas sonolência e epigastralgia foram relacionados ao uso do fitoterápico. A avaliação dos voluntários para pulso e pressão sistólica não variaram, apenas a pressão diastólica decresceu na primeira semana do estudo (foi considerado significativo valor de $p < 0,05$). Os exames laboratoriais que incluíram análise hematológica, bioquímica e sorológica foram avaliadas após a 1^a, 2^a, 3^a, 4^a semana e 7 dias após a última administração, todos mantiveram-se nos limites da normalidade durante os 28 dias. Os efeitos adversos relatados foram classificados como leves e os resultados do uso do fitoterápico se mostrou seguro e sem sinais de toxicidade (41).

4.4.2 Fase II

Resultados de um estudo randomizado duplo-cego foi publicado no ano de 2000 (60) a fim de avaliar a efetividade do extrato de *Salix* frente a voluntários com dor lombar. O estudo foi realizado com duas doses do extrato, uma vez que a monografia da Cooperativa Científica Europeia em Fitoterapia recomenda a dose máxima de 240 mg por dia, enquanto uma monografia alemã recomenda metade dessa dose. Para isso, foram selecionados 210 pacientes com dor lombar exacerbada com ou sem irradiação para as pernas, os quais relataram uma escala de dor (Escala Análoga Visual) de no mínimo 5 a 10 e para os quais os médicos recomendaram no mínimo quatro semanas de tratamento. Os voluntários possuíam entre 18 e 75 anos, eram de ambos os sexos e foram divididos em três grupos de forma randomizada da seguinte forma: (I) pacientes que receberam drágeas de extrato de *Salix* contendo 120 mg de salicina por dia; (II) pacientes que receberam drágeas de extrato de *Salix* contendo 240 mg de salicina por dia; (III) pacientes que receberam placebo (drágeas de lactose) por quatro semanas. Durante o ensaio clínico, foi permitido o uso apenas de tramadol para suplementar o combate a dor, sendo o principal resultado observado a proporção de pacientes sem dor e sem recorrer ao tramadol por no mínimo cinco dias. Todos os voluntários foram contatados por telefone uma vez por semana para determinar se tiveram ou não dor e se recorreram ao tramadol e o número de doses do medicamento utilizadas durante o período. Dentre os 210 voluntários, 191 (19%)

finalizaram a pesquisa. Como resultado, foi observada uma melhora significativa ($p < 0,05$) da dor nos pacientes que receberam a dose de 240 mg de salicina uma semana após o início do estudo. Já o grupo que recebeu a dose de 120 mg apresentou melhora significativamente apenas após a segunda semana, diferente do placebo. Após as quatro semanas de tratamento, o grupo que recebeu placebo foi o que mais recorreu ao tramadol. Os números de pacientes sem dor ao final das quatro semanas de estudo foram: 39% dos que receberam a dose de 240 mg, 21% dos que receberam a dose de 120 mg e 6% dos que receberam placebo. Efeitos adversos foram relatados por alguns voluntários e envolveram um caso de alergia, o qual foi relacionado ao uso do extrato. Foi também relatado fraqueza, tonturas, cefaleia, diarreia, vômito e boca seca, estes relacionados ao uso do tramadol. O estudo concluiu pela efetividade do uso do extrato de *Salix* no combate à dor lombar, principalmente utilizando-se a dose correspondente a 240 mg diários de salicina com baixa incidência de efeitos adversos, sugerindo o extrato como uma alternativa efetiva contra dor lombar e especialmente recomendada a pacientes que não toleram anti-inflamatórios não esteroidais (60).

Outro estudo clínico de fase II, utilizando o extrato de *Salix*, foi realizado a fim de avaliar a efetividade e a tolerância do extrato em pacientes com artrose (gonartrose – artrose de joelho e coxartrose – artrose de quadril) (61). Nesse contexto, foi realizado um estudo de coorte, aberto e multicêntrico, que contou com um total de 139 voluntários com idade entre 50 e 75 anos, diagnóstico de gonartrose ou coxartrose por um especialista e histórico de dor e degeneração das articulações. Os voluntários foram tratados com o extrato padronizado de *Salix*, que consiste em um comprimido com 393,24 mg de extrato contendo 60 mg de salicina, a dose recomendada do extrato varia entre 2 a 4 comprimidos por dia (120 a 240 mg de salicina), administrados duas vezes ao dia. Os pacientes foram divididos em três grupos: (I) 90 voluntários foram tratados apenas com o extrato, sendo que 83 receberam 2 comprimidos do extrato duas vezes ao dia (240 mg de salicina), 3 pacientes receberam 1 comprimido de extrato duas vezes ao dia (120 mg de salicina) e 4 pacientes receberam 1 a 2 comprimidos duas vezes ao dia (120 a 240 mg de salicina); (II) 41 pacientes receberam tratamento de referência com os seguintes medicamentos sintéticos, sendo que 8 deles receberam coxib, 20 receberam diclofenaco, 8 receberam ibuprofeno, 4 receberam oxicam e um não foi descrito; (III) os 8 pacientes restantes receberam uma combinação dos dois tratamentos (não foram descritas as doses). A avaliação da efetividade foi realizada após 3 e 6 semanas pelos médicos que acompanharam os pacientes e por um questionário que avaliou dor, rigidez das articulações e

