



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DE ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DA ESPÉCIE *Byrsonima japurensis* A.
JUSS. (MALPIGHIACEAE)**

FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

**MANAUS
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DE ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DA ESPÉCIE *Byrsonima japurensis* A.
JUSS. (MALPIGHIACEAE)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em Patologia
Tropical da Universidade Federal do
Amazonas, para a obtenção do título
de Mestre em Patologia Tropical na
área de concentração “Etnomedicina
e Biodiversidade”.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

**MANAUS
2009**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Guilhon-Simplicio, Fernanda

G958e Estudo farmacognóstico e de atividade farmacológica da espécie
Byrsonima japurensis A. Juss. (Malpighiaceae) / Fernanda Guilhon-
Simplicio. - Manaus: UFAM, 2009.

158 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade
Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Meneses Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

1. *Byrsonima japurensis* – Ação anti-inflamatória 2.
Farmacologia – Estudos experimentais 3. Plantas medicinais I.
Pereira, Maria de Meneses II. Lima, Emerson Silva III. Universidade
Federal do Amazonas IV. Título

CDU 615.012(043.3)

FERNANDA GUILHON SIMPLICIO

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E DE ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA DA ESPÉCIE *Byrsonima japurensis* A.
JUSS. (MALPIGHIACEAE)**

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical pelo Programa de Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira
Universidade Federal do Amazonas
(Presidente / Orientadora)

Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas
(Membro Titular Interno)

Prof. Dr. Pierre Alexandre do Santos
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
(Membro Titular Externo)

Manaus, 30 de junho de 2009

A todos aqueles amam a ciência.

Dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus, pela vida e pelas bênçãos.

À minha mãe, D. Graça, pelo apoio incondicional aos meus sonhos e, acima de tudo, por ser um exemplo de força, caráter e determinação. Obrigada pelo amor com o qual me criou.

A meu irmão, Ronald, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de alegria. Ser exemplo e motivo de orgulho para você faz-me querer ir mais longe.

Ao meu amor, André Luiz, pelo carinho, dedicação, amizade, zelo e por tudo mais que me faz amá-lo tanto.

À minha orientadora, mentora, psicóloga e muitas vezes, mãe, Professora Doutora Maria de Meneses Pereira, pelos anos de convivência (e paciência), pela confiança e pelos conhecimentos repassados. A Senhora é uma pessoa que eu admiro muito!!!

Ao Professor Doutor Emerson Silva Lima, pela rica e gratificante experiência de ser sua orientanda durante o Mestrado. Meus sinceros agradecimentos por todos os ensinamentos.

Ao Professor Doutor Cleomir Pinheiro, por escancarar as portas do seu laboratório para mim, pela disposição em ensinar e ajudar. O Senhor tornou esse trabalho possível.

A toda equipe científica desse trabalho, que tanto o enriqueceu com competência.

À Mestre e “Senpai”, Maria José, pelo indispensável apoio técnico-científico e pela amizade verdadeira que partilhamos. Você é f...

Às “Farmacogirls”, Ana e Gaby, com as quais hoje tenho uma fraterna amizade. Obrigada pelos braços e pernas que ajudaram a construir esse sonho.

Aos amigos leais feitos durante minha infância e adolescência: Valéria, Andréa Giordanna, Liliana, Kellen, Maína, Suzane, Adilene, Flávia (BGG), Enílson e Vinícius, que fazem minha vida ter sentido.

À Turma Panacea (Farmacêuticos-UFAM, 2006/2), pelas ~~miguelagens~~ experiências maravilhosas vividas durante nossos quatro anos de faculdade.

A todos os professores da Graduação e Mestrado, que marcaram, cada um a sua maneira, a minha vida.

Às amigas Cynthia e Gilmara, pessoas maravilhosas que tive a sorte de conhecer durante o Mestrado.

À Maria Christina (que veio do Riiiiio!), que eu admiro pela competência e pela disposição em sempre fazer o bem ao próximo.

Às minhas companheiras de lutas e risadas, Leidy, Vivi e Daniele. Vocês tornaram os perrengues do dia-a-dia muito mais divertidos. Tenho todas no meu coração.

À minha querida Jane, decente, guerreira, admirável. Obrigada por ter cruzado meu caminho.

A todas as pessoas que ao executar suas tarefas com competência, deixam sua marca na história desse trabalho: Muito obrigada a todos os servidores da UFAM, INPA e CBA, pelos serviços prestados.

*Fazer o que você gosta é liberdade.
Gostar do que você faz é felicidade.*

Frank Tyger

RESUMO

Espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) são amplamente empregadas como medicamento em todas as regiões do Brasil. O chá da casca do caule de *Byrsonima japurensis* A. Juss., conhecida popularmente como sara-tudo, é indiscriminadamente utilizado contra diversas doenças inflamatórias pela população do Estado do Amazonas. Porém, não havia estudos científicos que validassem esse emprego. Por esta razão, este trabalho fez uma caracterização farmacognóstica da casca do caule desta espécie e um estudo farmacológico de do extrato aquoso dessa droga vegetal. No estudo farmacognóstico foram utilizadas metodologias farmacopéicas e não farmacopéicas visando determinar alguns parâmetros de qualidade da droga vegetal. No estudo farmacológico foram realizadas avaliações da capacidade antioxidante, antiagregante plaquetária e antiedematogênica do extrato aquoso, visando investigar o potencial anti-inflamatório e possíveis mecanismos. Para avaliar a segurança do uso do extrato com finalidades terapêuticas, também foi realizada uma avaliação de toxicidade aguda. O estudo farmacognóstico da casca do caule de *B. japurensis*, entre outros resultados, mostrou que essa droga vegetal possui uma grande diversidade de substâncias com potencial farmacológico. Esse fato foi refletido no estudo farmacológico, onde as substâncias presentes no extrato atuaram por diferentes mecanismos culminando numa apreciável atividade anti-inflamatória. Entretanto, essa mesma diversidade parece ser responsável pela toxicidade relativamente alta apresentada pelo mesmo. Contudo, a espécie mostrou ser promissora, após mais estudos da relação dose-efeito *in vivo*, para aplicação na terapêutica, ou mesmo como fonte de novos protótipos de fármacos.

Unitermos: *Byrsonima japurensis*, atividade anti-inflamatória, toxicidade.

ABSTRACT

The *Byrsonima* genus (Malpighiaceae) is widely used as a medicine in Brazil. The tea made of the stem bark of *B. japurensis* A. Juss., popularly known as “sara-tudo”, is indiscriminately used against many inflammatory disorders in Amazonas State, in spite of the fact that there is no scientific data to support this usage. Thus, in this work we performed a pharmacognostic characterization of the stem bark of this species and a pharmacological study with an aqueous extract obtained from it. In the pharmacognostic study we applied pharmacopeic and non-pharmacopeic methods to determine quality parameters of the herbal drug. In the pharmacological study we evaluated its antioxidant, antiplatelet and antiedematogenic capacity, in order to investigate its anti-inflammatory potential and possible mechanisms. To evaluate the safety of usage of an aqueous extract with therapeutic purposes we also carried out an acute toxicity study. The pharmacognostic study of the stem bark of *B. japurensis* showed that this herbal drug has a variety of substances with pharmacological potential. This fact was observed in the pharmacological study, where the substances of extract acted by different mechanisms culminating in an appreciable anti-inflammatory activity. However, the same composition variety was responsible for the high toxicity presented by the extract. Nevertheless, the species proved to be promising as a source of prototypes for new medicines. However, the species proved to be promising, after further study of the dose-effect *in vivo*, for use in therapy, or even as a source of new prototypes of drugs.

Key words: *Byrsonima japurensis*, anti-inflammatory activity, toxicity.

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1.1 – Amostras comerciais de uma planta medicinal coletadas na cidade de Manaus	23
--	----

Capítulo 2 - Fundamentação Teórica

Figura 2.1 – Distribuição geográfica da família Malpighiaceae.....	24
Figura 2.2 – <i>Byrsonima japurensis</i>	48
Figura 2.3 – Classificação taxonômica de <i>Byrsonima japurensis</i>	49
Figura 2.4 – Diagrama resumido do processo de formação dos eicosanóides e suas funções	54

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Figura 4.1 – Comparação entre o material-testemunho (à direita) e a exsiccata do INPA.....	63
Figura 4.2 – Análise histoquímica da droga vegetal	64
Fluxograma 4.1 – Preparação e análise físico-química da matéria-prima vegetal.....	66
Figura 4.3 – Filtrações das soluções extrativas	75
Fluxograma 4.2 – Estudo fitoquímico realizado com o extrato aquoso bruto.....	76
Figura 4.4 – Espectrômetro de infravermelho.....	77
Fluxograma 4.3 – Elaboração do EA para obtenção da fração FH, rica em heterosídeos cardioativos	80
Figura 4.5 – Leitor de microplacas utilizado na avaliação da atividade varredora de radicais livres.....	82
Figura 4.6 – Aparelhagem utilizada na análise da atividade antiagregante plaquetária	85
Figura 4.7 – Campo experimental utilizado no <i>screening</i> hipocrático.....	87
Figura 4.8 – Plestímetro utilizado na análise de atividade antiedematogênica	88

Capítulo 5 - Resultados e Discussão

Figura 5.1 – Aspecto da casca do caule de <i>Byrsonima japurensis</i>	90
Figura 5.2 – Análise histoquímica da casca do caule de <i>Byrsonima japurensis</i>	91
Figura 5.3 – Resultado da prospecção fitoquímica de heterosídeos cianogênicos.....	98
Figura 5.4 – Padrão de distribuição das partículas da MPV nos tamises utilizados.....	101
Figura 5.5 – Gráfico de Paretos da análise do teor de resíduo seco	104
Figura 5.6 – Espectro no infravermelho do extrato aquoso bruto em KBr.....	106
Figura 5.7 – Espectro no infravermelho da fração éter etílico em KBr.....	107
Figura 5.8 – Espectro no infravermelho da fração acetato de etila em KBr.....	108
Figura 5.9 – Espectro no infravermelho de STEB-1 em KBr.....	109
Figura 5.10 – Espectro de RMN de ^1H de STEB-1	110
Figura 5.11 – Expansão na região entre δ_{H} 5,30 – 4,00 do espectro de RMN de ^1H de STEB-1.....	110
Figura 5.12 – Expansão na região entre δ_{H} 7,90 – 7,45 do espectro de RMN de ^1H de STEB-1.....	111
Figura 5.13 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1	112
Figura 5.14 – Expansão na região entre δ_{C} 79,00 – 54,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1	112

Figura 5.15 – Expansão na região entre δ_C 170,00 – 115,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1	113
Figura 5.16 – Espectro no infravermelho da fração STEB-2 em KBr.	114
Figura 5.17 – Espectro de RMN de 1H de STEB-2	115
Figura 5.17 – Expansão na região entre δ_H 5,10 – 4,30 do espectro de RMN de 1H de STEB-2.....	115
Figura 5.19 – Expansão na região entre δ_H 7,80 – 6,40 do espectro de RMN de 1H de STEB-2.....	116
Figura 5.20 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1	116
Figura 5.21 – Expansão na região entre δ_C 150,00 – 60,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1	117
Figura 5.22 – Espectro no Infravermelho da fração STEB-3, em KBr.	118
Figura 5.23 – Espectro de RMN de 1H de STEB-3	119
Figura 5.24 – Expansão na região entre δ_H 4,70 – 4,15 do espectro de RMN de 1H de STEB-2.....	119
Figura 5.25 – Expansão na região entre δ_H 7,95 – 7,40 do espectro de RMN de 1H de STEB-2.....	120
Figura 5.26 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3	120
Figura 5.27 – Expansão na região entre δ_C 90,00 – 55,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3.....	121
Figura 5.28 – Expansão na região entre δ_C 175,00 – 115,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3.....	121
Figura 5.29 – Espectro no Infravermelho da fração STEB-4 em KBr.	122
Figura 5.30 – Espectro de RMN de 1H de STEB-4	123
Figura 5.31 – Expansão na região entre δ_H 4,60 – 3,60 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-4.....	123
Figura 5.32 – Expansão na região entre δ_H 7,80 – 6,60 do espectro de RMN de 1H de STEB-4.....	124
Figura 5.33 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3	124
Figura 5.34 – Expansão na região entre δ_C 140,00 – 60,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-4.....	125
Figura 5.35 – Núcleos fundamentais de chalconas (A), auronas (B) e flavanonas (C).	125
Figura 5.36 – Curvas dose-resposta dos testes de atividade varredora de radicais livres.....	127
Figura 5.37 – Sítio de ligação de metais a uma molécula de flavonóide.....	128
Figura 5.38 – Atuação dos flavonóides como doadores de elétrons e hidrogênio.	128
Figura 5.39 – Estrutura geral das antocianidinas e/ou antocianinas e catequinas.	129
Figura 5.40 – Curvas dose-resposta da atividade antiagregante plaquetária.	131
Figura 5.41 – Animais reclusos após a aplicação do extrato.	134
Figura 5.42 – Dissecção de animais da análise toxicológica e aparência de algumas vísceras.....	135
Figura 5.43 – Efeito das drogas testadas na primeira fase do edema de pata induzido por carragenina	141
Figura 5.44 – Efeito das drogas testadas na segunda fase do edema de pata induzido por carragenina	142

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Capítulo 2 - Fundamentação teórica

Tabela 2.1 - Usos etnofarmacológicos de espécies de <i>Byrsonima</i>	26
Tabela 2.2 - Atividades farmacológicas investigadas em espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	28
Tabela 2.3 – Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	34
Quadro 2.1 – Estrutura das substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	41
Quadro 2.2 – Exemplos de doenças relacionadas à inflamação.	52

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Tabela 4.1 – Reagentes utilizados nos testes histoquímicos	64
Quadro 4.1 – Interpretação dos resultados do teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.	67
Quadro 4.2 – Interpretação dos resultados do teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.	67
Quadro 4.3 – Substâncias-padrão e soluções cromogênicas utilizadas na CCD.	77
Tabela 4.2 – Cromatografia em coluna do extrato aquoso bruto	78
Tabela 4.3 – Cromatografia em coluna da fração éter etílico	79
Tabela 4.4 – Cromatografia em coluna da fração acetato de etila	79
Tabela 4.5 – Recromatografia da fração F4359	79
Tabela 4.6 – Recromatografia da fração F6078	80
Quadro 4.4 – Frações semi-purificadas selecionadas para análises em RMN e IV.	81

Capítulo 5 - Resultados e Discussão

Tabela 5.1 – Resultados da prospecção fitoquímica de compostos fenólicos e esteroidais	95
Tabela 5.2 – Resultados da prospecção fitoquímica de heterosídeos cardioativos	97
Tabela 5.3 – Resultados da prospecção fitoquímica de alcalóides	98
Tabela 5.4 – Resultados da análise físico-química da MPV	100
Tabela 5.5 – Resíduo seco dos diferentes métodos extrativos	104
Tabela 5.6 – Resultados obtidos nos diferentes ensaios de atividade varredora de radicais livres	126
Tabela 5.7 – Resultados dos testes de atividade antiagregante plaquetária	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Notação	Significado
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABS	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico
ADP	Difosfato de adenosina
ADR	Adrenalina
AINE	Antiinflamatórios não esteroidais
CC	Coluna cromatográfica ou cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CI ₅₀	Concentração inibitória mediana ou concentração que inibe 50% do fenômeno
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DL ₅₀	Dose letal mediana ou dose letal a 50% dos animais em teste
DPPH	2,2-difenil-1,1-picril-hidrazila
EPIC	Edema de pata induzido por carragenina
FAE	Fração acetato de etila
FEE	Fração éter etílico
Gp IIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenóico
I5	Extrato aquoso bruto obtido por infusão com 5% de droga vegetal
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
i. p.	Via intraperitoneal
IV	Espectrometria no infravermelho
LT	Leucotrieno (A ₄ , B ₄ , C ₄ , D ₄ ou E ₄)
MPV	Matéria-prima vegetal

(Continua)

Notação	Significado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
p.a.	Para análise
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
pág.	Página(s)
PG	Prostaglandina (F _{2α} , D ₂ ou E ₂)
PGI ₂	Prostraglandina I ₂ (prostaciclina)
PGS	Sintase de prostaglandina H ₂
PMS	<i>Phenazine Methyl Sulfate</i>
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
Rf	Fator(es) de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
SE	Solução(ões) extrativa(s)
TxA ₂	Tromboxane A ₂
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
v. o.	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

Notação	Significado
HO•	Radical hidroxila
O ₂ •	Radical superóxido
ROO•	Radical peroxila
RO•	Radical alcoxila
NO•	Radical óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
¹ O ₂	Oxigênio singleto
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
HNO ₂	Ácido nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
ONOO ⁻	Peroxinitrito
DPPH•	Radical livre 2,2-difenil-1,1-picril-hidrazila
ABTS ^{•+}	Cátion do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico
DPPH-H	Forma reduzida do radical livre 2,2-difenil-1,1-picril-hidrazila
ABTS ⁺	Cátion do ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico
®	Marca registrada
°C	Grau(s) Celsius
mm	Milímetro(s)
g	Grama(s)
mL	Mililitro(s)
pH	Potencial de ionização de hidrogênio
nm	Nanômetro(s)
UV λ ₃₆₅	Luz ultravioleta de 365 nanômetros
rpm	Rotações por minuto
N	Normal (concentração normal)

(Continua)

Notação	Significado
μm	Micrômetro(s)
mg	Miligramas
% m/m	Porcentagem massa por massa
m/v	Massa por volume
KBr	Brometo de potássio
^1H	Isótopo de hidrogênio 1
^{13}C	Isótopo de carbono 13
MHz	Mega Hertz
mg/mL	Miligramas por mililitro(s)
μL	Microlitro(s)
$\mu\text{mol/L}$	Micromol(s) por mililitro(s)
mg/kg	Miligramas por quilograma(s)
p/v	Peso por volume
cm	Centímetro(s)
cm^{-1}	Centímetro(s) inverso(s) ou centímetro(s) a menos 1
O–H	Ligação covalente simples entre oxigênio e hidrogênio
C=C	Ligação covalente dupla entre carbonos
C–H	Ligação covalente simples entre carbono e hidrogênio
C=O	Ligação covalente dupla entre carbono e oxigênio
δ_{H}	Deslocamento químico de hidrogênio
CD_3OD	Metanol deuterado
δ_{C}	Deslocamento químico de carbono
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1 A família Malpighiaceae Juss.	24
2.2 Gênero <i>Byrsonima</i> Rich. ex Kunth	25
2.2.1 Estudos científicos com espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	27
2.2.2 <i>Byrsonima japurensis</i>	48
2.3 Busca por novos anti-inflamatórios.....	51
2.4 Busca por novos antiplaquetários.....	57
2.5 Busca por novos antioxidantes.....	59
2 OBJETIVOS.....	62
2.1 Objetivo geral.....	62
2.2 Objetivos específicos.....	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1 Coleta e identificação da amostra	63
4.2 Estudo farmacognóstico	63
4.2.1 Análise macroscópica	63
4.2.2 Análise histoquímica	64
4.2.3 Análise físico-química	65
4.2.3.1 Obtenção da Matéria-Prima Vegetal (MPV).....	65
4.2.3.2 Prospeção fitoquímica preliminar	65
4.2.3.2.1 Investigação de compostos fenólicos e esteroidais	65
4.2.3.2.2 Investigação de heterosídeos cardioativos.....	69
4.2.3.2.3 Investigação de compostos nitrogenados	71
4.2.3.3 Análise granulométrica	72
4.2.3.4 Perda por dessecação	72
4.2.3.5 Teor de cinzas	73
4.2.3.6 Teor de extrativos	73
4.2.4 Estudo para a obtenção do extrato bruto.....	74
4.2.4.1 Estudo fitoquímico do extrato bruto	75
4.2.4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	76
4.2.4.1.2 Espectrometria no infravermelho (IV)	77
4.2.4.1.3 Elaboração das colunas cromatográficas.....	78

4.2.4.1.4 Obtenção dos heterosídeos cardioativos.....	80
4.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)	81
4.3 Estudo de atividade farmacológica/toxicológica	81
4.3.1 Testes <i>in vitro</i>	81
4.3.1.1 Ensaio de capacidade varredora de radicais livres	81
4.3.1.1.1 Ensaio do DPPH [•]	82
4.3.1.1.2 Ensaio do ABTS ^{•+}	83
4.3.1.1.3 Ensaio do O ₂ [•]	83
4.3.1.2 Ensaio da capacidade antiagregante plaquetária	84
4.3.2 Avaliações <i>in vivo</i>	86
4.3.2.1 Animais	86
4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade	86
4.3.2.3 Avaliação da toxicidade aguda (Dose simples).....	87
4.3.2.4 Avaliação da capacidade antiedematogênica	88
4.4 Análise estatística	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.1 Estudo farmacognóstico	90
5.1.1 Análise macroscópica	90
5.1.2 Análise histoquímica	90
5.1.3 Prospeção fitoquímica preliminar	94
5.1.3.1 Constituintes fenólicos e esteroidais	94
5.1.3.2 Constituintes nitrogenados	98
5.1.4 Análise da qualidade da MPV	100
5.1.5 Estudo para a obtenção do extrato bruto.....	103
5.1.5.1 Estudo fitoquímico do extrato bruto	105
5.1.5.1.1 Perfil cromatográfico do extrato bruto (I5)	105
5.1.5.1.2 Perfil cromatográfico da fração éter etílico (FEE).....	106
5.1.5.1.3 Perfil cromatográfico da fração acetato de etila	108
5.1.5.1.4 Análises das frações semi-purificadas.....	109
5.2 Estudo de atividade farmacológica / toxicológica	126
5.2.1 Atividade varredora de radicais livres	126
5.2.2 Atividade antiagregante plaquetária	130
5.2.3 Citotoxicidade	132
5.2.4 Toxicidade aguda.....	132

5.2.5 Atividade antiedematogênica	139
6 CONCLUSÃO	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e/ou prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Apesar da industrialização, que alavancou a alopatia a partir da segunda metade do século XX, as populações mais pobres, especialmente determinadas comunidades e grupos étnicos de países em desenvolvimento continuam com dificuldades de acesso aos medicamentos e à assistência médica de qualidade. Tal fato corrobora para o amplo uso de plantas medicinais até os dias de hoje, já que muitas vezes esse conhecimento milenar se concretiza como único recurso terapêutico dessas populações (MACIEL et al., 2002; VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

Entretanto, o uso popular é insuficiente para validar científica e eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Em geral, as virtudes terapêuticas desses vegetais são difundidas pela própria população, que os utilizam baseadas em estudos empíricos de tentativa e erro que, em muitos casos, pode significar potencial risco à saúde dos usuários (MACIEL et al., 2002). Assim sendo, torna-se importante e necessária a realização de estudos criteriosos para que haja comprovação, ou não, dos efeitos farmacológicos atribuídos pela população (CORRÊA et al., 2003).

A pesquisa com plantas utilizadas na medicina popular tem despertado grande interesse de pesquisadores de diversas áreas, pois muitas delas tiveram seus efeitos biológicos comprovados após investigações químico-farmacológicas adequadas (CORRÊA et al., 2003). Comparativamente, são encontradas mais atividades farmacológicas em plantas utilizadas na medicina popular que naquelas escolhidas ao acaso para estudo (CACHINEL-FILHO; YUNES, 1998), o que as torna uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos ou que se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos

(GUERRA; NODARI, 2007; SCHMIDT et al., 2008). Mais de 90% das classes terapêuticas conhecidas atualmente são derivadas de protótipos naturais (MCCHESENEY et al., 2007).

Estudos realizados em 2005 relatam que o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 320 bilhões de dólares ao ano, com crescimento estimado entre 10 e 20%, o que se deve a uma tendência de valorização de hábitos saudáveis de vida, à comprovação da eficácia de fitoterápicos e aos preços significativamente menores que os dos medicamentos de origem sintética. Porém, esse crescente e promissor mercado é liderado por empresas sediadas em países altamente industrializados como Alemanha, França, Estados Unidos e Japão, cujos produtos muitas vezes são derivados de plantas nativas de países em desenvolvimento, cabendo a estes últimos, na maioria das vezes detentores de grande biodiversidade e de conhecimento acerca do uso de plantas como medicamentos, o papel de meros pagadores de *royalties* (FUNARI; FERRO, 2005; RATES, 2001).

O Brasil possui uma extensa e diversificada flora, que compreende cerca de um terço da flora mundial, além disso, é estimado que populações indígenas brasileiras dominem a aplicação de pelo menos 1300 espécies como medicamentos. Portanto, nosso país deveria ocupar uma posição privilegiada em relação ao desenvolvimento de produtos fitoterápicos ou de substâncias puras biologicamente ativas. Porém, o que se observa é uma situação paradoxal: os fitoterápicos mais vendidos no país são produzidos a partir de espécies estrangeiras ou são produtos acabados oriundos de nossa própria matéria-prima, reimportados com alto valor agregado (YUNES et al., 2001).

Estudos interdisciplinares envolvendo aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos, com espécies vegetais tidas como medicinais pela população, podem encurtar o caminho para o desenvolvimento de novos medicamentos, servem como embasamento para o uso terapêutico seguro desses vegetais, e contribuem para a preservação e valorização de um

conhecimento que fora desenvolvido, acumulado e aprimorado por séculos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; HEINRICH, 2003; HEINRICH et al., 2006).

Dessa forma, fica evidente que estudos científicos de plantas brasileiras podem alavancar a indústria de medicamentos no país, tendo conseqüências sócio-econômicas significativas pela diminuição de gastos com importação e a disponibilização de medicamentos mais baratos à população, além de aumentar a autonomia nacional para a criação e o gerenciamento de políticas de saúde (DOS SANTOS, 2001).

A floresta tropical amazônica, reconhecida por sua riqueza vegetal, é uma valiosa fonte de plantas com potencial terapêutico, uma vez que a probabilidade de obtenção de produtos terapeuticamente ativos aumenta com a diversidade de espécies (GUERRA; NODARI, 2007). O Estado do Amazonas, que concentra grande parte desta floresta, tem uma população extremamente habituada ao uso de plantas medicinais e detentora de muito conhecimento acerca de virtudes terapêuticas de plantas da região.

Em uma breve visita aos mercados locais ou mesmo observando algumas barracas dispostas em calçadas da cidade de Manaus, são facilmente encontradas folhas, cascas e raízes rasuradas e embaladas, além das chamadas “garrafadas” (alcoholaturas de partes de um ou de vários vegetais) e pós de partes de vegetais encapsulados, inclusive com expressas indicações terapêuticas, constituindo uma espécie de “farmácia viva”, na qual a população local deposita grande confiança (Figura 1.1, pág. 23). Essa interação população-natureza reflete, além de questões econômicas, a notória influência de culturas indígenas.

Apesar desses fatos, a pesquisa com plantas medicinais da região é escassa e pouco contribui para o conhecimento científico de plantas medicinais brasileiras (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2000). Isso tem impacto negativo não somente do ponto de vista econômico, mas também sócio-cultural, uma vez que muito do conhecimento tradicional

acerca de plantas medicinais na região vem se perdendo pela influência de outras culturas e pela ausência de registros oficiais.



Figura 1.1 – Amostras comerciais de uma planta medicinal coletadas na cidade de Manaus. A – cascas de caule embaladas e seu respectivo pó encapsulado; B – detalhes das cascas; C – detalhes das cápsulas.

Por todo o exposto, visando contribuir com o estudo de plantas medicinais amazônicas e intencionando que esse estudo possa se traduzir em benefícios para a população como um todo, este trabalho realizou estudo farmacognóstico e farmacológico de *Byrsonima japurensis*, espécie de amplo uso como medicamento entre a população do Estado do Amazonas.

Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa intitulado “Identificação de espécies botânicas amazônicas como potenciais fitoterápicos: estudos etnobotânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos”, financiando pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. O referido projeto teve a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, sob o registro 038/2006, e a autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente, sob registro 034/2008, para ser executado (Anexos A e B).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A família Malpighiaceae Juss.

Malpighiaceae é uma família de árvores, arbustos, subarbustos e lianas com aproximadamente 60 gêneros e 1250 espécies, que se distribuem em florestas tropicais, subtropicais e savanas do Velho e Novo Mundo (Figura 2.1). Dentre os gêneros reconhecidos, 47 são exclusivamente neotropicais, dos quais se destacam: *Banisteria*, *Byrsonima*, *Malpighia*, *Stigmaphyllon* e *Thryallis* (DAVIS et al., 2002; GIESE, 2005). No Brasil encontram-se 32 gêneros e 300 espécies, distribuídas por todas as regiões do país (LOMBELLO, 2000).

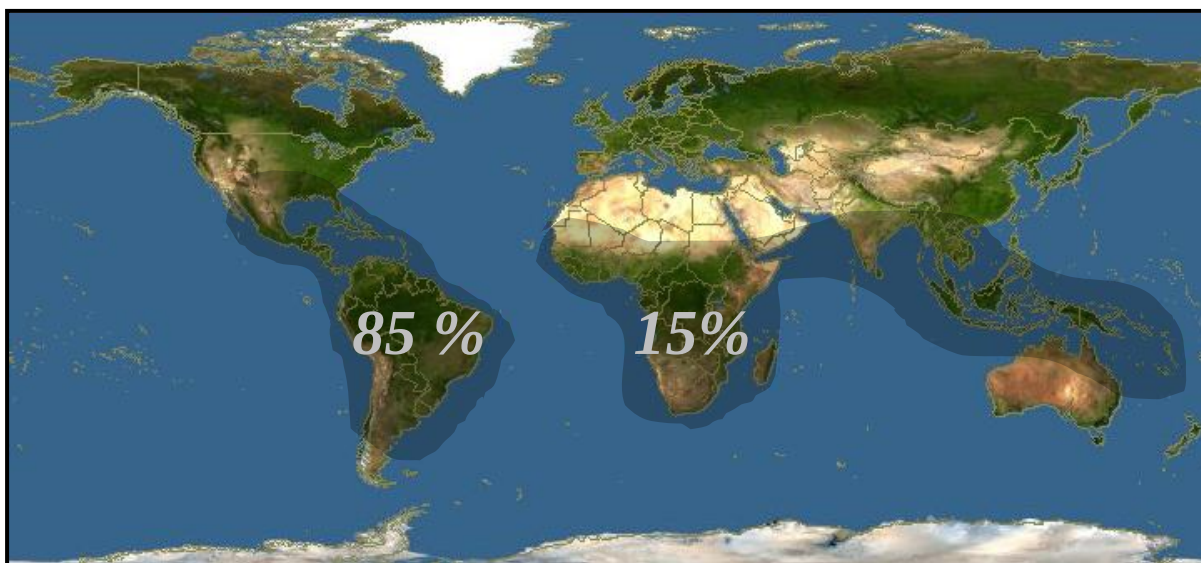


Figura 2.1 – Distribuição geográfica da família Malpighiaceae.
FONTE: Davis et al. (2002).

As folhas desta família são inteiras, alternas, opostas, com pêlos na forma de “T”, conhecidos como pêlos malpighiáceos. As flores são hermafroditas, agrupadas em inflorescências vistosas, geralmente amarelas ou rosadas, facilmente reconhecíveis pela presença de um par de glândulas na base externa de cada uma das cinco sépalas (VICENTINI; ANDERSON, 1999). Ao contrário das flores, seus frutos possuem extrema diversidade

morfológica, podendo ser indeiscentes carnosos ou secos, secos deiscentes, com ou sem alas, glabros ou pilosos (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

2.2 Gênero *Byrsonima* Rich. ex Kunth

O gênero *Byrsonima* é composto de aproximadamente 150 espécies, com distribuição marcadamente neotropical (TEIXEIRA; MACHADO, 2000; GIESE, 2005). O Brasil concentra 50% das espécies, que são encontradas principalmente nas Regiões Norte, Nordeste e Central, podendo também ser encontradas na Região Sudeste do país, em áreas de cerrado (CARDOSO, 2006).

A madeira dessas espécies é leve, sendo utilizada na construção civil para a fabricação de caibros e vigas. Algumas delas já foram bastante empregadas em curtumes e para tingir tecidos, devido à grande quantidade de tanino e matéria tintorial nas cascas. Com flores vistosas, frutos que atraem aves e rápido crescimento, tais espécies têm grande potencial como plantas ornamentais e também são úteis na recuperação de áreas degradadas (VICENTINI; ANDERSON, 1999).

No Norte e Nordeste do Brasil os frutos de espécies de *Byrsonima*, genericamente conhecidos como “murici”, são bastante apreciados para o consumo *in natura* e muito utilizados para fazer sucos, licores, geléias e doces (CARDOSO, 2006). Além do uso dos frutos como alimento, várias partes de diversas espécies têm emprego popular como medicamentos. A tabela 2.1 (pág. 26) mostra alguns usos etnofarmacológicos de espécies de *Byrsonima* reportados na literatura.

Tabela 2.1 - Usos etnofarmacológicos de espécies de *Byrsonima*

Espécie	Parte utilizada	Usos etnofarmacológicos	Referências
<i>B. basiloba</i>	Folhas	Antidiarréico, tratamento de úlceras gástricas	LIRA et al., 2008
<i>B. crassa</i>	Folha e casca do caule	Anti-diarréico, antiemético, diurética, febrífuga, tratamento doenças de pele, gastrite, picadas de cobra e úlceras gástricas	CARDOSO et al., 2006 SANNOMIYA et al., 2004 SANNOMIYA et al., 2005b
<i>B. crassifolia</i>	Folha, casca do caule, fruto e semente	Abortivo, antidiarréico, anti-inflamatório, antimalárico, digestivo, diurético, febrífugo, laxativo, tratamento de amenorréia, asma, bronquite, cólicas, dor de dente, infecções na pele e mucosas, leucorréia, parasitoses intestinais, perda de apetite, picadas de cobra, tosses e para expelir placenta	AMARQUAYE et al., 1994 BEJAR et al., 1995 BERGER et al., 1998 CÁCERES et al., 1990 CÁCERES et al., 1991 CÁCERES et al., 1993 CÁCERES et al., 1998 GEISS et al., 1995 RASTRELLI et al., 1997 REZENDE; FRAGA, 2003 SILVA, E. et al., 2007
<i>B. fagifolia</i>	Folha e casca do caule	Antiemético, diurético, tratamento de gastrite e úlceras gástricas	SANNOMIYA et al., 2007a
<i>B. intermedia</i>	Casca do caule	Tratamento de bronquites e tosses	BONZANI DA SILVA, 1970b
<i>B. sericea</i>	Folha	Antidiarréico e para o tratamento de diabetes	BOSCOLO et al., 2007
<i>B. verbascifolia</i>	Folha e casca da raiz	Tratamento de doenças de pele	DOSSEH et al., 1980 LOPEZ et al., 2001

2.2.1 Estudos científicos com espécies do gênero *Byrsonima*

Buscas realizadas em bases de dados de revistas científicas utilizando a palavra chave “*Byrsonima*”, obtiveram os seguintes resultados, incluindo patentes: 152 ocorrências na base de dados ISI Web of Knowledge, 124 ocorrências na base de dados Scopus, 113 ocorrências na base de dados Scifinder Scholar, 33 ocorrências na base de dados Pubmed e 43 ocorrências na base de dados SciELO. Para efeito da revisão bibliográfica dessa dissertação, apenas os trabalhos que se referiam a estudos químicos e/ou farmacológicos com espécies do gênero *Byrsonima*, datados de 1970 a 2008, foram considerados. As patentes foram excluídas.

De acordo com essa pesquisa, 11 espécies do gênero foram estudadas do ponto de vista farmacológico, sendo a maioria desses estudos relacionados à investigação da capacidade antimicrobiana (bactérias, enterobactérias, micobactérias, fungos, *Tripanossoma* spp. e *Leishmania* spp.) e antioxidante de extratos brutos. Mais detalhes sobre esses estudos são encontrados na tabela 2.2 (pág. 28-33), onde os resultados são limitados aos extratos e concentrações testados, e no caso de testes com micro-organismos, às espécies testadas.

Sete espécies foram estudadas do ponto de vista químico, destacando-se estudos com as folhas. De maneira geral, esses estudos reportam o isolamento e identificação de substâncias químicas, dentre as quais predominam flavonóides e terpenos. Mais detalhes sobre esses estudos são encontrados na tabela 2.3 (pág. 34-40), e no quadro 2.1 (pág. 41-47), são encontradas as estruturas das substâncias nela citadas. Somente três trabalhos que tratam apenas de identificação de substâncias não foram detalhados na referida tabela: Rezende; Fraga (2003) e Alves; Franco (2003) que identificaram cerca de 50 substâncias voláteis diferentes em frutos de *Byrsonima crassifolia*, e Thonsem; Brimer (1997), que detectaram constituintes cianogênicos nas folhas *Byrsonima crispa*.

Tabela 2.2 - Atividades farmacológicas investigadas em espécies do gênero *Byrsonima*

Espécie	Parte estudada	Atividade farmacológica investigada	Resultado	Referências
<i>B. basiloba</i>	Folha	Antidiarréica	Ativo ^{i,j}	FIGUEIREDO et al., 2005
		Antibacteriana	Ativo (várias) ^{i,j}	MICHELIN et al., 2008
		Antifúngica	Ativo (<i>Candida albicans</i>) ^{i,j}	
		Antimicobacteriana	Pouco ativo (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) ^{d,f}	ARANTES et al., 2005
		Antimutagênica	Ativo (<i>Salmonella typhimurium</i>) ^{d,i}	LIRA et al., 2008
<i>B. bucidaefolia</i>	Casca do caule e folha	Leishmanicida	Ativo (forma promastigota de <i>Leishmania mexicana</i>) ⁱ	PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007
<i>B. coccolobifolia</i>	Folha	Antibacteriana	Ativo (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ^c	ALVES et al., 2000
		Antifúngica	Inativo (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>) ^c	
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>) ^c	
		Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria glabrata</i>) ^c	
<i>B. crassa</i>	Folha	Antibacteriana	Ativo (várias) ^{e,i,j,l}	SANNOMIYA et al., 2005a
		Antifúngica	Ativo (<i>Candida albicans</i>) ^{e,i,j,l}	
		Antiulcerogênica	Ativo ^{i,j}	SANNOMIYA et al., 2005b
		Antimicobacteriana	Pouco ativo (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) ^{d,f}	ARANTES et al., 2005
			Ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ^{d,substâncias de d,i}	LEITE et al., 2008 HIGUCHI et al., 2008a
		Mutagênica	Ativo ^{i,j}	CARDOSO et al., 2006

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.2)

Espécie	Parte estudada	Atividade farmacológica investigada	Resultado	Referências
<i>B. crassa</i>	Casca do caule	Antimicobacteriana	Pouco ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ^{d, substâncias de d}	HIGUCHI et al., 2008a
<i>B. crassifolia</i>	Casca do caule	Antibacteriana	Ativo (várias) ^e	MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 1999
			Ativo (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) ^{f, l}	CÁCERES et al., 1998
		Antioxidante	Ativo ^m	SILVA, E. et al., 2007
		Antifúngica	Ativo (vários) ^l	CÁCERES et al., 1991
			Ativo (<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>) ^h	CÁCERES et al., 1993
			Ativo (<i>Candida albicans</i> ^f , <i>Cryptococcus neoformans</i> ^{f, l} , <i>Microsporum gypseum</i> ^f)	CÁCERES et al., 1998
		Antitripanossoma (forma epimastigota)	Inativo ^{a, f, l}	BERGER et al., 1998
			Inativo ^f	CÁCERES et al., 1998
		Antitripanossoma (forma tripomastigota)	Ativo ^j	BERGER et al., 1998
			Inativo ^f	CÁCERES et al., 1998
		Citotóxica (<i>Artemia salina</i>)	Inativo ^{a, f, l}	BERGER et al., 1998
			Inativo ^{b, f, l}	CÁCERES et al., 1998
		Enterobactericida	Ativo (<i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i>) ^h	CÁCERES et al., 1990
		Espasmogênica	Ativo ^f	BEJAR; MALONE, 1993
		Estimulante/depressora do sistema nervoso central	Ativo (efeito depressor) ^l	CIFUENTES et al., 2001

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.2)

Espécie	Parte estudada	Atividades farmacológicas avaliadas	Resultados	Referências
<i>B. crassifolia</i>	Casca do caule	Leishmanicida	Ativo (forma promastigota de <i>Leishmania mexicana</i>) ⁱ	PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007
		Tóxica	Inativo (via oral e intraperitoneal em camundongos) ^f	CÁCERES et al., 1998
	Folha	Antioxidante	Ativo ^m	SILVA, E. et al., 2007
		Antifúngica	Pouco ativo (<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>) ^h	CÁCERES et al., 1993
		Antitripanossoma (forma epimastigota)	Inativo ^{a, f, l}	BERGER et al., 1998
		Antrípanossoma (forma tripomastigota)	Ativo ^{a, f, l}	
		Citotóxica (<i>Artemia salina</i>)	Inativo ^{a, f, l}	
		Espasmogênica	Ativo ^{substâncias de i}	BEJAR et al., 1995
			Ativo ^f	BEJAR; MALONE, 1993
		Estimulante/depressora do sistema nervoso central	Ativo (efeito depressor) ^l	CIFUENTES et al., 2001
		Leishmanicida	Ativo	PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007
	Flor	Antifúngica	Ativo (<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>) ^h	CÁCERES et al., 1993
	Fruto	Antioxidante	Ativo ^m	SILVA, E. et al., 2007
		Antifúngica	Ativo (<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>) ^h	CÁCERES et al., 1993
	Raiz	Antibacteriana	Ativo (várias) ^{e, i}	MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 1999

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.2)

Espécie	Parte estudada	Atividade farmacológica investigada	Resultado	Referências
<i>B. crassifolia</i>	Raiz	Antifúngica	Pouco ativo (<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i>) ^g	CÁCERES et al., 1993
<i>B. fagifolia</i>	Folha	Antibacteriana	Ativo ⁱ	LIMA, Z. et al., 2008
			Ativo (várias) ^{i,j}	MICHELIN et al., 2008
		Antidiarréica	Ativo ⁱ	LIMA, Z. et al., 2008
		Antifúngica	Ativo (<i>Candida albicans</i>) ^{i,j}	MICHELIN et al., 2008
		Antimicobacteriana	Pouco ativo (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) ^{d,f}	ARANTES et al., 2005
			Ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ^d , substâncias de d, i, j	HIGUCHI et al., 2008b
		Antioxidante	Ativo ⁱ	LIMA, Z. et al., 2008
		Antiulcerogênica	Ativo (ensaio do etanol/mecanismo antioxidante) ⁱ	
		Mutagênica	Inativo ⁱ	
<i>B. gardneriana</i>	Partes aéreas	Antioxidante	Ativo ⁱ	DAVID et al., 2007
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>) ⁱ	
<i>B. intermedia</i>	Folha	Antibacteriana	Não determinado ^{i,l}	ALVES et al., 2000
			Ativo (várias) ^{i,j}	MICHELIN et al., 2008
		Antifúngica	Ativo (<i>Candida albicans</i>) ^{i,j}	
			Inativo (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>) ^{i,l}	ALVES et al., 2000
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>) ^{i,l}	
		Genotóxica	Inativo ^{d,i,j}	SANNOMIYA et al., 2007a
		Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria glabrata</i>) ⁱ	ALVES et al., 2000

(continua)

(Continuação da Tabela 2.2)

Espécie	Parte Estudada	Atividade farmacológica investigada	Resultado	Referências
<i>B. intermedia</i>	Folha	Mutagênica	Ativo ⁱ	SANNOMIYA et al., 2007a
<i>B. japurensis</i>	Casca do caule	Antimicobacteriana	Pouco ativo (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ^b	GRAHAM et al., 2003
<i>B. sericea</i>	Casca do caule	Estimulante/depressora do sistema cardiovascular e cardiorrespiratório	Ativo (efeito depressor) ^{f, l}	BARROS et al., 1970
		Estimulante/depressora sobre órgãos isolados	Ativo (efeito estimulante sobre coração de sapo, duodeno de coelho e útero de rata e efeito inibitório sobre íleo de cobaia) ^{f, l}	
		Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria straminea</i>) ^{f, l}	SILVA, M. et al., 1971
		Tóxica	Ativo (camundongos e peixes) ^{f, l}	BARROS et al., 1970
	Casca da raiz	Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria straminea</i>) ^{f, l}	SILVA, M. et al., 1971
	Folha	Antioxidante	Ativo ^f	BOSCOLO et al., 2007
		Moluscicida	Ativo (<i>Biophalaria straminea</i>) ^{f, l}	SILVA, M. et al., 1971
	Fruto	Moluscicida	Inativo (<i>Biomphalaria straminea</i>) ^{f, l}	
	Madeira	Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria straminea</i>) ^{f, l}	
<i>B. verbascifolia</i>	Casca da raiz	Antibacteriana	Ativo (<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) ⁱ	LOPEZ et al., 2001
		Antifúngica	Inativo (<i>Candida albicans</i>) ⁱ	
		Antimicobacteriana	Ativo (<i>Mycobacterium phlei</i>) ⁱ	
		Antiviral	Ativo (vírus da herpes simples) ⁱ	
		Estimulante de fagocitose	Ativo ^g	DELAVEAU et al., 1980

(continua)

(Continuação da Tabela 2.2)

Espécie	Parte Estudada	Atividade farmacológica investigada	Resultado	Referências
<i>B. verbascifolia</i>	Casca do caule	Antibacteriana	Ativo (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ^{i, l}	ALVES et al., 2000
<i>B. verbascifolia</i>	Casca do caule	Antifúngica	Inativo (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>) ^{i, l}	ALVES et al., 2000
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>) ^{i, l}	
		Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria glabrata</i>) ^{i, l}	
	Folha	Antibacteriana	Ativo (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) ^c	LOPEZ et al., 2001
			Ativo (<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) ⁱ	
		Antifúngica	Inativo (<i>Cladosporium sphaerospermum</i>) ^c	ALVES et al., 2000
			Inativo (<i>Candida albicans</i>) ⁱ	LOPEZ et al., 2001
		Antimicobacteriana	Ativo (<i>Mycobacterium phlei</i>) ⁱ	
		Antiviral	Ativo (vírus da herpes simples) ⁱ	
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>) ^c	ALVES et al., 2000
		Moluscicida	Ativo (<i>Biomphalaria glabrata</i>) ^c	

a = extrato hexânico, *b* = extrato diclorometânico, *c* = extrato diclorometano : metanol (1 : 1), *d* = extrato clorofômico, *e* = extrato acetato de etila, *f* = extrato etanólico, *g* = etanólico a 10 %, *h* = etanólico a 50 %, *i* = extrato metanólico, *j* = extrato metanólico a 80 %, *l* = extrato aquoso, *m* = metanol : etanol : água : ácido clorídrico (69 : 20 : 10 : 10 : 1, *v* : *v* : *v* : *v*).