situação geral de saúde. Os médicos constataram uma melhora geral, semelhante do grupo tratado apenas com extrato ao grupo tratado com o medicamento de referência após três semanas. Após seis semanas, houve sinais de melhora mais efetivos no grupo tratado apenas com o extrato. O tratamento foi bem tolerado pelos voluntários, com apenas 14 eventos adversos relatados, sendo apenas 1 no grupo que recebeu apenas o extrato, 11 no grupo que recebeu o tratamento de referência e dois no grupos que recebeu ambos os tratamentos; entre eles apenas os dois relatados para o grupo que recebeu ambos os tratamento foi relacionado à medicação por serem sintomas de refluxo gástrico. Os resultados mostraram que o extrato de *Salix* possui efetividade semelhante aos medicamentos sintéticos de referência no tratamento dos dois tipos de artrose avaliados, além de ser bem tolerado pelos pacientes. Ademais, a avaliação final dos pacientes que receberam o tratamento com o extrato foi relatada como “muito boa” por 64% dos pacientes, contra apenas 37% dos pacientes que receberam o tratamento de referência. Para a análise dos resultados a comparação intraindividual foi realizada por estatística descritiva (61).

Os dois ensaios clínico descritos relataram a efetividade do extrato de salgueiro tanto em pacientes com inflamação aguda, a exemplo do tratamento de dor lombar, como para pacientes acometidos por inflamações crônicas, como a artrose. Além disso, o extrato vegetal foi bem tolerado pelos pacientes, com baixa incidência de efeitos adversos graves relacionados ao uso do fitoterápico, mesmo utilizando-se a dose máxima recomendada de 240 mg de salicina por dia. Durante o tratamento com essa concentração de salicina, a concentração encontrada no soro de salicilato equivale a aproximadamente 50 mg, que possui efeito relacionado à cardioproteção e baixa analgesia, o que corrobora com os achados *in vitro* de correlação do efeito do extrato vegetal com outros compostos presentes na espécie, como polifenóis, e não apenas a presença da salicina (60, 62).

4.4.3 Fase III

O único ensaio clínico de fase III encontrado entre os buscados sobre *Salix alba* foi realizado por um grupo alemão e publicado em 2013. O grupo de Uehleke realizou um estudo observacional multicêntrico com 436 voluntários de ambos os sexos e com idade superior a 18 anos diagnosticados com distúrbios esqueléticos como osteoartrite e dor na costas que receberam como tratamento o extrato comercial STW 33-I, com ou sem suplementação com outros analgésicos como anti-inflamatórios não esteroidais ou opióides por um período de 24

semanas (6 meses). Eles foram acompanhados clinicamente no início do tratamento e após 3, 6, 12, 18 e 24 semanas. A avaliação da dor foi realizada por uma escala visual análoga para dor variando entre 1 a 100 (“sem dor” a “dor mais intensa”). A avaliação da eficácia do tratamento foi avaliada pelos médicos por uma escala de Likert de 5 pontos (de 0 a 4), sendo que o 0 indicava “muito bom/remissão quase completa”, o 3 indicava “nenhuma melhora/piora” e o 4 indicava “não avaliado”. A segurança e tolerabilidade ao extrato foram avaliadas a partir da segunda visita e foram relacionadas à presença e efeitos adversos, os quais foram classificados de acordo com a intensidade e relação com o uso do extrato. De acordo com o observado ao longo dos 6 meses de estudo, houve uma redução contínua e significativa ($p < 0,05$) da dor relatada pelos pacientes, diminuindo de uma média de 58,4 para 22,5. Os médicos também classificaram mais de 60% dos pacientes como possuindo remissão completa ou parcial dos sintomas. Durante todo o estudo foram relatados um total de 176 eventos adversos por 106 pacientes, desses apenas sete foram considerados severos. Os efeitos mais relatados foram dor abdominal, náusea, dispepsia, seguidos de fraqueza, dor e fadiga. Nenhum foi diretamente relacionado ao uso do extrato de *Salix* e, no geral, o tratamento foi considerado bem tolerado pelos pacientes. Por fim, o estudo classificou a analgesia induzida pelo extrato STW 33-I como moderada e sugeriu que o extrato de *Salix* é eficaz e seguro no tratamento contra dor induzida por osteoartrite e dor nas costas e pode ser utilizado como tratamento básico e auxiliado se necessário por analgésicos convencionais (63).