Tabela 2.3 – Substâncias isoladas de espécies do gênero *Byrsonima*

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. basiloba</i>	Folha	Ácido gálico <u>1</u> Amentoflavona <u>2</u> (+)-catequina <u>3</u> Metil galato <u>4</u> Quercetina-3-O-α-L-2''-galoilarabinopiranosídeo <u>5</u> Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) <u>6</u> Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→3)-O-[α-L-rhamnopiranosil-(1→6)]-β-D-alopiranosídeo <u>7</u> Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo <u>8</u> Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilgalactopiranosídeo <u>9</u>	FIGUEIREDO et al., 2005 LIRA et al., 2008
<i>B. crassa</i>	Folha	α-amirina <u>10</u> α-amirinona <u>11</u> β-amirina <u>12</u> Acetato de α-amirina <u>13</u> Acetato de β-amirina <u>14</u> Ácido oleanóico <u>15</u> Ácido ursólico <u>16</u> Amentoflavona <u>2</u> (+)-catequina <u>3</u> Derivados do ácido quínico <u>17a</u> – <u>17d</u> Derivados de proantocianidina <u>18</u> (-)-epicatequina <u>19</u>	HIGUCHI et al., 2008a SANNOMIYA et al., 2004 SANNOMIYA et al., 2005a SANNOMIYA et al., 2005b SANNOMIYA et al., 2005c

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. crassa</i>	Folha	Galato de (-)-epigallocatequina <u>20</u> Lupeol <u>21</u> Metil galato <u>4</u> Quercetina <u>22</u> Quercetina-3-O- α -L-2''-galoilarabinopiranosídeo <u>5</u> Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) <u>6</u> Quercetina-3-O- β -D-2''-galoilgalactopiranosídeo <u>9</u> Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (hiperina) <u>23</u>	HIGUCHI et al., 2008 SANNOMIYA et al., 2004 SANNOMIYA et al., 2005a SANNOMIYA et al., 2005b SANNOMIYA et al., 2005c
	Casca do caule	β -amirina <u>12</u> Friedelina <u>24</u>	HIGUCHI et al., 2008
<i>B. crassifolia</i>	Casca do caule	3-O-galoil-(+)-epicatequina <u>25</u> 3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]- 3-O-galoil-(+)-epicatequina <u>26</u> 3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]-(+)-epicatequina <u>27</u> 3-O-galoil-(-)-epicatequina-[4 β $\rightarrow$ 8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]-(+)-epicatequina <u>28</u> 3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]-(+)-epicatequina <u>29</u> Ácido gálico <u>1</u> (+)-catequina <u>3</u> (+)-epicatequina <u>30</u> (+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 6]-(+)-epicatequina <u>31</u> (+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]-(+)-epicatequina <u>32</u> (+)-epicatequina-[4 α $\rightarrow$ 8]- 3-O-galoil-(+)-epicatequina <u>33</u>	GEISS et al., 1995

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. crassifolia</i>	Folha	β-sitosterol <u>34</u> 1,2-di-<i>O</i>-(8-hexadecenoil)-3-<i>O</i>-(β-D-glicopiranosil)-glicerol <u>35</u> 1,2-di-<i>O</i>-(8-hexadecenoil)-3-<i>O</i>-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol <u>36</u> 1,2-di-<i>O</i>-palmitoil-3-<i>O</i>-(β-D-glicopiranosil)-glicerol <u>37</u> 1,2-di-<i>O</i>-miristoil-3-<i>O</i>-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol <u>38</u> 1,2-di-<i>O</i>-palmitoil-3-<i>O</i>-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol <u>39</u> 2-β-hidróxi-lupeol <u>40</u> Ácido aspártico <u>41</u> Ácido betulínico <u>42</u> Ácido 2-α-hidróxi-oleanóico <u>43</u> Ácido 2-β-hidróxi-oleanóico <u>44</u> Ácido 5-hidróxi-pipecólico <u>45</u> Ácido oleanóico <u>15</u> Ácido pipecólico <u>46</u> Betulina <u>47</u> Betulinaldeído <u>48</u> (+)-catequina <u>3</u> D-alanina <u>49</u> Daucosterol <u>50</u> (-)-epicatequina <u>19</u> Lupeol <u>21</u>	AMARQUAYE et al., 1994 BEJAR et al., 1995 RASTRELLI et al., 1997

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. crassifolia</i>	Folha	Metil galato <u>4</u> Quercetina <u>22</u> Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) <u>6</u> Quercetina-3-O- β -D-6''-galoilgalactopiranosídeo <u>51</u> Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (hiperina) <u>23</u> Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetina) <u>52</u> Prolina <u>53</u> Valina <u>54</u>	AMARQUAYE et al., 1994 BEJAR et al., 1995 RASTRELLI et al., 1997
<i>B. fagifolia</i>	Folha	α -amirina <u>10</u> β -amirina <u>12</u> 3-O-acetil-lupeol <u>55</u> Acetato de α -amirina <u>13</u> Acetato de β -amirina <u>14</u> Ácido bássico <u>56</u> Ácido gálico <u>1</u> Derivados do ácido quínico <u>17a</u> – <u>17e</u> Dotriacontano <u>57</u> Lupeol <u>21</u> Metil galato <u>4</u> Quercetina-3-O- β -D-2''-galoilgalactopiranosídeo <u>9</u> Quercetina-3-O- β -D-2''-galoilglicopiranosídeo <u>58</u>	HIGUCHI et al., 2008b LIMA, Z. et al., 2008 SANNOMIYA et al., 2007b

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. fagifolia</i>	Folha	Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo <u>52</u> Quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo <u>59</u> Quercetina-galoil-desóxihexose-hexosídeo <u>60</u> Quercetina-galoil-hexosídeo <u>61</u> Quercetina-hexosídeo <u>62</u>	LIMA, Z. et al., 2008 SANNOMIYA et al., 2007b
<i>B. intermedia</i>	Folha	Ácido gálico <u>1</u> Amentoflavona <u>2</u> (+)-catequina <u>3</u> (-)-epicatequina <u>19</u> Metil galato <u>4</u> Quercetina <u>22</u> Quercetina-3-O-α-L-2''-galoilarabinopiranosídeo <u>5</u> Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) <u>6</u> Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilgalactopiranosídeo <u>9</u> Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina) <u>23</u>	SANNOMIYA et al., 2007a
<i>B. intermedia</i>	Raiz	β-amirina <u>12</u> Ácido gálico <u>1</u> Pirocatequina <u>63</u> Pirogalol <u>64</u>	BONZANI DA SILVA, 1970a BONZANI DA SILVA, 1970b
	Flor	Ácido (3R, 7R)-3,7-diacetóxi-docosanóico (ácido birsônico) <u>65</u>	REIS et al., 2007

(Continua)

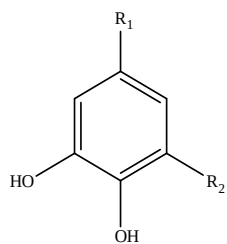
(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. microphylla</i>	Folha	3 β -eicosanato de 24-hidróxi-olean-12-enila <u>66</u> 3 β -eicosanato de 24-hidróxi-urs-12-enila <u>67</u> 3 β -estearato de 24-hidróxi-olean-12-enila <u>68</u> 3 β -estearato de 24-hidróxi-urs-12-enila <u>69</u> 3 β -palmitato de 24-hidróxi-olean-12-enila <u>70</u> 3 β -palmitato de 24-hidróxi-urs-12-enila <u>71</u> Ácido 3 β , 2 α -dihidróxi-urs-12-en-28-óico <u>72</u> Ácido oleanóico <u>15</u> Metil galato <u>4</u> Quercetina <u>22</u>	MENDES et al., 1999
	Madeira	Δ^1 -lupenona <u>73</u> 3,5-dicloro-6-(6-hidróxi-4-metóxi-3-metóxicarbonil-2-metil-fenóxi)-2-hidróxi-4-metil-benzoato <u>74</u> 3,7-dihidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-7,8-dihidro-6H-antraceno-1,4,5-triona <u>75</u> (2S, 3S)-3'-hidróxi-5,7,4'-trimetóxi-flavan-3-ol <u>76</u> (2S*, 10aR*)-2,8-dihidróxi-6-metóxi-1,1,7-trimetil-2,3,10,10a-tetrahidro-1-H-fenatreno-9-ona <u>77</u> 3-hidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-8H-antraceno-1,4,5-triona <u>78</u>	AGUIAR et al., 2005 ROCHA et al., 2006
<i>B. verbascifolia</i>	Casca	β -amirina <u>12</u> β -amirirona <u>79</u> β -sitosterol <u>34</u> 3-O-acetil-lupeol <u>55</u>	GOTTLIEB et al., 1975

(Continua)

(Continuação da Tabela 2.3)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas	Referências
<i>B. verbascifolia</i>	Casca	Ácido 3- <i>O</i> -acetil-oleanóico <u>80</u> Friedelina <u>24</u>	GOTTLIEB et al., 1975
	Folha	α -amirina <u>10</u> Ácido oleanóico <u>15</u> Ácido ursólico <u>81</u> Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) <u>6</u>	DOSSEH et al., 1980

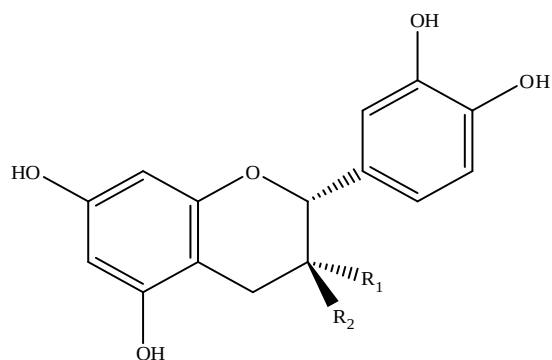
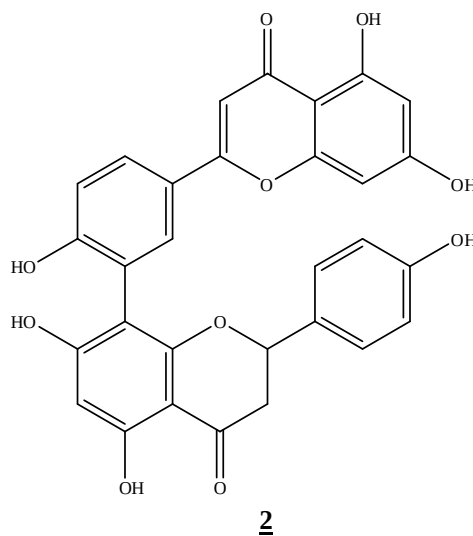
Quadro 2.1 – Estrutura das substâncias isoladas de espécies do gênero *Byrsonima*

$R_1 = COOH$, $R_2 = OH$ **1**

$R_1 = COOCH_3$, $R_2 = OH$ **4**

$R_1 = H$, $R_2 = H$ **63**

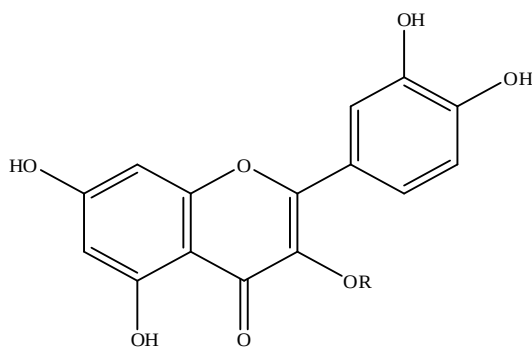
$R_1 = H$, $R_2 = OH$ **64**



$R_1 = H$, $R_2 = OH$ **3**

$R_1 = OH$, $R_2 = H$ **19**

$R_1 = \text{galoil}$, $R_2 = H$ **20**



$R = (2''\text{-galoil})\text{-}\alpha\text{-L- arabinopiranosil}$ **5**

$R = \alpha\text{-L- arabinopiranosil}$ **6**

$R = \alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1}\rightarrow\text{3)-O-[}\alpha\text{-L-rhamnopiranosil-(1}\rightarrow\text{6)]-}\beta\text{-D-alopiranosil}$ **7**

$R = \alpha\text{-L-ramnopiranosil-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopiranosil}$ **8**

$R = (2''\text{-galoil})\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosil}$ **9**

$R = H$ **22**

$R = \beta\text{-D-galactopiranosil}$ **23**

$R = (6''\text{-galoil})\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosil}$ **51**

$R = \beta\text{-D-glicopiranosil}$ **52**

$R = (2''\text{-galoil})\text{-}\beta\text{-D-glicopiranosil}$ **58**

$R = \beta\text{-D-xilopiranosil}$ **59**

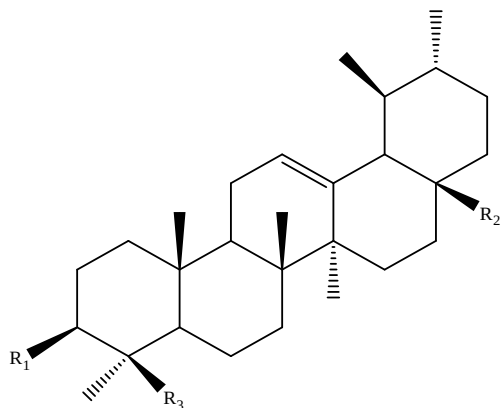
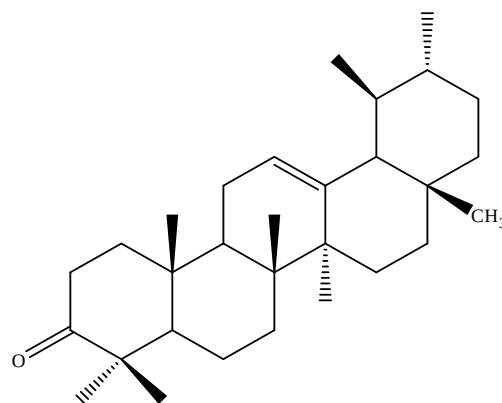
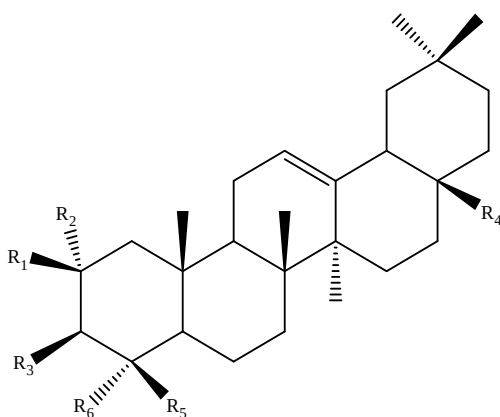
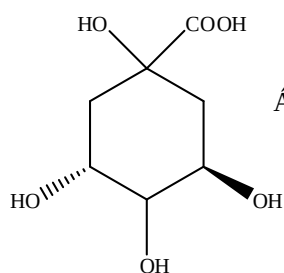
$R = \text{galoil-desóxihexosil-hexose}$ **60**

$R = \text{galoil-hexose}$ **61**

$R = \text{hexosil}$ **62**

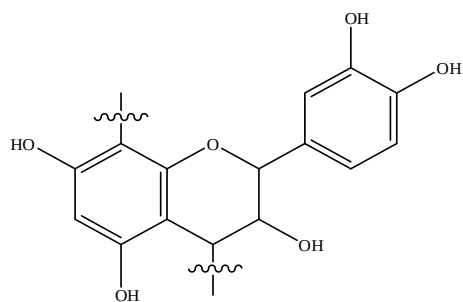
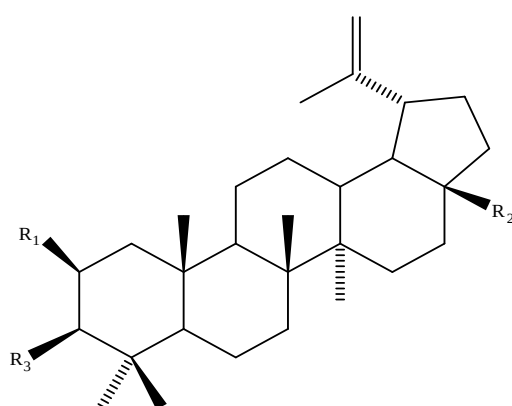
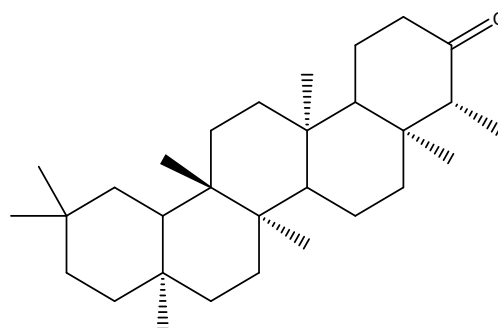
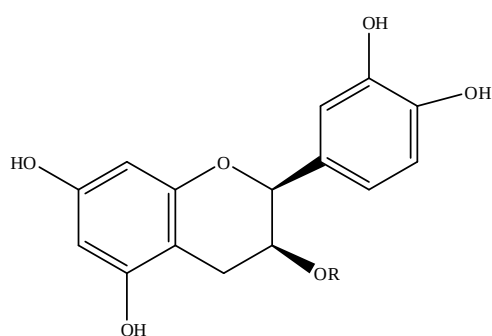
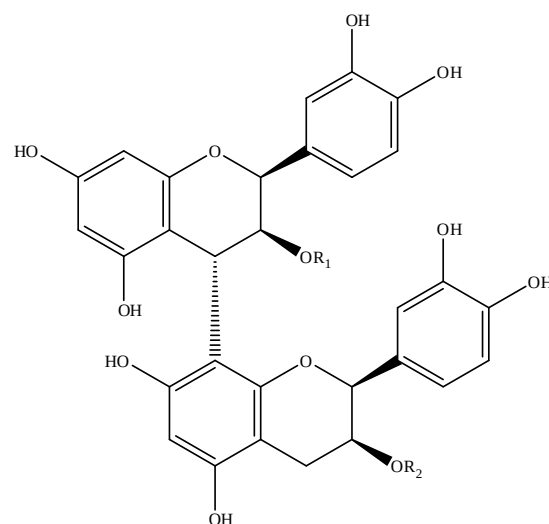
(Continua)

(Continuação do Quadro 2.1)

R₁ = OH, R₂ = CH₃ **10**R₁ = OCOCH₃, R₂ = CH₃ **13**R₁ = OH, R₂ = COOH **16****11**R₁ = R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = CH₃, R₅ = CH₃, R₆ = H **12**R₁ = R₂ = H, R₃ = OCOCH₃, R₄ = CH₃, R₅ = CH₃, R₆ = H **14**R₁ = R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = COOH, R₅ = CH₃, R₆ = H **15**R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OH, R₄ = COOH, R₅ = CH₃, R₆ = H **43**R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = COOH, R₅ = CH₃, R₆ = H **44**R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = COOH, R₅ = H, R₆ = OH **56**R₁ = R₂ = H, R₃ = OCO(CH₂)₁₈CH₃, R₄ = CH₃, R₅ = CH₂OH, R₆ = H **66**R₁ = R₂ = H, R₃ = OCO(CH₂)₁₈CH₃, R₄ = CH₃, R₅ = CH₂OH, R₆ = H **68**R₁ = R₂ = H, R₃ = OCO(CH₂)₁₈CH₃, R₄ = CH₃, R₅ = CH₂OH, R₆ = H **70**R₁ = R₂ = H, R₃ = OCOCH₃, R₄ = COOH, R₅ = CH₃, R₆ = H **80**R₁ = R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = COOH, R₅ = H, R₆ = H **81**Ácido quínico **17**Monogaloil substituído **17a**Digaloil substituído **17b**Trigaloil substituído **17c**Tetragaloil substituído **17d**Pentagaloil substituído **17e**

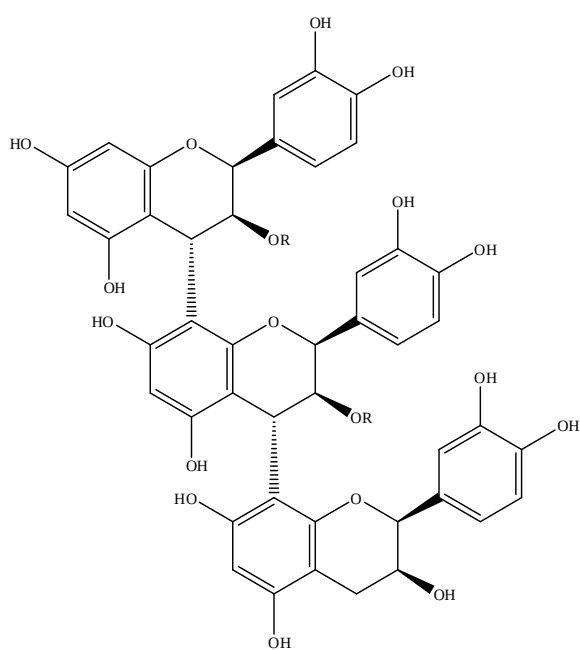
(Continua)

(Continuação do Quadro 2.1)

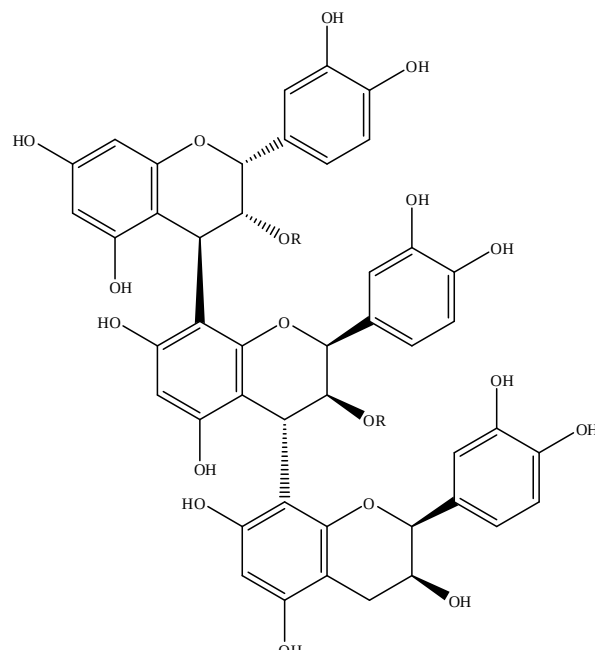
Proantocianidinas **18**Monômero **18a**Monômero monogaloil substituído **18a₁**Dímero **18b**Dímero digaloil substituído **18b₁**Trímero **18c**Tetrâmero **18d**Pentâmero **18e** $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = OH$ **21** $R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = OH$ **40** $R_1 = OH, R_2 = COOH, R_3 = OH$ **42** $R_1 = H, R_2 = CH_2OH, R_3 = OH$ **47** $R_1 = OH, R_2 = CHO, R_3 = OH$ **48** $R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = OCOCH_3$ **55****24** $R = \text{galoil}$ **25** $R = H$ **30** $R_1 = R_2 = \text{galoil}$ **26** $R_1 = H, R_2 = \text{galoil}$ **29** $R_1 = R_2 = H$ **32** $R_1 = \text{galoil}, R_2 = H$ **33**

(Continua)

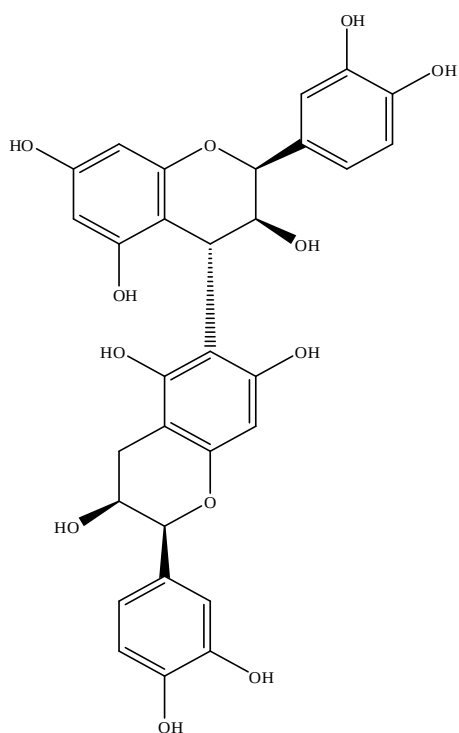
(Continuação do Quadro 2.1)



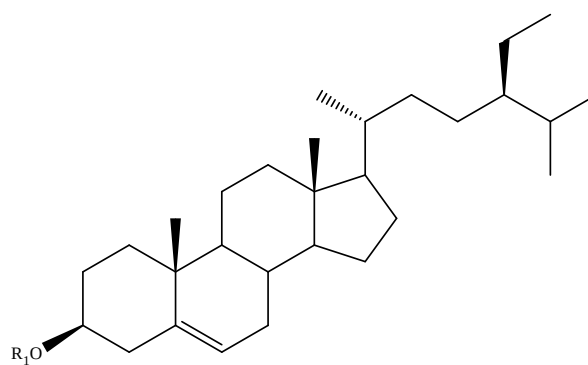
R = galoil **27**



R = galoil **28**

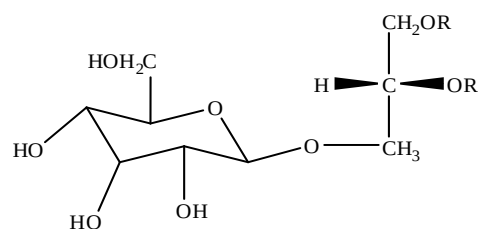


31



R₁ = H **34**

R₁ = glicosil **50**

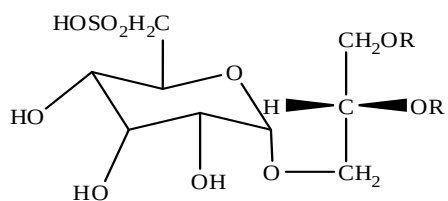


R = hexadecenoil **35**

R = palmitoil **37**

(Continua)

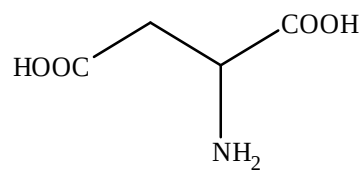
(Continuação do Quadro 2.1)



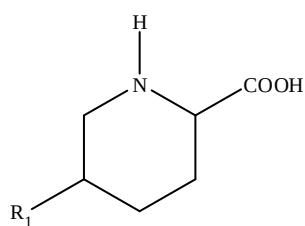
R = hexadecenoil 36

R = miristoil 38

R = palmitoil 39

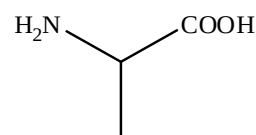


41

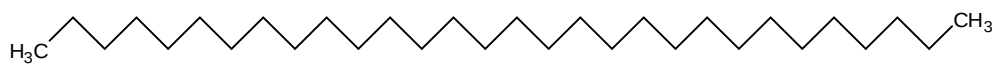


R₁ = OH 45

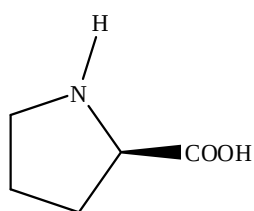
R₁ = H 46



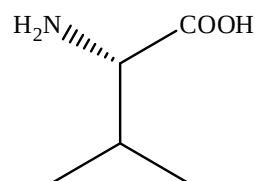
49



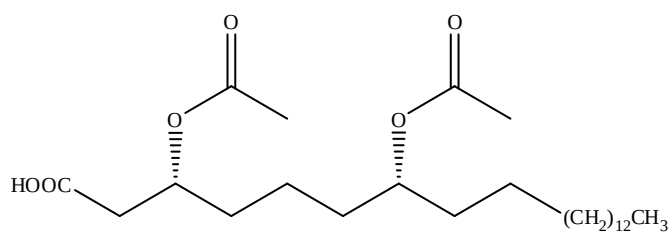
57



53



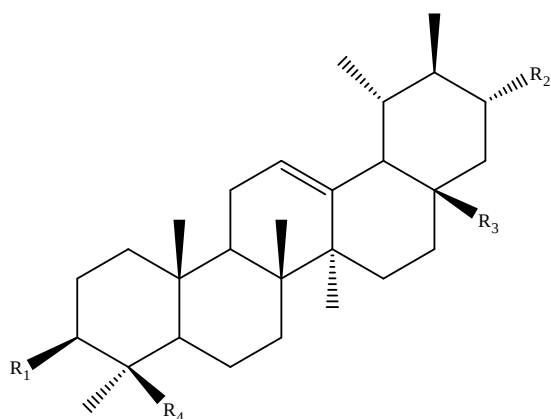
54



65

(Continua)

(Continuação do Quadro 2.1)

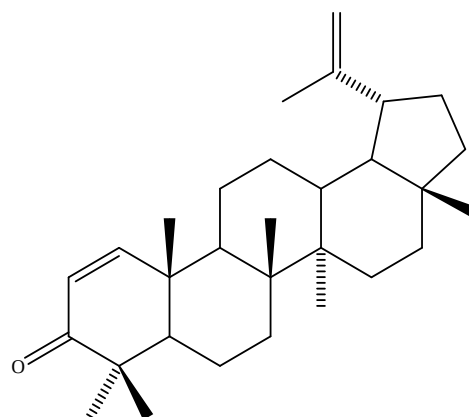


R₁ = CH₃(CH₂)₁₈COO, R₂ = H, R₃ = CH₃, R₄ = CH₂OH **67**

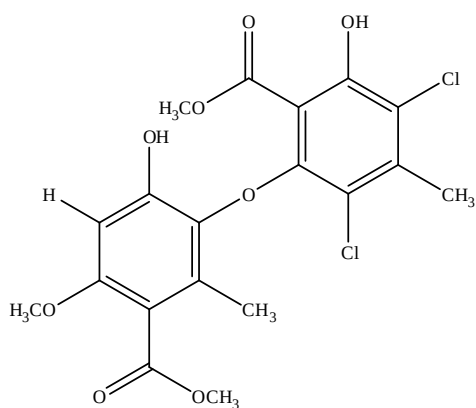
R₁ = CH₃(CH₂)₁₆COO, R₂ = H, R₃ = CH₃, R₄ = CH₂OH **69**

R₁ = CH₃(CH₂)₁₄COO, R₂ = H, R₃ = CH₃, R₄ = CH₂OH **71**

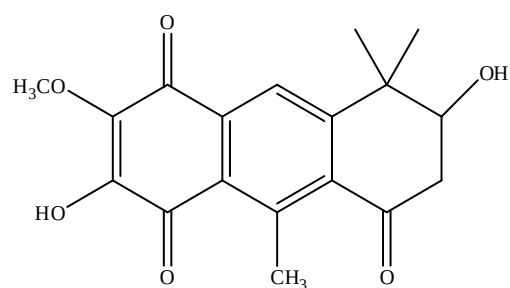
R₁ = R₂ = OH, R₃ = COOH, R₄ = CH₃ **72**



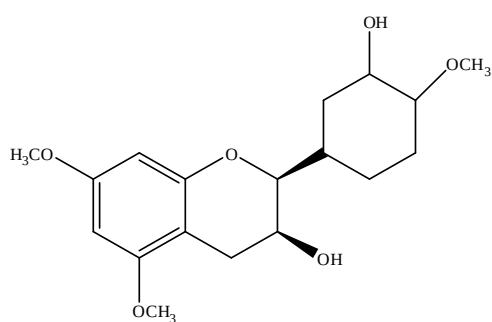
73



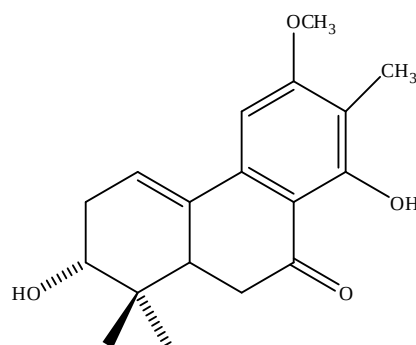
74



75



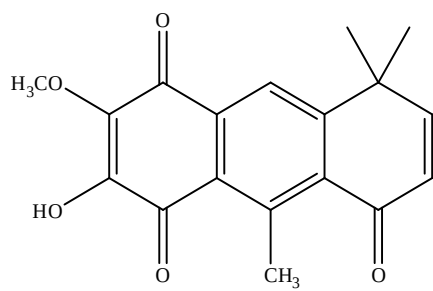
76



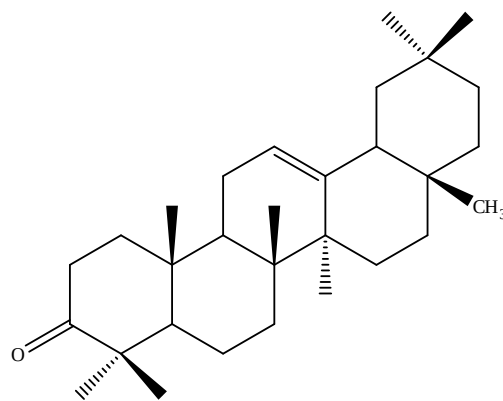
77

(Continua)

(Continuação do Quadro 2.1)



78



79

2.2.2 *Byrsonima japurensis*

Byrsonima japurensis A. Juss. (sinonímias: *B. fluminensis* Nied., *B. inundata* Benth., *B. japurensis* subespécie *fluminensis* (Nied.) Cuatrec., *B. japurensis* subespécie *silvatica* Cuatrec. e *B. uvulifera* Spruce) é uma espécie arbórea endêmica da Região Amazônica, com registros de ocorrência na maioria dos países dessa região, nomeadamente, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela, sendo tipicamente encontrada em áreas de várzea. Esta espécie pode atingir cerca de 20 metros de altura quando adulta e possui flores cor-de-rosa com estames amarelos e caracteres típicos das malpighiáceas. Seus frutos são pequenos e globosos, amarelos e comestíveis quando maduros (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009; THE FIELD MUSEUM, 2009a) (Figura 2.2).

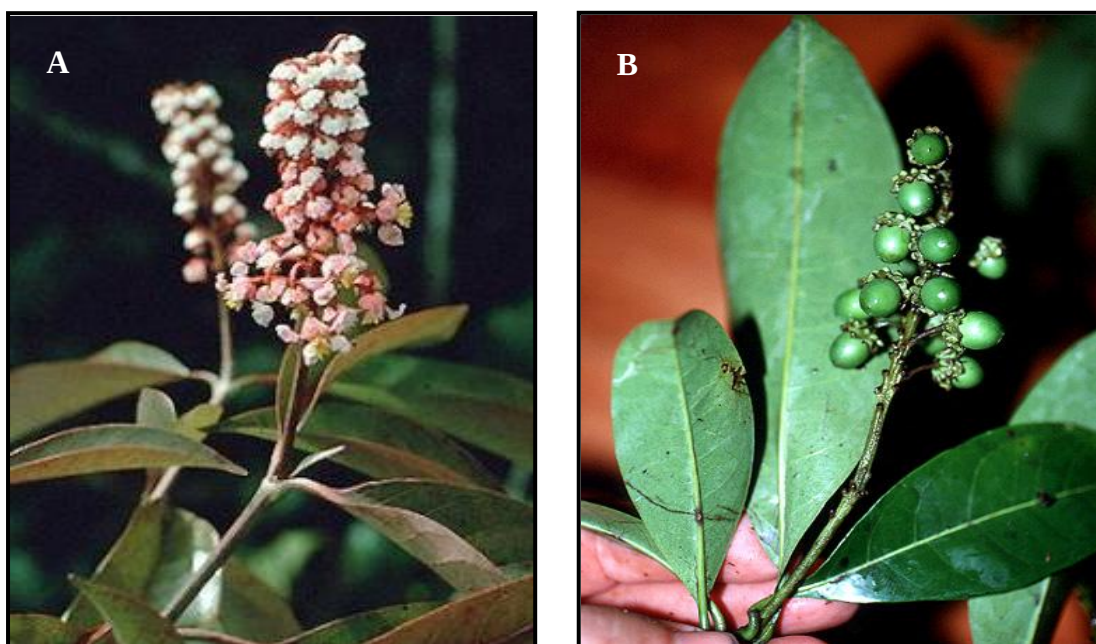


Figura 2.2 – *Byrsonima japurensis*. A - Detalhes das flores; B – Detalhe das folhas e frutos.
Fonte: A – Missouri Botanical Garden (2009); B – The Field Museum (2009b).

Byrsonima japurensis encontra-se taxonomicamente classificada conforme a figura 2.3 (pág. 49).

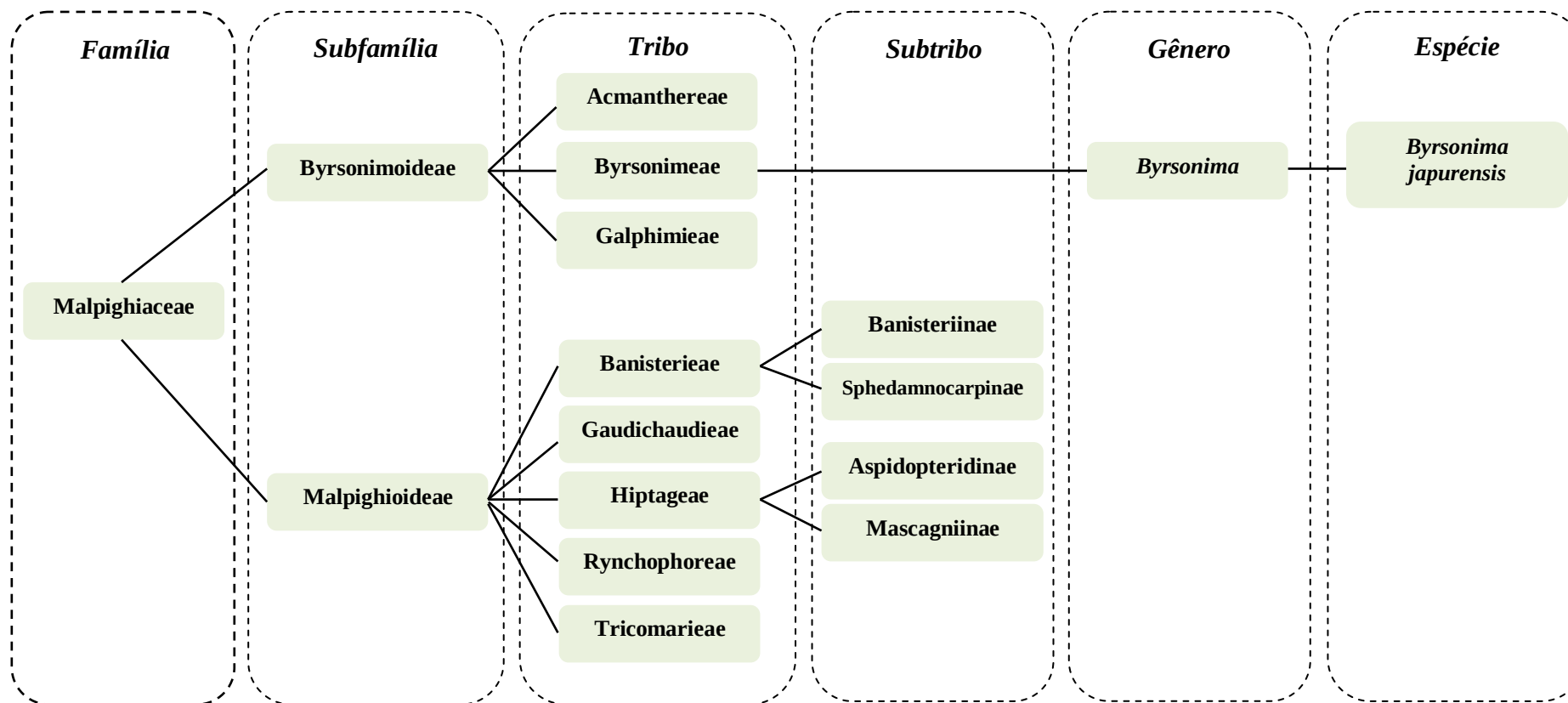


Figura 2.3 – Classificação taxonômica de *Byrsonima japurensis*.
 Fonte: Adaptado de Lombello (2000).