4.4.4 Fase IV

Um ensaio comparando a eficácia do extrato de *Salix alba* já comercializado com o anti-inflamatório rofecoxib no combate a dor lombar aguda foi verificado na literatura (64). O estudo foi realizado com 228 pacientes diagnosticados com dor lombar e idade entre 18 e 80 anos. Eles foram separados em dois grupos aleatoriamente: o primeiro continha metade dos pacientes, os quais receberam quatro cápsulas do extrato totalizando 240 mg de salicina ao dia enquanto o outro grupo recebeu 12,5 mg de rofecoxib, ambos por quatro semanas. Antes e ao final das quatro semanas, os pacientes responderam a um questionário com uma escala visual análoga de dor, além de serem acompanhados via telefone semanalmente a fim de se monitorar as reações adversas. Ao final do estudo, houve uma avaliação médica do sucesso do tratamento. A eficácia dos dois tratamentos foi comparável nos dois grupos, sendo a melhora quase completa da dor relatada por 20 pacientes no primeiro grupo e 22 no segundo.

Aproximadamente, 60% dos pacientes de ambos os grupos relataram ter respondido bem ao tratamento com uma redução da dor igual ou maior que 30%. A maioria dos médicos também avaliou a resposta a ambos os tratamentos como bom. Um total de 50 pacientes relataram reações adversas, 27 dos que foram tratados com o extrato e 23 com o medicamento sintético. Dentre os 27, a maioria relatou efeitos gastrointestinais (13), seguido de alergia cutânea (5), e foi considerado nível de significância $p < 0,05$ para as variáveis analisadas. O estudo conclui pela eficácia e tolerabilidade semelhante de ambos os tratamentos, porém enfatizou-se que o custo do tratamento com o fitoterápico é aproximadamente 40% menor que o do rofecoxib (64).

Os dois estudos relatados deste grupo foram avaliados em uma revisão sistemática, a qual analisou dez publicações referentes a ensaios clínicos investigando tratamento fitoterápico para dor lombar. Entre outros tratamentos, a revisão considerou forte evidência de eficácia para o tratamento realizado com uma dose diária de 240 mg do extrato padronizado de *Salix alba* no combate a episódios agudos de dor lombar crônica. Evidência moderada foi atribuída ao tratamento utilizando a dose diária de 120 mg de salicina pela revisão sistemática (65).

4.4.5 Estudos observacionais

Foi relatado o caso de uma senhora de 61 anos com histórico de osteoartrite que chegou a uma emergência hospitalar com respiração curta e tosse 30 minutos após ingerir um suplemento contendo casca de *Salix* (66). A paciente não relatou caso prévio de alergia ao suplemento. O diagnóstico foi de falência respiratória hipóxica aguda secundária de uma severa síndrome do estresse respiratório agudo. O tratamento foi realizado com a administração endovenosa de metilprednisolona e oral de anti-histamínicos, ao qual a paciente reagiu bem. Este foi o primeiro caso relatado de síndrome de estresse respiratório causado pela espécie vegetal em estudo. A reação adversa descrita não era esperada, e a indução de anafilaxia por extrato de *Salix alba* é rara, geralmente são descritos casos de *rash* cutâneos ou outros efeitos adversos leves a moderados. Os autores não recomendam o uso de salgueiro por pessoas com histórico de alergia ou sensibilidade a salicilatos (66).

4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO

Ações dos derivados da espécie vegetal *Salix alba*, principalmente extratos etanólicos, aquosos e metanólicos, descritas pela maioria dos trabalhos tanto clínicos como não clínicos foram as ações anti-inflamatórias, antitérmicas e analgésicas. O fitoterápico encontra-se

presente da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) do Ministério da Saúde com indicação contra os sintomas da dor lombar baixa aguda e por sua ação anti-inflamatória (67). Estudos não-clínicos também relataram potencial antioxidante do derivado vegetal, o qual pode ter influência no mecanismo de ação anti-inflamatório.(68).