No Estado do Amazonas (Brasil), onde é popularmente conhecida como muruci, muruxi, mucuxi, murici, murici da várzea ou sara-tudo, seus frutos não são muito apreciados para consumo, servindo mais à alimentação de peixes. Seu principal uso é na medicina popular, na qual chás ou alcoolaturas da casca do caule são empregados com diversas finalidades terapêuticas, entre as quais, para tratar úlceras gástricas, gastrite, diarreia, cólicas, dor no estômago, infecção intestinal, hemorróidas, dor na garganta, corrimentos e tumores no útero, problemas na próstata, no fígado e ferimentos diversos.

De acordo com o Senhor Francisco Medeiros Cavalcante, mateiro e representante da comunidade da Vila do Purupuru, origem da amostra utilizada neste trabalho, a casca desta espécie deve ser coletada de maneira muito cuidadosa, pois os pedaços que caem sobre a água não podem ser aproveitados, visto que, uma vez molhados, eles passam a “fazer mal à saúde”. Por esse motivo, e também pela dificuldade de acesso ao seu *habitat*, as cascas são preferencialmente coletadas no período de vazante (seca) dos rios.

Após a coleta, as cascas são raspadas, secadas à sombra e rasuradas, e com as lascas são produzidos os chás ou alcoolaturas (empregando como solvente uma mistura de cachaça e água), consumidos diariamente até que cessem os sintomas da doença. A posologia empregada é de dois dedos do chá ou a medida de uma tampa de refrigerante da alcoolatura diluída em um copo de água, de uma a duas vezes por dia, sendo que a última opção é aplicada apenas nos casos mais graves, pois as preparações com essa droga vegetal são consideradas “fortes”.

A despeito do uso terapêutico, a casca também já foi muito utilizada por ribeirinhos (como são conhecidos os moradores das margens dos rios) para o tingimento de malhadeiras (instrumentos utilizados para a pesca), pois a cor escura que o extrato lhe conferia, enganaria os peixes por se assemelhar a cor da água dos rios da região.

2.3 Busca por novos anti-inflamatórios

A inflamação é uma resposta não específica da microcirculação a injúrias teciduais provocadas por estímulos de origem física, química ou biológica, ou alguma combinação destes (MORGAN, 2007).

As alterações bioquímicas e celulares características dos processos inflamatórios são reguladas pela liberação imediata e sequencial de mediadores da inflamação, dentre os quais podem ser citados os produtos da degranulação de mastócitos, fator ativador de plaquetas (PAF), bradicinina, componentes do sistema complemento, citocinas e eicosanóides. Esses mediadores são responsáveis pelos cinco sinais característicos da resposta inflamatória: dor, calor, rubor e tumor, que podem vir acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (BURKE et al., 2006; COUSSENS; WERB, 2002; JANEWAY JUNIOR et al., 2007).

Em última instância, o objetivo da inflamação é livrar o organismo de patógenos e corpos estranhos e/ou reparar os danos teciduais decorrentes dos diversos estímulos inflamatórios. Portanto, a inflamação é fundamentalmente um mecanismo de proteção, sem o qual as infecções não seriam sustadas e as feridas jamais cicatrizariam (BOGLIOLO et al., 1993; ROBBINS et al., 1996; SIMÃO DA SILVA, 2007).

Entretanto, quando ocorre perda do controle homeostático, que é relativamente comum dada a diversidade e quantidade de estímulos inflamatórios existentes, a inflamação assume um papel destrutivo, maléfico ao organismo. Por isso, a inflamação está intimamente relacionada com doenças de alto impacto coletivo (Quadro 2.2, pág. 52). Em muitos casos, quando os eventos patogénéticos de uma determinada doença não são conhecidos, tratar a inflamação relacionada é a melhor opção (NATHAN, 2002; VITOR, 2007).

Doenças consideradas inflamatórias	
Anafilaxia	Gota
Asma	Injúria pós-isquêmica
Artrite Reumatóide	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Aterosclerose	Osteoartrite
Colite ulcerativa	Pênfigo
Dermatite atópica	Psoríase
Diabetes mellitus tipo I	Sarcoidose
Doença de Alzheimer	Síndrome da febre periódica
Doença de Crohn	Tireoidite de Hashimoto
Doença pulmonar obstrutiva crônica	Vasculite
Esclerose múltipla	Rejeição xenográfica
Doenças de origem infecciosa com prognóstico agravado pela inflamação	
Disenteria bacteriana	Hanseníase (forma tuberculóide)
Doença de Chagas	Hepatite C
Filariose	Meningite por <i>Neisseria</i> sp. ou <i>Pneumococcus</i> sp.
Fibrose cística	Pneumonia por vírus Influenza
Gastrite por <i>Helicobacter pylori</i>	Síndrome séptica
Glomerulonefrite estreptocócica	Tuberculose
Patologias causadas por fibrose pós-inflamatória	
Cirrose hepática pós-viral ou alcoólica	Fibrose pulmonar induzida por Bleomicina
Esquistossomose	Fibrose pulmonar induzida por radiação
Fibrose pulmonar idiopática	Rejeição alográfica crônica

Quadro 2.2 – Exemplos de doenças relacionadas à inflamação.

Fonte: Nathan (2002).

Devido a grande importância da inflamação como alvo terapêutico, existem vários medicamentos anti-inflamatórios de origem sintética disponíveis no mercado, sendo que a grande maioria são inibidores da síntese de eicosanóides, principalmente por inativação da enzima ciclooxigenase. Esses medicamentos são classificados farmacologicamente como anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), em referência aos hormônios esteróides, que atuam como anti-inflamatórios endógenos, e figuram entre os mais consumidos no mundo, dado o seu amplo espectro de aplicação (STEINMEYER, 2000).

Os eicosanóides são oriundos da via metabólica do ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado de 20 átomos de carbono encontrado na forma esterificada nos

fosfolipídios de membranas, o qual é hidrolisado pelo sistema enzimático das fosfolipases (fosfolipases A, C ou D), ativadas por estímulos inflamatórios, e serve de substrato para os complexos enzimáticos das lipo-oxigenases e ciclo-oxigenases (KATZUNG, 2004).

As lipo-oxigenases atuam sobre o ácido araquidônico para formar ácido hidroxicicosatetraenóico (HETE) ou ácido hidroperoxieicosatetraenóico (HPETE) que são instáveis e rapidamente convertidos a leucotrienos por ação da 5-lipo-oxigenase, ou lipoxinas por ação da 12-lipo-oxigenase ou 15-lipo-oxigenase (SMYTH et al., 2006).

As ciclo-oxigenases ou sintases de prostaglandina H_2 (PGHS), cujas principais isoformas são a ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), são enzimas bifuncionais que catalisam tanto a bi-oxigenação do ácido araquidônico ao endoperóxido instável prostaglandina G_2 , com atividade de endoperóxido-redutase, quanto a sua subsequente redução a prostaglandina H_2 , outro endoperóxido instável com atividade de peroxidase (KUMMER; COELHO, 2002).

A prostaglandina H_2 serve de substrato a outras sintases de prostaglandinas (PGS) ou isomerases para a produção de outras prostaglandinas. O tipo de prostaglandina gerada depende do tipo de célula, dada a seletividade tecidual na distribuição das PGS (CARVALHO et al., 2004; CLAUDINO, 2006). A figura 2.4 (pág. 54) resume o processo de formação e as funções dos eicosanóides.

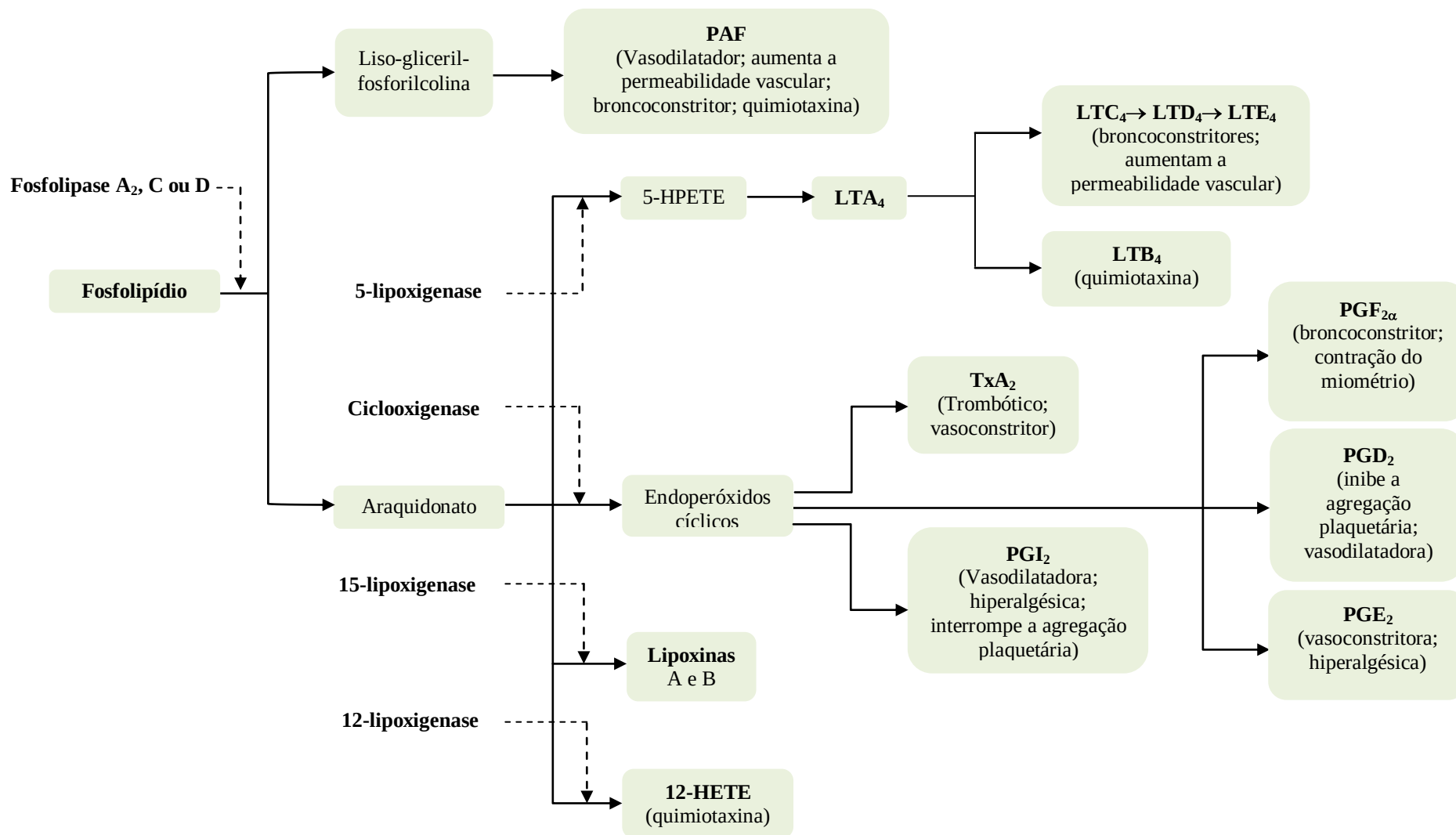


Figura 2.4 – Diagrama resumido do processo de formação dos eicosanóides e suas funções. LT, leucotrieno (A₄, B₄, C₄, D₄ ou E₄); PG, prostaglandina (F_{2α}, D₂ ou E₂); TxA₂, tromboxane A₂; HETE, ácido hidroxi-eicosatetraenóico; HPETE, ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico; PGI₂, prostacilina (prostaglandina I₂); PAF, fator ativador de plaquetas. Fonte: Adaptado de Rang et al. (2004).

A COX-1 é uma enzima constitutiva presente em praticamente todas as células do organismo e seus produtos possuem muitas funções fisiológicas importantes nos sistemas nervoso, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinário, respiratório e imunológico. Estudos recentes mostraram que mesmo a COX-2, anteriormente conhecida como uma enzima exclusivamente inflamatória, por ser expressa somente em determinadas células ativadas por estímulos inflamatórios, é constitutivamente expressa no sistema nervoso central e no útero grávido de ratas, onde teria papel na angiogênese (STEINMEYER, 2000).

Por isso, os AINE possuem vários efeitos indesejáveis, decorrentes das funções fisiológicas dos eicosanóides, dentre os quais, o mais frequentemente relatado é o surgimento de complicações gastrointestinais, como gastrites, úlceras e perfurações. Evidentemente, esses efeitos estão mais relacionados à inativação da COX-1, o que por muito tempo sugeriu que inibidores seletivos da COX-2 seriam os anti-inflamatórios ideais (KUMMER; COELHO, 2002).

Porém, os inibidores seletivos da COX-2 não inibem agregação plaquetária associada à inflamação. As plaquetas, por serem anucleadas, não são capazes de sintetizar a COX-2 e não são afetadas por esses medicamentos, e a produção de TxA_2 , potente ativador das plaquetas, pela COX-1 permanece inalterada. Isso aumenta o risco de complicações cardiovasculares ligadas à inflamação, particularmente comuns em pacientes ateroscleróticos. A situação se agrava se houver cardiopatia associada (GOTTLIEB et al., 2005; LIBBY, 2002).

Além disso, a inibição da via metabólica das ciclooxigenases aumenta o suprimento de substrato para as lipooxigenases, às quais poucos AINE são capazes inibir em concentrações convenientemente baixas. Isso leva a um aumento na síntese de leucotrienos inflamatórios. De fato, estratégias como a inibição seletiva de um dado eicosanóide, poderiam aumentar a síntese de um produto enzimaticamente relacionado (KATZUNG, 2004).

Recentemente foi sugerida a existência de uma terceira isoforma da ciclo-oxigenase, a ciclo-oxigenase-3, identificada no córtex cerebral e no coração em humanos. Contudo, foi mostrado que se tratava de uma variante de RNA mensageiro da COX-1, com uma sequência de cerca de 30 aminoácidos de diferença em relação a esta, na região hidrofóbica. Por esse motivo, é pouco provável que essa enzima seja capaz de produzir prostaglandinas e sua função no organismo ainda é desconhecida (CLAUDINO, 2006).

Pelos motivos expostos até aqui, a busca por novos medicamentos moduladores da resposta inflamatória, dotados de menos efeitos colaterais e/ou atuantes por outros mecanismos é tão relevante e objeto de tantos estudos. Um método amplamente utilizado na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos medicamentos é o “Edema de pata induzido por carragenina”, no qual uma injeção intra-plantar do polissacarídeo, em ratos ou camundongos, induz um aumento progressivo do volume da pata injetada, que é proporcional à intensidade da resposta inflamatória (LAPA et al., 2008).

A resposta inflamatória causada pela carragenina é caracterizada por duas fases. A primeira está relacionada principalmente com a liberação de histamina, serotonina, bradicinina, PAF e leucotrienos, que induzem um rápido crescimento do edema imediatamente após a injeção de carragenina até os 60 primeiros minutos. Entre 60 e 90 minutos há um retardo no crescimento do edema, seguido de um novo período de rápido crescimento que perdura até a terceira hora, quando o edema atinge seu pico máximo. Isso se deve, principalmente, à liberação de prostaglandinas e outros prostanóides pela ciclooxigenases, e caracteriza a segunda fase da resposta induzida pela carragenina (MUNIAPPAN; SUNDARARAJ, 2003; PEREIRA, 2005).

Nesse método, o volume do edema é convenientemente medido utilizando-se plestimômetro, que mede o volume de uma solução salina deslocado pela pata inflamada do animal, por meio de um eletrodo, e o traduz em forma digital. A progressão do edema é

calculada pela diferença entre a medida basal e aquelas feitas a cada 60 minutos subsequentes à injeção da carragenina. A análise da interferência de substâncias nessa progressão pode ser feita com a administração da droga, seja pela via oral ou intraperitoneal, uma hora antes da injeção da carragenina (LAPA et al., 2008).

2.4 Busca por novos antiplaquetários

As plaquetas são pequenos fragmentos discóides anucleados oriundos do citoplasma de megacariócitos. Quando ativadas, essas células têm mais capacidade de aderirem umas às outras e à parede dos vasos sanguíneos, e expõem em suas membranas receptores para os complexos tenase e protrombinase que medeiam a produção de fibrina, componente indispensável à estabilização dos tampões plaquetários (trombos brancos) e formação dos coágulos sanguíneos (trombos vermelhos) (CASTRO et al., 2006; FRANCO, 2001).

A função desses tampões e coágulos é a interrupção da perda sanguínea e a imposição de uma barreira física à disseminação de patógenos. Contudo, apesar da valiosa função homeostática, esse tampões plaquetários são a principal causa das complicações cardiovasculares nas doenças inflamatórias, entre as quais se incluem doenças vasculares periféricas, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico, que muitas vezes se configuram como a principal causa de morte de paciente com inflamações crônicas (GOTTLIEB et al., 2005; PIEDADE et al., 2003; PRICE et al., 1991).

As plaquetas também possuem receptores de baixa afinidade para imunoglobulina E e podem produzir radicais livres e proteínas catiônicas pró-inflamatórias. O fator de crescimento produzido por elas contribui para os processos de reparo após a resposta inflamatória. Outra relação da agregação plaquetária com a inflamação advém do fato de que colágeno, difosfato de adenosina (ADP), adrenalina, PAF, metabólitos do ácido araquidônico, polications, serotonina e trombina, envolvidos na resposta inflamatória, são agonistas da

agregação plaquetária, capazes de ativar as plaquetas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ABIB-JUNIOR, 2004; WEYRICH et al., 2003).

Ao interagirem com os receptores específicos associados a proteínas G, esses agonistas, por intermédio da entrada de cálcio nas plaquetas, ativam as fosfolipases A₂ e C, que dão início à produção de eicosanóides pela COX-1, dentre os quais o TxA₂, que é um poderoso indutor e amplificador da agregação plaquetária (KLINGER; JELKMANN, 2002). Por isso, os AINE inibidores da COX-1, são também dotados de atividade antiagregante plaquetária. O ácido acetilsalisílico (AAS), que inibe não seletivamente e irreversivelmente as COX-1 e 2, é o fármaco antitrombótico mais utilizado na terapêutica, apesar dos graves efeitos adversos relacionados ao sistema gastrointestinal (RANG et al., 2004).

Outra particularidade das plaquetas ativadas é a expressão da glicoproteína IIb/IIIa (Gp IIb/IIIa), que funciona como um receptor para fibrinogênio ou fator de von Willebrand, que são as moléculas que ligam as plaquetas umas às outras (GAWAZ et al., 2005). A inibição da Gp IIb/IIIa também inibe a agregação plaquetária induzida por qualquer agonista, e por isso, esse tem sido um alvo estratégico para o desenvolvimento de novos antiplaquetários. Representantes já existentes dessa classe de fármacos são o abciximab, o eptifibatide e o tirofiban (KATZUNG, 2004).

Existe ainda um inibidor seletivo do TxA₂, o sulotroban. Contudo, o mesmo risco da produção aumentada de metabólitos enzimaticamente relacionados, comentado no item anterior, é aplicável nesse caso. Ticlopidina e clopidrogel inibem a agregação plaquetária somente quando induzida por ADP, além de possuírem efeitos adversos como náusea, dispepsia e diarreia (KATZUNG, 2004; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Além disso, os principais efeitos adversos apresentados por todos os antiagregantes plaquetários são leucopenia, sangramentos e até mesmo hemorragias, sendo que os dois

últimos, na maioria das vezes, são condicionados a intervenções cirúrgicas prévias ou distúrbios hemorrágicos pré-existentes (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Portanto, a busca por antiagregantes plaquetários mais eficientes permanece ativa. Em 1962, Born propôs um método que é largamente utilizado até os dias atuais, para a avaliação da capacidade antiagregante plaquetária de substâncias, realizada no plasma rico em plaquetas (PRP) obtido de amostras sanguíneas humanas. Esse método é baseado na medição da interrupção da passagem de luz através do PRP, pela turbidez ocasionada pela formação de trombos, após a adição de indutores da agregação plaquetária. Se a substância em teste limita esse aumento da turbidez é sinal de que possui atividade antiagregante plaquetária. É um método simples e eficiente com o qual é possível testar a capacidade antiagregante de qualquer substância frente a qualquer agonista plaquetário (CASTRO et al., 2006).

2.5 Busca por novos antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são inerentes à vida aeróbia, produzidas em reações de oxidação-redução. Ambas dividem-se entre radicalares, mais conhecidas como radicais livres [hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), alcóxila ($\text{RO}^\bullet$) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$)]; e não-radicalares [oxigênio molecular (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-)] (BARREIROS et al., 2006).

Apesar de terem funções benéficas ao organismo, pois estão envolvidas na produção de energia, na eliminação de patógenos e corpos estranhos, na regulação do crescimento de células e na sinalização intercelular, o acúmulo dessas espécies por processos patofisiológicos ou por influência ambiental (radiação ultravioleta, estresse mecânico, etc.), desencadeia efeitos danosos como peroxidação de lipídios de membrana e agressão a proteínas dos

tecidos, a enzimas, a carboidratos e a DNA, por reações de oxidação-redução em cadeia (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres mais reativos e, portanto, mais prejudiciais ao organismo, são o $\text{HO}^\bullet$ (meia-vida de 10^{-9} segundos) e o $\text{RO}^\bullet$ (meia-vida de 10^{-6} segundos). Devido à meia-vida muito curta e ação imediata no próprio sítio onde são gerados, seus efeitos *in vivo*, ao contrário das indicações de testes *in vitro*, são inevitáveis (PIETTA, 2000; SIES, 1993). O radical $\text{O}_2^\bullet$ e o H_2O_2 , produzidos por fagócitos e fibroblastos durante resposta a patógenos e corpos estranhos, são pouco reativos e não causam danos ao organismo, porém, são precursores diretos do radical $\text{HO}^\bullet$. Ao agredir as células do endotélio, por exemplo, o radical $\text{HO}^\bullet$ gerado durante o processo inflamatório desencadeia uma nova resposta (AMES et al., 1993; BARREIROS et al., 2006).

O organismo humano possui dois sistemas de defesa contra as ERO e ERN: um sistema enzimático, do qual, as superóxido dimutases, catalase e glutathione peroxidase, são as principais representantes, e um sistema não-enzimático composto por glutathione, ubiquinona, bilirrubina, hemoglobina, ácido úrico, dentre outros. Apesar de complexo, esse sistema de defesa é falho devido à velocidade de produção e de reação dos radicais livres, além da diversidade e quantidade de fontes estimuladoras às quais o organismo humano está sujeito. Assim, parte dos constantes e sucessivos danos às células e proteínas do corpo vão se acumulando com a idade (AMES et al., 1993; SIES, 1993).

Por isso, os radicais livres estão relacionados ao agravamento de reações inflamatórias descontroladas como na artrite reumatóide, na aterosclerose, na septicemia e em doenças autoimunes, além de ter papel comprovado no envelhecimento, na oncogênese, no autismo e em doenças degenerativas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e catarata (AMES et al., 1993; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além das defesas produzidas pelas próprias células, o organismo humano adquire várias moléculas antioxidantes através dos alimentos, dentre elas os carotenóides, os tocoferóis (principalmente o α -tocoferol ou vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos, que têm, todos, como fonte principal os produtos de origem vegetal. Dietas ricas em frutas, verduras, legumes e chás têm sido relacionadas à diminuição da incidência de doenças degenerativas, de doenças do coração, de diversos tipos de câncer e ao retardo do envelhecimento. Isso tem contribuído para a crescente valorização de hábitos mais saudáveis de vida, dada a eterna busca do homem pela longevidade (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PIETTA, 2000; RICE-EVANS et al., 1999).

Numerosos estudos têm avaliado a capacidade antioxidante de diversas substâncias, tanto de origem sintética como natural, visando, principalmente, terapias de prevenção às doenças relacionadas aos radicais livres. Além disso, novos antioxidantes mais baratos e menos tóxicos são de grande interesse para a indústria química e de alimentos (SIES, 1993). Entre os métodos mais utilizados para a avaliação a capacidade antioxidante completa de compostos isolados ou misturas, como extratos vegetais, estão o ensaio do radical livre 2,2-difenil-1,1-picril-hidrazila (DPPH $\bullet$) e o ensaio do cátion do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino)-6-sulfônico (ABTS $\bullet^+$) (ES-SAFI et al., 2007; RUFINO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Ambos os métodos baseiam-se na medida do decréscimo na absorbância ou descoloração ocasionada pela redução dessas espécies na presença de substâncias doadoras de elétrons ou hidrogênio. O DPPH $\bullet$ tem cor púrpura e absorbância em torno de 517 nm, e sua forma reduzida (DPPH-H) tem cor amarela. O ABTS $\bullet^+$ tem cor verde-escura, absorbância característica primária em 415 nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820 nm, sendo que sua forma mais estável (catiônica) tem cor verde-clara (KOLEVA et al., 2002; SOUSA et al., 2007; RUFINO et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo farmacognóstico com a casca do caule da espécie *Byrsonima japurensis* A. Juss. e investigar o potencial antioxidante, antiagregante plaquetário, anti-inflamatório e tóxico de um extrato aquoso dessa droga vegetal.

2.2 Objetivos específicos

- Elucidar caracteres farmacognósticos e tecnológicos da cascas do caule de *Byrsonima japurensis*, avaliando o possível emprego desta matéria-prima para a produção de fitoterápicos;
- Contribuir para a validação científica, ou não, do uso popular de *B. japurensis* com finalidades terapêuticas;
- Avaliar a segurança do uso do extrato aquoso da casca do caule de *B. japurensis* com finalidade terapêutica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação da amostra

Cascas do caule da espécie *Byrsonima japurensis* foram coletadas no município Careiro-Castanho, Amazonas, às 14 horas e 30 minutos do dia 03 de março de 2007, pelo Senhor Francisco Medeiros Cavalcante. A espécie foi identificada e classificada taxonomicamente por botânicos do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por meio de um material-testemunho (Figura 4.1). Duas exsicatas foram depositadas: uma no herbário do INPA sob o número 224415 e outra no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM) sob o número 7983.



Figura 4.1 – Comparação entre o material-testemunho (à direita) e a exsicata do INPA.
Fonte: Arquivo de Maria Christina dos Santos Verdam.

4.2 Estudo farmacognóstico

4.2.1 Análise macroscópica

Antes de qualquer tratamento, a droga vegetal foi submetida a um exame visual à luz do dia para verificação da cor. A textura e a consistência foram examinadas ao toque e com o auxílio de outros procedimentos como dobrar e partir o material (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2 Análise histoquímica

Amostras frescas do floema secundário de *Byrsonima japurensis* foram seccionadas transversalmente com o auxílio de um micrótomo manual e os fragmentos foram mantidos em água destilada até o momento da montagem das lâminas. Sobre os cortes selecionados foram gotejados reagentes específicos, de acordo com a tabela 4.1 (JOHANSEN, 1940). Após esse procedimento, os cortes foram observados em fotomicroscópio óptico (Zeiss®) nos aumentos de 10, 20 e 40 vezes, para a verificação dos resultados (Figura 4.2).

Tabela 4.1 – Reagentes utilizados nos testes histoquímicos

Reagente	Composto detectado	Coloração resultante
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	Enegrecida
Lugol	Amido	Arroxeadas
Reagente de Dragendorff	Alcalóides	Verde
Sudan III	Lipídeos	Laranja

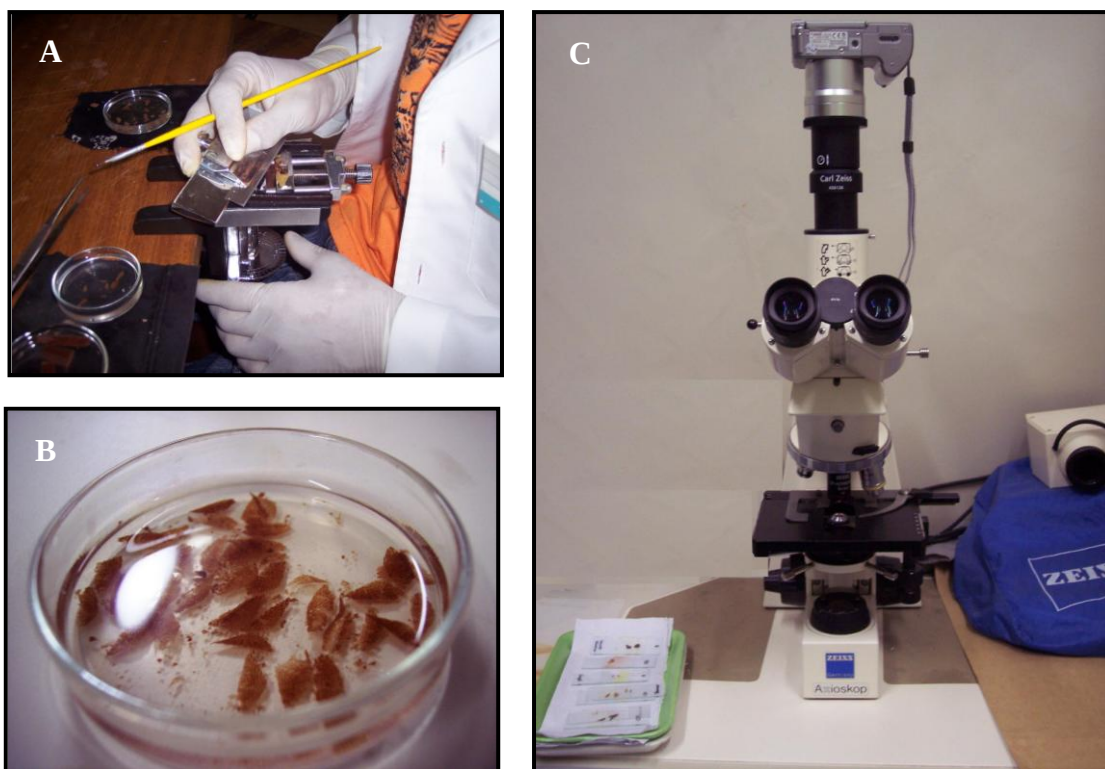


Figura 4.2 – Análise histoquímica da droga vegetal. A – micrótomo manual; B – cortes em água destilada; C – fotomicroscópio utilizado.

4.2.3 Análise físico-química

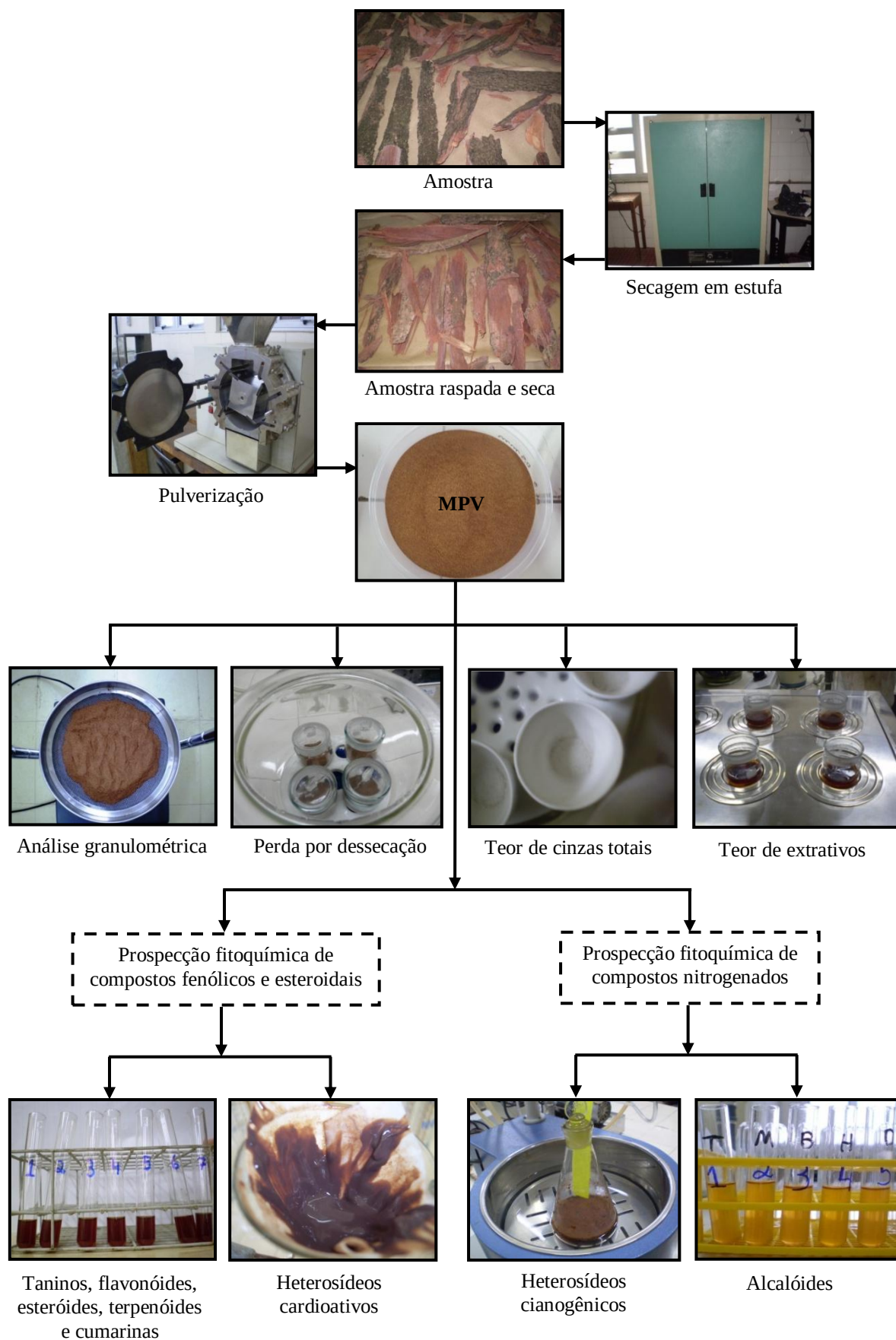
4.2.3.1 Obtenção da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

As cascas de *B. japorensis* foram secadas a 40 °C em estufa com circulação interna de ar, até que adquirissem aspecto quebradiço. Após este período, as mesmas foram raspadas para a retirada da camada mais externa e submetidas a uma nova secagem por mais 3 dias. Então, as cascas foram pulverizadas em moinho de facas com tamis de 0,5 mm de abertura de malha. A matéria-prima assim obtida foi submetida às análises físico-químicas, conforme o fluxograma 4.1 (pág. 66). A metodologia dessas análises está detalhada nos itens de 4.2.3.2 a 4.2.3.6 (pág. 65-74).

4.2.3.2 Prospeção fitoquímica preliminar

4.2.3.2.1 Investigação de compostos fenólicos e esteroidais

Um extrato hidroalcoólico foi preparado com 2,5 g de MPV e 50 mL de etanol a 70% por decocção por 10 minutos, o qual foi filtrado e após arrefecimento, transferido para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com etanol a 70%. Uma alíquota de 10 mL do extrato foi transferida a um béquer e levada à secura em banho-maria e outras alíquotas de 3 mL foram distribuídas em oito tubos: sete foram numerados e utilizados para os testes de I a VII (pág. 67 a 69) e o outro tubo foi utilizado como controle. O preparo das soluções reagentes e toda a sequência dos testes foram realizados seguindo as recomendações de Matos (1997).



Fluxograma 4.1 – Preparação e análise físico-química da matéria-prima vegetal.

I - Teste para taninos

Ao tubo 1 foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico, agitando-se bem. Foi observado se houve a formação de precipitado de coloração azul, indicativo de taninos hidrolisáveis, ou verde, indicativo de taninos condensados.

II - Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

O pH dos tubos 2, 3 e 4 foram ajustados a 3, 5 e 11 por meio da adições de soluções de ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio, respectivamente, observando se houve mudanças na coloração das soluções. O resultado foi interpretado de acordo com o quadro 4.1.

Constituintes	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarelo
Chalcona e Auronas	Vermelha	-	Vermelho-púrpura
Flavononóis	-	-	De vermelho a laranja

Quadro 4.1 – Interpretação dos resultados do teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

FONTE: Matos (1997).

III - Teste para leucoantocianinas, catequinas e flavonas

O pH dos tubos 5 e 6 foram ajustados com solução de ácido clorídrico a 1 e 11 por meio da adição de soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, respectivamente, observando se houve mudanças na coloração das soluções. O resultado foi interpretado de acordo com o quadro 4.2.

Constituintes	Tubo 5	Tubo 6
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-Amarelada	-
Flavanonas	-	De vermelho a laranja

Quadro 4.2 – Interpretação dos resultados do teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.

FONTE: Matos (1997).

IV - Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (reação de Shinoda)

Ao tubo 7 foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico p.a. Ao final da efervescência foi observado se houve aparecimento ou intensificação de cor vermelha.

V - Teste para esteróides e triterpenóides (reação de Liebermann-Burchard)

O resíduo do béquer foi extraído de duas a três vezes com cerca de 2,0 mL de clorofórmio, triturando-se bem o resíduo com o solvente. O resíduo insolúvel foi reservado para o teste de saponinas. A solução clorofórmica foi filtrada em algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro e transferida para um tubo de ensaio bem seco, ao qual foi adicionado 1,0 mL de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico concentrado, agitando bem. Foi observado se houve desenvolvimento de coloração azul, seguida de verde permanente, indicativo da presença de esteróides livres, ou parda até avermelhada, indicativo de triterpenóides pentacíclicos livres.

VI - Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio obtido no teste anterior foi ressuspenso em 5,0-10,0 mL de água destilada. A solução foi então filtrada para um tubo de ensaio e agitada fortemente, por dois a três minutos, observando se houve formação de espuma persistente por pelo menos cinco minutos, indicativo da presença de saponinas.

VII - Teste confirmatório para saponinas

Foram adicionados 2,0 mL de ácido clorídrico ao conteúdo do tubo do teste anterior, o qual foi deixado em banho-maria a 60 °C, por uma hora. Em seguida, o conteúdo do tubo foi

neutralizado com solução de hidróxido de sódio, observando se houve ausência de espuma e formação de precipitado, que confirmariam a presença de saponinas.

VIII - Teste para cumarinas

Duas gotas do extrato hidroacoólico foram despejadas separadamente sobre um pedaço de papel de filtro comum. Sobre uma delas (mancha-teste), foi gotejada solução de hidróxido de potássio a 10 %. Sob luz ultravioleta de 365 nm (UV λ_{365}) foi observado se a mancha de teste apresentava fluorescência amarelo-esverdeada em comparação com a outra (mancha-controle).

4.2.3.2.2 Investigação de heterosídeos cardioativos

O preparo do extrato e das soluções reagentes e a sequência dos testes da investigação de heterosídeos cardioativos foram realizados conforme recomendam os autores Alice (1985) e Costa (2001). Cerca de 2,0 g da MPV foram fervidas com 20,0 mL de etanol a 50 % e 10,0 mL solução de acetato neutro de chumbo a 10 % por dois minutos. Então, a mistura foi centrifugada a 3500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação, ao qual foi adicionado 20,0 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi extraída com duas porções de 15,0 mL de clorofórmio, e as frações clorofórmicas foram reunidas. Porções de cerca de 5,0 mL do extrato clorofórmico final foram distribuídas em cinco tubos de ensaio numerados e evaporadas à secura em banho-maria, em capela. Os resíduos foram submetidos às reações para identificação de desóxi-açúcares, núcleo esteroidal, anéis lactônicos e grupos carbonila, conforme especificado a seguir:

- Reações com desóxi-açúcares

- a) Reação de Keller Killiani

O resíduo do tubo 1 foi dissolvido em 3,0 mL do reativo de Keller Killiani e transferido cuidadosamente a outro tubo contendo 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sem agitar. Foi observado se houve aparecimento de cor violácea na zona de contato dos dois líquidos.

- b) Reação de Pessez

Uma pequena alíquota do extrato clorofórmico foi transferida para uma pequena cápsula de porcelana, a qual foram adicionadas algumas gotas de ácido fosfórico p.a., agitando-se com bastão de vidro. Sob luz ultravioleta, foi observado se houve aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada.

- Reações com o núcleo esteroideal

- a) Reação de Libermann-Burchard

O resíduo do tubo 2 foi dissolvido com 1,0 mL do reativo de Libermann-Burchard e foi observado se houve aparecimento de cor castanho-avermelhada ou esverdeada na solução.

- Reações com o anel lactônico

- a) Reação de Kedde

Ao resíduo do tubo 3 foram adicionados 2,0 mL de álcool etílico a 50 %, 2,0 mL de água destilada, 2,0 mL do reativo de Kedde, 2,0 mL de solução de hidróxido de potássio 1 N. Após cinco minutos, foi observado se houve desenvolvimento de cor castanho-avermelhado a castanho-violeta na solução.

b) Reação de Baljet

O resíduo do tubo 4 foi dissolvido em 2,0 mL do reativo de Baljet. Ao mesmo tubo foram acrescentadas algumas gotas de hidróxido de potássio 1 N, observando se houve aparecimento de coloração alaranjada.

- Reações com grupos carbonila

a) Reação de Legal

Ao resíduo do tubo 5 foram adicionados 1 mL de piridina, 0,5 mL de água, 0,5 mL da solução de hidróxido de sódio a 10% e 0,5 mL da solução do reativo de Legal. Ao final desses procedimentos, foi observado se houve aparecimento gradual de cor vermelha na solução.

4.2.3.2.3 Investigação de compostos nitrogenados

- Investigação de heterosídeos cianogênicos

Em um Erlenmeyer de 250,0 mL com tampa esmerilhada foram reunidos 10,0 g da matéria-prima vegetal (MPV), 50,0 mL de água e 1,0 mL de ácido sulfúrico 1 N. À tampa foi presa uma fita de papel de picrato de sódio. O Erlenmeyer foi deixado em banho-maria a uma temperatura de 60 °C por duas horas. Foi observado o aparecimento de coloração vermelha-castanha na fita, que indica presença de heterosídeos cianogênicos (MATOS, 1997).

- Investigação de alcalóides

Toda esta investigação, incluindo o preparo dos reagentes, foram realizados segundo as recomendações de Costa (2001). Um extrato por decocção foi preparado a partir de 1,0 g da MPV e 20,0 mL de ácido clorídrico diluído e distribuído em cinco tubos de ensaio de 10,0 mL. A quatro deles foram acrescentadas algumas gotas dos reativos de Mayer, Bertrand,

Hager e Dragendorff, respectivamente, observando-se a formação de precipitados. O quinto tubo serviu de controle.

4.2.3.3 Análise granulométrica

A determinação do tamanho médio das partículas da MPV foi realizada conforme recomenda a Farmacopéia Brasileira (1988). Uma alíquota de exatamente cerca de 50,0 g foi submetida à passagem forçada por vibração através de tamises com abertura de malha de tamanhos diferentes e decrescentes. Neste trabalho foram utilizados tamises de 1,0 mm, 850,0 µm, 710,0 µm, 600,0 µm, 500,0 µm, 425,0 µm, 355,0 µm e 250,0 µm de abertura de malha e tamisor da marca Bertel. A análise foi realizada em quadruplicata com tempo fixado em 15 minutos e na escala 30 do aparelho. O tamanho médio das partículas foi calculado em função de frequências de passagem e retenção.

4.2.3.4 Perda por dessecação

Alíquotas de exatamente cerca de 2,0 g da MPV foram pesadas em quadruplicata em pesa-filtros previamente tarados, que foram colocados em estufa previamente aquecida a 105 °C onde permaneceram por duas horas. Logo após, os mesmos foram resfriados em dessecador e pesados em balança analítica. Todo o procedimento foi repetido, com o tempo de estufa reduzido para uma hora, até a constatação de peso constante, considerado quando a diferença entre duas pesagens consecutivas era inferior a 2,0 mg (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). A porcentagem da perda por dessecação foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$pd (\%) = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

onde:

pd = perda por dessecação

Pa = peso da amostra

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

4.2.3.5 Teor de cinzas

Alíquotas de exatamente cerca de 3,0 g da MPV foram pesadas em triplicata, em cadinhos previamente calcinados. Os cadinhos foram levados à mufla e submetidos à elevação gradual da temperatura até a máxima de 450 °C, na qual permaneceram por períodos de 2 horas, intercalados por 30 minutos de resfriamento em dessecador e pesagem em balança analítica. Esses procedimentos foram até constatação de peso constante, considerado quando a diferença entre duas pesagens consecutivas era inferior a 2,0 mg (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). O teor de cinzas foi calculado em relação ao peso inicial da amostra.

4.2.3.6 Teor de extrativos

Exatamente cerca de 1,5 g de MPV foram pesados e transferidos a um Erlenmeyer, ao qual se adicionou 150,0 mL de água destilada. O conjunto (Erlenmeyer + MPV + água destilada) foi pesado e levado à decocção por 10 minutos. Após arrefecimento, o peso inicial do conjunto foi reconstituído com água destilada.

Em seguida, filtrou-se a solução desprezando-se os primeiros 20 mL. Do restante foram pesadas alíquotas de exatamente cerca de 20,0 g em pesa-filtros previamente tarados, que foram evaporadas à secura em banho-maria. Logo após, levou-se os mesmos à estufa previamente aquecida a 105 °C e iniciou-se o processo de dessecação até peso constante, considerado quando a diferença entre duas pesagens consecutivas era inferior a 2,0 mg

(BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE, 1986; MIGLIATO et al., 2007). Os resultados foram calculados pela fórmula abaixo:

$$TE = \frac{g \times FD \times 100}{m - \left(m \times \frac{pd}{100} \right)}$$

onde:

TE = teor de extrativos (% m/m);

g = massa do resíduo seco (g);

FD = fator de diluição;

m = massa da amostra inicial (g);

pd = perda por dessecação da amostra (% m/m).

4.2.4 Estudo para a obtenção do extrato bruto

Foi utilizado um desenho experimental 2^2 , onde as variáveis independentes foram método de extração (infusão e decocção) e relação droga:solvente m/v (5% e 15%), sendo a variável de resposta o teor de resíduo seco. Todas as soluções extrativas foram obtidas utilizando água como solvente por um tempo de extração de 15 minutos.

Ao final dos procedimentos de extração, foram realizadas duas filtrações: a primeira com tecido de algodão limpo para retirada das partículas mais grosseiras, e a segunda à vacuo com papel de filtro analítico em sistema de Kitassato e funil de Büchner (Figura 4.3, pág. 75). Após arrefecimento, os extratos foram transferidos a balões volumétricos de 100,0 mL e completados com água destilada.

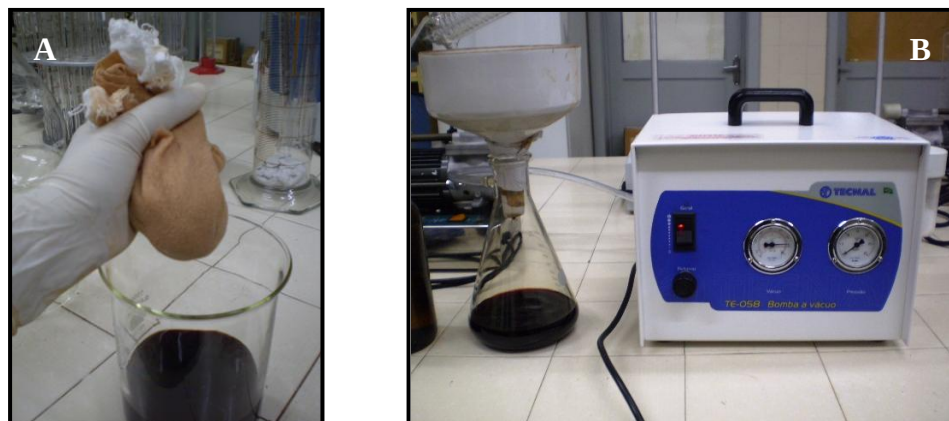


Figura 4.3 – Filtrações das soluções extrativas. A – filtração com tecido de algodão; B – filtração com papel de filtro analítico.

Com pipeta volumétrica, foram medidos exatamente 5,0 mL de cada solução extrativa (SE), transferidos a pesa-filtros tarados e conduzidos à secura em banho-maria. Em seguida, os conjuntos foram levados à estufa previamente aquecida a 105 °C por duas horas. Após resfriamento em dessecador, os conjuntos foram pesados.

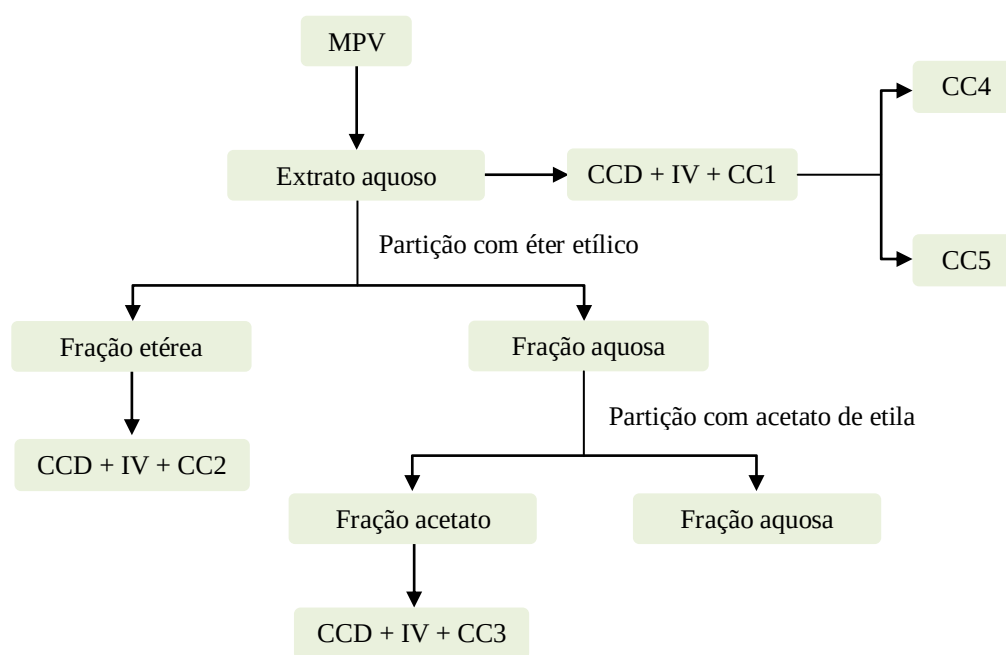
O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de uma hora, até a constatação de peso constante, considerado quando a diferença entre duas pesagens consecutivas era inferior a 2 mg. Esta análise foi realizada em quadruplicata e o teor de resíduo seco (sólidos solúveis em água) foi calculado pela razão entre a massa de resíduo depositada no cadinho e a massa inicial extraída, correspondente à alíquota de 5,0 mL, em porcentagem (BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE, 1986). O esquema extrativo que proporcionou maior teor de resíduo seco foi empregado no restante do trabalho para a obtenção do extrato aquoso bruto sempre que necessário.

4.2.4.1 Estudo fitoquímico do extrato bruto

Inicialmente, foram preparados 2000,0 mL do extrato bruto conforme o método determinado pelo item anterior, que foram então concentrados a 200,0 mL em rotaevaporador

sob pressão reduzida. O mesmo foi submetido à partição líquido-líquido com cinco porções de 200,0 mL de éter etílico e posteriormente, acetato de etila, até 1000,0 mL de cada solvente. As porções do mesmo solvente foram reunidas e concentradas em rotaevaporador com a temperatura ajustada no ponto de ebulição de cada um, ao menor volume possível. O volume residual foi evaporado em capela com o auxílio de um secador.

As frações éter etílico (FEE) e acetato de etila (FAE), assim como o próprio extrato aquoso bruto foram submetidos a análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria no infravermelho (IV) e fracionadas em colunas cromatográficas (CC), empacotadas com sílica gel 60 de 0,04-0,063 mm (Vetec), para a obtenção de frações mais purificadas. O fluxograma 4.2 ilustra o estudo fitoquímico do extrato aquoso bruto.



Fluxograma 4.2 – Estudo fitoquímico realizado com o extrato aquoso bruto.

4.2.4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Em todas as análises em CCD descritas nesta dissertação foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (Merck) e sistemas de eluentes obtidos da literatura ou

determinados empiricamente. Como agentes reveladores, foram utilizados vapores de iodo e UV λ_{365} para detecções gerais, além de soluções cromogênicas mais específicas. Após a determinação de um bom perfil cromatográfico para cada amostra, com manchas bem definidas e fatores de retenção (Rf) razoavelmente distintos, as mesmas foram comparadas à substâncias padrão. As substâncias padrão e soluções cromogênicas utilizadas neste trabalho encontram-se no quadro 4.3.

Classes químicas	Substâncias-padrão	Soluções cromogênicas
Flavonóides	Kaempferol (BioChemika) Luteolina (SIGMA) Quercetina-3D-galactosídeo (Fluka) Hesperidina (SIGMA) Naringenina (SIGMA) Quercetina Rutina	Reagente natural, seguido de observação em UV λ_{365}
Terpenos	Ácido oleanólico (SIGMA) Ácido ursólico (SIGMA)	Ácido fosfotungstico a 25 % em etanol, seguido de aquecimento

Quadro 4.3 – Substâncias-padrão e soluções cromogênicas utilizadas na CCD.

4.2.4.1.2 Espectrometria no infravermelho (IV)

Todos os espectros na região infravermelho mostrados neste trabalho foram obtidos na Central Analítica da UFAM, com o uso de pastilhas de brometo de potássio (KBr), em espectrômetro Spectrum 2000, FT-IR, Perkin Elmer (Figura 4.4).



Figura 4.4 – Espectrômetro de infravermelho.

4.2.4.1.3 Elaboração das colunas cromatográficas

Foram cromatografados 3,0 g do extrato aquoso bruto, 93,7 mg da fração éter etílico (FEE) e 964,1 mg da fração acetato de etila (FAE). As amostras foram trituradas, separadamente, na proporção aproximada de 1:2 com sílica gel (utilizada como fase estacionária) em almofariz até a homogeneização, e adicionadas às suas respectivas colunas.

Os eluentes utilizados na análise do extrato aquoso bruto (CC1) e FEA (CC3) foram determinados empiricamente, partindo-se de um solvente de baixa polaridade, com aumento gradativo da mesma, por meio de variações na proporção de misturas de solventes de polaridades crescentes [tabela 4.2 e 4.4 (pág. 79)]. Os eluentes utilizados na análise da FEE (CC2) foram determinados pelas análises prévias por CCD (Tabela 4.3, pág. 79). Todas as frações resultantes das colunas foram analisadas em CCD com eluentes de polaridade similar àquela na qual foram recolhidas. As frações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e concentradas em rotaevaporador, quando necessário, para posteriores análises.

Tabela 4.2 – Cromatografia em coluna do extrato aquoso bruto (CC1 do fluxograma 4.2, pág. 76)

Eluentes	Frações recolhidas	Reuniões
Hexano	1	Frações de 9 a 38, de 43 a 59, de 60 a 78, de 79 a 81, de 93 a 94; de 96 a 99, de 100 a 106 e de 107 a 111
Diclorometano	2 a 3	
Diclorometano : acetato de etila (1:1)	4 a 7	
Acetato de etila	8 a 39	
Acetato de etila : metanol (75:25)	40 a 56	
Acetato de etila : metanol (1:1)	57 a 77	
Acetato de etila : metanol (25:75)	78 a 82	
Metanol	83 a 99	
Metanol : água destilada (9:1)	100 a 111	

As reuniões de 43 a 59 (**F4359**) com 970 mg, e de 60 a 78 (**F6078**) com 450 mg, apresentaram boa separação de manchas sob UV λ_{365} e foram selecionadas para um novo fracionamento em CC (Tabelas 4.5 e 4.6, pág. 79-80).

Tabela 4.3 – Cromatografia em coluna da fração éter etílico (CC2 do Fluxograma 4.2, pág. 76)

Eluentes	Frações recolhidas	Reuniões
Acetato de etila	1 a 6	-----
Etanol : metanol (1:1)	7 a 8	
Metanol	9	

Tabela 4.4 – Cromatografia em coluna da fração acetato de etila (CC3 do Fluxograma 4.2, pág. 76)

Eluentes	Frações recolhidas	Reuniões
Diclorometano : acetato de etila (1:1)	1 a 4	Frações de 1 a 3, de 8 a 9 e de 12 a 15
Acetato de etila	5	
Acetato de etila acetona	6	
Acetona	7 a 8	
Acetona : etanol (1:1)	9 a 12	
Etanol : metanol (1:1)	13	
Metanol	14 a 15	

Tabela 4.5 – Recromatografia da fração F4359 (CC4 do Fluxograma 4.2, pág. 76)

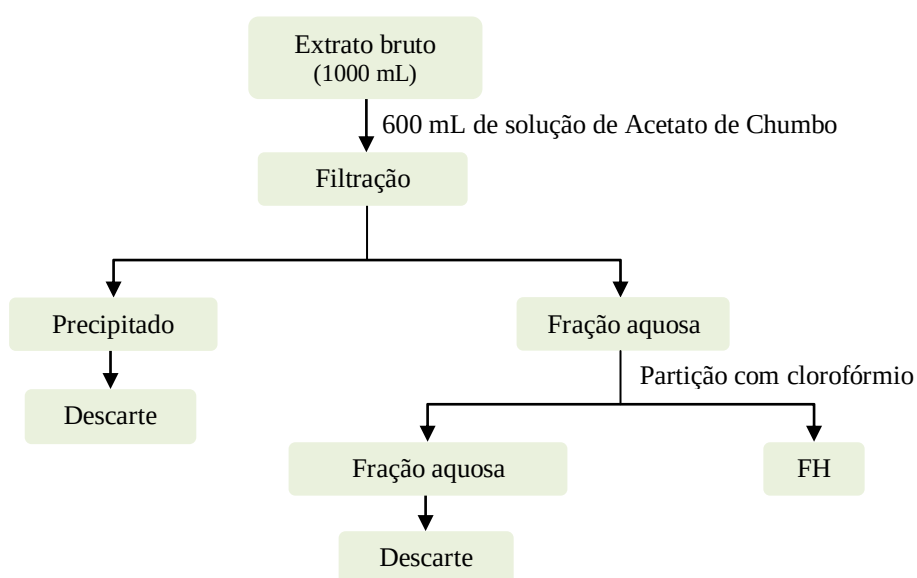
Eluentes	Frações recolhidas	Reuniões
Tolueno : acetato de etila : ácido acético (96:4:1)	1 a 2	Frações de 1 a 3
Tolueno : acetato de etila : ácido acético (70:4:3)	3 a 4	
Tolueno : acetato de etila : ácido acético (60:6:10)	5	
Tolueno : acetato de etila : ácido acético (40:5:30)	6 a 7	
Tolueno : metanol : ácido acético (80:10:10)	8	
Metanol : ácido acético (70: 30)	9 a 10	

Tabela 4.6 – Recromatografia da fração F6078 (CC5 do Fluxograma 4.2, pág. 76)

Eluentes	Frações recolhidas	Reuniões
Acetato de etila	1 a 2	Frações de 3 a 7 e de 8 a 13
Acetato de etila : etanol (9:1)	3 a 4	
Acetato de etila : etanol (7:3)	5	
Acetato de etila : etanol (3:7)	6	
Etanol	7	
Etanol : acetona (1:1)	8	
Acetona : metanol (1:9)	9 a 10	
Metanol	11	
Metanol : água destilada (1:1)	12 a 13	

4.2.4.1.4 Obtenção dos heterosídeos cardioativos

Foi empregado um método extrativo similar ao utilizado no item 4.2.3.2.2 (pág 69), para a obtenção de heterosídeos cardioativos do extrato aquoso bruto. A fração enriquecida com os heterosídeos cardioativos foi nomeada **FH** e o procedimento para sua obtenção está esquematizado no fluxograma 4.3

**Fluxograma 4.3** – Elaboração do EA para obtenção da fração FH, rica em heterosídeos cardioativos.

4.2.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Quatro frações semi-purificadas oriundas das colunas cromatográficas apresentaram manchas bem definidas na CCD, contudo, não puderam ser identificadas por CCDC. Por isso, as mesmas foram selecionadas para análise por RMN de ^1H e ^{13}C (Quadro 4.4), visando uma elucidação estrutural, ainda que parcial.

As amostras foram enviadas ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) para obtenção de espectros em espectrômetros de 500 e 125 MHz. As mesmas amostras foram também submetidas à análise por espectrometria na região do infravermelho, nas condições já descritas.

Código	Origem da fração	Massa
STEB-1	CC4 (1-3)	1,3 mg
STEB-2	CC2 (1)	15,1 mg
STEB-3	CC3 (1-3)	1,3 mg
STEB-4	FH	16,7 mg

Quadro 4.4 – Frações semi-purificadas selecionadas para análises em RMN e IV.

4.3 Estudo de atividade farmacológica/toxicológica

Para os testes desta seção, 2000,0 mL de extrato obtido conforme item 4.2.5 (pág. 61), foram enviados ao Laboratório de Tecnologia do Pescado da UFAM para liofilização.

4.3.1 Testes *in vitro*

4.3.1.1 Ensaios de capacidade varredora de radicais livres

Para estes testes foram preparadas oito diluições sucessivas (1:1) com etanol a 50%, em tubos de ensaio, a partir de uma solução de 1,0 mg/mL do extrato aquoso liofilizado. Em todos eles foi utilizado o leitor de microplacas TP reader, Thermo Plate (Figura 4.5, pág. 82).

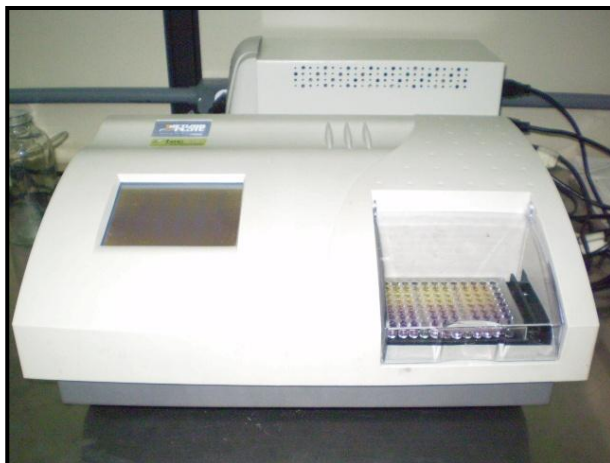


Figura 4.5 – Leitor de microplacas utilizado na avaliação da atividade varredora de radicais livres.

4.3.1.1.1 Ensaio do DPPH[•]

Inicialmente, a absorbância da solução de DPPH[•] foi ajustada para $1,0 \pm 0,1$ por meio de diluições com etanol a 50% seguidas de medidas de absorbância no comprimento de onda de 517 nm, o mesmo para todo o teste.

Foram distribuídas alíquotas de 250,0 µL das diluições dos extratos em triplicata em microplaca, e as absorbâncias foram medidas. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos (ABS_{branco}). Em seguida, foram acrescentados 100,0 µL da solução de DPPH[•] em todos os poços com extrato.

Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram novamente medidas (ABS_{teste}). O controle negativo foi constituído de 250,0 µL de etanol a 50% e 100,0 µL da solução de DPPH[•], em triplicata, também incubado nas mesmas condições ($ABS_{controle}$).

O percentual de atividade varredora de radical nesse ensaio (AV_{DPPH}) foi calculado pela fórmula abaixo:

$$AV_{DPPH} = 100 - \left[\frac{ABS_{teste} - ABS_{branco}}{ABS_{controle}} \right] \times 100$$

4.3.1.1.2 Ensaio do ABTS^{•+}

Primeiramente, fez-se uma diluição a 40% da solução de ABTS^{•+} recém-preparada, com água miliQ. Aliquotas de 250,0 µL das diluições dos extratos foram distribuídas em triplicata em microplaca e as absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 734 nm. Essa leitura constituiu o branco nos cálculos (ABS_{branco}).

Em seguida, foram acrescentados 100,0 µL da solução de ABTS^{•+} em todos os poços com extrato. Após 15 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram novamente medidas (ABS_{teste}). O controle negativo foi constituído de 250,0 µL de etanol a 50% e 100,0 µL da solução de ABTS^{•+}, também incubado nas mesmas condições (ABS_{controle}).

O percentual de atividade varredora de radical nesse ensaio (AV_{ABTS}) foi calculado pela fórmula abaixo:

$$AV_{ABTS} = 100 - \left(\frac{ABS_{teste} - ABS_{branco}}{ABS_{controle}} \right) \times 100$$

4.3.1.1.3 Ensaio do O₂[•]

Aliquotas de 50,0 µL das diluições dos extratos foram distribuídas em triplicata em microplaca, às quais foram acrescentados 100,0 µL da solução de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) e 100,0 µL da solução de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), nesta ordem. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 560 nm, e os valores obtidos constituíram o branco nos cálculos (ABS_{branco}).

Em seguida foram adicionados 100,0 µL da solução de *Phenazine Methyl Sulfate* (PMS) em todos os poços com extratos, deixando-se a microplaca sob incubação no escuro e

à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse tempo, a absorbância foi medida novamente no mesmo comprimento de onda (ABS_{teste}).

O controle negativo foi constituído de 50,0 µL de etanol a 50 %, 100,0 µL da solução de NBT, 100,0 µL da solução de NADH e 100,0 µL da solução de PMS, incubados da mesma forma descrita anteriormente.

O percentual de atividade varredora de radical nesse ensaio (AV_{SO}) foi calculado pela fórmula abaixo:

$$AV_{SO} = 100 - \left(\frac{ABS_{teste} - ABS_{branco}}{ABS_{controle}} \right) \times 100$$

4.3.1.2 Ensaio da capacidade antiagregante plaquetária

Para esta avaliação, amostras de sangue humano foram obtidas de voluntários adultos saudáveis, sendo utilizadas em até três horas após a coleta. Primeiramente, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação da amostra de sangue a 1500 rpm durante 5 minutos sob temperatura ambiente.

A concentração de plaquetas, sempre que necessário, era ajustada para $3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6 / \mu L$, por adição de plasma pobre em plaquetas (PPP) obtido por centrifugação do plasma a 3000 rpm durante cinco minutos.

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro / agregômetro tipo Born (PA-04, Qualitem), associado ao programa Aggrepic[®], no qual a passagem da luz pelo PRP era traduzida em porcentagem de agregação plaquetária. (Figura 4.6, pág. 85).

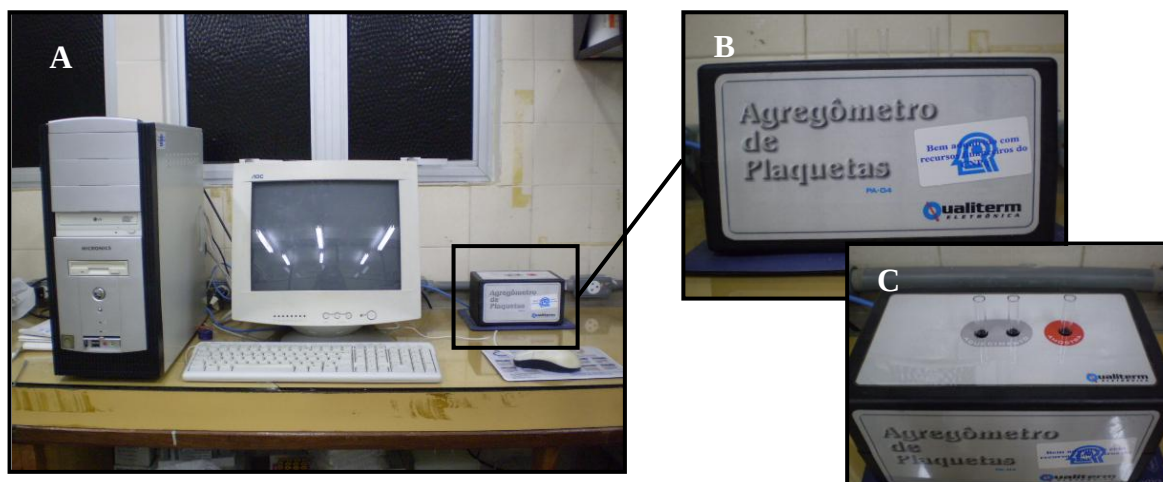


Figura 4.6 – Aparelhagem utilizada na análise da atividade antiagregante plaquetária (A). B – detalhe do espectrofotômetro /agregômetro; C – detalhe das cubetas e dos orifícios de leitura.

Em cada teste, uma alíquota de 396,0 µL de PRP era incubada por dois minutos a 37 °C com 4,0 µL das diferentes concentrações do extrato (50,0; 25,0; 12,5 e 6,25 mg/mL), dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) em cubetas próprias do aparelho utilizado. Para o controle negativo, o extrato foi substituído por DMSO. Após esse tempo, 5,0 µL de ácido araquidônico (10,0 µmol/L) ou 10,0 µL de adenosina difosfato (10,0 µmol/L) ou 10,0 µL de adrenalina (10,0 µmol/L) eram adicionados e a agregação plaquetária era medida.

Todos os testes foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

onde:

A = % agregação do controle

B = % agregação da amostra em teste

4.3.2 Avaliações *in vivo*

4.3.2.1 Animais

Para a avaliação de citotoxicidade foram utilizados cistos de *Artemia salina* adquiridos em *pet shops* locais. Para a avaliação da toxicidade aguda, foram utilizados camundongos Balb/c machos não isogênicos, provenientes do biotério do INPA, e para a avaliação da atividade antiedematogênica foram utilizadas ratas da raça Wistar, provenientes do biotério do INPA e do biotério central da UFAM.

Os camundongos eram alojados em grupos de cinco e as ratas em grupos de seis, ambos em gaiolas plásticas forradas com maravalha. Os animais eram mantidos permanentemente sob a temperatura de 25 ± 3 °C, controlada por condicionadores de ar, e iluminação em ciclos de 12 horas de claro / escuro. Alimentação com ração balanceada e água filtrada era disponibilizada *ad libitum*, com exceção daqueles que participaram de testes com administração oral do extrato e os respectivos animais controles, pois a alimentação foi retirada 12 horas antes. Os animais foram ambientados no local dos experimentos pelo menos 24 horas antes dos testes (LAPA et al., 2008).

4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade

Cerca de 10,0 mg de cistos de *A. salina* foram colocados em água do mar artificial e mantidos sob iluminação artificial, à temperatura controlada de 28 °C, até a eclosão (cerca de 24 horas).

Os microcrustáceos vivos foram submetidos à incubação com o extrato em uma placa de 12 poços de 3,0 mL de capacidade. No poço-teste foram acrescentados 10 microcrustáceos vivos, 100 µL do extrato (na concentração de 30,0 mg/mL em água destilada) e o volume completado com água do mar artificial. No poço-controle o extrato foi substituído por água

destilada. Na mesma placa foram preparados três poços-teste e três poços-controle. Após 24 horas de incubação em local fresco e sob iluminação artificial, fez-se a contagem dos microcrustáceos sobreviventes.

4.3.2.3 Avaliação da toxicidade aguda (Dose simples)

Para esta avaliação foram utilizados camundongos com peso variando entre 20 e 30 g, sendo convenientemente divididos de forma que o coeficiente de variação dentro dos grupos não ultrapassasse 20 % (BRITO, 1994).

Foram utilizados grupos de 5 animais. Doses de 5000 e 2500 mg/kg de peso pela via oral (v. o.) e doses de 1000,0; 750,0; 500,0; 250,0; 150,0; 135,0; 125,0 e 10,0 mg/kg de peso pela via intraperitoneal (i. p.) do extrato dissolvido em solução salina estéril (0,9 % p/v) foram administradas em diferentes grupos. Os animais controle receberam o volume médio equivalente a cada dose em solução salina. As mortes em cada grupo foram registradas em até 72 horas. Todos os animais foram observados continuamente nas primeiras quatro horas. Foram observados parâmetros de alterações comportamentais e fisiológicas (*screening* hipocrático) por 14 dias (GASPI et al., 2006). Nesse contexto, a diminuição da atividade motora/exploratória foi mensurada pela contagem das vezes em que o animal adentrava cada divisória do campo experimental (Figura 4.7) dentro de 120 segundos, antes e imediatamente após a administração do extrato.



Figura 4.7 – Campo experimental utilizado no *screening* hipocrático. Dimensões da caixa de vidro: 63 x 39 x 26 cm; Divisões internas: 8 x 8 x 6 cm.

Testes de equilíbrio e apreensão das patas antes e após o extrato também foram realizados, nos quais os animais eram colocados com as quatro patas sobre uma pipeta graduada de vidro de 2,0 mL, suspensa ao ar, antes e após as aplicações do extrato, e o tempo de permanência na mesma era medido em segundos.

4.3.2.4 Avaliação da capacidade antiedematogênica

Esta avaliação foi realizada segundo Lapa et al. (2008), utilizando o plestimômetro digital LE – 7500, Panlab (Figura 4.8).

Foram realizados dois testes: um com a administração oral por gavagem de solução controle, droga padrão e extrato, e outro com administração intraperitoneal dos mesmos. Em ambos foi utilizada solução salina estéril (0,9% p/v) como veículo do extrato, na preparação da solução de carragenina (λ -carrageenan, Biochemika, Fluka) a 1% p/v e na preparação da solução de indometacina (Indocid®, MSD) a 10,0 mg/mL, ambas frescamente preparadas. As ratas utilizadas tinham peso corpóreo variando entre 100,0 e 220,0 g, e foram convenientemente divididas de forma que o coeficiente de variação entre os grupos do mesmo teste não ultrapassasse 20% (BRITO, 1994).



Figura 4.8 – Plestimômetro utilizado na análise de atividade antiedematogênica. A – equipamento completo; B – detalhe do eletrodo de leitura.

Para cada teste foram utilizados cinco grupos de seis ratas: um grupo para o controle negativo (salina), um grupo para o controle positivo (indometacina 10,0 mg/kg) e três grupos para diferentes doses do extrato (10,0; 50,0 e 100,0 mg/ kg i.p. e 100,0; 200,0 e 400,0 mg/kg v. o.). Antes de qualquer administração, o volume das patas foi mensurado.

Após uma hora da administração de salina e das drogas, 0,1 mL da solução de carragenina foi injetado na aponeurose plantar da pata direita traseira de todos os animais, enquanto que a pata esquerda traseira recebeu o mesmo volume de salina. O volume de ambas as patas de todos os animais foi medido em meia, uma, duas, três, quatro e cinco horas após a injeção de carragenina. A progressão do edema foi calculada por diferença entre as medidas antes e após a injeção da carragenina.

4.4 Análise estatística

Para os cálculos referentes às fórmulas descritas no corpo da dissertação, cálculos de média, desvio-padrão, coeficiente de variação e confecção de gráficos referentes a esses resultados foi utilizado o programa Microsoft Excel 2007[®] (Microsoft Corporation).

O tamanho médio das partículas da MPV e as concentrações inibitórias mediana (CI₅₀) dos testes *in vitro* foram calculados no programa OriginPro 8 (OriginLab Corporation), também utilizados na confecção dos gráficos referentes a esses dados.

Para análises de variância foi utilizado o programa SigmaPlot para Windows, versão 11.0 (Systat Software, Inc.), considerando valores de $p < 0,05$ como significativos e intervalo de confiança de 95%. O cálculo da dose letal mediana (DL₅₀) das avaliações toxicológicas foi feito por análise de probitos com o auxílio do programa StatPlus versão 2007 (AnalystSoft), que também foi utilizado para a confecção de gráficos referentes a esses dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo farmacognóstico

5.1.1 Análise macroscópica

A casca do caule de *Byrsonima japurensis* possui duas camadas com cores e texturas distintas. A camada externa é enegrecida, com superfície áspera e dura. Quanto à fragilidade, essa camada é quebradiça, e desprende com facilidade da camada inferior, especialmente após secagem. A camada interna, que foi a utilizada neste trabalho para a confecção do extrato, tem cor vermelha opaca e superfície áspera, de aparência ressecada e consistência fibrosa, o que é especialmente verificado com a quebra do material (Figura 5.1).

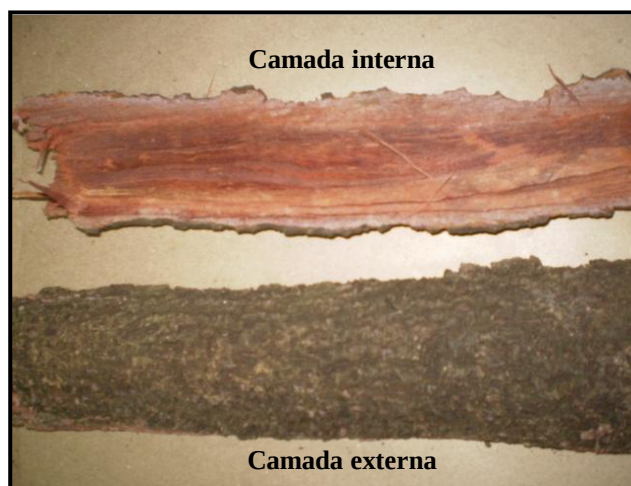


Figura 5.1 – Aspecto da casca do caule de *Byrsonima japurensis*.

5.1.2 Análise histoquímica

Nos testes histoquímicos realizados na casca do caule de *Byrsonima japurensis*, foram detectados lipídeos, amido e compostos fenólicos (Figura 5.2, pág. 91), acumulados principalmente nas células do raio e no parênquima axial. Não foram detectados alcalóides na amostra.

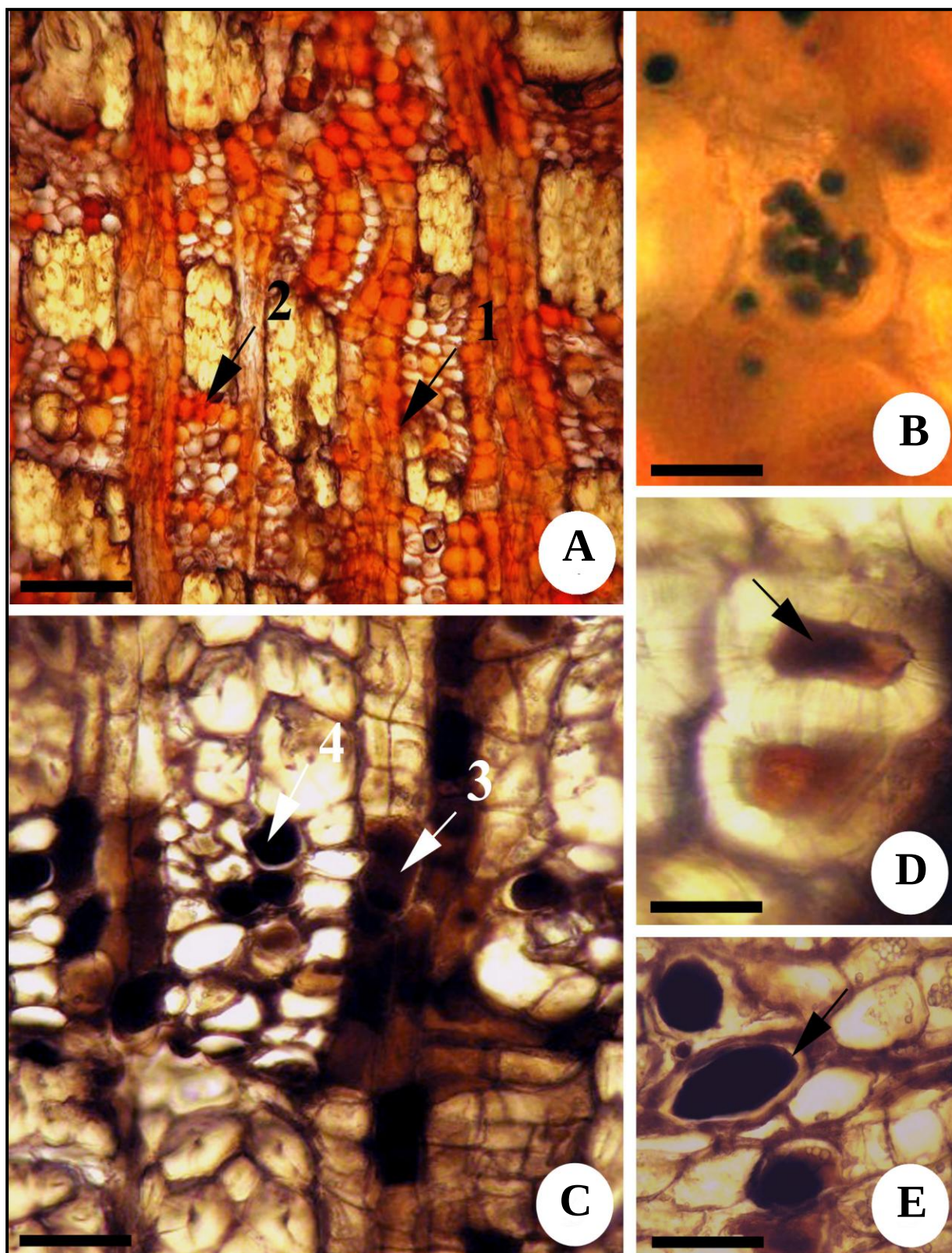


Figura 5.2 – Análise histoquímica da casca do caule de *Byrsonima japorensis*. A – lipídeos nas células do raio (seta 1) e nas células do parênquima axial (seta 2); B – grãos de amido nas células do raio; C – compostos fenólicos nas células do raio (seta 3) e do parênquima axial (seta 4); D – esclereides com conteúdo fenólico no lume das células (seta); E – células de parênquima com conteúdo fenólico (seta). Barras = 100 μm (A), 40 μm (B, E), 60 μm (C), 25 μm (D).

A abundância de grãos de amido e lipídeos nas células do parênquima da casca de *B. japurensis*, ambos integrantes do metabolismo primário das plantas e com papel no suprimento de energia necessária a atividades vitais, pode estar associada à manutenção de reservas de carbono necessárias ao estímulo de crescimento, após algum tipo de injúria no caule, provocada por fatores abióticos (MACHADO et al., 2005). A retirada da casca por ribeirinhos, para a confecção dos chás e outros usos, pode ter influência neste aspecto.

Além disso, os lipídeos são a base estrutural dos compostos esteroidais e terpenóides, grupo de metabólitos secundários no qual se incluem saponinas, heterosídeos cardioativos e triterpenos, que desempenham funções na proteção das plantas contra a herbivoria. Entre os lipídios detectados em *B. japurensis*, podem estar incluídos alguns ou todos esses metabólitos secundários citados, já que a análise qualitativa aqui realizada não permite tal distinção.

A abundância de compostos fenólicos na casca de *B. japurensis* pode ser explicada pela grande incidência de radiação ultravioleta na Região Amazônica, localizada na zona equatorial do globo. Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre a intensidade de radiação solar e a produção de flavonóides e taninos, que são os metabólitos responsáveis pela proteção da planta contra os raios ultravioletas e consequentemente, o aquecimento excessivo e a produção de radicais livres, que poderiam danar os tecidos. Compostos fenólicos também atuam como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes e na defesa contra herbívoros e patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Alguns estudos indicam que há um aumento na produção compostos fenólicos, especialmente antocianinas, em situações de estresse hídrico, o que contribui para a manutenção da integridade estrutural dos tecidos da espécie durante períodos de desidratação (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Nesse aspecto, o ambiente natural da espécie, a várzea amazônica, pode ter grande influência, visto que é uma área caracterizada por período de cheia e seca intermitentes.

Assim como os lipídeos, os compostos fenólicos também englobam diferentes grupos de substâncias que não puderam ser distinguidos nesta análise preliminar, nomeadamente, flavonóides, taninos e lignanas. Os flavonóides, por exemplo, são considerados os metabólitos secundários de maior interesse científico, dadas as funções que exercem nos vegetais e a comprovação de diversas atividades farmacológicas de vários representantes, relacionadas principalmente à capacidade antioxidante e de inibição enzimática dessa classe de substâncias (MACHADO et al., 2008).

A ausência de alcalóides em *B. japurensis* pode ser consequência da característica do solo da Região Amazônica, que é reconhecidamente mais pobre em nutrientes que solos de outras regiões do Brasil. A exuberância das florestas de terra firme é mantida por uma fina camada de matéria orgânica (serrapilheira), que é oriunda da própria vegetação e decomposta por fungos saprófitos, e as florestas de várzeas são mantidas pelos nutrientes trazidos pelas águas dos rios durante a cheia (ADAMS et al., 2005; DEMATTÊ; DEMATTÊ, 1993).