4.5.1 Vias de Administração

A via de administração de escolha é a oral por meio de comprimidos do extrato etanólico de *Salix alba* (7, 67).

4.5.2 Dose Diária

A dose indicada para o tratamento de dores de origem inflamatória, indicada pela monografia da OMS é determinada de acordo com a quantidade de salicina presente no extrato etanólico, de 60 a 240 mg de salicina ao dia (7, 60, 61).

4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo)

A posologia indicada é de 1 a 2 comprimidos de extrato etanólico contendo 60 mg de salicina cada, uma a duas vezes ao dia (7, 60, 61).

4.5.4 Período de Utilização

Um ensaio clínico descreveu o uso do extrato de *Salix alba* por pacientes em tratamento de artrite e dor nas costas por seis meses, período no qual o tratamento foi bem tolerado. O período de avaliação da utilização do extrato variou entre 3 (agudo) a 24 (crônico) semanas (crônico) (63).

4.5.5 Contra Indicações

Apesar de o extrato vegetal estudado possuir indícios de segurança e boa tolerabilidade por pacientes adultos de ambos os sexos, um estudo não clínico de toxicologia reprodutiva utilizando ratas foi realizado com um fitoterápico, que além de *Salix alba*, contém extrato de *Passiflora incarnata* e *Crataegus oxycantha* e não houve indicação de danos às ratas gestantes ou à sua ninhada (47). No entanto, devido à ausência de estudos específicos para o delineamento da toxicologia reprodutiva da espécie vegetal *Salix alba*, sua utilização em gestantes não é

recomendada, principalmente no primeiro trimestre de gestação, tampouco no período de lactação, uma vez que o salicilato atravessa a placenta e é excretado pelo leite (12).

4.5.6 Grupos de Risco

Pessoas com alergia ou hipersensibilidade a salicilatos e seus derivados (66).

4.5.7 Precauções de Uso

O extrato vegetal de *Salix alba* não é recomendado para pessoas com alergia ou hipersensibilidade a salicilatos e seus derivados (66).

4.5.8 Efeitos Adversos Relatados

Entre os efeitos adversos relatados nos estudos clínicos envolvendo o uso de *Salix alba*, alguns efeitos adversos foram relacionados ao uso da espécie vegetal, entre eles síndrome do estresse respiratório aguda, o que representa um caso grave de reação (66). Também foram relatados outros efeitos de severidade leve a moderada, como alergia (60), epigastralgia (41) e refluxo gástrico (61).

4.5.9 Interações Medicamentosas

4.5.9.1 Descritas

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.9.2 Potenciais

Sabendo da presença de salicina na espécie vegetal, seria esperada a interferência com anticoagulantes e outros anti-inflamatórios não-esteroidais (ácido acetilsalicílico, por exemplo), potencializando seus efeitos. No entanto, não há interações descritas na literatura. Ao contrário, o estudo de Beer e Wegener (2008) utilizou combinação entre o extrato de *Salix alba* e anti-inflamatórios não-esteroidais no tratamento de um grupo de pacientes com artrose sem descrever interações, os pesquisadores ainda sugeriram a combinação do tratamento no combate à dor (61).

4.5.10 Informações de Superdosagem

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.10.1 Descrição do quadro clínico

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.10.2 Ações a serem tomadas

Em caso de superdosagem sugere-se suspender o uso e procurar orientação médica.

5 INFORMAÇÕES GERAIS

5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS /FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Entre os estudos avaliados, a maioria utilizou derivados vegetais, os quais foram obtidos conforme descrito no item 3.2.2 (Métodos de obtenção) . Já as formas farmacêuticas descritas na literatura foram todas obtidas comercialmente, sem que fosse detalhado seu método de obtenção. Elas estão listadas abaixo no Quadro 4.

Tabela 4 Formas farmacêuticas de *Salix alba* obtidas a partir da literatura pesquisada.