Muitos trabalhos já demonstraram que há uma relação negativa entre a produção de alcalóides e pouca disponibilidade de nitrogênio e até mesmo de fósforo e potássio. Em contrapartida, a produção de compostos fenólicos parece ser aumentada em espécies oriundas de solos com essas características, e menores quantidades dessas substâncias são produzidas em solos com abundante quantidade de nitrogênio (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

De maneira geral, a produção de metabólitos secundários reflete a adequação da espécie ao seu ambiente. Embora todo tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de produzir essas substâncias, em várias espécies existem locais de biossíntese e armazenamento específicos, e os mesmos somente são mobilizados quando necessário. Em outros casos, a produção de um determinado metabólito pode estar restrita a um determinado estágio do desenvolvimento do vegetal ou até mesmo a um ataque microbiológico (SANTOS, 2007).

Por isso, fatores como época e hora da coleta, idade da planta e fatores ambientais como temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, radiação ultravioleta, altitude, além de estímulos mecânicos ou ataque de patógenos têm influência na natureza e concentração de metabólitos secundários e devem ser ponderados em um estudo com plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Portanto, pode-se dizer que a ausência de alcalóides na casca do caule de *B. japurensis* não é determinante da sua ausência em outras partes da planta. Contudo, como neste trabalho a droga vegetal estudada é a mesma utilizada na medicina popular, pode-se inferir que esses compostos não têm influência nos efeitos farmacológicos declarados pela população.

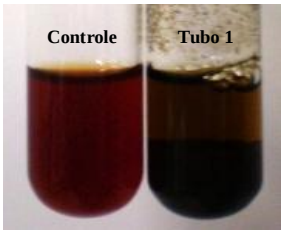
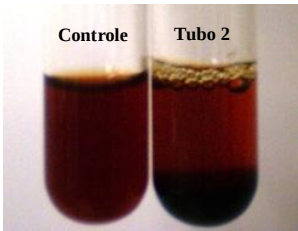
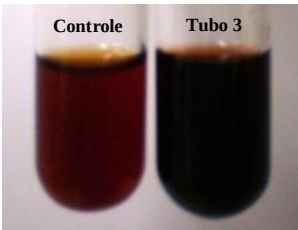
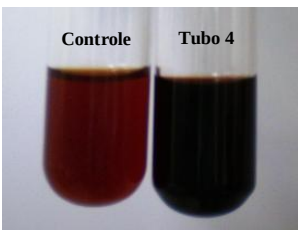
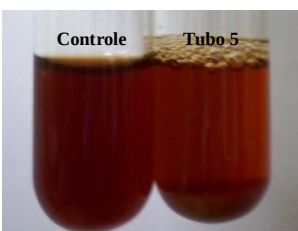
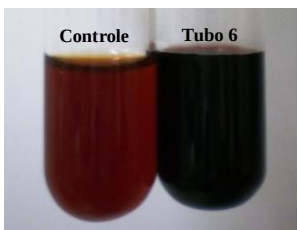
5.1.3 Prospecção fitoquímica preliminar

Toda a bateria de testes de prospecção fitoquímica foi realizada por dois avaliadores diferentes e com o número de repetições necessárias para sanar quaisquer dúvidas. As adaptações feitas à consagrada metodologia de Matos (1997) foram baseadas em tentativas anteriores de análise desta droga vegetal, cujo extrato obtido da forma sugerida pelo autor (bastante concentrada), impossibilitava a observação de quaisquer mudanças de cores e de formação de precipitados, dada coloração escura que possuía. Vale ressaltar que as análises foram realizadas somente com extratos de natureza hidrofílica, devido ao solvente que seria utilizado para a obtenção do extrato bruto neste trabalho.

5.1.3.1 Constituintes fenólicos e esteroidais

Os resultados dos testes de investigação de fitoconstituintes fenólicos e esteroidais na casca de *B. japurensis* estão dispostos na tabela 5.1 (pág. 95). A tabela 5.2 (pág. 97) mostra os resultados da investigação de heterosídeos cardioativos.

Tabela 5.1 – Resultados da prospecção fitoquímica de compostos fenólicos e esteroidais

Constituinte investigado	Figura correspondente	Resultado
Taninos		Positivo para taninos condensados
Antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas chalconas e auronas Flavononóis		Positivo para antocianinas e antocianidinas e chalconas e auronas
Antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas chalconas e auronas Flavononóis		Confirmou antocianinas e antocianidinas
Antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas chalconas e auronas Flavononóis		Confirmou chalconas e auronas
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas		Positivo para catequinas
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas		Positivo para flavanonas

(continua)

(continuação da Tabela 5.1)

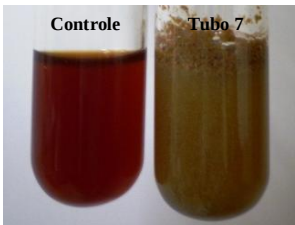
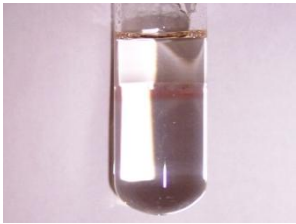
Constituinte investigado	Figura correspondente	Resultado
Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas		A ausência de cor vermelha descarta a presença de flavonóis, flavononóis e xantonas. A cor apresentada pode ser indicativa da presença de chalconas que isomerizaram nas flavanonas correspondentes durante a reação (HARBORNE, 1964)
Esteróides e triterpenóides		Positivo para triterpenóides pentacíclicos livres
Saponinas		Positivo
Confirmatório para saponinas		Positivo
Cumarinas		Negativo

Tabela 5.2 – Resultados da prospecção fitoquímica de heterosídeos cardioativos

Reação empregada	Figura correspondente	Resultado
Reação de Keller-Killiani		Positivo
Reação de Pessez		Positivo
Reação de Liebermann-Burchard		Positivo
Reação de Kedde		Positivo
Reação de Baljet		Positivo
Reação de Legal		Positivo

5.1.3.2 Constituintes nitrogenados

Não foram detectados heterosídeos cianogênicos na casca de *Byrsonima japurensis* (ausência de mancha marrom no papel de picrato de sódio), como pode atestar a figura 5.3.



Figura 5.3 – Resultado da prospecção fitoquímica de heterosídeos cianogênicos.

Os resultados da investigação da presença de alcalóides em todas as reações empregadas estão organizados na tabela 5.3. O tubo 1 é o controle em todas as figuras.

Tabela 5.3 – Resultados da prospecção fitoquímica de alcalóides

Reação empregada	Figura correspondente	Resultado
Reação de Meyer		Negativo
Reação de Bertrand		Negativo
Reação de Hager		Negativo
Reação de Dragendorff		Negativo

Dos três grandes grupos de metabólitos secundários das plantas, as substâncias fenólicas, as substâncias esteroidais e as substâncias nitrogenadas, os dois primeiros foram detectados na prospecção fitoquímica da casca de *Byrsonima japurensis*, o que foi coerente com os resultados dos testes histoquímicos realizados na droga vegetal.

A prospecção fitoquímica esclareceu que entre os compostos lipídicos encontrados na análise histoquímica estavam triterpenos, saponinas e heterosídeos cardioativos e que os compostos fenólicos encontrados eram, predominantemente, chalconas, auronas, flavanonas, antocianidinas (agliconas) e/ou antocianinas (heterosídeos) e catequinas, todas classes de flavonóides, e taninos condensados.

A presença de heterosídeos cardioativos, classe de metabólitos com distribuição restrita na natureza, ainda não havia sido reportada no gênero, mas a ausência de alcalóides na casca do caule da espécie é coerente com os achados de Raffauf (1996). Houve discrepância entre as classes de flavonóides detectadas em *B. japurensis* e em outras espécies do mesmo gênero, nas quais os trabalhos já realizados indicam predominância de flavonóis e flavonas (Tabela 2.3, pág. 34-40). Contudo, tanto esse resultado quanto a presença de taninos condensados são adequados à natureza da droga vegetal.

Os taninos condensados estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas, sendo formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Em muitos deles, a unidade fundamental é uma catequina. Sua degradação com ácidos minerais diluídos dá origem à antocianidinas e por isso esses compostos são também chamados de proantocinidinas (SANTOS; MELO, 2007)

Antocianidinas são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, responsáveis pelas cores laranja, rosa, escarlata, vermelho, violeta e azul nas plantas. São mais encontradas na forma de seus heterosídeos, as antocianinas, pois os açúcares conferem maior estabilidade à sua molécula (DORNAS et al., 2007).

Chalconas e auronas são consideradas precursoras da biossíntese de flavonóides, e são encontradas em geral nas mesmas plantas. As chalconas também atuam na pigmentação, sendo responsáveis pela cor amarela em muitos vegetais. São relativamente instáveis e isomerizam com certa facilidade nas suas flavanonas correspondentes (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Embora a prospecção fitoquímica seja de grande valia na elucidação química prévia de uma espécie em estudo, é uma análise qualitativa de pouca sensibilidade, em que a presença de compostos em concentrações menores pode acabar sendo mascarada. Por isso, não é prudente afirmar que os compostos não detectados nesta análise não estão presentes na espécie, mas é possível concluir que os que foram são majoritários.

Por outro lado, a ausência de alcalóides conta com o embasamento prévio da análise histoquímica, que é mais sensível, pois se trata de uma análise feita no próprio tecido vegetal. Além disso, na técnica utilizada para a investigação de alcalóides, o método de extração é específico para essa classe de substâncias.

5.1.4 Análise da qualidade da MPV

As características físico-químicas da amostra utilizada para a obtenção dos extratos utilizados neste trabalho, após raspagem, secagem à 40 °C e pulverização, são apresentadas na tabela 5.4 como média, desvio-padrão e coeficiente de variação.

Tabela 5.4 – Resultados da análise físico-química da MPV

Análise	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação
Tamanho médio das partículas	318,30 µm	1,65 µm	0,52 %
Perda por dessecação	10,32 %	0,09 %	0,87 %
Teor de cinzas	3,39 %	0,04 %	1,18 %
Teor de extrativos	12,23 %	0,17 %	1,39 %

A padronização da matéria-prima vegetal utilizada para a obtenção de extratos empregados com finalidade terapêutica reflete na reprodutibilidade dos efeitos do produto final. Portanto, o estabelecimento de parâmetros físico-químicos de qualidade para a matéria-prima derivada da casca do caule de *B. japurensis* é um determinante inicial da qualidade de um fitoterápico que venha a ser produzido com a espécie (CARVALHO et al., 2006).

Segundo o resultado da análise granulométrica (tamanho médio das partículas), a MPV obtida da casca de *B. japurensis* classifica-se como “pó moderadamente fino” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). As frequências acumuladas de passagem e retenção das partículas da MPV no tamisador estão ilustradas na figura 5.4.

O tamanho das partículas da amostra influencia diretamente na eficiência de uma extração, já que implica na área de contato entre o material sólido e o solvente. Quanto mais rígido o tecido da droga vegetal, mais difícil é a penetração pelo líquido extrator. Assim sendo, para tecidos compactados como casca de caule, por exemplo, é recomendado que se reduza a granulatura ao menor tamanho possível (FALKENBERG et al., 2007).

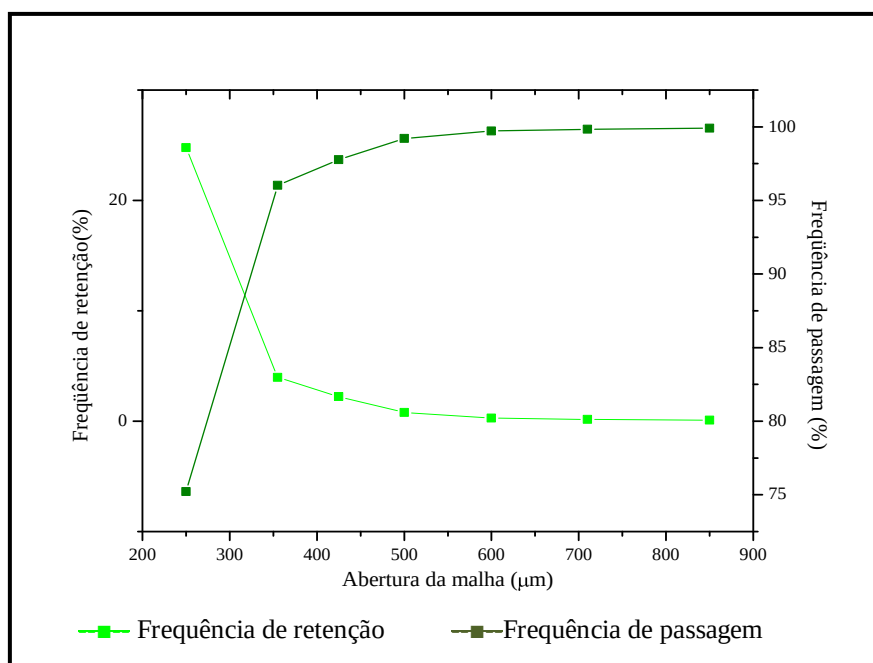


Figura 5.4 – Padrão de distribuição das partículas da MPV nos tamises utilizados.

Porém, a rigidez do material também dificulta o processo de moagem. Por isso, neste trabalho foi utilizado moinho de facas com tamis de 0,5 mm de abertura de malha, sistema com o qual foi obtida uma granulatura adequada para a amostra. Tamises com abertura menor poderiam dificultar o processo, aumentando o tempo de execução e a perda de material.

A análise da perda por dessecação determina a quantidade de água e substâncias voláteis na droga vegetal. O excesso de água em matérias-primas vegetais pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias e deterioração de substâncias por atividade enzimática, além de interferir nos processos de extração (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A Farmacopéia Brasileira 4^o edição (1988) preconiza que teores de água dentro da faixa de 8 a 14%, na qual se encontra a MPV deste trabalho, são adequados à manutenção das propriedades de uma droga vegetal em condições de estocagem. Teores superiores a essa faixa requereriam secagem imediata após coleta. Este é um dado importante para o futuro desenvolvimento de um fitoterápico com a espécie, já que indica que a matéria-prima não requer longos ou sofisticados processos de secagem. Durante a análise da perda por dessecação, observou-se que três horas de secagem em estufa a 105 °C são suficientes para a eliminação da água presente na amostra.

O teor de cinzas totais serve de parâmetro de detecção de adulterações da matéria-prima, uma vez que reflete a quantidade de matéria inorgânica presente na droga vegetal, que podem ser de origem fisiológica, presentes no próprio tecido da planta, ou não fisiológica, por exemplo, resíduos de solo aderidos à superfície do vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Como a superfície externa da droga vegetal utilizada neste trabalho foi raspada para a retirada de impurezas, pode-se presumir que o teor de cinzas detectado é representativo das cinzas fisiológicas. As antocianinas, por exemplo, cuja principal ação nas plantas é agir como atrativos para insetos e pássaros para a polinização e dispersão de sementes, podem, muitas

vezes, formar complexos coloridos com diferentes metais (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

A Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988) admite um máximo de 14% no teor de cinzas totais, porém, uma vez que foi determinado que a matéria-prima vegetal de *B. japurensis* possui teor de cinzas fisiológicas em torno de 3,5%, valores acima deste podem ser considerados indicativos de adulteração da mesma.

A análise do teor de extrativos determina a quantidade de material extraível por um determinado solvente, aplicável quando não há estudo físico-químico ou biológico adequado com a matéria-prima. Trata-se de um parâmetro inicial da viabilidade de extração com o solvente escolhido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Neste trabalho, a intenção inicial era utilizar uma extração a quente com água destilada para a obtenção do extrato que seria submetido aos testes de atividade farmacológica, respeitando o uso popular da espécie, e baseado nos fatos de que extrações a quente são mais rentáveis e mais rápidas que extrações a frio e que grande parte das classes de constituintes de interesse químico-farmacológico é extraível por solventes polares. Além disso, a água destilada é um solvente isento de toxicidade e de baixo custo (FALKENBERG et al., 2007).

Nesse caso, a *World Health Organization* (1998) preconiza a avaliação do teor de extrativos pelo método da decocção. O resultado apresentado pela MPV deste trabalho foi considerado bastante satisfatório, já que o rendimento foi superior a 10%, indicando que extração a quente com água é um bom método extrativo para esta matéria-prima.

5.1.5 Estudo para a obtenção do extrato bruto

A média do resíduo seco (RS) das SE obtidas no item 4.2.4 (pág. 74) são mostrados na tabela 5.5 (pág. 104), juntamente o rendimento de cada método extrativo e o coeficiente de variação da análise.

Tabela 5.5 –Resíduo seco dos diferentes métodos extrativos

Solução extrativa	Média do rendimento	Coefficiente de variação
Decocção a 5%	6,6259 %	1,3940
Decocção a 15 %	4,8708 %	1,5075
Infusão a 5 %	10,5383 %	1,7113
Infusão a 15 %	5,8497 %	1,8921

A análise estatística dos resultados (ANOVA) demonstrou que ambas variáveis independentes (método de extração e relação droga:solvente) apresentaram influência significativa e negativa sobre os resíduos secos ($p < 0,001$), conforme ilustra a figura 5.5.

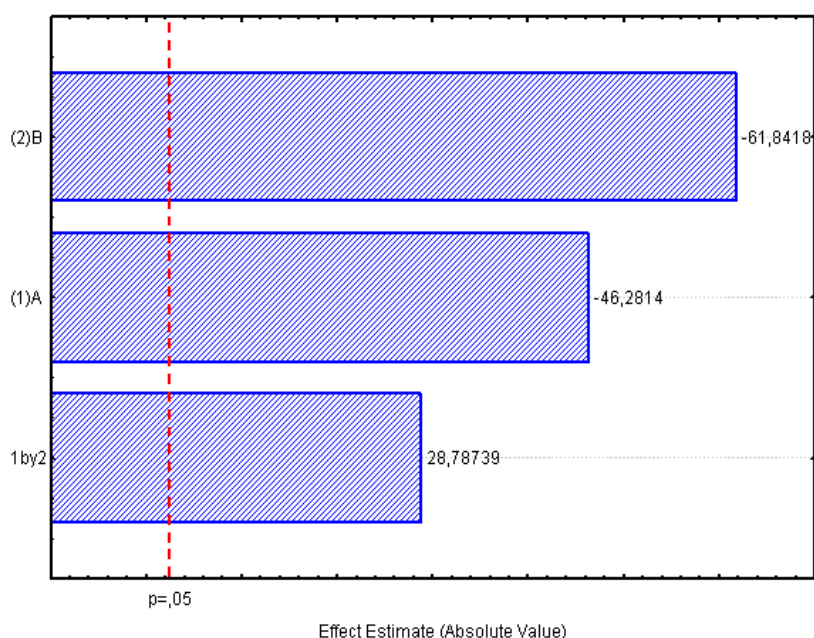


Figura 5.5 – Gráfico de Pareto da análise do teor de resíduo seco. No gráfico, A representa o método de extração e B, a relação droga solvente.

De acordo com os resultados, a infusão a 5% de droga vegetal é o melhor esquema extrativo em rendimento para a amostra dentre os que foram analisados. Por este motivo, este foi o método escolhido para a obtenção do extrato aquoso bruto, a partir de agora chamado de **I5**.

Uma explicação para o pior desempenho da decocção como método extrativo pode ser a decomposição de substâncias presentes na droga vegetal, em novas substâncias insolúveis no solvente utilizado, dada a alta temperatura em que se processa a extração. No processo de

infusão, o solvente sofre resfriamento gradual, visto que a extração se processa sob temperatura ambiente, o deve minimizar essas perdas.

As relações droga-solvente empregadas nesta análise tiveram o objetivo de mimetizar o uso popular (5%) ou tentar uma saturação total do solvente (15%). Foi constatado que a menor relação droga solvente favoreceu uma maior interação do pó com a água, minimizando efeitos de intumescimento, aumentando assim o rendimento da extração. Por isso, os métodos com 5% de matéria-prima vegetal (MPV) tiveram maiores teores de resíduo seco.

5.1.5.1 Estudo fitoquímico do extrato bruto

5.1.5.1.1 Perfil cromatográfico do extrato bruto (I5)

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) não obteve bons resultados. Inúmeros sistemas eluentes foram testados, mas nenhum proporcionou um bom perfil cromatográfico para a amostra. Por isso, na elaboração da coluna cromatográfica descrita no item 4.2.4.1.3 (pág. 78) foram utilizados sistemas determinados empiricamente e não pela cromatografia em camada delgada (CCD) prévia. As soluções cromogênicas utilizadas não destacaram nenhuma substância. Ao invés disso, independente do sistema utilizado, a amostra se apresentava como uma mancha escura única, que praticamente não se alterava em presença dessas soluções.

Contudo, conforme descrito nos itens 5.1.2 e 5.1.3 (pág. 90-100), a análise histoquímica e a prospecção fitoquímica da MPV evidenciaram a presença de grupos de constituintes químicos extremamente interessantes, que motivaram o fracionamento de I5 e as análises de espectrometria no infravermelho (IV) desse extrato e de algumas de suas frações, e as análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de algumas frações semipurificadas.

A figura 5.6 apresenta o espectro no infravermelho de I5. As absorções em 3222 e 1378 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações axial e angular de O–H. A absorção em 1607 cm^{-1} é característica de deformação axial de C=C em compostos aromáticos, o que é confirmado pelas bandas presentes na região entre 822 e 620 cm^{-1} , características de deformação angular fora do plano de C–H de sistemas aromáticos. A absorção em 1653 cm^{-1} é sugestiva de deformação axial de C=O, característica em sistemas conjugados (SILVERSTEIN et al., 2007).

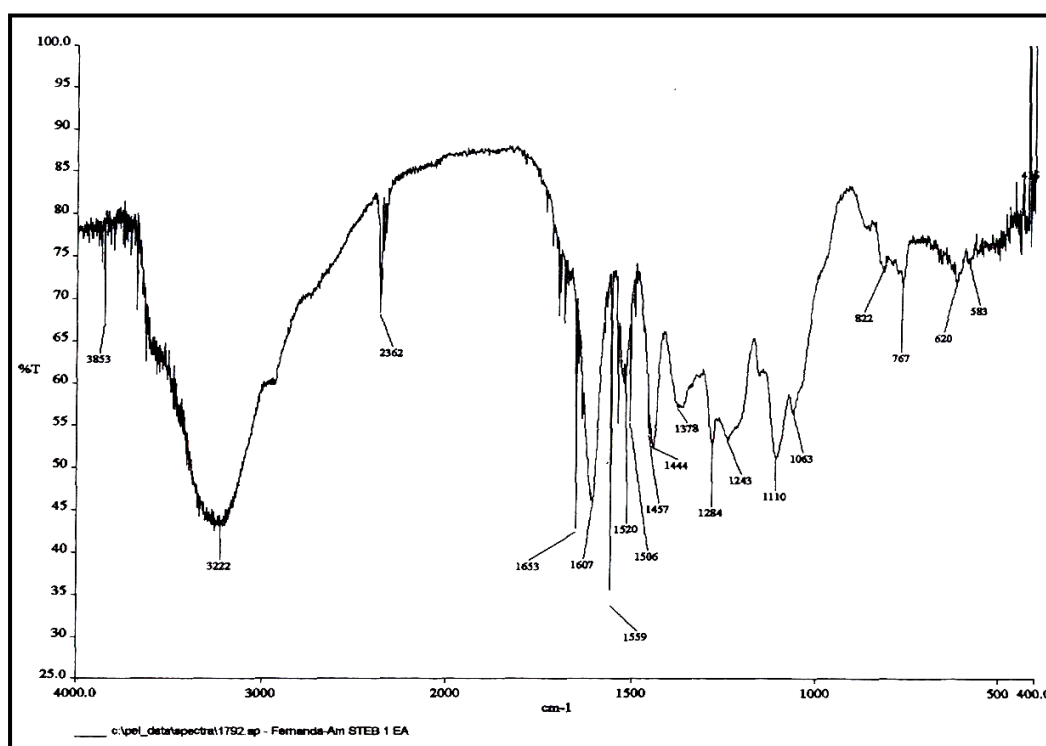


Figura 5.6 – Espectro no infravermelho do extrato aquoso bruto em KBr.

5.1.5.1.2 Perfil cromatográfico da fração éter etílico (FEE)

Em geral, a análise em CCD da FEE foi mais bem sucedida do que a de I5. Dentre os vários sistemas eluentes testados na análise em CCD da FEE, o sistema tolueno : clorofórmio : acetona (40:25:35) foi o que proporcionou melhor separação de substâncias, com manchas bem definidas e R_f razoavelmente distintos. Assim sendo, a amostra foi cromatografada juntamente com algumas substâncias padrão (Quadro 4.3, pág. 77), porém, nenhuma foi identificada na amostra.

Em grande parte, este resultado, aparentemente negativo, refletiu os resultados da prospecção fitoquímica da droga vegetal: apenas dois dos padrões de flavonóides testados pertenciam a classes detectadas na prospecção fitoquímica da amostra (hesperidina e naringenina, duas flavanonas).

Quercetina, quercetina-D-galactosídeo, ácido oleanóico, ácido ursólico e lupeol, apesar de já terem sido isolados de outras espécies do gênero *Byrsonima* (Tabela 2.3, pág. 34-40), não foram detectados nesta fração.

A figura 5.7 apresenta o espectro no infravermelho da fração éter etílico (FEE). A absorção em 3337 cm^{-1} é característica de deformação axial de O–H. As absorções registradas em 2961 e 2928 cm^{-1} são características de deformação axial de C–H. A absorção em 1733 cm^{-1} , embora atípica, é sugestiva de deformação axial de C=O. A absorções em 1616 e 1506 cm^{-1} , são típicas de deformação axial de C=C e de deformação angular fora do plano de C–H, respectivamente, em compostos aromáticos, confirmadas pelas absorções entre 860 e 668 cm^{-1} , também características de deformação angular fora do plano de C–H de sistemas aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

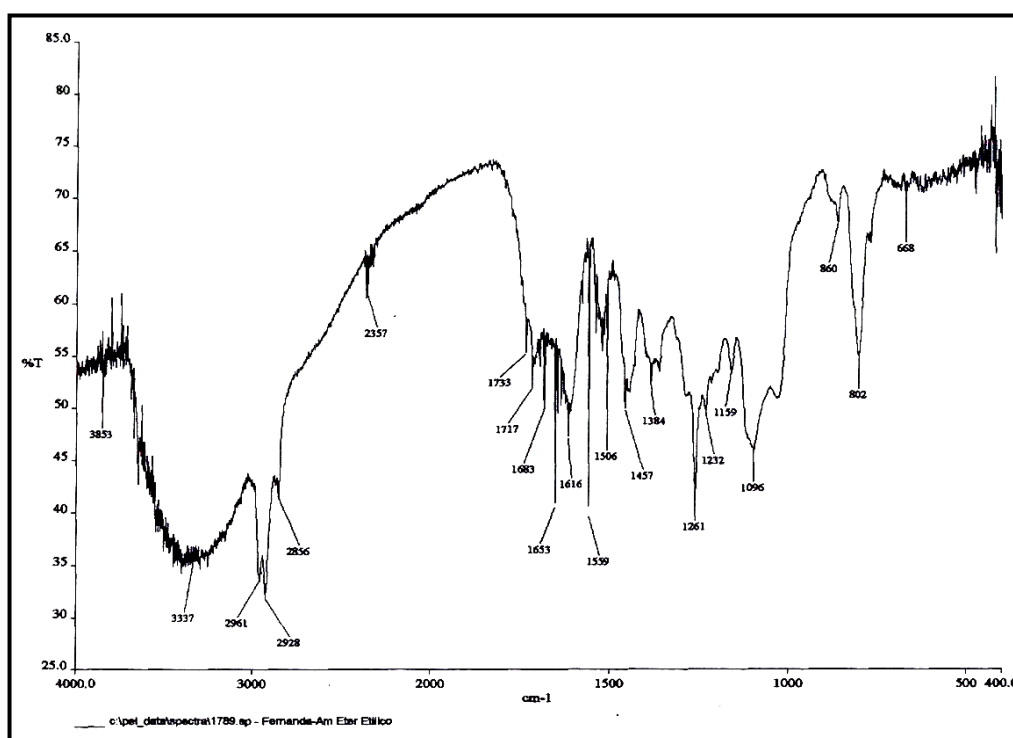


Figura 5.7 – Espectro no infravermelho da fração éter etílico em KBr.

5.1.5.1.3 Perfil cromatográfico da fração acetato de etila

Assim como na análise em CCD de I5, na análise desta fração também não foi possível obter um perfil cromatográfico satisfatório. Em muitos dos sistemas testados, a amostra sequer saía da origem de aplicação e em outros, apresentava-se como um rastro de cor escura. O uso de soluções cromogênicas também não destacou qualquer substância.

A figura 5.8 apresenta o espectro no infravermelho da fração acetato de etila (FAE). A absorção registrada em 3305 cm^{-1} é característica de deformação axial de O–H. As absorções em 2962 e 2927 cm^{-1} são características de deformação axial de C–H. As absorções na região entre 1616 e 1365 cm^{-1} e as absorções entre 864 e 618 cm^{-1} são características de deformação axial de C=C e deformação e angular fora do plano de C–H, respectivamente, em compostos aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

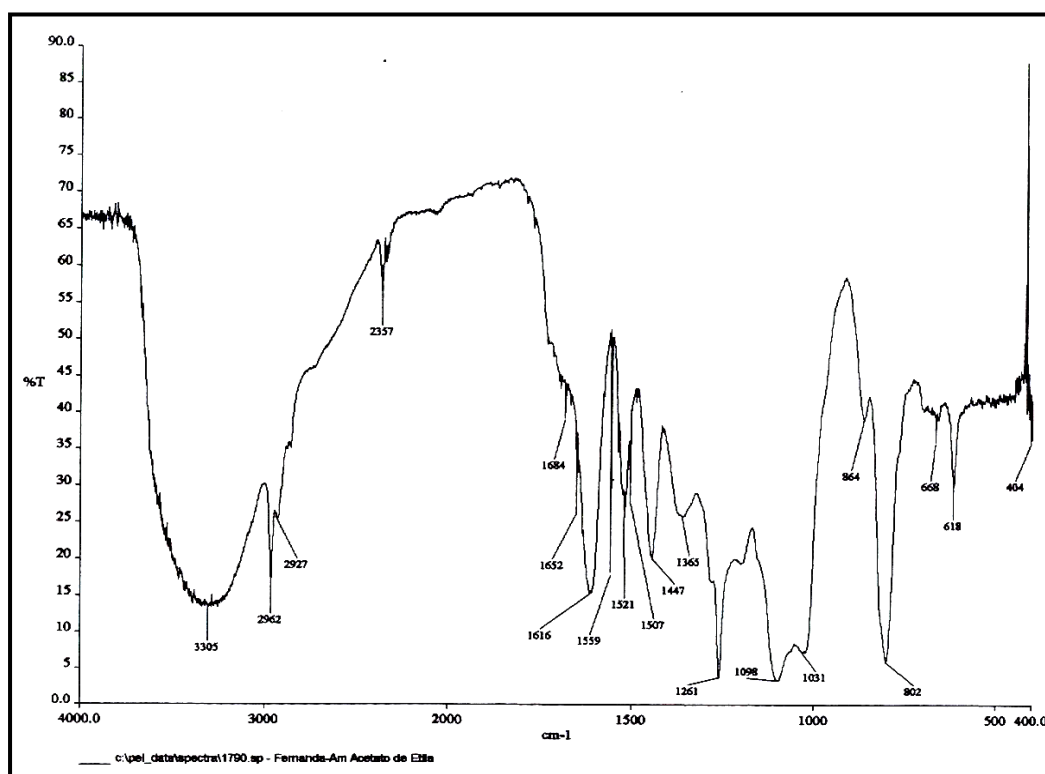


Figura 5.8 – Espectro no infravermelho da fração acetato de etila em KBr.

5.1.5.1.4 Análises das frações semi-purificadas

A figura 5.9 apresenta o espectro no infravermelho da fração STEB-1. A absorção em 3735 cm^{-1} , embora atípica, é sugestiva de deformações axial de O–H. As absorções em 2955 e 2925 cm^{-1} são características de deformações axiais de C–H. A absorção em 1730 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial de C=O. Absorções em 2854 e 1378 cm^{-1} são características de deformação axial e angular de C–H de carbono carbonílico. As absorções entre 805 e 705 cm^{-1} são características de deformação angular fora do plano de C–H em sistemas aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

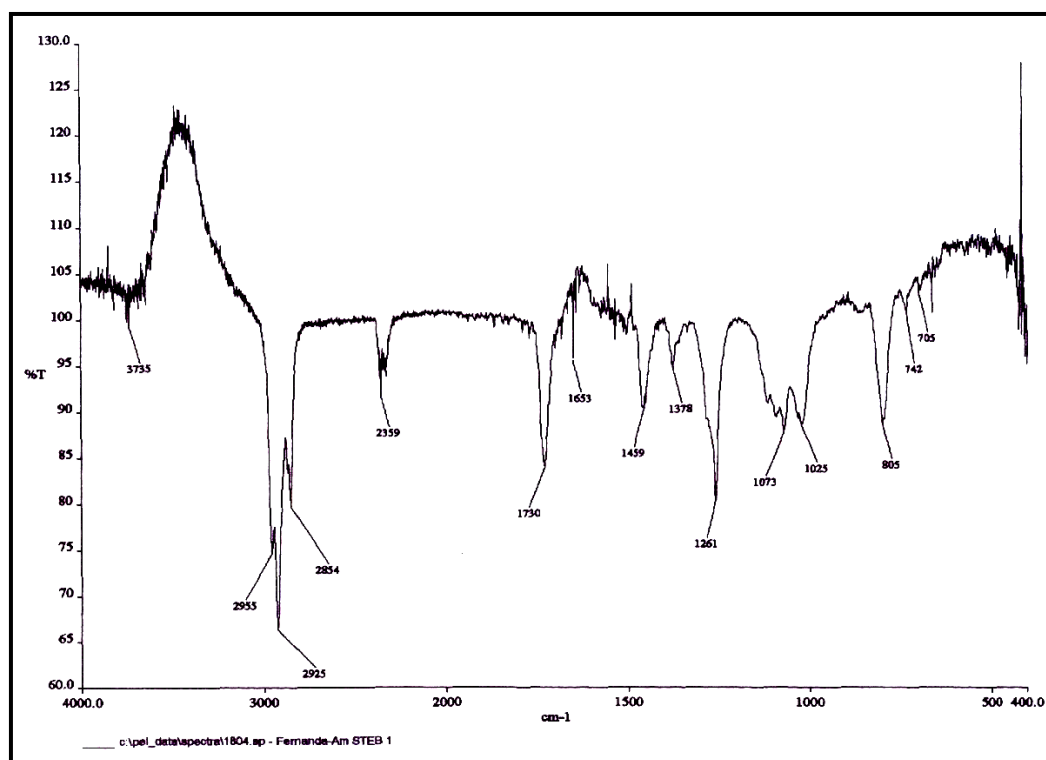


Figura 5.9 – Espectro no infravermelho de STEB-1 em KBr.

As figuras 5.10, 5.11 e 5.12 (pág. 110-111) apresentam o espectro de RMN de ^1H de STEB-1 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_{H} 1,40 e 0,78 podem ser atribuídos a hidrogênios de grupos alquilas. Os sinais entre δ_{H} 4,90 e 4,00 são característicos de hidrogênios olefínicos. Os sinais entre δ_{H} 7,75 e 7,60 podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

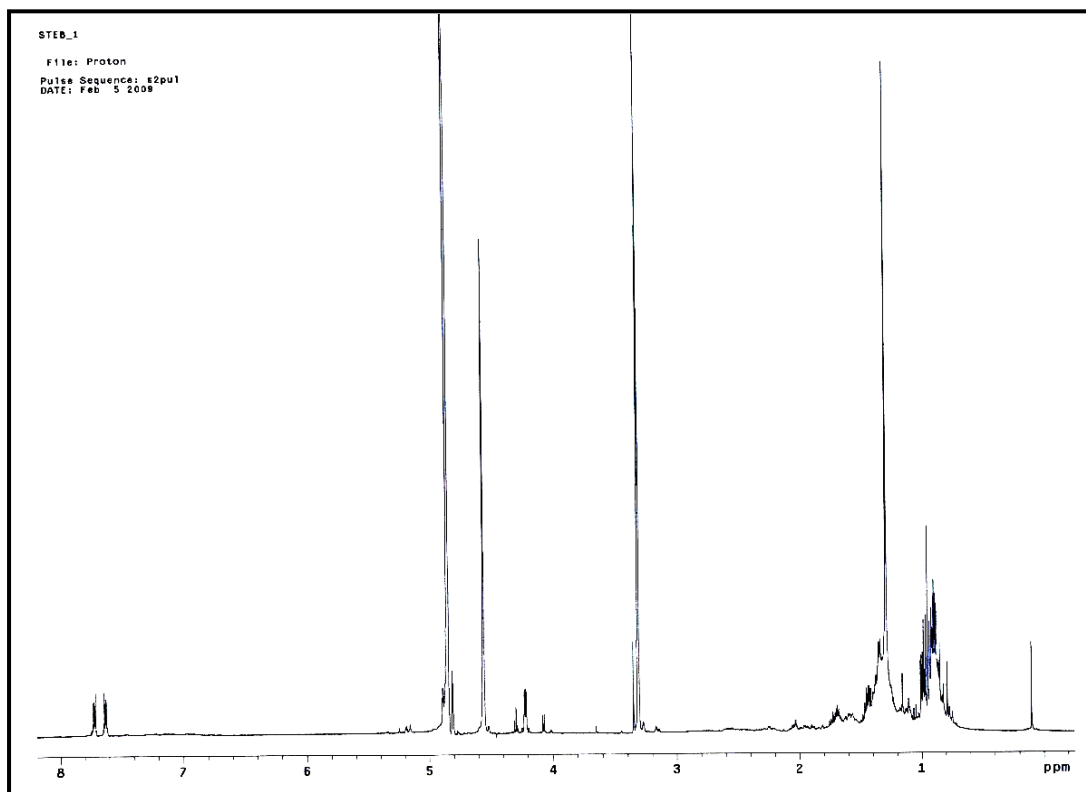


Figura 5.10 – Espectro de RMN de ^1H de STEB-1 (CD_3OD , 500 MHz).

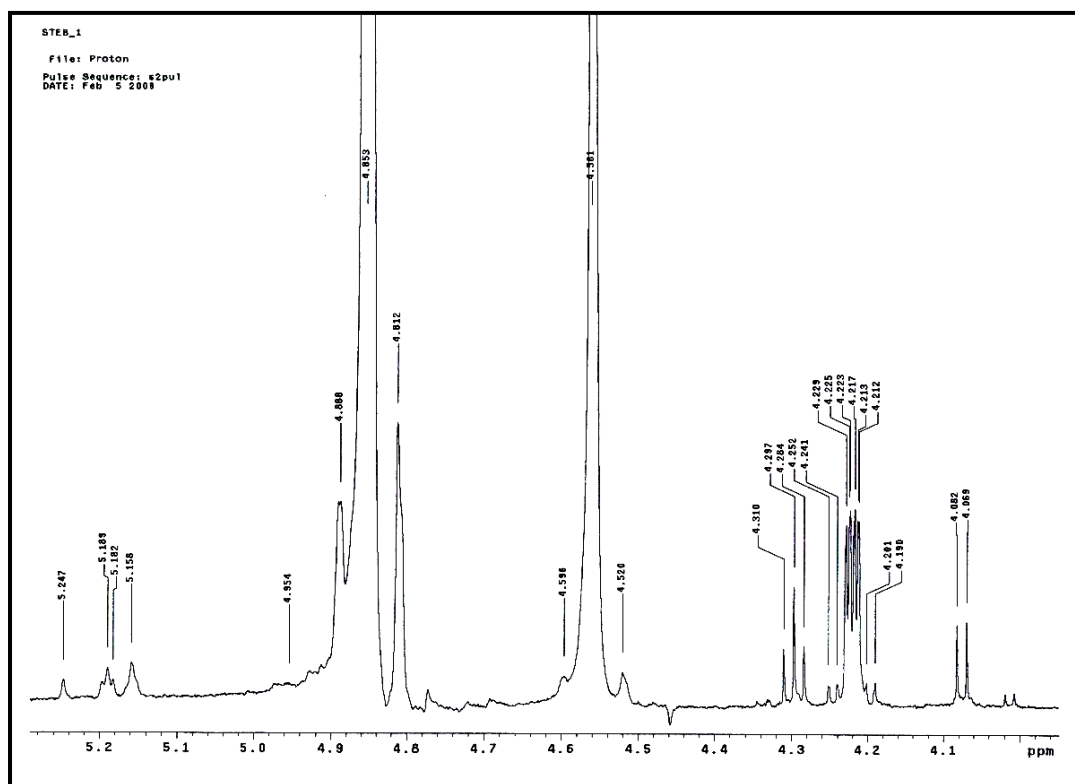


Figura 5.11 – Expansão na região entre δ_{H} 5,30 – 4,00 do espectro de RMN de ^1H de STEB-1 (CD_3OD , 500 MHz).

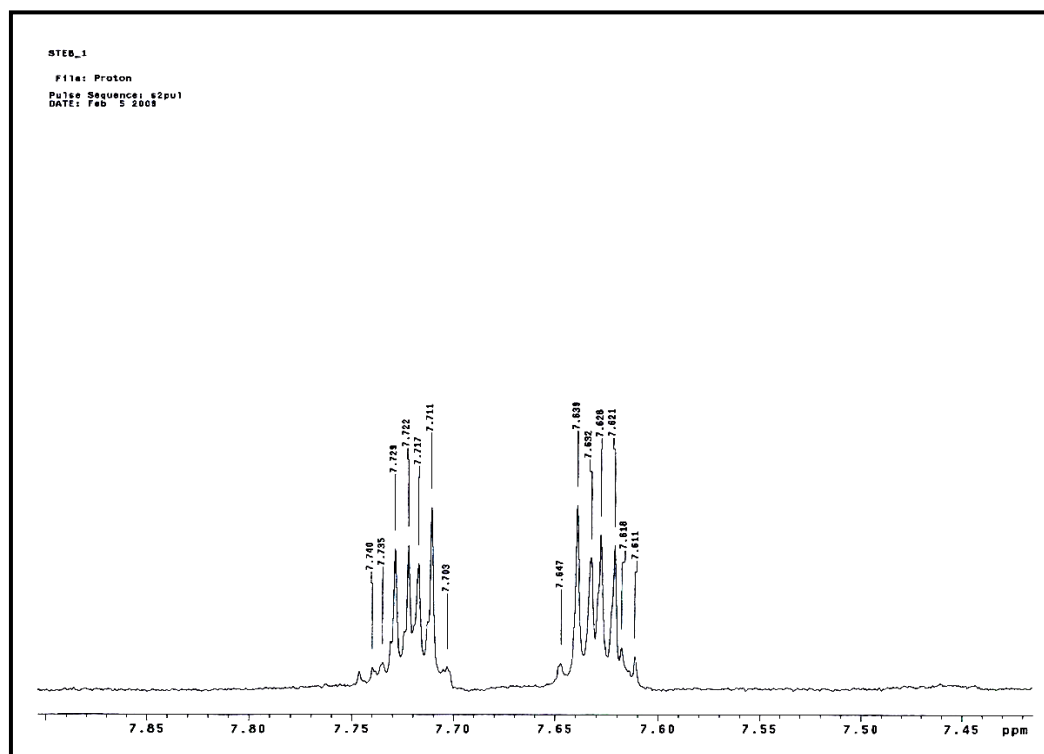


Figura 5.12 – Expansão na região entre δ_H 7,90 – 7,45 do espectro de RMN de 1H de STEB-1 (CD_3OD , 500 MHz).