Número da referência	Tipo	Método de obtenção
41	Comprimidos revestidos contendo 100 mg de extrato seco de <i>Salix alba</i> , 30 mg de extrato seco de <i>Crataegus oxyacantha</i> e 100 mg <i>Passiflora incarnata</i> .	Método não descrito. Obtido comercialmente. O fitoterápico é comercializado em farmácias no Brasil.
10	Cápsulas: amostras 4, 5 e 6	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias da Itália e Dinamarca.
17	Comprimidos contendo 330 mg de <i>Salix Cortex</i> e Rutinosal C, contendo 300 mg de <i>Salix</i> , 20 mg de <i>Rutosidum</i> e 40 mg de Vitamina C)	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias de Warszawa, Polônia.
42	Comprimidos de derivado vegetal contendo casca de salgueiro branco (<i>Salix</i> sp.), sem concentração descrita.	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias de Nova Iorque, Estados Unidos.

64	Comprimidos de extrato seco da casca de <i>Salix alba</i> contendo no mínimo 60 mg de salicina por comprimido.	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias na Alemanha.
59	Comprimidos de extato vegetal de <i>Salix alba</i> padronizado ontendo 60 mg de salicina.	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias na Alemanha.
39 57 51 63	Comprimidos do extrato STW 33-I obtido a partir da casca de <i>Salix alba</i> , contendo 60 mg de salicina, também comercializado.	Método não descrito. Obtido comercialmente em farmácias na Alemanha.

N.D. = Não descrito

5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS

A busca por produtos que possuem *Salix alba* em sua formulação e registro ativo na ANVISA resultou em quatro (4) fitoterápicos, de acordo com o portal eletrônico da Agência (69). Os quatro produtos encontram-se descritos abaixo.

Entre eles, apenas um produto possui exclusivamente *Salix alba* L. como princípio ativo. Sua classificação é de fitoterápico simples analgésico, o qual é apresentado em solução oral em frasco de vidro ambas de 150 mL.

Os demais produtos são classificados como fitoterápicos compostos ou associados e possuem em sua composição, além de *Salix alba* L., extrato seco de *Passiflora incarnata* e extrato seco de *Crataegus oxyacantha*. Os três fitoterápicos em questão possuem forma física de comprimido revestido e concentração dos extratos de 100mg de *Salix alba* L., 100 mg de *Passiflora incarnata* e 30 mg de *Crataegus oxyacantha*. Já as apresentações variaram, apesar de os três dos fitoterápicos disponibilizarem apresentação de 20 comprimidos revestidos em blister de alumínio, um deles também possui como apresentação 40 e 200 comprimidos revestidos. Um dos fabricantes que disponibiliza a apresentação de 20 comprimidos também

possui como apresentação uma solução oral do fitoterápico em frasco âmbar de 100 mL. Para esta apresentação, cada 5 mL da solução oral contém 0,50 mL de extrato fluido de *Passiflora incarnata*, 0,35 mL de alcoolato de *Crataegus oxyacantha* e 0,250 g de extrato mole de *Salix alba* L.

5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente de vidro bem fechado, ao abrigo da luz, calor e umidade (4).

5.4 ROTULAGEM

A rotulagem de medicamentos fitoterápicos conforme é classificado o extrato de *Salix alba*, deve seguir as regras estabelecidas na RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009, que estabelece regras para a rotulagem de medicamentos, ou em suas atualizações (70).

5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS

A espécie vegetal está presente nos seguintes documentos oficiais:

- Farmacopeia Brasileira, Volume 2 (4);
- Farmacopeia Europeia (9);
- Monografia da OMS - *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants* (7);
- Monografia da European Medicines Agency (EMA) - *Assessment report on salicis cortex (willow bark) and herbal preparation(s) thereof with well-established use and traditional use* (12).

5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL

A busca por patentes envolvendo a espécie vegetal *Salix alba* foi realizada em dezembro de 2014 nas seguintes bases de dados: World Intellectual Property Organization (WIPO), U.S. Patent and Trademark Office (USPTO), European Patent Office (EPO) e Japan Patent Office (JPO). A busca no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) foi realizada no mês de janeiro de 2015.

A busca nos bancos de dados INPI, EPO e JPO não geraram nenhum resultado.

Como resultado da busca na WIPO, foram encontradas duas patentes depositadas, entretanto, nenhuma delas referia-se ao uso de espécie como fitoterápico, uma delas consistia

num suplemento alimentar e a outra num produto veterinário, por esse motivo não estão listadas nesse documento.

A busca no banco de dados de patentes americano – USPTO – revelou três resultados, um deles referia-se a um composto autobronzeador e os outros dois depósitos estão descritos abaixo.