As figuras 5.13, 5.14 e 5.15 (pág. 112-113) apresentam o espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_C 67,96 e 10,21 podem ser atribuídos a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos. O sinal em δ_C 78,54 pode ser atribuído a carbono tetrasubstituído oxigenado. Os sinais entre δ_C 132,42 e 122,02 podem ser atribuídos a carbonos olefínicos de sistemas aromáticos. O sinal em δ_C 168,17 é característico de carbono carbonílico (SILVERSTEIN et al., 2007).

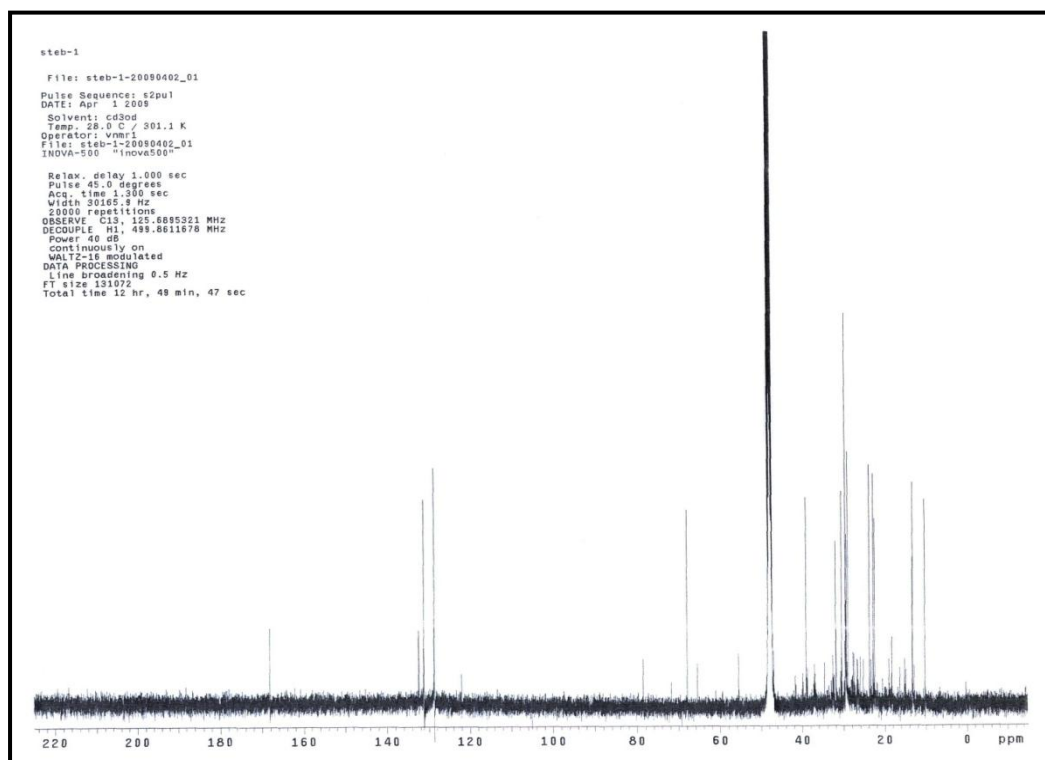


Figura 5.13 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

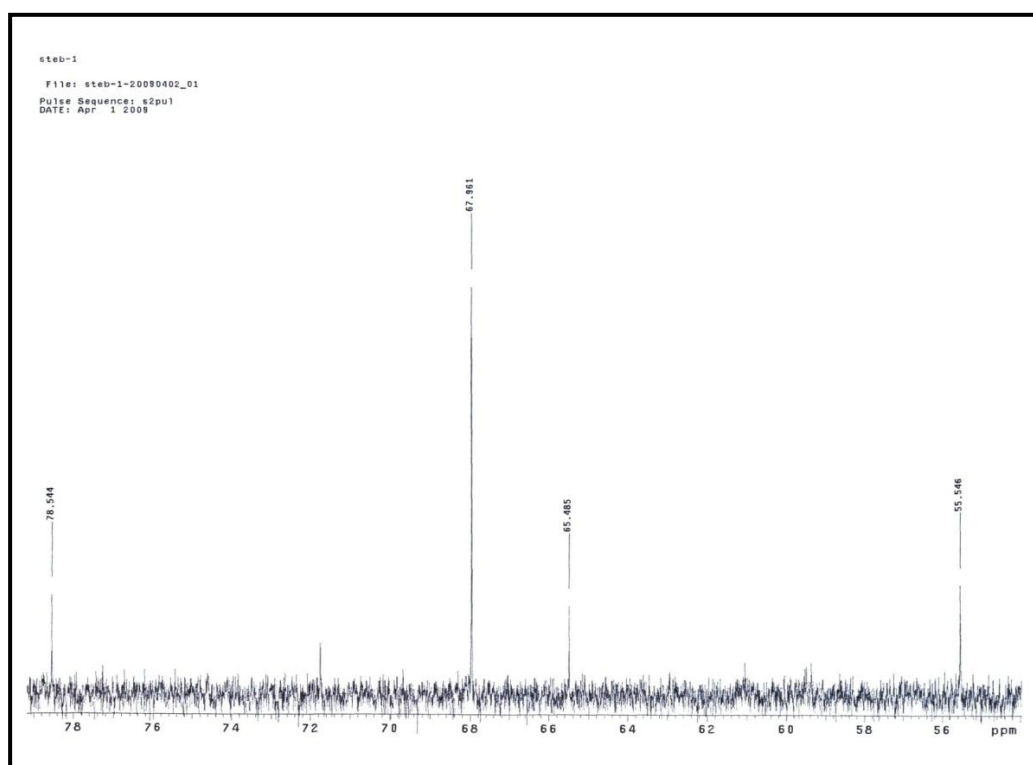


Figura 5.14 – Expansão na região entre δ_{C} 79,00 – 54,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

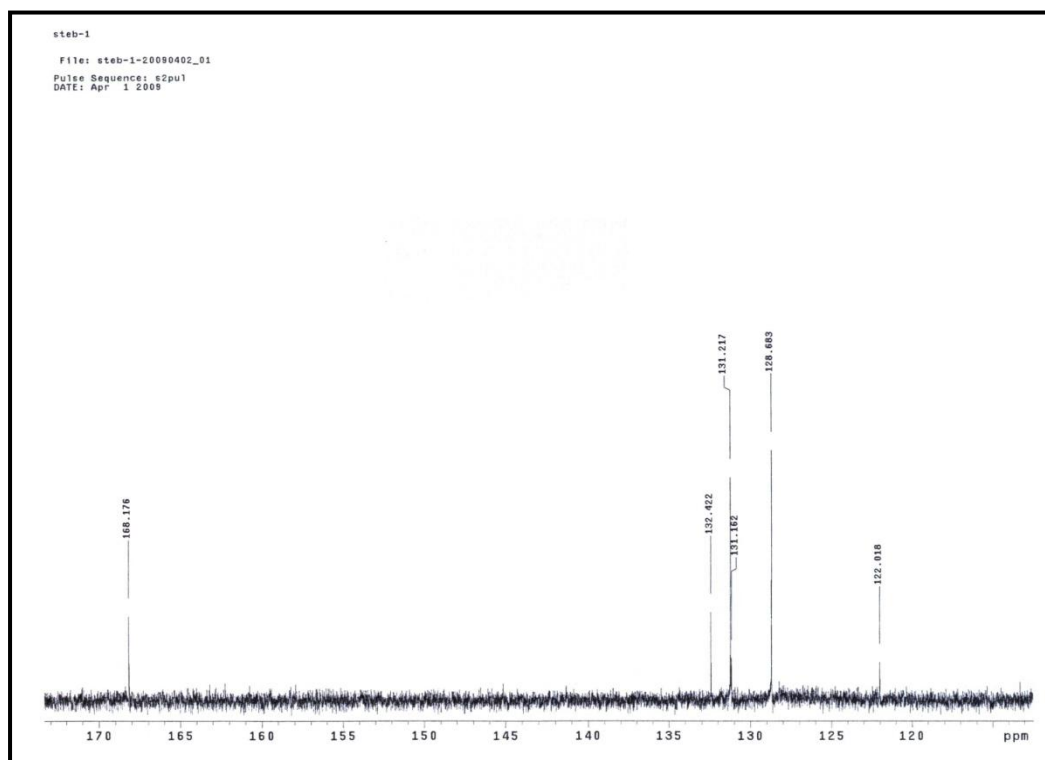


Figura 5.15 – Expansão na região entre δ_C 170,00 – 115,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

A figura 5.16 (pág. 114) apresenta o espectro no infravermelho da fração STEB-2. As absorções entre 3735 e 3650 cm^{-1} , embora atípicas, são sugestivas de deformação axial de O–H. As absorções em 2960 e 2924 cm^{-1} são características de deformação axial de C–H. A absorção em 1734 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial de C=O. As absorções em 2853 e 1362 cm^{-1} são características de deformação axial e angular de C–H de carbono carbonílico. Absorções na região entre 869 e 668 cm^{-1} são características de deformação angular fora do plano de C–H em sistemas aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

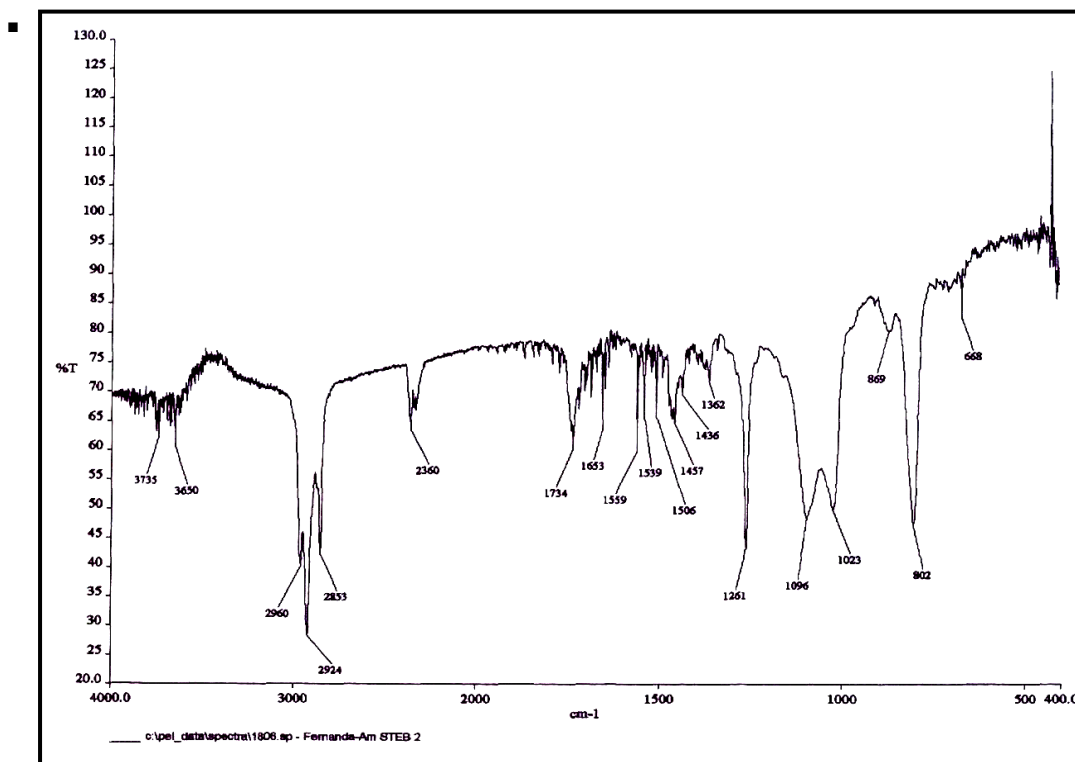


Figura 5.16 – Espectro no infravermelho da fração STEB-2 em KBr.

As figuras 5.17, 5.18 e 5.19 (pág. 115-116) apresentam o espectro de RMN de ^1H de STEB-2 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_{H} 1,50 e 0,50 podem ser atribuídos a hidrogênios de grupos alquilas. Os sinais entre δ_{H} 4,90 e 4,50 são característicos de hidrogênios olefínicos. Nessa mesma região, também podem ser observados sinais de hidrogênios ligados a oxigênios, como o sinal em δ_{H} 4,55. Os sinais entre δ_{H} 7,75 e 7,60 podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

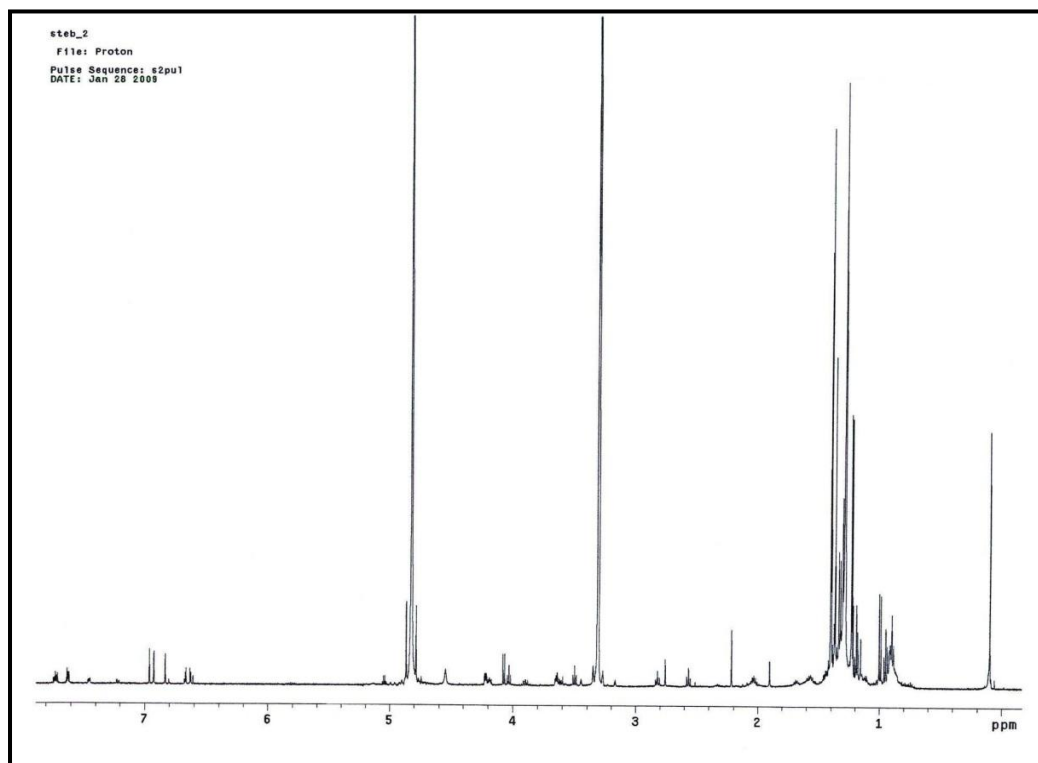


Figura 5.17 – Espectro de RMN de ^1H de STEB-2 (CD_3OD , 500 MHz).

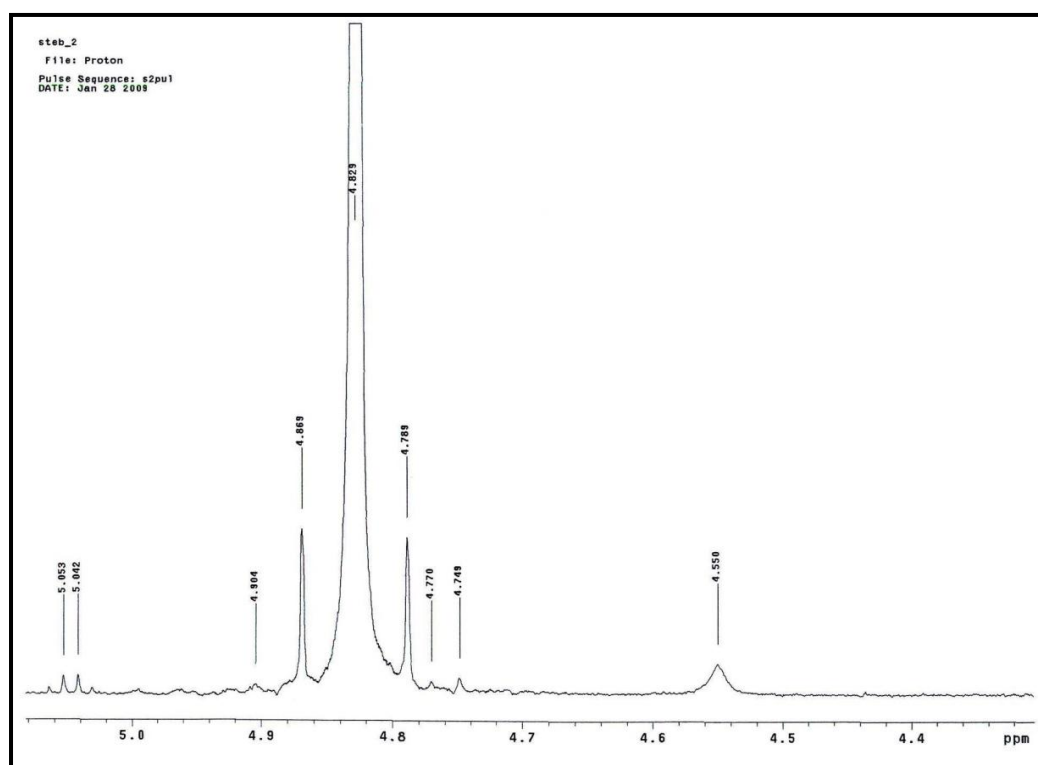


Figura 5.17 – Expansão na região entre δ_{H} 5,10 – 4,30 do espectro de RMN de ^1H de STEB-2 (CD_3OD , 500 MHz).

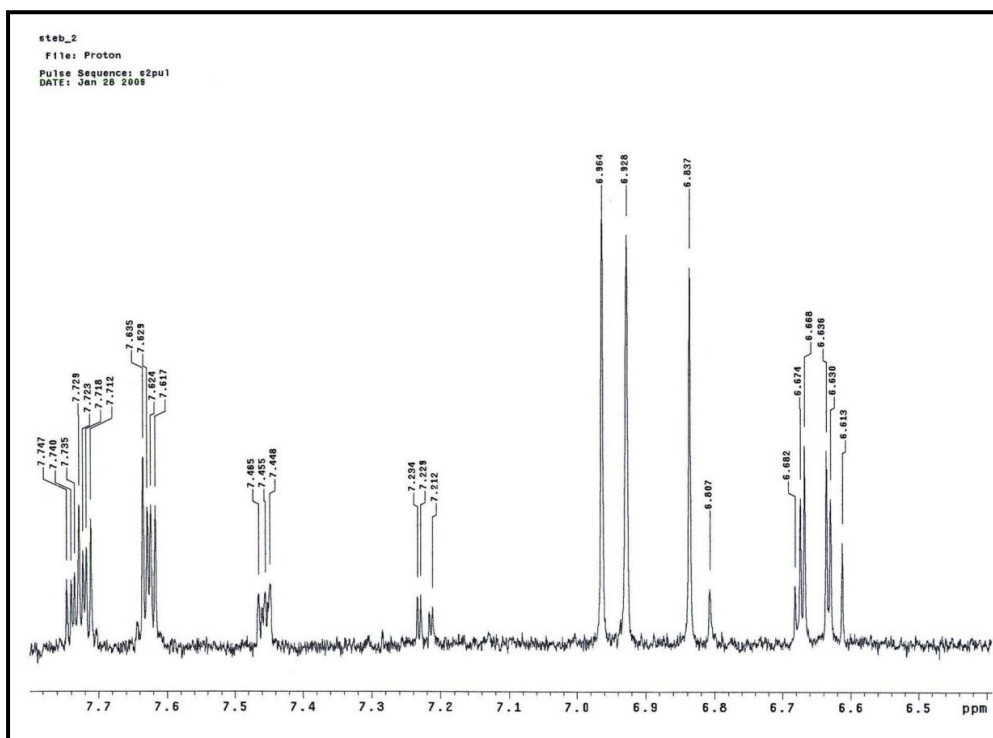


Figura 5.19 – Expansão na região entre δ_H 7,80 – 6,40 do espectro de RMN de 1H de STEB-2 (CD_3OD , 500 MHz).

As figuras 5.20 e 5.21 (pág. 117) apresentam o espectro de RMN de ^{13}C de STEB-2 e sua expansão. Os sinais observados entre δ_C 144,59, e 105,00 podem ser atribuídos a carbonos olefínicos de sistemas aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

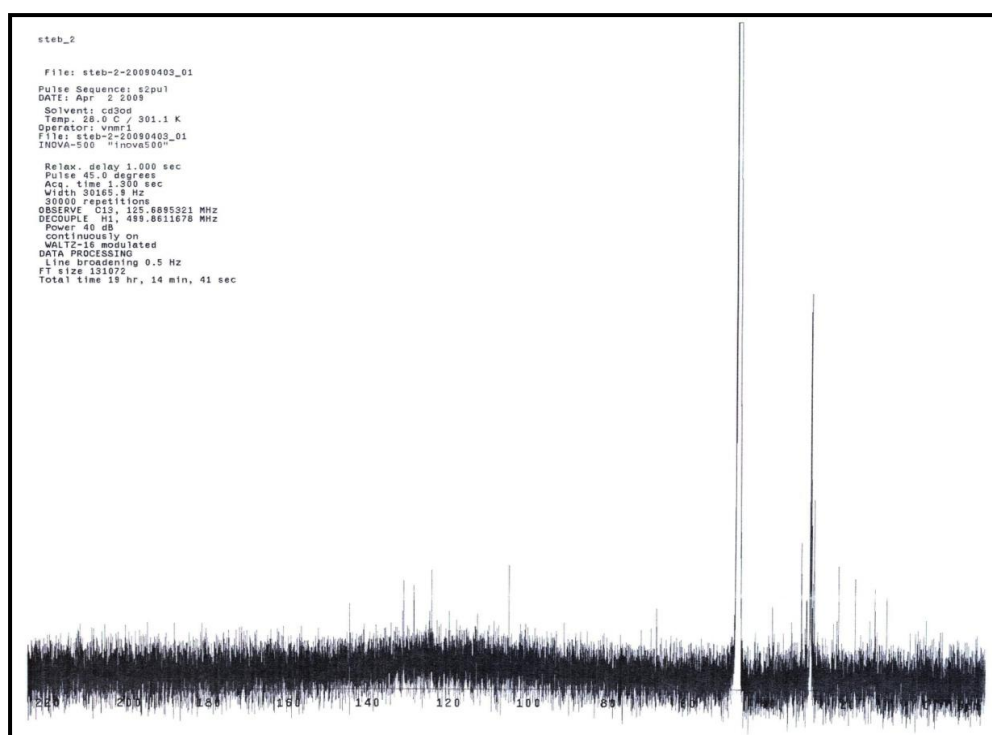


Figura 5.20 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

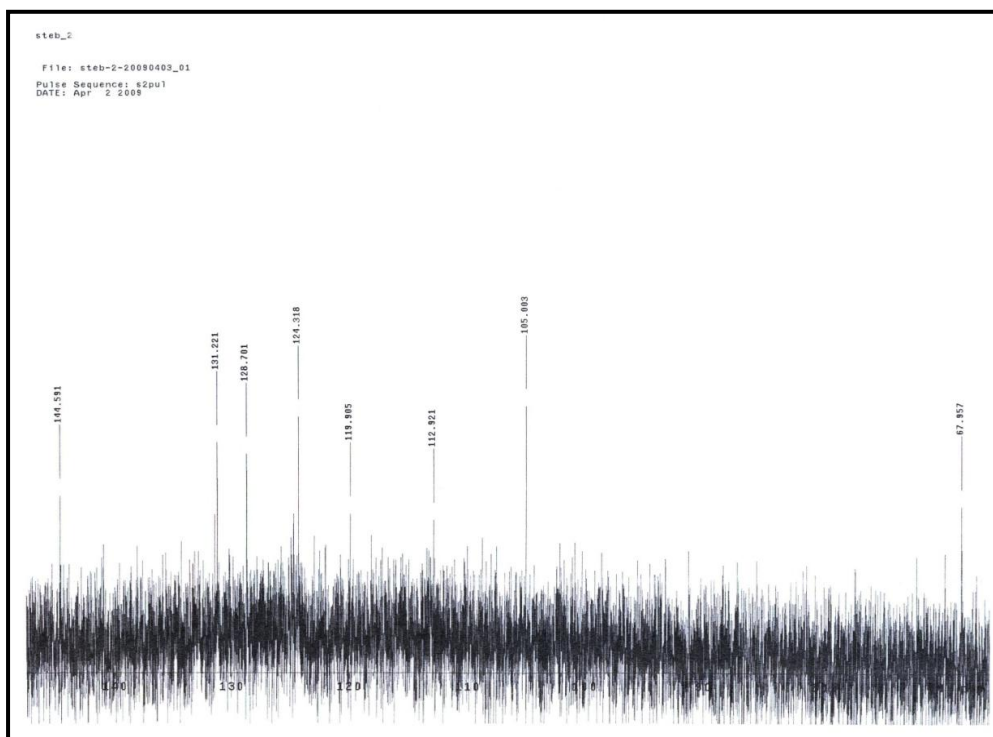


Figura 5.21 – Expansão na região entre δ_C 150,00 – 60,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-1 (CD_3OD , 125 MHz).

A figura 5.22 (pág. 118) apresenta o espectro no infravermelho de STEB-3. A absorção em 3735 cm^{-1} , embora atípica, é sugestiva de deformação axial de O–H. As absorções em 2955 e 2925 cm^{-1} podem ser atribuídas à deformação axial de C–H. Absorções em 1653 e 1507 cm^{-1} são características de deformação axial de compostos com aromaticidade, confirmadas pelas absorções presentes na região entre 882 e 668 cm^{-1} , características de deformações angulares fora do plano de C–H de anéis aromáticos. As absorções em 2854 e 1378 cm^{-1} são características de deformação axial e angular de C–H de carbono carbonílico. A absorção em 1733 cm^{-1} é característica de deformação axial de C=O (SILVERSTEIN et al., 2007).

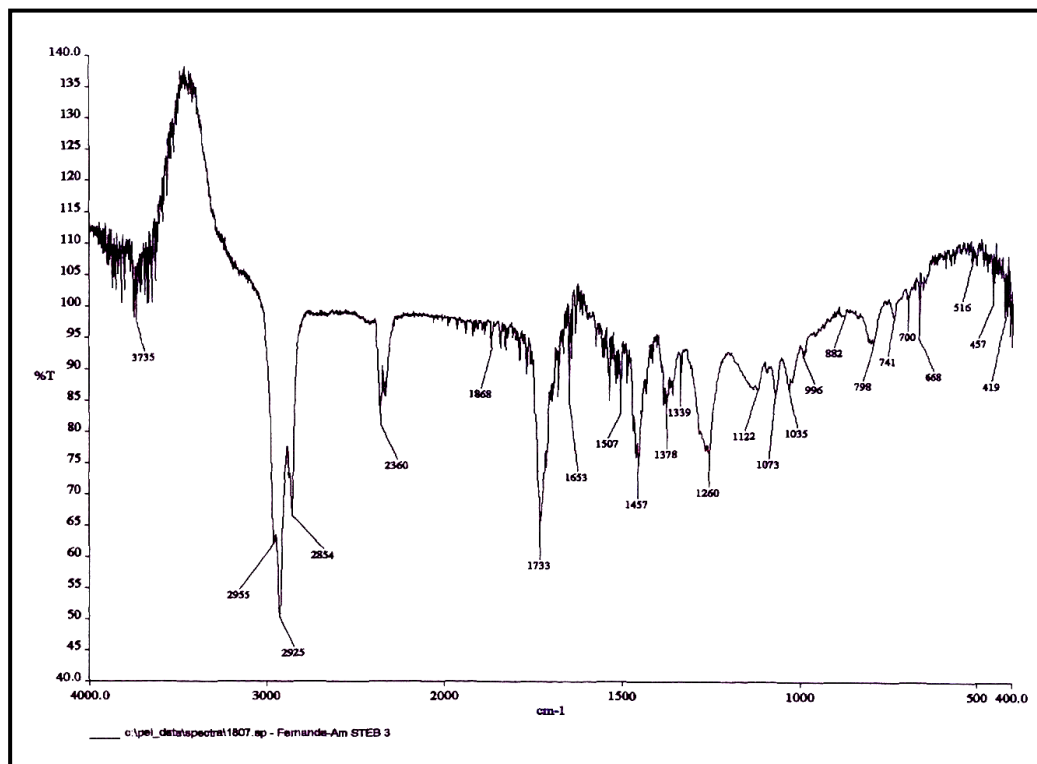


Figura 5.22 – Espectro no Infravermelho da fração STEB-3, em KBr.

As figuras 5.23, 5.24 e 5.25 (pág 119 -120) apresentam o espectro de RMN de ^1H de STEB-3 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_{H} 1,40 e 0,50 podem ser atribuídos a hidrogênios de grupos alquilas. Os sinais entre δ_{H} 4,60 e 4,00 são característicos de hidrogênios olefínicos. Nessa região dos espectros também podem ser observados sinais de hidrogênios ligados a oxigênio, como o sinal em δ_{H} 4,54. Os sinais entre δ_{H} 7,70 e 7,60 podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006).

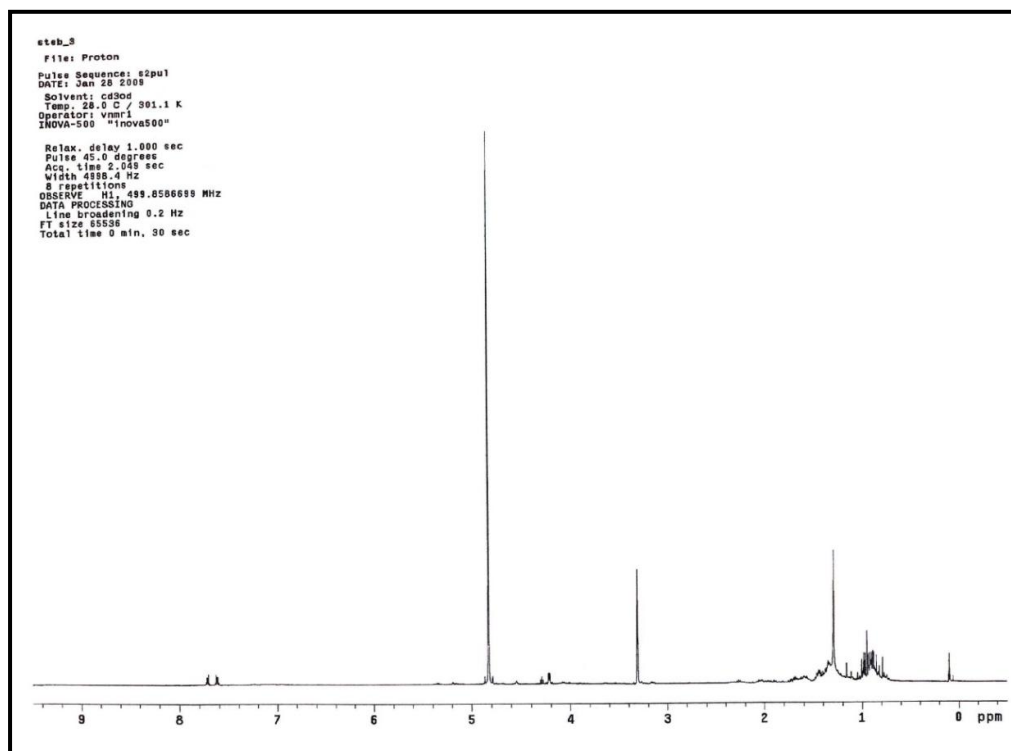


Figura 5.23 – Espectro de RMN de ^1H de STEB-3 (CD_3OD , 500 MHz).

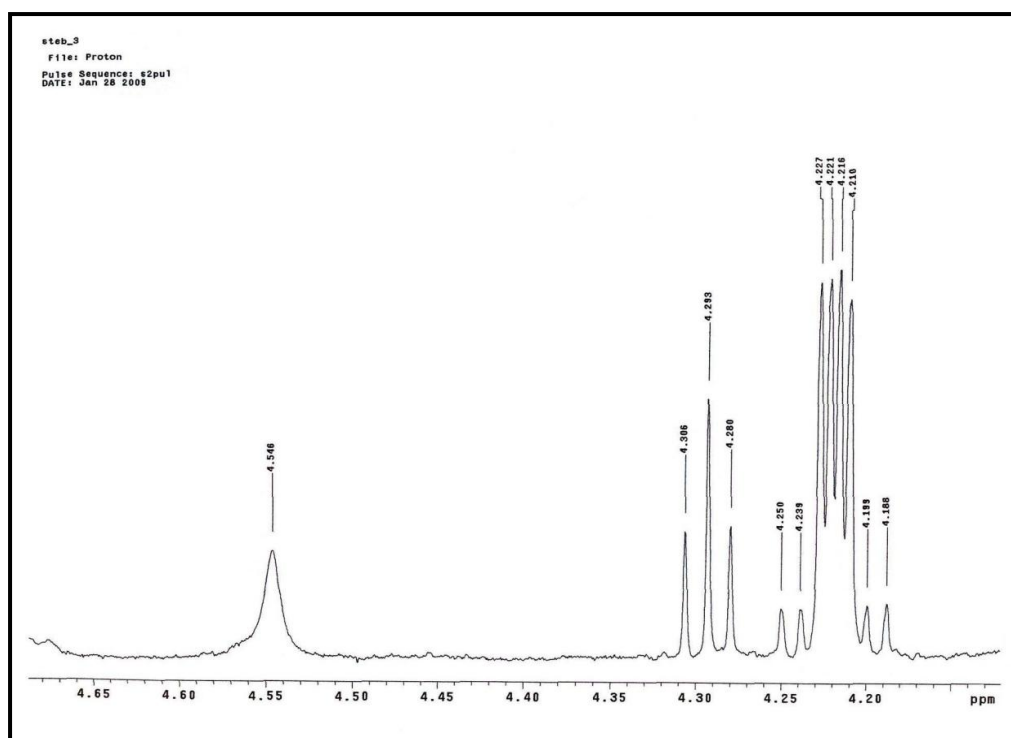


Figura 5.24 – Expansão na região entre δ_{H} 4,70 – 4,15 do espectro de RMN de ^1H de STEB-2 (CD_3OD , 500 MHz).

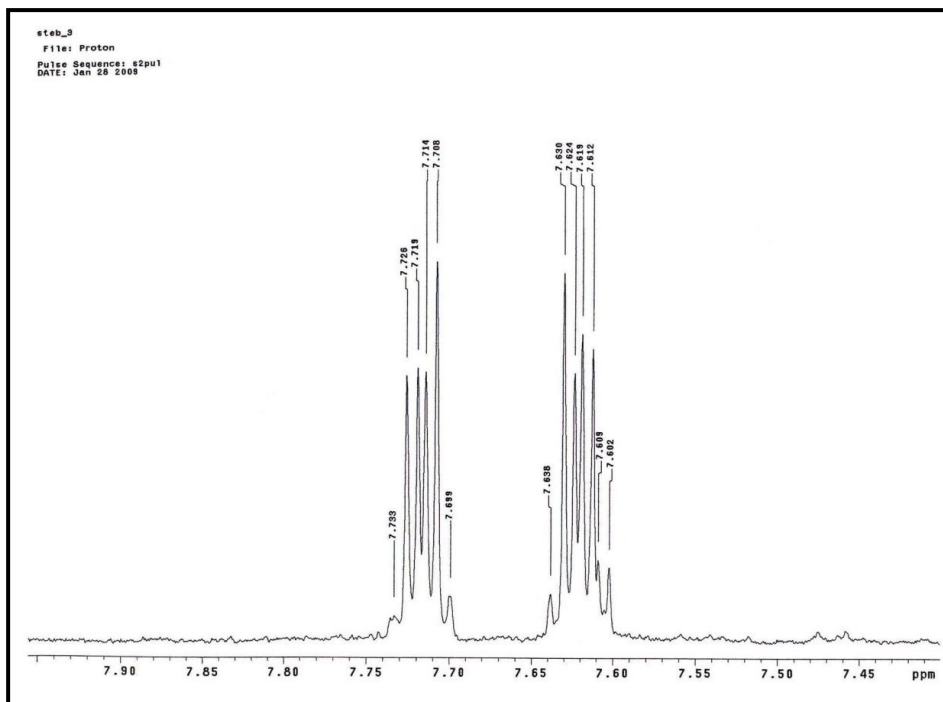


Figura 5.25 – Expansão na região entre δ_H 7,95 – 7,40 do espectro de RMN de 1H de STEB-2 (CD_3OD , 500 MHz).

As figuras 5.26, 5.27 e 5.28 (pág. 121) apresentam o espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_C 146,33 e 123,19 podem ser atribuídos a carbonos olefínicos de sistemas aromáticos. O sinal em δ_C 163,34 pode ser atribuído a carbono carbonílico (SILVERSTEIN et al., 2007).

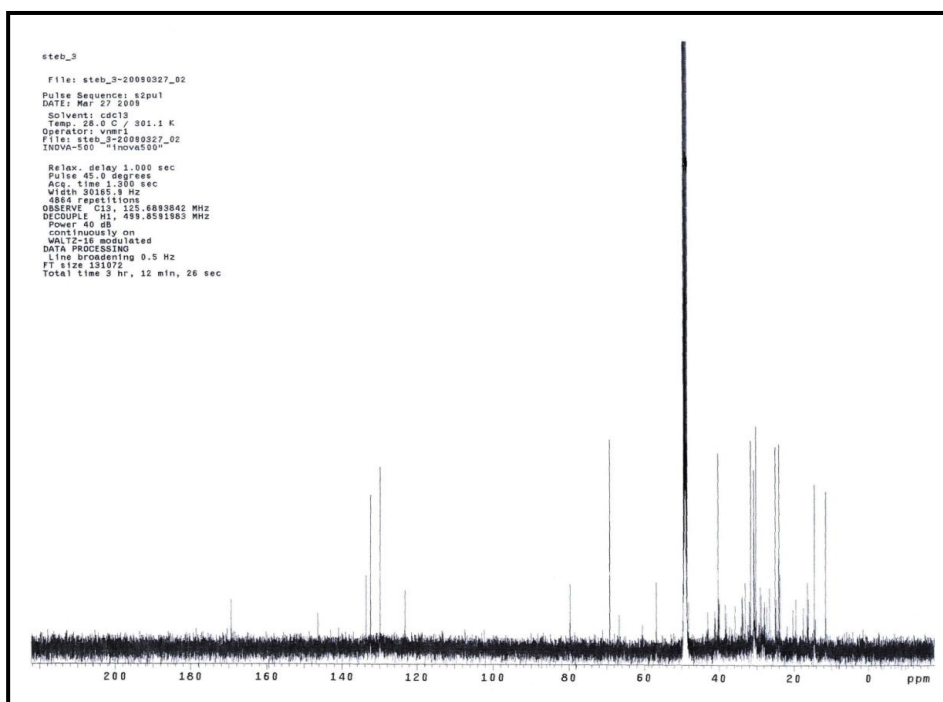


Figura 5.26 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3 (CD_3OD , 125 MHz).

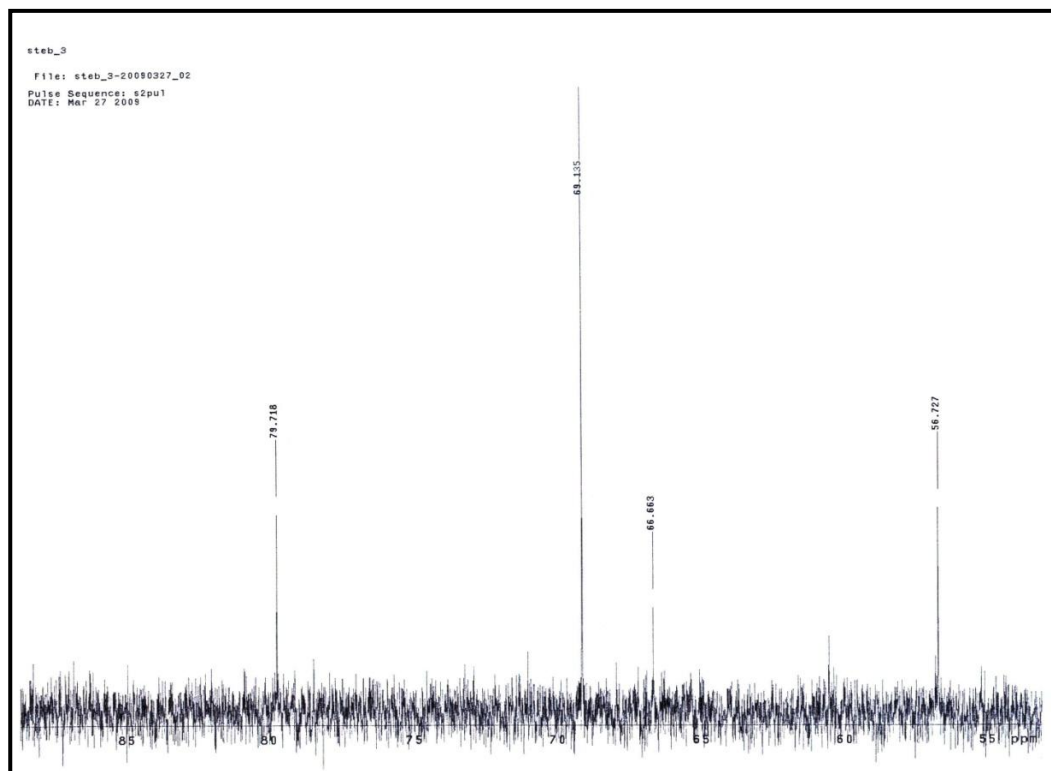


Figura 5.27 – Expansão na região entre δ_C 90,00 – 55,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3 (CD_3OD , 125 MHz).

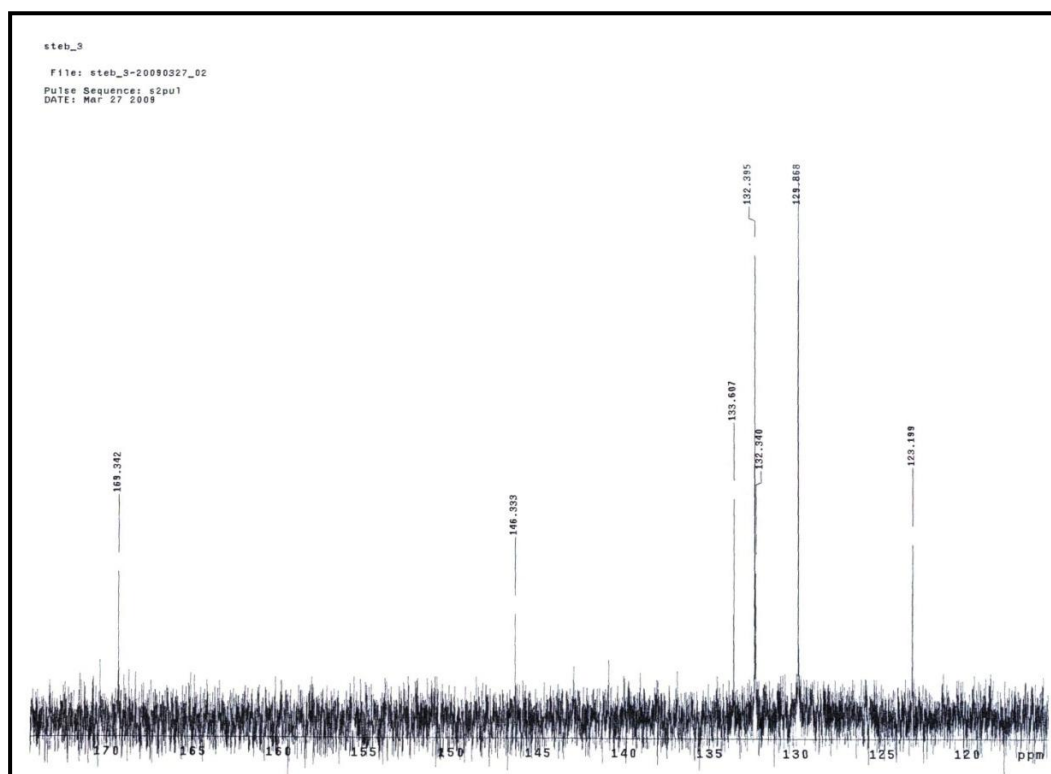


Figura 5.28 – Expansão na região entre δ_C 175,00 – 115,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3 (CD_3OD , 125 MHz).

A figura 5.29 apresenta o espectro no infravermelho de STEB-4. A absorção em 3513 cm^{-1} , embora atípica, é sugestiva de deformação axial de O–H. As absorções em 2957 e 2923 cm^{-1} são características de ligações C–H. A absorção em 1734 cm^{-1} é característica de deformação axial de C=O. A absorção em 2850 cm^{-1} é característica de deformação axial de C–H de carbono carbonílico. A absorções em 1653 e 1559 cm^{-1} são características de deformação axial de compostos com aromaticidade, confirmadas pelas absorções presentes na região entre 802 e 662 cm^{-1} , características de deformação angular fora do plano de C–H de compostos aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

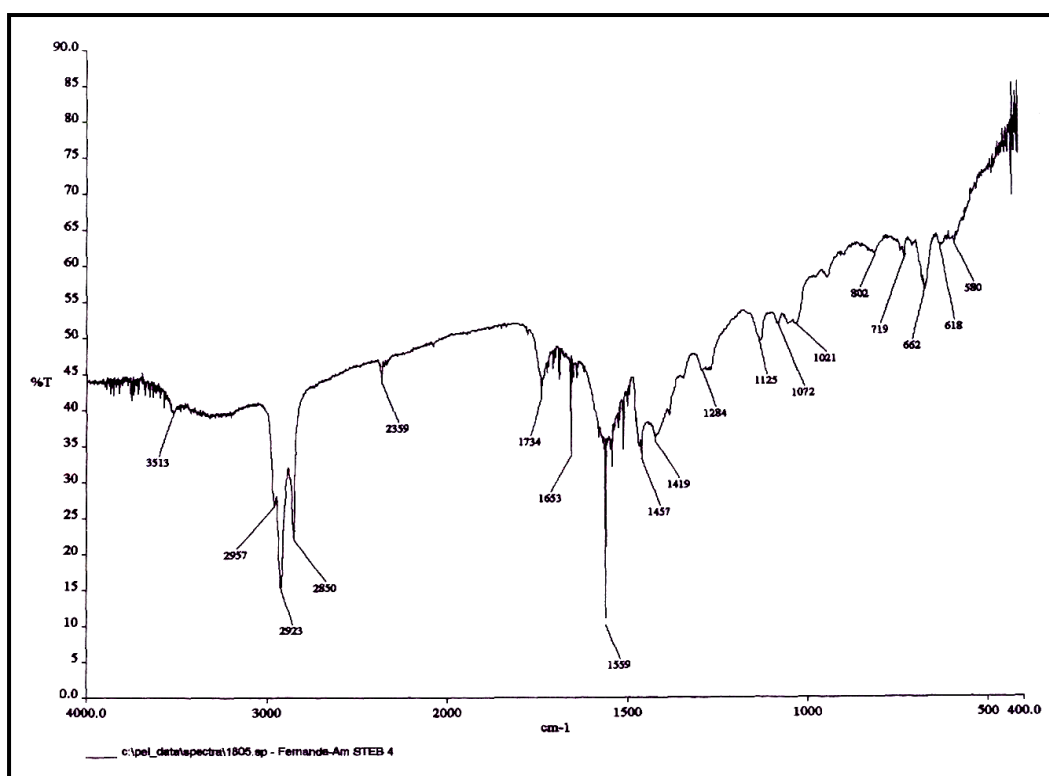


Figura 5.29 – Espectro no Infravermelho da fração STEB-4 em KBr.

As figuras 5.30, 5.31 e 5.32 (pág. 123-124) apresentam o espectro de RMN de ^1H de STEB-4 e suas expansões. Os sinais observados entre δ_{H} 2,00 e 0,80 podem ser atribuídos a hidrogênios de grupos alquilas. Os sinais entre δ_{H} 4,40 e 4,00 são característicos de hidrogênios olefínicos. Os sinais entre δ_{H} 6,60 e 7,80 podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos e/ou heteroaromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007).

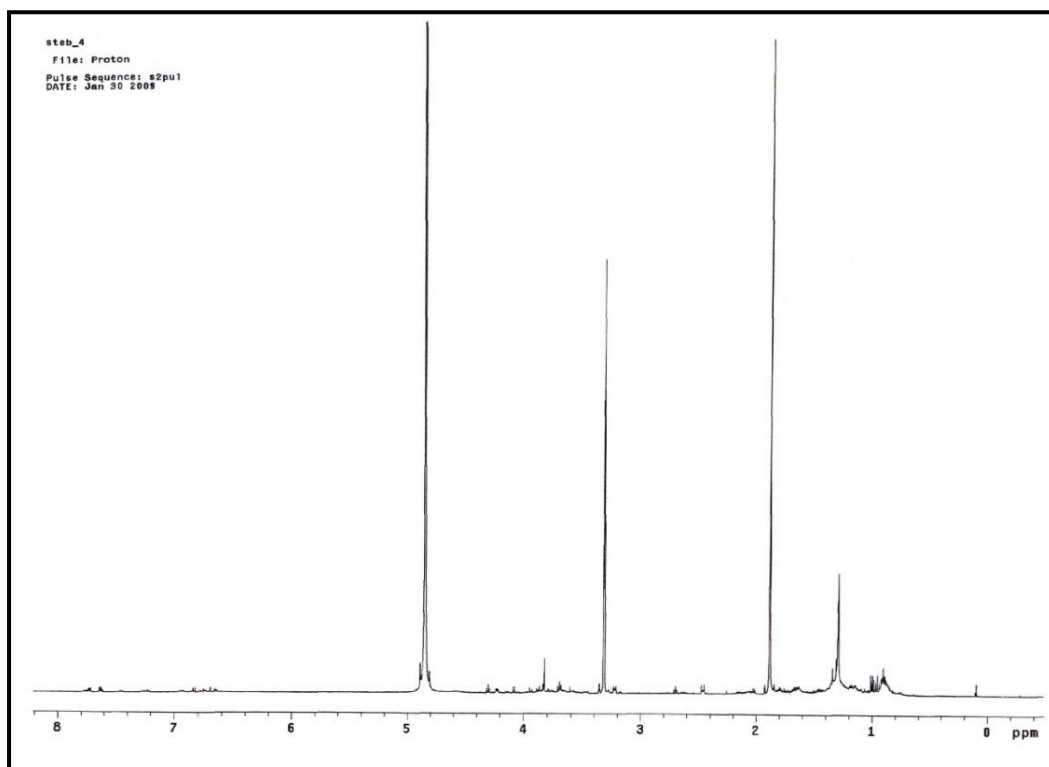


Figura 5.30 – Espectro de RMN de ^1H de STEB-4 (CD_3OD , 500 MHz).

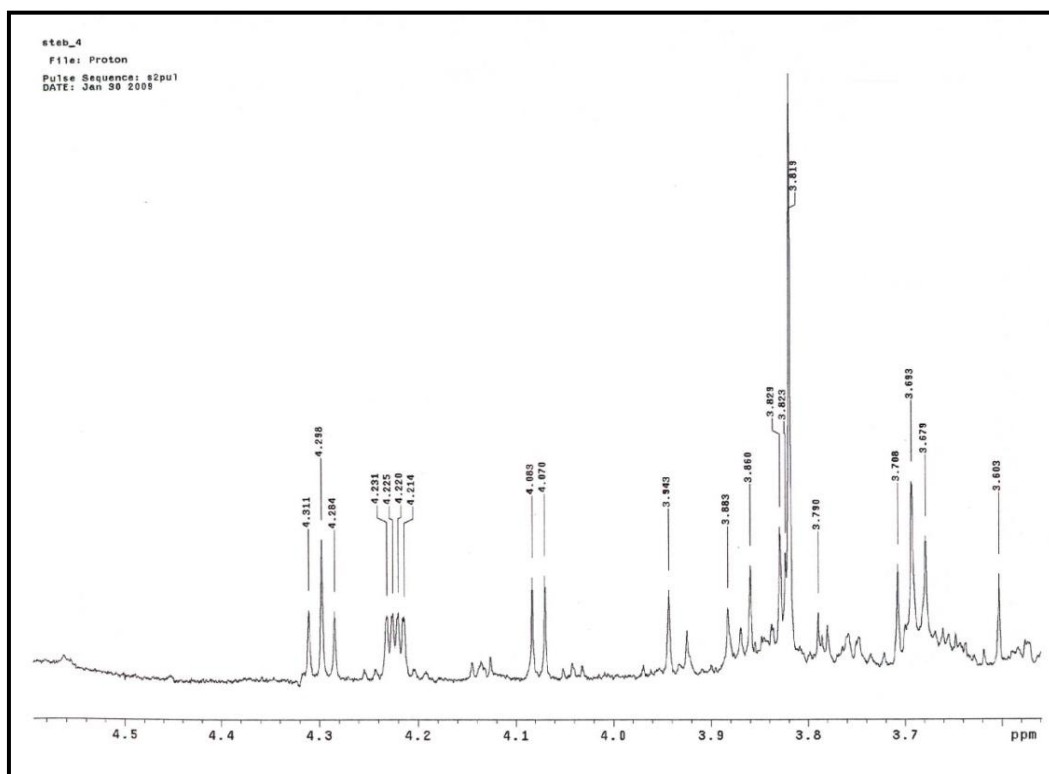


Figura 5.31 – Expansão na região entre δ_{H} 4,60 – 3,60 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-4 (CD_3OD , 500 MHz).

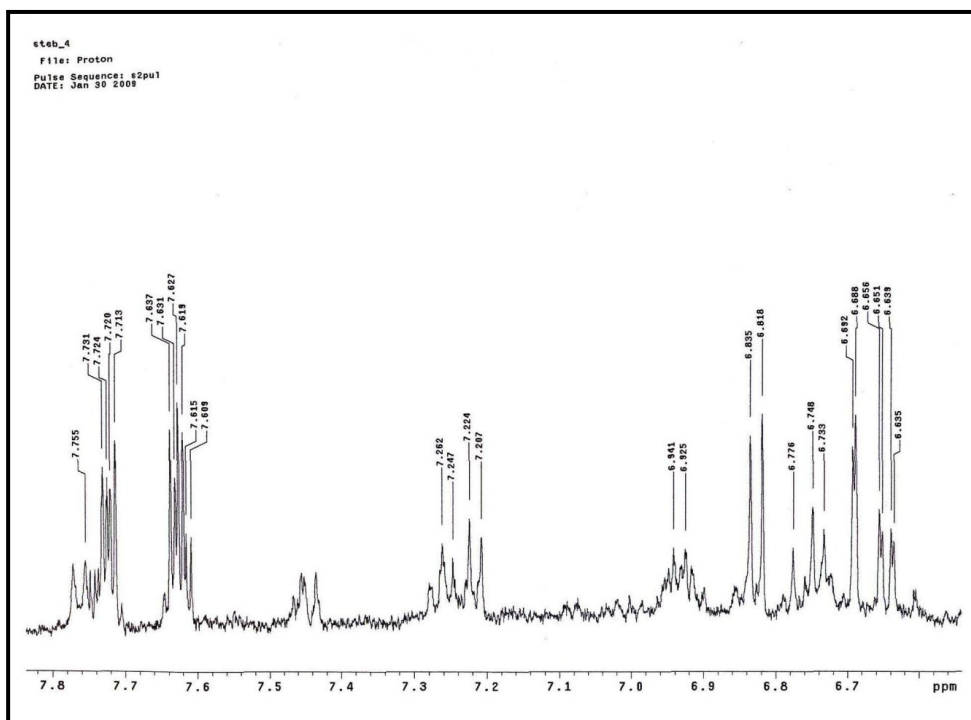


Figura 5.32 – Expansão na região entre δ_H 7,80 – 6,60 do espectro de RMN de 1H de STEB-4 (CD_3OD , 500 MHz).

As figuras 5.33 e 5.34 (pág. 125) apresentam o espectro de RMN de ^{13}C de STEB-4 e sua expansão. Os sinais observados entre δ_C 133,55 e 123,19 podem ser atribuídos a carbonos olefínicos de sistemas aromáticos. O sinal em δ_C 163,34 pode ser atribuído a carbono carbonílico (SILVERSTEIN et al., 2007).

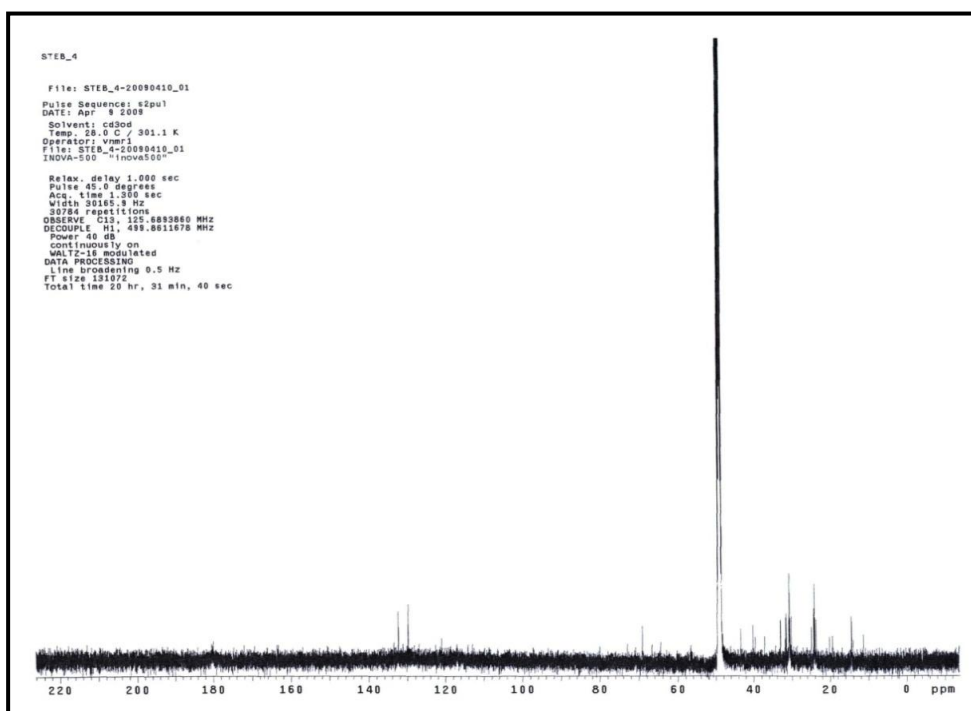


Figura 5.33 – Espectro de RMN de ^{13}C de STEB-3 (CD_3OD , 125 MHz).

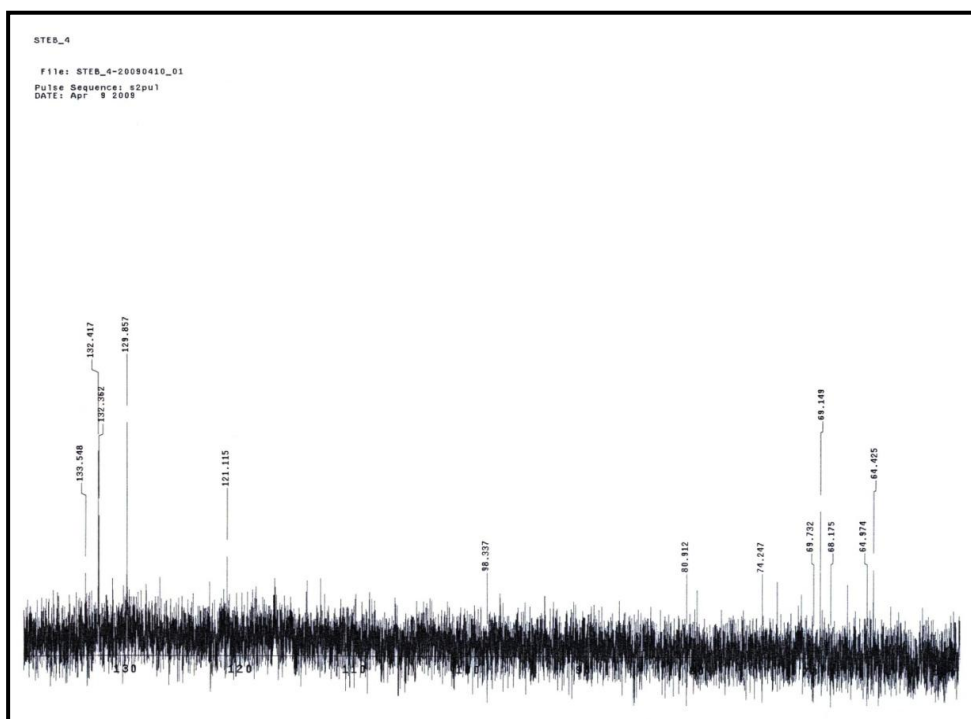


Figura 5.34 – Expansão na região entre δ_C 140,00 – 60,00 do espectro de RMN de ^{13}C de STEB-4 (CD_3OD , 125 MHz).

Como visto, os espectros de RMN das frações semi-purificadas foram bastante semelhantes entre si e, além disso, coerentes com seus espectros na região do infravermelho. De modo geral, eles mostraram que o extrato aquoso é rico em compostos aromáticos, hidroxilados e carbonilados. Essas são características de algumas das classes de flavonóides detectadas na proiecção fitoquímica de *Byrsonima japurensis* (Figura 5.35).

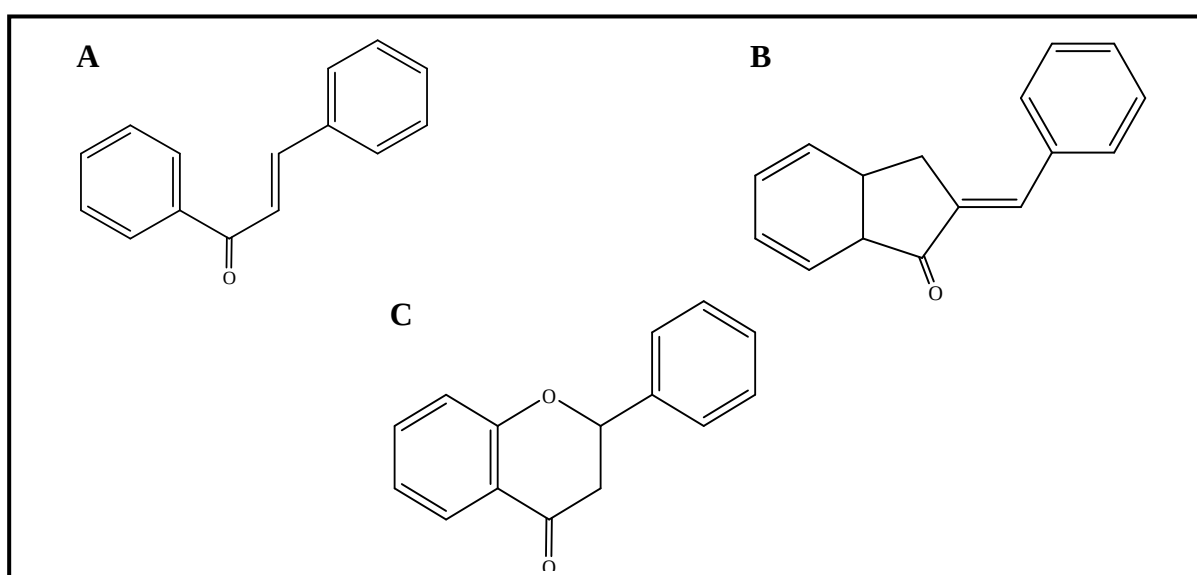


Figura 5.35 – Núcleos fundamentais de chalconas (A), auronas (B) e flavanonas (C). Dentre elas são conhecidas estruturas com até cinco substituições por hidroxilas (OH).
FONTE: Zuanazzi; Montanha (2007).

5.2 Estudo de atividade farmacológica / toxicológica

5.2.1 Atividade varredora de radicais livres

As concentrações inibitórias medianas (CI_{50}) obtidas nos testes de atividade varredora de radicais livres estão apresentadas na tabela 5.6, como média $\pm$ desvio-padrão. Os gráficos utilizados para a determinação da CI_{50} ilustram as relações dose-resposta obtidas nesses testes (Figura 5.36, pág. 127).

Tabela 5.6 – Resultados obtidos nos diferentes ensaios de atividade varredora de radicais livres

Substâncias testadas	Radical DPPH	Radical ABTS	Radical superóxido
Extrato aquoso (I5)	7,1 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,2	42,5 $\pm$ 1,3
α -tocoferol	12,5 $\pm$ 0,6	10,4 $\pm$ 0,4	180,0 $\pm$ 14,2
Ácido ascórbico	4,8 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,3	32,9 $\pm$ 1,6
Ácido gálico	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 1,2

Unidade de medida: $\mu\text{g/mL}$. Os dados dos controles positivos são tabelados pelo grupo de pesquisa e constam no trabalho para efeito de comparação.

A atividade varredora de radicais livres de compostos fenólicos é bem conhecida, e pode ser considerada causa ou consequência das funções que esses compostos exercem nas plantas (ES-SAFI et al., 2007). Portanto, era esperado que o extrato aquoso de *B. japurensis*, na qual taninos e flavonóides foram detectados, apresentasse essa atividade.

A estrutura geral dos flavonóides favorece tanto a captura de metais de transição (Figura 5.37, pág. 128), catalisadores das reações de Fenton e Haber-Weiss, que geram radicais deletérios a partir de $\text{O}_2^\bullet$ e H_2O_2 , quanto a doação de elétrons e hidrogênio a espécies oxidadas (Figura 5.38, pág. 128).

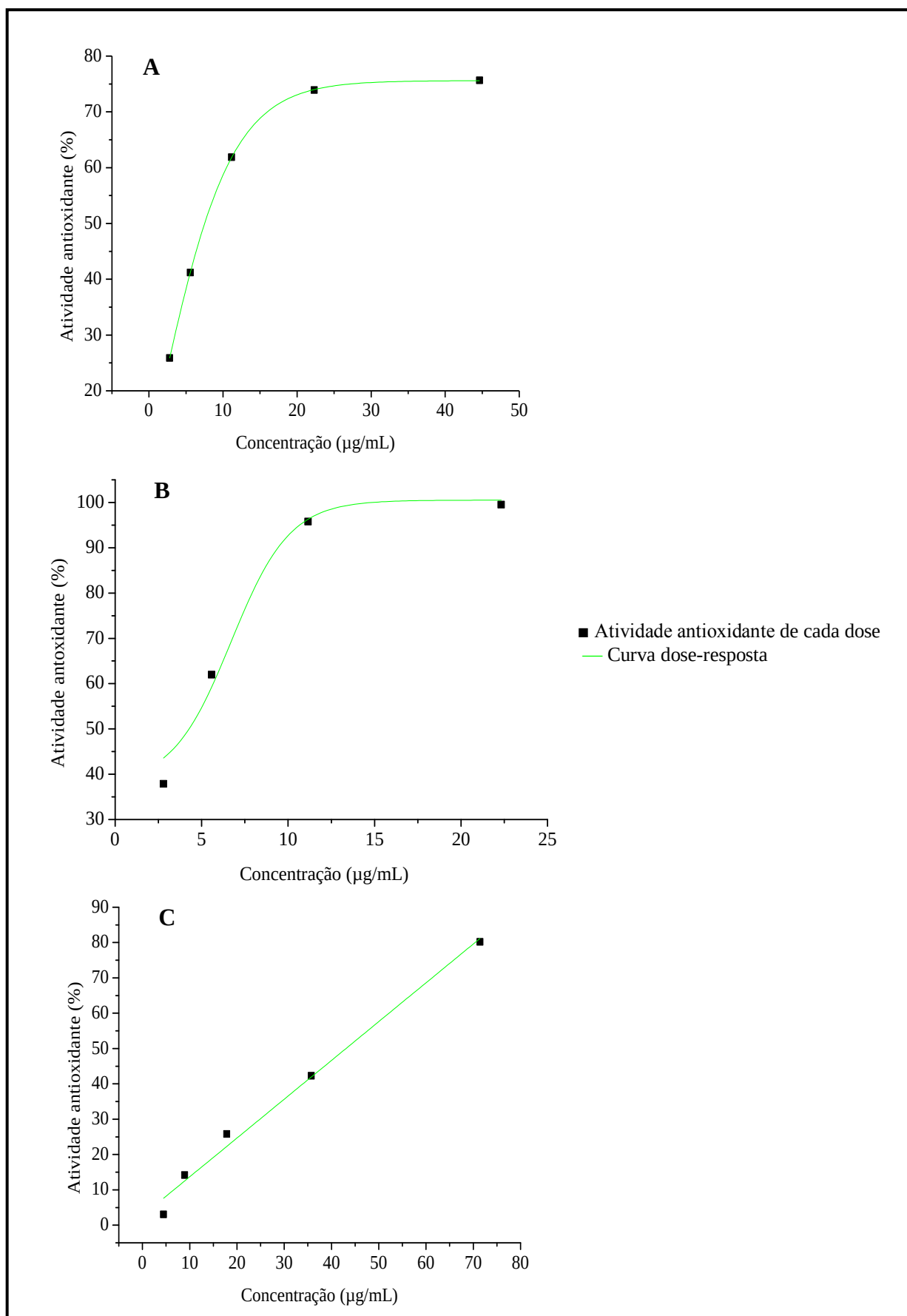


Figura 5.36 – Curvas dose-resposta dos testes de atividade varredora de radicais livres. A – curva do teste com o radical livre DPPH; B – curva do teste com o cátion radical ABTS; C- curva do teste com o ânion radical superóxido.

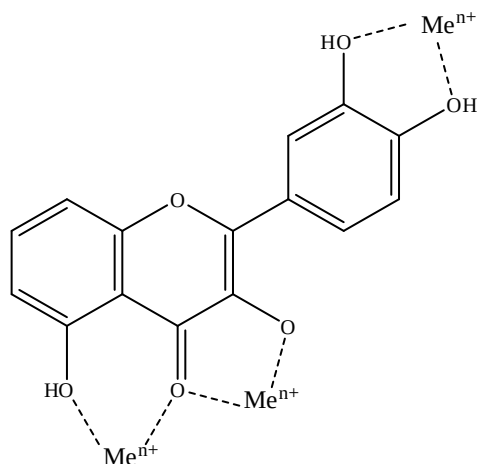


Figura 5.37 – Sítio de ligação de metais a uma molécula de flavonóide.
 FONTE: Barreiros et al. (2006).

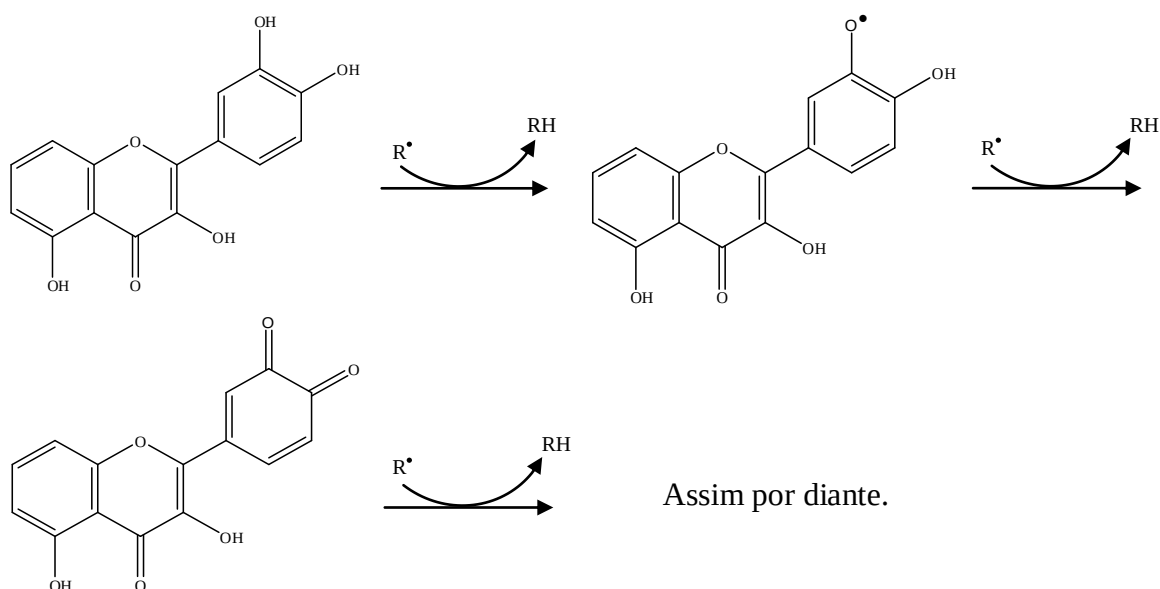


Figura 5.38 – Atuação dos flavonóides como doadores de elétrons e hidrogênio.
 FONTE: Adaptado de Barreiros et al.(2006)

De modo geral, flavonóides que possuem maior número de hidroxilas e insaturações na sua estrutura, possuem maior atividade antioxidante (VAN ACKER et al., 1996). As mesmas regras se aplicam aos taninos condensados. Além disso, esses compostos possuem reconhecida capacidade de inativar enzimas como xantina oxidase, ciclo-oxigenase, lipo-oxigenase, mono-oxigenase microsomal, glutathione S-transferase, succinoxidase mitocondrial e nicotinamida dinucleotídeo oxidase, todas envolvidas na produção de radicais livres (BARREIROS et al., 2006; PIETTA, 2000; RICE-EVANS et al., 1999).

Portanto, estes resultados podem ser atribuídos às antocianidinas e/ou antocianinas e às catequinas e, por conseguinte, aos taninos, presentes na droga vegetal, os quais, como já é sabido, apresentam expressiva capacidade varredora de radicais livres, graças às características de suas estruturas (Figura 5.39), ricas em substituições por hidroxilas e insaturações (ES-SAFI et al., 2007). O cátion flavílio, núcleo fundamental das antocianidinas e antocianinas, pode neutralizar radicais com carga negativa, além disso, a capacidade varredora de radicais superóxido de chalconas é bem conhecida, e contribui significativamente para sua atividade antiinflamatória (NOWAKOWSKA, 2007).

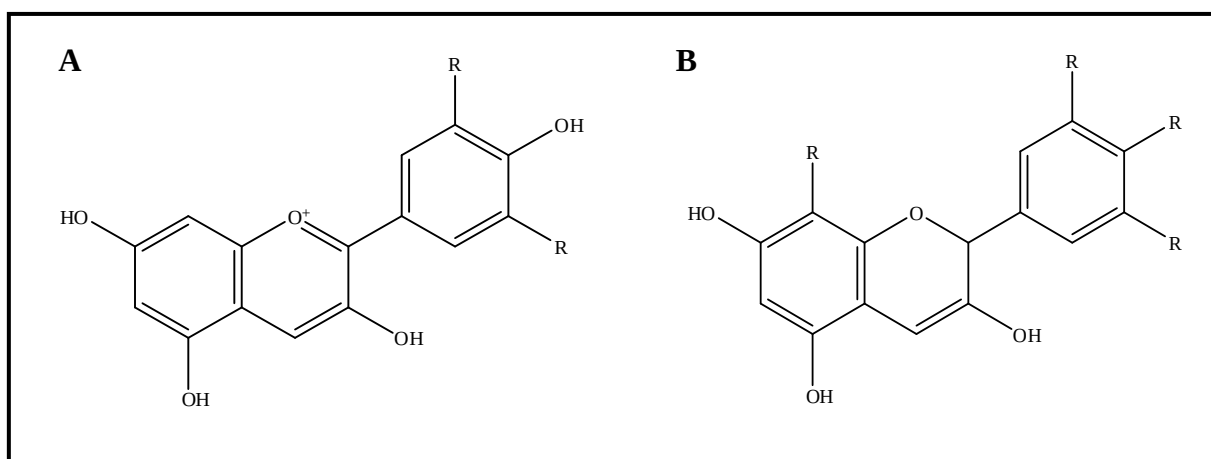


Figura 5.39 – Estrutura geral das antocianidinas e/ou antocianinas e catequinas. A – cátion flavílio, onde R pode ser um grupo OH, OCH₃ ou H; B – catequinas, onde R pode ser OH ou H.
FONTE: Adaptado de Zuanazzi, Montanha (2007).

Um fato bastante interessante nos resultados desses testes é a grande capacidade varredora de radicais livres desse extrato mesmo em comparação com outros potentes antioxidantes agindo de forma isolada. Essa característica pode contribuir para sua possível atividade anti-inflamatória, uma vez que a neutralização de radicais livres limita sua capacidade de causar danos aos tecidos, que é um fator crucial na geração ou manutenção de uma resposta inflamatória (SCHINELLA et al., 2002; WELLEN; HOTAMILISGIL, 2005).

Contudo, para verificar se a atividade antioxidante apresentada por I5 deve-se a um efeito sinérgico entre os componentes do extrato, ou ainda, se há uma interação negativa entre eles, um estudo fitoquímico biomonitorado ainda precisa ser realizado.

5.2.2 Atividade antiagregante plaquetária

As concentrações inibitórias medianas (CI_{50}) obtidas nessa avaliação estão apresentadas na tabela 5.7, como média $\pm$ desvio-padrão. Os gráficos utilizados para a determinação da CI_{50} ilustram as relações dose-resposta obtidas nesses testes (Figura 5.40, pág 131).

Tabela 5.7 – Resultados dos testes de atividade antiagregante plaquetária

Substâncias testadas	AA	ADP	ADR
Extrato aquoso (I5)	178,5 $\pm$ 1,6	117,7 $\pm$ 4,5	97,5 $\pm$ 7,9
Ácido acetilsalicílico	32,5 $\pm$ 0,2	21,5 $\pm$ 1,4	11,7 $\pm$ 0,5

AA, ácido araquidônico; ADP, adenosina difosfato; ADR, adrenalina. Unidade de medida: $\mu\text{g/mL}$. Os dados do controle positivo são tabelados pelo grupo de pesquisa e constam no trabalho para efeito de comparação.

O extrato (I5) mostrou atividade antiagregante plaquetária frente a todos os agonistas testados neste trabalho, o que sugere que seu efeito está relacionado a um mecanismo comum pelo qual todas essas substâncias induzem o fenômeno.

Como já dito, flavonóides têm capacidade de inativar enzimas como fosfolipases, ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases, o que se deve, muito provavelmente, à sua capacidade de inativar os radicais livres que se formam no sítio ativo dessas enzimas. Outros trabalhos mostram que sua capacidade de inibição das fosfolipases depende do número de hidroxilas em sua molécula e está relacionada à capacidade de quelar e reduzir metais (CAO et al., 1997; MIDDLETON JR et al., 2000). Portanto, essas substâncias inibem a síntese de eicosanóides, entre eles o TxA_2 , iniciada nas plaquetas logo após a sua ativação por qualquer agonista. Dada as classes de metabólitos secundários majoritariamente presentes em I5, é muito provável que este seja o mecanismo envolvido na sua atividade antiagregante plaquetária.

No entanto, o mecanismo via inibição da Gp IIb / IIIa também não está descartado, visto que, nesse caso, a atividade antiagregante plaquetária também independe da qualidade do ativador plaquetário (GOMES et al., 2000).

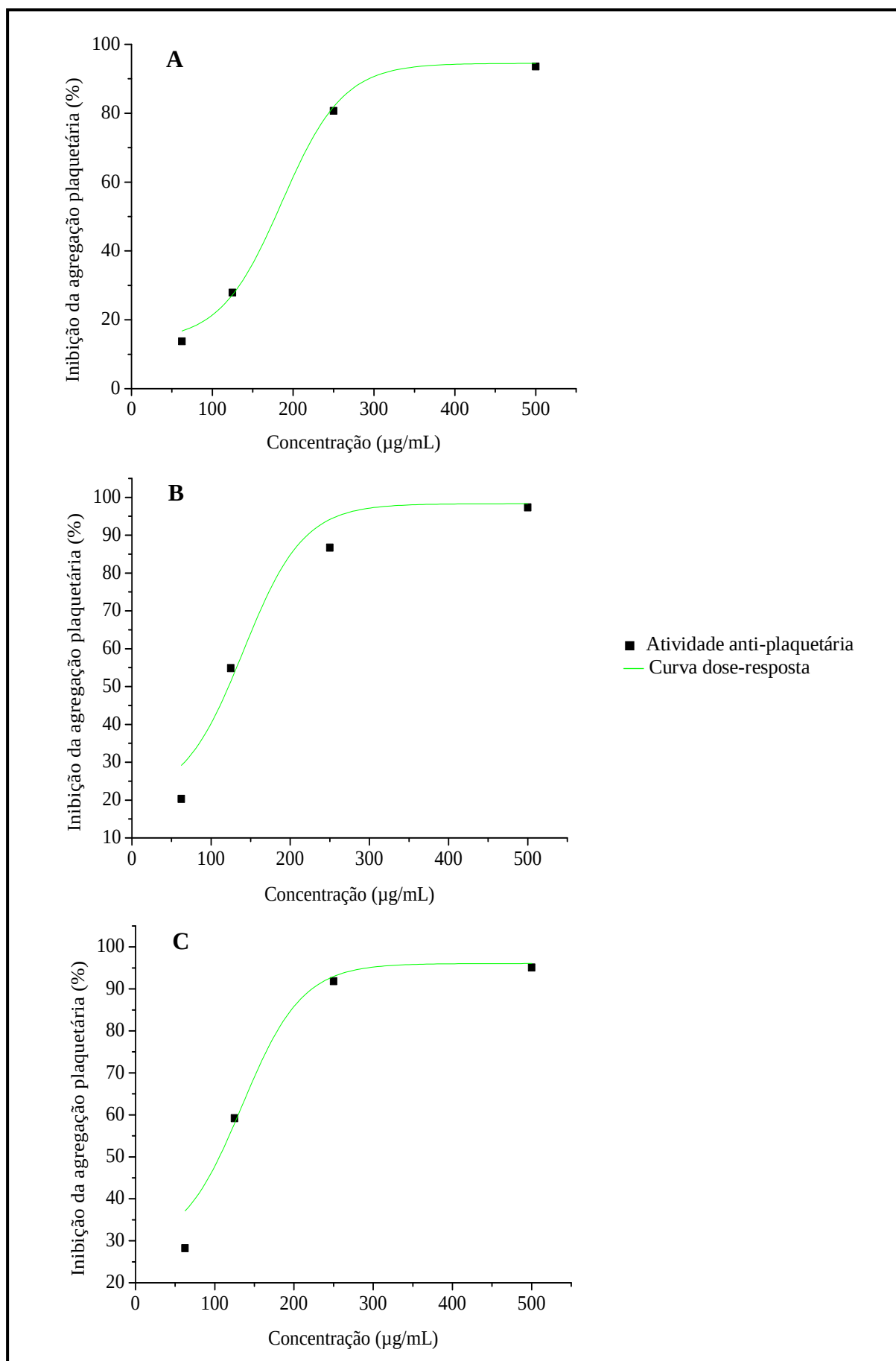


Figura 5.40 – Curvas dose-resposta da atividade antiagregante plaquetária. A – curva frente ao AA; B – curva frente à ADP; C – curva frente à ADR.

5.2.3 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade sobre larvas de *Artemia salina* tem sido utilizado para *screening* inicial de atividades farmacológicas e tóxicas de diversas substâncias. Existem correlações positivas entre citotoxicidade sobre *A. salina* e atividade tripanossomicida (ZANI et al., 1995) e antioxidante (MATHEWS, 1995).

O extrato aquoso de *B. japurensis* não foi tóxico às larvas de *A. salina* e DL_{50} não pode ser calculada, mesmo em duas baterias de testes em triplicata com a concentração máxima de 1,0 mg/mL. Mais uma vez, esses resultados foram coerentes com os dados obtidos com outras espécies do mesmo gênero: nenhuma daquelas testadas contra esse mesmo microcrustáceo, apresentou atividade citotóxica, como pode ser verificado na tabela 2.2 (pag. 28-33).

Apesar disso, todas as espécies do gênero *Byrsonima* testadas contra microorganismos patogênicos, inclusive *Tripanossoma cruzi* e *Leishmania* sp. foram eficientes (Tabela 2.2 , pag. 28-33) e ainda não existem estudos sobre a atividade antitumoral dessas espécies. Portanto, os resultados obtidos nesta análise não descartam a possibilidade de que *B. japurensis* apresente ação antitumoral e/ou antimicrobiana.

5.2.4 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda é uma análise preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, que fornece informações acerca dos riscos para a saúde, resultante da exposição de curta duração por uma determinada via e informações iniciais sobre o modo de ação tóxico da substância (BRITO, 1994; HIGUCHI, 2007). Uma vez que os sinais de toxicidade observados podem ser indicativos de várias atividades farmacológicas interessantes, o *screening* hipocrático realizado durante a avaliação da toxicidade aguda é uma

ferramenta útil na investigação preliminar de atividades farmacológicas *in vivo* (KARANGWA et al., 2006).