A primeira patente foi depositada em 2011 (US 8,747,914 B2) e é intitulada “Filme anti-inflamatório dissolvível”, o filme foi desenvolvido com o objetivo de tratar lesão em mucosa e se dissolve completamente após 15 minutos da aplicação. Ele possui em sua composição extrato de *Sambucus nigra* combinado com um dos seguintes extratos: *Salix alba*, *Calendula officinalis*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Centella asiatica*, *Commiphora molmol*, *Echinacea purpurea*, *Gaultheria procumbens*, *Hypericum perforatum*, *Krameria triandra*, *Ligusticum porterii-oshia*, *Matricaria recutita*, *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Uncaria tomentosa*, *Usnea barbata* ou *Vaccinium myrtillus*. A camada adesiva do filme é composta principalmente por polímeros como o Carbopol 940 (71).

A outra patente utilizando o extrato vegetal com fim farmacológico foi depositada em 2012 (US 8,765,194 B2) e titula-se como “Composição de um analgésico e anti-inflamatório tópico natural”. Ela descreve os componentes da fórmula a ser utilizada como analgésico e anti-inflamatório de uso tópico, que além de extrato de *Salix alba* (1 a 3%) possui óleo essencial de *Helichrysum gymnocephalum* (0,03%), além de *Mentha avrensis* (mentol), cânfora, *Eucalyptus globules*, óleo de *Lavandula angustifolia* (lavanda), óleo de *Pelargonium graveoleus* (gerânio), óleo de *Mentha viridis* (menta) e base para creme (72).

REFERÊNCIAS

1. IPNI. The International Plant Name Index 2014 [cited 2014 02 de abril de 2014]. <http://www.ipni.org/ipni/plantnamesearchpage.do>.
2. BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Lista de espécies Flora do Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2014 [cited 2014 02 de abril de 2014]. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do>.
3. Tropicos. Missouri Botanical Garden 2014 [cited 2014 03 de abril de 2014]. www.tropicos.org.

4. Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 2. In: Anvisa ANdVS, editor. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz/Editora; 2010. p. 1279-81.
5. MOBOT. Missouri Botanical Garden 2014 [cited 2014 02 de abril de 2014]. www.missouribotanicalgarden.org.
6. Kenstaviciene P, Nenortiene P, Kiliuviene G, Zevzikovas A, Lukosius A, Kazlauskiene D. Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of Salix. *Medicina (Kaunas)*. 2009;45(8):644-51.
7. Organization WH. WHO monographs on selected medicinal plants. Spain: WHO Press; 2009.
8. Argus GW. The genus Salix (Salicaceae) in the southeastern United States. In: Taxonomists ASoP, editor. *Systematic Botany Monographs*. 91986.
9. European Pharmacopoeia. 8 ed. Strasbourg, France 2013.
10. Agnolet S, Wiese S, Verpoorte R, Staerk D. Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. *J Chromatogr A*. 2012;1262:130-7.
11. Sugier DS, P. Banaś, A. Szewczuk, C. The content of phenolic glycosides and macroelements (K, Ca, Mg) in the bark of herbal willows. *Acta Sci Pol, Hortorum Cultus*. 2013;12(4):31-41.
12. Agency EM. Assessment report on Salicis cortex (willow bark) and herbal preparation(s) thereof with well-established use and traditional use. London: European Medicines Agency; 2009. p. 1-27.
13. Barcaccia G, Meneghetti S, Albertini E, Triest L, Lucchin M. Linkage mapping in tetraploid willows: segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure for Salix alba x Salix fragilis interspecific hybrids. *Heredity (Edinb)*. 2003;90(2):169-80.
14. Organization WH. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues Spain: WHO Press; 2007.

15. Parthik P, Patel NM, Patel PM. WHO guidelines on quality control of herbal medicines. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*. 2011;2(4):1148-54.
16. Araujo MGF, Bauab TM. Microbial quality of medicinal plant materials. In: Akyar I, editor. *Latest Research into Quality Control: InTech*; 2012. p. 67-82.
17. Kalny P, Wyderska S, Fijalek Z, Wroczynski P. Determination of selected elements in different pharmaceutical forms of some Polish herbal medicinal products. *Acta Pol Pharm*. 2012;69(2):279-83.
18. Toman R, Karácsonyi S, Kováčik V. Polysaccharides from the bark of the white willow (*Salix alba* L.): structure of a galactan. *Carbohydrate Research*. 1972;25(2):371-8.
19. Toman R, Karácsonyi Š, Kubačková M. Studies on the pectin present in the bark of white willow (*Salix alba* L.): Fractionation and acidic depolymerization of the water-soluble pectin. 1975;43(1):111-6.
20. Raiciu AD, Mihele DE, Ionita C, Nistorica V, Manea S. Antimicrobial activity of *Ribes nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Betula pubescens*, *Salix alba*, *Vaccinium myrtillus* gemoderivatives. *FARMACIA*. 2010;58(6):735-48.
21. Sulaiman GM, Hussien NN, Marzoog TR, Awad HA. Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2013;9(1):41-6.
22. Kompantsev VA, Gaidash PM, Dauksha AD. Phenolic compounds of the bark of *Salix alba* × *babylonica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1974;10(6):839.
23. Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, O’Riordan D. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). 2009;42(9):1468-73.
24. Drummond EM, Harbourne N, Marete E, Martyn D, Jacquier J, O’Riordan D, et al. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res*. 2013;27(4):588-94.
25. Behrens A, Maie N, Knicker H, Kögel-Knabner I. MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry*. 2003;62(7):1159-70.