Apesar da observação de sintomas de toxicidade em todas as doses testadas, tanto pela via oral (5000,0 e 2500,0 mg/kg), quanto pela via intraperitoneal (1000,0; 750,0; 500,0; 250,0; 150,0; 140,0; 135,0; 125,0 e 10,0 mg/kg), o extrato (I5) foi letal apenas pela via intraperitoneal, com DL_{50} de 146, 5 mg/kg.

Os mesmos sintomas de toxicidade foram observados em todos os animais, contudo o grau e a duração dos mesmos variaram de acordo com as doses, sendo, em geral, mais brandos nos animais que receberam o extrato pela via oral. Esses sintomas instalavam-se dentro de poucos minutos após a administração, sendo eles: diminuição da motilidade seguida de reclusão (frequentemente em duplas ou grupos), aumento da frequência cardíaca (taquicardia), dificuldade respiratória (representada pelo coçar de focinho nos minutos iniciais e dispnéia), ptose bilateral, contorções abdominais (mais frequentes nos minutos iniciais e esporádicas após 60 minutos), distensão abdominal, piloereção persistente (após cerca de 30 minutos da administração), cianose (cauda e focinho), diminuição da defecação e micção, diminuição no apetite (mesmo nos grupos da via oral, submetidos a jejum prévio de 12 horas), tremores e flacidez.

Foi observado que as fezes dos animais dos grupos que receberam o extrato pela via oral apresentavam-se liquefeitas e na mesma cor do extrato, sugerindo que o mesmo é pouco absorvido por essa via. Isso que pode explicar a menor intensidade dos sintomas. Nas doses em que não ocorreram mortes (5000,0 e 2500,0 mg/kg v. o. e 125,0 e 10,0 mg/kg i.p.), os animais recuperaram-se dentro de algumas horas.

Apesar do estado débil, todos os animais respondiam a estímulos de som, como bater de palmas e estalar de dedos e dor, como pressão sobre as orelhas e caudas com pinça, e não se apresentavam sedados. Movimentavam-se e caminhavam esporadicamente pelo campo

experimental, mas logo paravam e retornavam ao estado recluso. Espasmos violentos foram observados em alguns animais, sendo que nas doses mais altas, juntamente com um surto dispnéico e micção, eles constituíam o evento que antecedia a morte dos animais. Dois casos isolados de paralisia do trem posterior foram observados nas doses de 150 e 135 mg/kg pela via intraperitoneal.

A diminuição da atividade motora / exploratória dentro dos dois primeiros minutos após a aplicação do extrato foi significativa ($p < 0,05$) apenas nas doses de 1000,0 e 750,0 mg/kg. Em contrapartida, após 10 minutos, todos os animais, em todas as doses, apresentavam-se reclusos, permanecendo assim por várias horas (Figura 5.41).



Figura 5.41 – Animais reclusos após a aplicação do extrato. Pode ser notado ainda, que os animais estão flácidos e cianóticos.

O estado catatônico dos animais foi perceptível no teste de equilíbrio e apreensão das patas. Antes da aplicação do extrato os animais tendiam a andar sobre a barra de vidro e evitavam ao máximo a queda com o auxílio das patas e da cauda; após a aplicação do extrato, os animais permaneciam praticamente imóveis e não evitavam a queda com tanta veemência.

A necropsia foi realizada apenas nos animais cuja hora da morte pode ser acompanhada. Mais uma vez, os achados podem ser generalizados: as vísceras apresentaram-se íntegras, sem alterações morfoanatômicas, o que é coerente com a ausência de citotoxicidade apresentada no teste de *A. salina*; o estômago permanecia com alimento, mesmo depois de seguidas horas sem alimentação (dada a falta de apetite), e o intestino, em geral, continha fezes. O pulmão apresentava-se hiperemiado e frequentemente o coração permanecia contraindo-se por vários minutos após a parada respiratória (Figura 5.42).

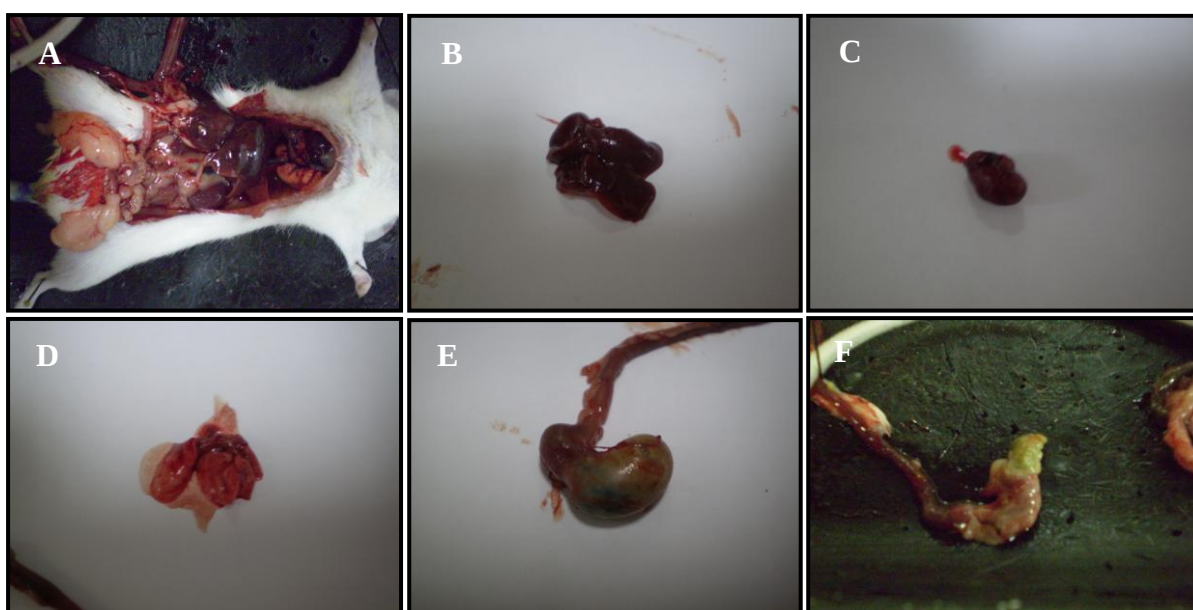


Figura 5.42 – Dissecção de animais da análise toxicológica e aparência de algumas vísceras. A – animal dissecado; B – fígado; C – coração; D – pulmão; E – estômago; F – presença de alimento no estômago.

Todos os sinais de toxicidade verificados no *screening* hipocrático de I5 também foram encontrados por Bejar; Malone (1993), em uma análise semelhante com um extrato etanólico da casca do caule e com um extrato ácido acético a 2% das folhas de *Byrsonima crassifolia* e por Cifuentes et al. (2001), com extratos aquosos da casca do caule e das folhas da mesma espécie. Bejar; Malone (1993) ainda encontraram quadro semelhante ao aqui relatado na necropsia dos seus animais.

Taninos têm capacidade de inibir enzimas digestivas, da qual deriva grande parte dos seus efeitos tóxicos, configurando-se com um dos principais mecanismos pelo qual esses

metabólitos atuam como protetores das plantas contra a herbivoria (MONTEIRO et al., 2005). Isso pode ter contribuído para a presença de alimento no estômago, mesmo após horas sem os animais se alimentarem e, por conseguinte, para a inibição do reflexo da fome.

A taquicardia observada pode ser explicada pela presença de heterosídeos cardioativos em *Byrsonima japurensis*. Esses metabólitos aumentam a contratilidade e o débito cardíaco, por mecanismos ainda pouco conhecidos. A hipótese mais aceita é que esses esteróides atuam inibindo bombas de sódio e potássio nas células miocárdicas, o que aumenta o influxo de cálcio para essas células e consequentemente sua força contrátil (ALTAMIRANO et al., 2006; FRAGA; BARREIRO, 1996).

Os efeitos dos heterosídeos cardioativos sobre o coração fazem com que esses sejam drogas de primeira escolha para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. No entanto, seu índice terapêutico é baixo e a ocorrência de intoxicações é relativamente comum, classicamente representadas por taquicardia. A presença desses compostos também poderia explicar a hiperestimulação do músculo cardíaco observada nos animais submetidos à necropsia (RATES; BRIDI, 2007).

Saponinas são particularmente irritantes a mucosas, devido a sua capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando sua destruição por esfoliação, o que limita a aplicação prática de saponinas como medicamentos, mesmo estas sendo dotadas de atividade anti-helmíntica, hipocolesterolemiantes e anti-inflamatória comprovadas (FRANCIS et al., 2002; SCHENKEL et al., 2007). Uma possível irritação da mucosa gástrica desencadeada pelas saponinas de *B. japurensis* poderia explicar as contorções abdominais observadas nos animais nesta análise. Esta observação já foi relatada em outros trabalhos (LIMA, C., 2007).

I5 também promoveu alterações em funções motoras dos animais, como diminuição da motilidade, ptose, flacidez e catatonia, sugerindo uma ação sobre a musculatura esquelética.

Já foi demonstrado que flavonóides têm capacidade de inativar um amplo espectro de proteínas quinase, diretamente envolvidas na contração muscular (MIDDLETON JR et al., 2000).

Sabe-se ainda, que o sistema muscular é modulado pelo sistema nervoso central (SNC) por meio de mensageiros químicos que agem sobre receptores específicos. Na musculatura esquelética, a acetilcolina é o neurotransmissor que desencadeia a contração das fibras, ao se ligar a receptores nicotínicos. Os efeitos do bloqueio da ação da acetilcolina no músculo esquelético são fraqueza muscular, aumento da fadigabilidade e incapacidade de manutenção de contrações duradouras, e têm como sinal clássico a ptose palpebral (KATZUNG, 2004; RANG et al., 2004).

O bloqueio de receptores nicotínicos ainda envolve outros efeitos, que são numerosos e complexos já que ambas as divisões do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, são bloqueadas. Porém, alguns deles puderam ser claramente observados nos animais submetidos a este *screening* hipocrático: sensação de frio (reclusão em grupos e tremores finos), diminuição do apetite, constipação e retenção urinária (por relaxamento da musculatura lisa das vias urinárias) (RANG et al., 2004).

A inibição não seletiva do outro grupo de receptores colinérgicos, os receptores muscarínicos, causa efeitos semelhantes, somados a uma prolongada inibição da motilidade gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo e cólon) e taquicardia (BROWN; TAYLOR, 2006). Diminuição da motilidade gastrointestinal já foi observada com *Byrsonima basiloba* (FIGUEIREDO et al., 2005) e com *Byrsonima fagifolia* por (LIMA, Z. et al., 2008), quando estes em investigações da atividade antidiarréica dessas espécies. Flavonóides podem atuar como agentes espasmolíticos, conforme vários trabalhos já demonstraram (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Outro importante efeito dos bloqueadores muscarínicos é a inibição de secreções glandulares, mais notavelmente no trato respiratório (nariz, boca, faringe e brônquios) (BROWN; TAYLOR, 2006). O coçar de focinho apresentado pelos animais pode ser um sinal do desconforto causado pela inibição das secreções das vias respiratórias. Também pode ter influência a ação irritante das saponinas, discutida anteriormente.

Um dos efeitos mais evidentemente observados foi a cianose. É interessante destacar que um acúmulo de secreções nas vias aéreas, outro efeito colateral dos bloqueadores muscarínicos, explicaria a dispnéia e a cianose (BROWN; TAYLOR, 2006; RANG et al., 2004). No entanto, a análise anatomopatológica das vias aéreas dos animais não foi realizada.

A presença de agonistas β -adrenérgicos no extrato também é possível na medida em que essas substâncias causam aumento da frequência e da força de contração cardíacas e vasodilatação, que podem justificar a taquicardia, contração das fibras de músculo branco, que justificariam os tremores dos animais, e relaxamento do músculo detrusor da bexiga, que explicaria a retenção urinária. Os mesmos resultados dos agonistas adrenérgicos podem ser obtidos pela estimulação da liberação de noradrenalina e/ou inibição da recaptação deste mediador (RANG et al., 2004; KATZUNG, 2004; WESTFALL; WESTFALL, 2006).

Um trabalho não publicado realizado pelo grupo de pesquisa envolvido neste estudo, sobre a atividade vasodilatadora de *B. japurensis*, embasa essa hipótese. A espécie mostrou potente atividade vasodilatadora sobre anéis aórticos de ratos Wistar na presença de endotélio, a qual foi drasticamente diminuída com a supressão deste último. Isso é coerente com a ação de agonistas β -adrenérgicos, pois se sabe que seu mecanismo vasodilatador é mediado pelo endotélio por meio da liberação de óxido nítrico (RANG et al., 2004).

A piloereção, um dos efeitos mais notáveis e consistentes de I5, é resultado da estimulação de receptores α -adrenérgicos. Outro efeito interessante dos agonistas α -

adrenérgicos é a inibição da liberação colinérgica, o que poderia estar relacionado ao aparente bloqueio dos receptores nicotínicos e muscarínicos (RANG et al., 2004; KATZUNG, 2004).

5.2.5 Atividade antiedematogênica

As doses testadas nessa avaliação foram escolhidas de acordo com as observações feitas durante a avaliação da toxicidade aguda. Foram selecionadas três doses inseridas nos intervalos em que não houve mortes. Nesse caso, para a via oral levou-se também em consideração a extrapolação das doses a um humano adulto de 70,0 kg de peso corpóreo e as etapas de metabolização de drogas por esta via, que geralmente exige doses maiores para a obtenção da mesma biodisponibilidade de vias mais rápidas, como a intravenosa. Então, como dose mínima escolheu-se 100,0 mg/kg, dobrando-se as doses subsequentes. Para a via intraperitoneal, 10,0 mg/kg foi utilizada como dose mínima, para que fosse possível uma comparação direta entre o extrato e a droga padrão, 100,0 mg/kg como dose máxima e, como dose mediana, metade desta última.

Na primeira fase do edema de pata induzido por carragenina (EPIC) as doses mínimas e máximas mostraram atividade antiedematogênica estatisticamente significativa em relação ao controle negativo em ambas as vias, porém, não houve diferença com relação ao controle positivo (Figura 5.43, pág.141).

Por outro lado, na segunda fase do EPIC, o extrato mostrou atividade antiedematogênica estatisticamente significativa em relação ao controle negativo em todas as doses testadas. Com relação ao controle positivo, a maior dose testada pela via oral (400,0 mg/kg) e todas as doses testadas pela via intraperitoneal (10,0; 50,0 e 100,0 mg/kg) mostraram atividade antiedematogênica superior (Figura 5.44, pág. 142).

Os resultados mostram que, indiscutivelmente, I5 apresenta apreciável capacidade antiedematogênica, o que pode estar diretamente relacionado à sua atividade anti-

inflamatória, visto que o edema é sinal clássico da inflamação. Via de regra, os resultados obtidos com a metodologia empregada nesta avaliação são considerado por muitos, determinantes de atividade anti-inflamatória (LAPA et al., 2008).

Os efeitos mais pronunciados na segunda fase desta avaliação (Figura 5.44, pág. 142) sugerem que o extrato interfere na síntese dos eicosanóides, produtos da via metabólica do ácido araquidônico e principais responsáveis pela resposta inflamatória nessa fase do EPIC (LAPA et al., 2008; MUNIAPPAN; SUNDARARAJ, 2003). Isso reafirma o primeiro mecanismo discutido na avaliação da atividade antiagregante plaquetária (Item 5.2.2, pág. 130-131).

Esse mecanismo geralmente vem acompanhado de atividade analgésica, como pode ser observados nos AINE (CARVALHO et al., 2004). Tal fato se deve porque a dor de origem inflamatória é resultado da sensibilização de nociceptores por proteínas plasmáticas (oriundas do edema) e prostaglandinas, notadamente prostaglandina E₂ (PGE₂), que é um produto do metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclo-oxigenases. Na inflamação, a dor tem a função de alertar o indivíduo para a imobilização do local onde ocorre a resposta inflamatória (DAVIES et al., 1984; DRAY, 1995; STEINMEYER, 2000).

Porém, durante o *screening* hipocrático e mesmo durante a avaliação da atividade antiedematogênica, os animais apresentaram contorções abdominais intensas, que provavelmente se devem à presença de saponinas no extrato, como já foi discutido. Não somente as contorções, mas todos os sinais de toxicidade observados durante o *screening* hipocrático também foram observados nesta avaliação.

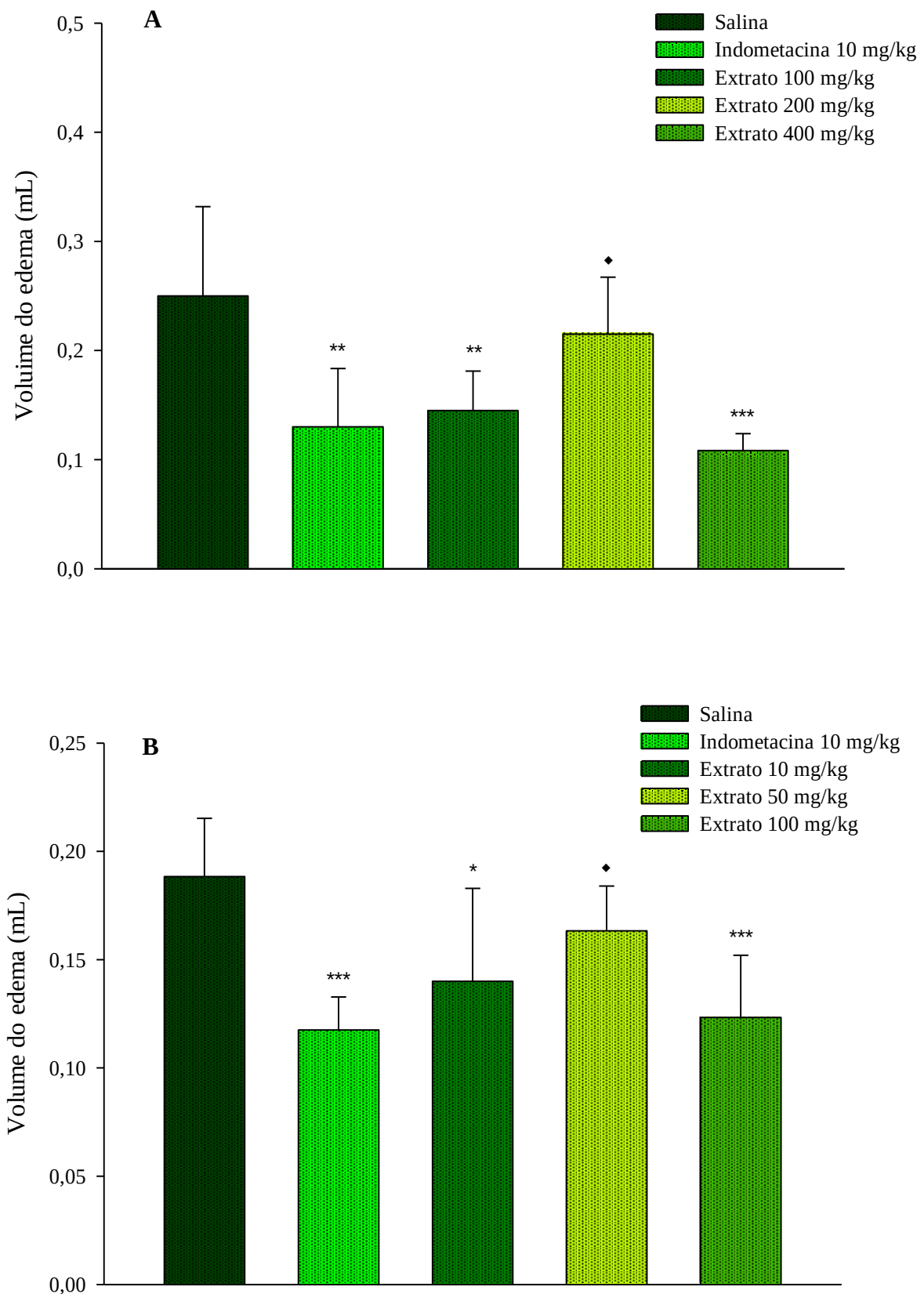


Figura 5.43 – Efeito das drogas testadas na primeira fase do edema de pata induzido por carragenina (primeira hora após a injeção da carragenina). A – efeitos pela via oral; B – efeitos pela via intraperitoneal. Valor de p versus controle negativo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Valor de p versus controle positivo: ♦ $p < 0,05$.

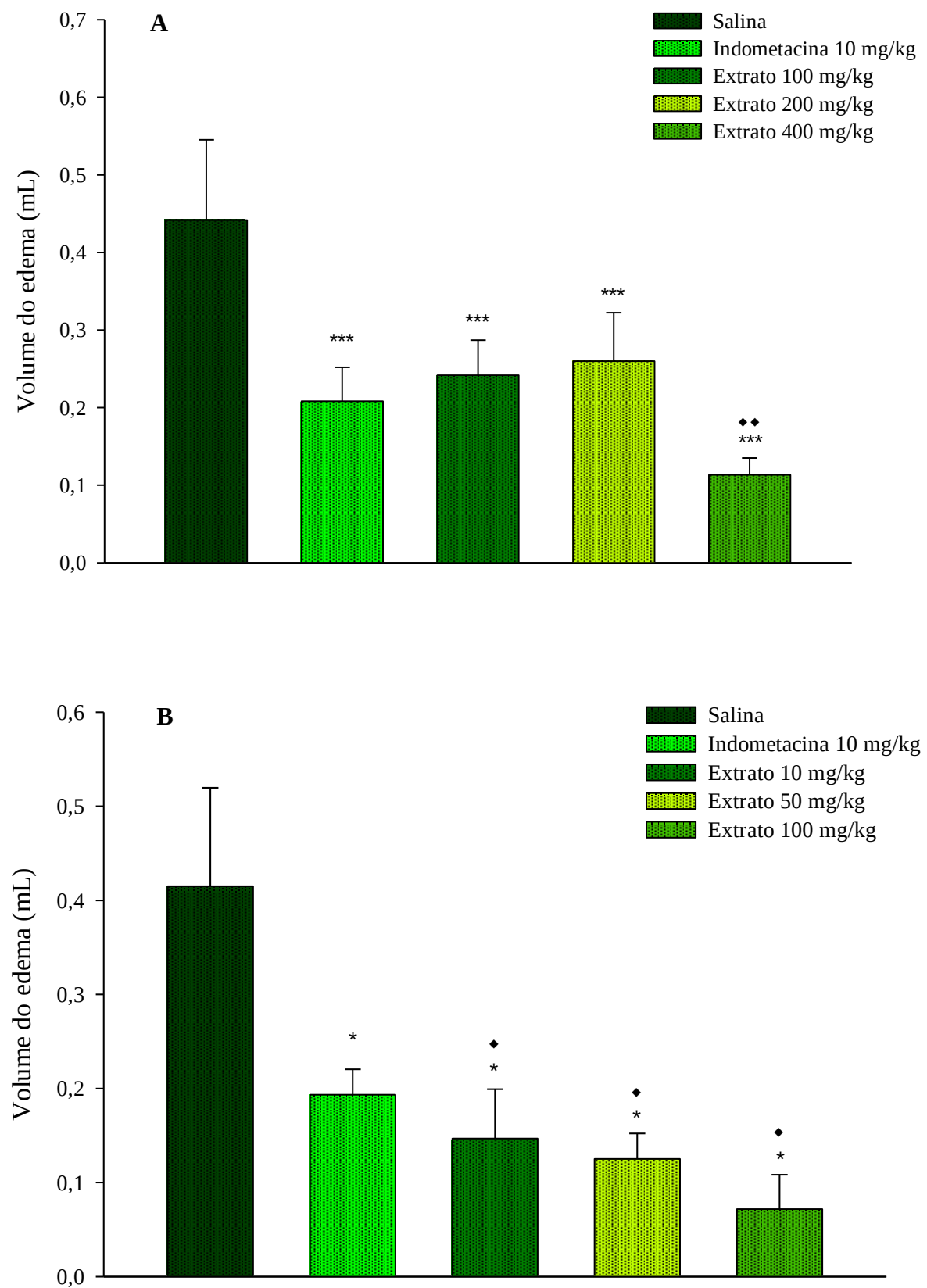


Figura 5.44 – Efeito das drogas testadas na segunda fase do edema de pata induzido por carragenina (terceira hora após a injeção da carragenina). A – efeitos pela via oral; B – efeitos pela via intraperitoneal. Valor de p versus controle negativo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Valor de p versus controle positivo: ♦ $p < 0,05$; ♦♦ $p < 0,01$.

A contorção abdominal é um parâmetro bastante utilizado na verificação da atividade analgésica de diversas substâncias, uma vez que simboliza que o animal está sentindo dor. Nessas metodologias, as contorções são provocadas por soluções diluídas de ácido acético ou mesmo bradicinina e acetilcolina, injetadas intraperitonealmente nos animais, geralmente camundongos, após a administração da substância em teste. A diminuição da frequência e do número de contorções em um intervalo determinado de tempo, é indicativo de atividade analgésica (LAPA et al., 2008). Portanto, se houvessem substâncias analgésicas no extrato, provavelmente as contorções não seriam observadas ou não seriam tão intensas. É possível fazer essa relação já que as contorções abdominais provocadas pelas saponinas são sinais de dor de origem inflamatória, desencadeada pela injúria à mucosa gastrointestinal (FRANCIS et al., 2002; SCHENKEL et al., 2007). Além disso, é válido lembrar que os animais responderam a todos os estímulos de dor a que foram submetidos durante o *screening* hipocrático.

Por esta razão, não pode ser descartada a possibilidade de que a atividade antiedematogênica de I5 se deva a sua ação vasodilatadora, que foi fortemente sugerida durante a discussão dos sinais do *screening* hipocrático. Nesse caso, a ação do extrato não teria real influência na resposta inflamatória, pois o edema seria diminuído por simples mecanismo físico (LAPA et al., 2008).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com o estudo farmacognóstico da casca do caule de *B. japurensis* são os primeiros descritos. Servem como referencial para a identificação da droga, corroboram grandemente para o desenvolvimento de um produto fitoterápico da espécie e podem ainda ser utilizados para a elaboração de uma monografia. As análises fitoquímicas, que incluíram a obtenção de espectros na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear de frações oriundas de fracionamentos do extrato aquoso dessa droga vegetal, mostraram que a mesma possui composição química variada, incluindo classes de metabólitos secundários cujas propriedades farmacológicas já são conhecidas.

O extrato aquoso da casca de *Byrsonima japurensis* é dotado de potente atividade antioxidante, além de possuir apreciável capacidade antiagregante plaquetária e antiedematogênica, que contribuem diretamente para a atividade anti-inflamatória do mesmo. Esses resultados são plenamente justificados pela constituição química da droga vegetal, que inclui flavonóides, triterpenos e taninos. Além disso, vários outros efeitos biológicos sobre o sistema cardiovascular e nervoso, potencialmente benéficos se controlados, que indicam que o extrato possivelmente atua como um agonista adrenérgico não seletivo, também puderam ser observados na análise toxicológica.

As chances de moléculas ainda não conhecidas serem responsáveis por alguns dos efeitos observados no sistema nervoso autônomo e somático são bastante palpáveis, uma vez que as substâncias de origem natural dotadas dos mesmos efeitos observados são alcalóides, que não estão presentes nesta droga vegetal. Contudo, a diversidade na composição química, que possibilita que o extrato apresente grande potencial farmacológico, também parece ser responsável pela sua toxicidade. Assim sendo, para a aplicação do extrato aqui estudado para fins terapêuticos, ainda são necessários mais estudos sobre sua relação dose-efeito *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIB-JUNIOR, E. **Estudo clínico do alho fresco em voluntários sadios: avaliação da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* e comportamento da pressão arterial através da MAPA *in vivo***. 2004. 69f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ADAMS, C.; MURRIETTA, R. S. S.; SANCHES, R. A. Agricultura e alimentação em populações ribeirinhas das várzeas do Amazonas: novas perspectivas. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 1, p. 1-23, jan./jun. 2005.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2388-92, Oct. 2005.
- ALICE, C. B. et al. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 83-94, 1985.
- ALTAMIRANO, J. et al. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger function. **Journal of Physiology**, v. 575, n. 3, p. 845-54, 2006.
- ALVES, G. L.; FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich.). **Journal of Chromatography A**, v. 985, 297-301, 2003.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-73, may/june 2000.
- AMARQUAYE, A. et al. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Medica**, v. 60, 85-6, 1994.
- AMES, B. N.; SHINENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, 7915-22, sep. 1993.
- ARANTES, V. P. et al. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 195-8, 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, 431-41, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BARROS, G. S. G. et al. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacia and Pharmacology**, v. 22, 116-22, 1970.

BEJAR, E.; MALONE, M. H. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 141-58, 1993.

BEJAR, E. et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **Internacional Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n. 1, p. 25-32, 1995.

BERGER, I. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, 107-15, 1998.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, mai./ago. 1999.

BOGLIOLO, L. et al. **Patologia Geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1993. 220 p.

BONZANI DA SILVA, J. Ácido gálico, pirogalol e pirocatequina na raiz de *Byrsonima intermedia* Ad.Jussieu forma latifolia Grisebach. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 187-92, jul./dez. 1970a.

BONZANI DA SILVA, J. Beta-amirina na raiz de *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu forma latifolia Grisebach. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, n. 1, p. 53-67, jan./jun. 1970b.

BORN, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v. 194, 927-9, 1962.

BOSCOLO, O. H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 8-12, 2007.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994. 122 p.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptors agonists and antagonists. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill / Medical Publishing Division, 2006.

BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE. **Deutscher Arzneimittel - Codex**. v. 1. Frankfurt: Govi-Verlag, 1986.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgesic-antipyretic agentes; pharmacology of gout. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill / Medical Publishing Division, 2006.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, 30, 1, p. 55-73, 1990.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, 195-202, 1998.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 31, 3, p. 263-76, 1991.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, 207-13, 1993.

CACHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-60, 1997.

CARDOSO, C. R. P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CARDOSO, C. R. P. et al. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 55-63, Aug. 2006.

CARVALHO, C. M. G. et al. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448-64, 2004.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-32, out. 2006.

CHAUHAN, A.; CHAUHAN, V. Oxidative stress in autism. **Pathophysiology**, v. 13, 171-81, 2006.

CIFUENTES, C. M. et al. Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, 223-8, 2001.

CLAUDINO, R. F. **Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E₂ (PGE₂) em camundongos**. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003. 247 p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1032 p.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, 860-7, 2002.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-8, Apr. 2007.

DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Reviews of Immunology**, v. 2, 335-57, 1984.

DAVIS, C. C. et al. Laurasian migration explains Gondwanan disjunctions: evidence from Malpighiaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 6833-7, May 2002.

DELAVEAU, P.; LALLOULETTE, P.; TESSIER, A. M. Drogues végétales stimulant l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. **Planta Medica**, v. 40, 49-54, 1980.

DEMATTE, J. L. I.; DEMATTE, J. A. M. Comparações entre as propriedades químicas de solos das regiões da floresta amazônica e do cerrado do Brasil Central. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 272-86, jul./set. 1993.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-9, 2007.

DOS SANTOS, M. H. **Estudo químico de *Vismia latifolia* e dos frutos de *Rheedia gardneriana*, atividades biológicas dos constituintes químicos isolados e transformações químicas em 7-epiclusianona**. 2001. 301f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DOSSEH, C. et al. Étude chimique des feuilles de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex Juss. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 14, n. 3, p. 136-42, 1980.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, 125-31, 1995.

ES-SAFI, N.-E.; GHIDOUCHE, S.; DUCROT, P. H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. **Molecules**, v. 12, 2228-58, 2007.

FALKENBERG, M. d. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 229-245.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 1988.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FIGUEIREDO, M. E. et al. Avaliação química e de atividade antidiarréica de *Byrsonima cinera* DC (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 79-83, jan./mar. 2005.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Cardiotônicos: histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 182-9, 1996.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, 587-605, 2002.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, v. 34, 229-37, jul./dez. 2001.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-82, 2005.

GASPI, F. G. O. et al. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandifolia* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, 19-24, 2006.

GAWAZ, M.; LANGER, H.; MAY, A. E. Platelets in inflammation and atherogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3378-84, dec. 2005.

GEISS, F. et al. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 635-43, 1995.

GIESE, S. O. K. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-81, 2007.

GOMES, M. E. W. et al. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 255-64, 2000.

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, n. 3, p. 203-7, jul./set. 2005.

GOTTLIEB, O. R.; MENDES, P. H.; MAGALHÃES, M. T. Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. **Phytochemistry**, v. 14, 1456, 1975.

GRAHAM, J. G. et al. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**, v. 10, 528-35, 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade, fitoterápicos e fitofármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 13-28.

HARBORNE, J. B. **Biochemistry of Phenolic Compounds**. 1. ed. London and New York: Academic Press, 1964. 618 p.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, 481-504, 2000.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, 29-42, 2003.

HEINRICH, M. et al. Ethnobotany and ethnopharmacology - Interdisciplinary links with the historical sciences. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, 157-60, 2006.

HIGUCHI, C. T. **Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus vegetais**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

HIGUCHI, C. T. et al. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1719-21, 2008a.

HIGUCHI, C. T. et al. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. **eCAM**, 1-5, dez. 2008b.

JANEWAY JUNIOR, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 824 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KARANGWA, C. et al. Chemical and biological investigation of a toxic plant of Central Africa, *Magnistipula butayei* subsp. *montana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, 433-8, 2006.

KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 9. ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004. 1604 p.

KLINGER, M. H. F.; JELKMANN, W. Role of blood platelet in infection and inflammation. **Journal of Interferon & Chemokines Research**, v. 22, 913-22, 2002.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extract for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, 8-17, 2002.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não-esteroidais inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5. ed. São Paulo: UNIFESP/EPM, 2008. 144 p.

LEITE, C. F. Q. et al. Antimycobacterial activity of *Byrsonima crassa* Nied leaf extract. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 4, p. 63-6, 2008.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, 868-74, Dec. 2002.

LIMA, C. M. P. ***Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr: Da teoria medicinal à investigação toxicológica e utilização terapêutica**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LIMA, Z. P. et al. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, 149-60, 2008.

LIRA, W. M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 111-9, 2008.

LOMBELLO, R. A. **Estudo cromossômico em Malpighiaceae A. Jussieu**. 2000. 78f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia (Universidade Estadual de Campinas), Campinas.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, 189-96, 2001.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 26, 37-44, 2008.

MACHADO, S. R. et al. Comparative bark anatomy of root and stem in *Styrax camporum* (STYRACEAE). **IAWA Journal**, v. 26, n. 4, p. 477-87, 2005.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Blood coagulation and anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill / Medical Publishing Division, 2006.

MARTINEZ-VAZQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, 79-82, 1999.

MATHEWS, R. S. *Artemia salina* s a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 5, p. 919-22, 1995.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 136p.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, 2015-22, 2007.

MENDES, C. C. et al. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-8, mar./abr. 1999.

MICHELIN, D. C. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima species* (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (supl.), 690-5, dez. 2008.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumuni* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, jan./mar. 2007.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. Estudo do potencial de mercado de fármacos (medicamentos e cosméticos), fitomedicamentos, "bancos de extratos e compostos" e serviços de patenteamento e certificação. Belém, 2000. 123p.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Byrsonima japurenis* A. Juss. Disponível em: <http://www.tropicos.org/name/19500195>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-6, 2005.

MORGAN, B. L. Overview of inflammation and coagulation. **Critical Care Concepts**, v. 12, 1-7, may 2007.

MUNIAPPAN, M.; SUNDARARAJ, T. Antiinflammatory and antiulcer activities of *Bambusa arundinacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, 161-7, 2003.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, 846-52, dec. 2002.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, 125-37, 2007.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R. et al. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v. 78, 315-8, 2007.

PEREIRA, M. M. **Estudo fitoquímico da espécie *Aspidosperma nitidum* (Benth.) Apocynaceae**. 2005. 200f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PIEDADE, P. R. et al. Papel da curva de agregação plaquetária no controle da antiagregação na prevenção secundária ao acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 3-B, p. 764-7, 2003.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, 1035-42, 2000.

PRICE, J. E.; KLIMIUK, P. S.; JAYSON, M. I. V. *In vitro* platelet aggregability studies: lack of evidence for platelet hiperactivity in systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 50, 567-71, 1991.

RAFFAUF, R. F. **Plant Alkaloids: a guide to their discovery and distribution**. New York: Haworth Press, 1996. 208 p.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RASTRELLI, L. et al. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 647-50, 1997.

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

REIS, M. G. et al. Byrsonic acid - the clue to floral mimicry involving oil-producing flowers and oil-collecting bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, 1421-9, 2007.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. G. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 425-8, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-9, apr. 1999.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996. 1277 p.

ROCHA, J. H. et al. A novel chlorinated diphenyl ether from *Byrsonima microphylla* (Malpighiaceae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 11, p. 2759-61, 2006.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **EMBRAPA: Comunicado Técnico on line**, n. 128, p. 1-4, jul. 2007.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, 319-26, June 2007a.

SANNOMIYA, M. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, Feb. 2005a.

SANNOMIYA, M. et al. *Byrsonima crassa* Niendezu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 71-5, 2005b.

SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 19, 16, p. 2244-50, 2005c.

SANNOMIYA, M. et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, v. 1035, 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M. et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling of compounds from the infusion of *Byrsonima fagifolia* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 21, 8, p. 1393-400, 2007b.

SANTOS, M. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 403-434.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHEYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 711-740.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant activities of anti-inflammatory plant extracts. **Life Sciences**, v. 70, 1023-33, 2002.

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, suppl. 1, p. S3-S9, 2008.

SIES, H. Strategies of antioxidants defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, 213-9, 1993.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, 1012-8, 2007.

SILVA, M. J. M.; SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro II. **Revista Brasileira de Farmácia**, Ano LII, n. 3, p. 117-23, mai./jun. 1971.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B. **Caracterização dos efeitos do Plumerídio, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SMYTH, E.; BURKE, A.; FITZGERALD, G. A. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill / Medical Publishing Division, 2006.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-5, 2007.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 697-712, out./dez. 2005.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**, v. 2, 379-85, 2000.

TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 347-57, 2000.

THE FIELD MUSEUM. Neotropical Herbarium Species. Disponível em: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/?page=results&genus=Byrsonima&species=japurensis>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

THE FIELD MUSEUM. Neotropical Live Plant Photos. Disponível em: <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?chkbox=5097>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

THOMSEN, K.; BRIMER, L. Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 124, 273-94, 1997.

VAN ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activities of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-42, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VICENTINI, A.; ANDERSON, W. R. Malpighiaceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S. et al. **Flora da reserva Ducke - guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme da Amazônia Central**. Manaus: INPA-DFID, 1999. v. 1, p. 505-511.

VITOR, C. E. **Avaliação do efeito antiinflamatório e imunomodulador do triterpeno pentacíclico α , β -amirina sobre a colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico em camundongos.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WELLEN, K. E.; HOTAMILISGIL, G. S. Inflammation, stress and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111-9, may 2005.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Adrenergic agonist and antagonist. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 11. ed. New York: McGraw-Hill / Medical Publishing Division, 2006.

WEYRICH, A. S.; LINDEMANN, S.; ZIMMERMAN, G. A. The evolving role of platelets in inflammation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, 1897-905, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plants materials.** Geneva: WHO Press, 1998. 123 p.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CACHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-52, 2001.

ZANI, C. L. et al. Brine shrimp lethality assay as a pre-screening system for anti-*Tripanossoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 2, 47-50, 1995.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da plantas ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 577-614.

Anexos



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 038/2006, intitulado: **“Identificação de espécies botânicas amazônicas como potenciais fitoterápicos: estudos etnobotânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos.”** tendo como Pesquisador Responsável Prof. Emerson Silva Lima.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 27 de abril de 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM

.....
Prof. Dra. Maria Rosa Lozano Borja
Coordenadora

Recb. em 03.03.06
Emerson

B – Autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SECRETARIA EXECUTIVA DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SCEN, Trecho 2, Ed. Sede do IBAMA, Bloco G - 70.818-900 - Brasília - DF
Telefone: (61) 3307-7118 - Fax: (61) 3307-7124 - <http://www.mma.gov.br/port/cgen> - cgen@mma.gov.br

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO A COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO PARA FINS DE BIOPROSPECÇÃO

AUTORIZAÇÃO Nº 34/2008

O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, instituído pela Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, que regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225, da Constituição Federal, os arts. 1º, 8º, alínea j, 10, alínea c e 16, alíneas 3 e 4, da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e no uso de suas competências conferidas pelos arts. 11, inciso IV, alíneas “a”, “b”, “c” e “d”; 15, inciso III, alíneas “a” e “b” da Medida Provisória nº 2.186-16, de 2001 e pelos arts. 3º, inciso IV, alíneas “a”, “b”, “c” e “d”; 7º, incisos IV e V, do Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, emite a presente **AUTORIZAÇÃO DE ACESSO A COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO PARA FINS DE BIOPROSPECÇÃO**, conforme a Deliberação nº 225, de 31 de julho de 2008, publicada no Diário Oficial da União de 20 de agosto de 2008, seção 1, folha 99, que autoriza a:

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

CNPJ: 04378626/0001-97

ENDEREÇO: Av. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, Manaus – Amazonas
CEP: 69077-000

REPRESENTANTE LEGAL: Hidembergue Ordoizgoith da Frota

CPF: 043.459.082-72

RG: 207326

ÓRGÃO EMISSOR: SESEG/ AM

COORDENADOR DO PROJETO: Emerson Silva Lima

CPF: 411.969.292-20

DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO: 0255442

ÓRGÃO EMISSOR: SSP/AC

Folha 2 de 4 da Autorização nº 34/2008

EQUIPE:

Maria Rosa Lozano Borrás
Maria de Meneses Pereira
Débora Teixeira Ohana
Ângela Líbia
Lenise Socorro Benarrós de Mesquita
Maria Elisa Freire Meneghini
Junia Raquel Dutra Ferreira
Miguel Ângelo da Silva
Rosemire Brondi Alves
Luiz Roberto Coelho Nascimento



TÍTULO DO PROJETO: “Identificação de espécies botânicas amazônicas como potenciais fitoterápicos: estudos etnobotânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos”.

C – Equipe Científica

Nome	Formação	Titulação	Atividade no Projeto
Maria de Meneses Pereira	Farmacêutica/Bioquímica	Doutora	Orientadora
Émerson Silva Lima	Farmacêutico/Bioquímico	Doutor	Co-Orientador
Carlos Cleomir de Souza Pinheiro	Biólogo	Doutor	Colaborador
Tatiane Pereira de Souza	Farmacêutica	Doutora	Colaboradora
Alexandre Antônio Alonso	Biólogo	Doutor	Colaborador
Débora Teixeira Ohana	Farmacêutica	Doutora	Colaboradora