26. Muetzel S, Becker K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology*. 2006;125(1–2):139–49.
27. Du Q, Jerz G, Shen L, Xiu L, Winterhalter P. Isolation and structure determination of a lignan from the bark of *Salix alba*. *Nat Prod Res*. 2007;21(5):451-4.
28. Poblocka-Olech L, Krauze-Baranowska M. SPE-HPTLC of procyanidins from the barks of different species and clones of *Salix*. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(3):965-8.
29. Poblocka-Olech L, van Nederkassel AM, Vander Heyden Y, Krauze-Baranowska M, Glod D, Baczek T. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J Sep Sci*. 2007;30(17):2958-66.
30. Poblocka-Olech L, Krauze-Baranowska M, Glod D, Kawiak A, Lojkowska E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem Anal*. 2010;21(5):463-9.
31. Jazayeri SB, Amanlou A, Ghanadian N, Pasalar P, Amanlou M. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *Daru*. 2014;22(1):17.
32. Oberprieler C, Dietz L, Harlander C, Heilmann J. Molecular and phytochemical evidence for the taxonomic integrity of *Salix alba*, *S. fragilis*, and their hybrid *S. x rubens* (*Salicaceae*) in mixed stands in SE Germany. *Plant Systematics and Evolution*. 2013;299(6):1107-18.
33. Souza RS, Almeida MC, Manoel CV, Santos-Filho SD, Fonseca AS, Bernardo Filho M. Biological effects of an aqueous extract of *Salix alba* on the survival of *Escherichia coli* AB1157 cultures submitted to the action of stannous chloride. *Biol Res*. 2009;42(2):199-203.
34. Fiebich BL, Chrubasik S. Effects of an ethanolic salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine*. 2004;11(2-3):135-8.
35. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography—densitometry : I. *Aesculus hippocastaneum* L., *Arctostaphylos uva-ursi* Spreng, *Fraxinus excelsior* L., *Gentiana lutea* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Hamamelis virginiana* L., *Hypericum perforatum* L., *Olea europea* L., *Salix alba* L. and *Silybum marianum* Gaertn. *Journal of Chromatography A*. 1983;281:263–71.

36. Du Q, Jerz G, Ha Y, Li L, Xu Y, Zhang Q, et al. Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2005;1074(1-2):43-6.
37. Farinacci M, Colitti M, Sgorlon S, Stefanon B. Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;126(1-2):54-63.
38. Shakibaei M, Allaway D, Nebrich S, Mobasheri A. Botanical Extracts from Rosehip (*Rosa canina*), Willow Bark (*Salix alba*), and Nettle Leaf (*Urtica dioica*) Suppress IL-1beta-Induced NF-kappaB Activation in Canine Articular Chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:509383.
39. Nahrstedt A, Schmidt M, Jaggi R, Metz J, Khayyal MT. Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect. *Wien Med Wochenschr*. 2007;157(13-14):348-51.
40. Pinto B, Caciagli F, Riccio E, Reali D, Saric A, Balog T, et al. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *Eur J Med Chem*. 2010;45(9):4122-8.
41. Nascimento DF, Santana APM, Leite IO, Viana FAC, Leite ALAeS, Moraes RAD, et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. em voluntários saudáveis

Clinical toxicology study of an herbal medicine with *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. in healthy volunteers. *Rev bras farmacogn*.19(1b):261-8.
42. Hoffman RJ, Nelson LS, Hoffman RS. Use of ferric chloride to identify salicylate-containing poisons. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002;40(5):547-9.
43. Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation*. 1994;89(1):432-49.
44. ANVISA. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico Ministério da Saúde ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2014.
45. IN nº 2, de 13 de maio de 2014, (2014).
46. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, (2014).

47. Bastos de Mello F, Langeloh A, Braga de Mello JR. Estudo de toxicidade e eficácia em ratos Wistar de produto fitoterápico usado como sedativo e/ou hipnótico. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007;26(1):38-44.
48. Kraychete D. Antiinflamatórios não-hormonais. In: Silva P, editor. *Farmacologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 566-78.
49. D'Acquisto F, Ianaro A. From willow bark to peptides: the ever widening spectrum of NF-kappaB inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(4):387-92.
50. Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos Celulares E Moleculares Da Dor Inflamatória. Modulação Periférica E Avanços Terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 1998;48(2):137-58.
51. Bonaterra GA, Heinrich EU, Kelber O, Weiser D, Metz J, Kinscherf R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv((R))) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*. 2010;17(14):1106-13.
52. Knuth S, Schubel H, Hellemann M, Jurgenliemk G. Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF-alpha induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Med*. 2011;77(10):1024-6.
53. Shen YC, Chen CF, Chiou WF. Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br J Pharmacol*. 2002;135(2):399-406.
54. Kong CS, Kim KH, Choi JS, Kim JE, Park C, Jeong JW. Salicin, an Extract from White Willow Bark, Inhibits Angiogenesis by Blocking the ROS-ERK Pathways. *Phytother Res*. 2014.
55. Jukic M, Burcul F, Carev I, Politeo O, Milos M. Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia. *Nat Prod Res*. 2012;26(18):1703-7.
56. Nizard C, Noblesse E, Boisdé C, Moreau M, Faussat AM, Schnebert S, et al. Heat shock protein 47 expression in aged normal human fibroblasts: modulation by *Salix alba* extract. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:223-7.
57. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Okpanyi SN, Kelber O, Weiser D. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Arzneimittelforschung*. 2005;55(11):677-87.

58. Bucolo C, Marrazzo G, Platania CBM, Drago F, Leggio GM, Salomone S. Fortified Extract of Red Berry, *Ginkgo biloba*, and White Willow Bark in Experimental Early Diabetic Retinopathy. *Journal of Diabetes Research*. 2013;2013:1-6.
59. Knuth S, Abdelsalam RM, Khayyal MT, Schweda F, Heilmann J, Kees MG, et al. Catechol conjugates are in vivo metabolites of *Salicis cortex*. *Planta Med*. 2013;79(16):1489-94.
60. Chrubasik S, Eisenberg E, Balan E, Weinberger T, Luzzati R, Conradt C. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am J Med*. 2000;109(1):9-14.
61. Beer AM, Wegener T. Willow bark extract (*Salicis cortex*) for gonarthrosis and coxarthrosis--results of a cohort study with a control group. *Phytomedicine*. 2008;15(11):907-13.
62. Krivosíková Z, Spustová V, Dzúrik R. A highly sensitive HPLC method for the simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic and salicyluric acids in biologic fluids: pharmacokinetic, metabolic and monitoring implications. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1996;18(8):527-32.
63. Uehleke B, Muller J, Stange R, Kelber O, Melzer J. Willow bark extract STW 33-I in the long-term treatment of outpatients with rheumatic pain mainly osteoarthritis or back pain. *Phytomedicine*. 2013;20(11):980-4.
64. Chrubasik S, Künzel O, Model A, Conradt C, Black A. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(12):1388-93.
65. Gagnier JJ, van Tulder MW, Berman B, Bombardier C. Herbal medicine for low back pain: a Cochrane review. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(1):82-92.
66. Srivali N, Cheungpasitporn W, Chongnarungsin D, Edmonds LC. White willow bark induced acute respiratory distress syndrome. *N Am J Med Sci*. 2013;5(5):330.
67. Brasil. Renome 2013 - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. In: Secretaria de Ciência TeIEDdAF, editor.: Ministério da Saúde; 2013. p. 200.
68. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 2001;8(5):401-9.

69. ANVISA. Consulta de Produto - Medicamento [cited 2014 17 de dezembro de 2014]. http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp:[
70. RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009, (2009).
71. Loewy ZG, Lawn F, Jerusalem WZL, Bet Shemesh AJS, inventors; Izun Pharmaceuticals, Inc., New York, NY (US), assignee. ANTI-INFLAMMATORY DISSOLVABLE FILM. United States2011.
72. Antioch MM, Murfreesboro MH, inventorsNATURAL—TOPICAL ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY COMPOSITION. United States2012.