UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados

CÉLIO TAKASHI HIGUCHI
Farmacêutico-bioquímico

Araraquara – SP
Junho - 2007

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados

CÉLIO TAKASHI HIGUCHI

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Co-orientadora: Profª Drª Clarice Queico Fujimura Leite

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara – SP

Junho - 2007

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Higuchi, Célio Takashi
H638b Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. / Célio Takashi Higuchi . – Araraquara, 2007.
85 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento
Co-orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

. 1. Byrsonima spp. 2. Atividade antimicobacteriana. 3. Anatomia foliar. 4. Histoquímica (Estudo) 5. Citotoxicidade. 6. Botânica. I.Sacramento, Luis Vitor Silva do, orient.. II. Leite, Clarice Queico Fujimura, co-orient. III. Título.

CDD: 581.012

CAPES:40300005

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

DEDICO

Ao meu Senhor por iluminar em todos os momentos os meus caminhos;

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em toda a fase da minha vida;

A minha irmã, Èrika Mayumi Higuchi, por ser uma pessoa companheira, agradeço a Deus pela sua existência;

A querida e amada Talita Ishioka, uma pessoa querida, encantadora e presente tanto nos momentos tristes e alegres. Junto ajudou-me a enfrentar mais um desafio. Te amo muito!

Aos meus irmãos que me orgulho muito, agradeço por fazerem parte da minha vida. Aos ensinamentos, o companheirismo e por serem verdadeiros amigos. Nunca esquecerei desta fase da vida. Dedico a vocês: Tuchê, Dinda, Kioske, Pito, Murphy, Fodão, Freba, Maguila, Ktatau, Oá, Quasy, Fino, Caqui, Boi, Vinagre, Teco, Beavis, Thunder, Vampeta, Sashimi, Batata, Xavasco, Kushiro, Lester, Medelin, Querubim, Kusono, Muringa, Pão, Tarciso, Tomolto e Mun-ha.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelos ensinamentos, experiência acadêmica e acima de tudo amigo. Sempre com disposição e competência profissional, transmitiu com paciência à vontade de ensinar;

A Co-Orientadora Prof[a]. Dr[a]. Clarice Queico Fujimura Leite, pelas primeiras experiências como pesquisador, despertando meu interesse pela busca do meio científico. Pelas palavras e pensamentos que me fizeram me ajudar;

A Dr[a]. Daisy Nakamura Sato, por sempre me auxiliar e enriquecer meus conhecimentos sobre a Micobactéria. Iluminada pela vontade de ajudar os outros;

Ao prof. Dr. João Aristeu da Rosa, que me contribuiu muito no meu crescimento profissional e pessoal, e dar a oportunidade de trabalhar no PET. Pessoa única, preocupada com todas as pessoas que te rodeiam. Admiro muito;

Aos amigos de laboratório Prof. Dr. Hugo David, pela convivência e amizade com cada um de vocês: Carol, Zé, Adolfo, Cleso, Faber, Karina e Fernando. Aos amigos de laboratório de Botânica pela força e companheirismo: Luis e Vitor;

A Pós-Doutora Miriam Sannomiya, que auxiliou muito no meu trabalho;

Ao prof. Dr. Wagner Vilegas, no fornecimento dos extratos;

Á Técnica Maria Angélica Lima Barreto pelo auxílio, conversa e amizade;

Á Técnica Maria Zenaide Pita Fernandes pela sua paciência, carinho e paciência em ensinar;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos transmitidos;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP;

A Seção de Pós-Graduação pelo empenho no profisssionalismo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE FIGURAS **I**
LISTA DE TABELAS **III**
LISTA DE FLUXOGRAMA **IV**
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS **V**
RESUMO **1**
ABSTRACT **2**
1. INTRODUÇÃO **3**
2. REVISÃO DE LITERATURA **4**
2.1. Família Malpighiaceae 4
2.2. Estudo morfológico das espécies *Byrsonima* 6
2.3. *Mycobacterium tuberculosis* 9
2.4. Pesquisa de novas alternativas terapêuticas para tuberculose 10
2.5. Método de determinação do perfil de sensibilidade utilizando Alamar Blue® 12
2.6. Avaliação de citotoxicidade 12
2.7. Determinação da toxicidade aguda 13
3. OBJETIVOS **15**
4. MATERIAL E MÉTODOS **16**
4.1. Material botânico 16
4.2. Estudo anatômico 16
4.3. Estudo histoquímico 18
4.4. Avaliação da atividade antimicobacteriana 19
4.4.1. Preparo de frações e compostos isolados 21
4.4.2. Preparo das suspensões bacilares 21
4.4.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro* 22
4.5. Determinação da citotoxicidade 24
4.5.1. Crescimento e manutenção dos macrófagos J774 24
4.5.2. Determinação da concentração celular 24

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.5.3. Ensaio de citotoxicidade propriamente dito 25
4.5.4. Determinação do Índice de Seletividade 26
4.6. Avaliação de toxicidade 27
4.6.1. Seleção de animais 27
4.6.2. Extrato microemulsionado 27
4.6.3. Avaliação da toxicidade aguda 28
5. RESULTADOS 29
5.1. Descrição microscópica 29
5.2. Estudo histoquímico 34
5.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro* 43
5.4. Avaliação de citotoxicidade 44
5.5. Determinação do Índice de Seletividade 45
5.6. Determinação da toxicidade aguda 49
6. DISCUSSÃO 50
7. CONCLUSÕES 58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59
9. ANEXO 71

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Representação esquemática da preparação das frações e compostos isolados utilizando-se a técnica de microdiluição em placas para determinação da atividade antimicobacteriana.....	22
2	**Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima crassa***. A: detalhe do pêlo tector unicelular em forma de T; B: aparelho estomático do tipo paracítico (seta); C: mesofilo; D: nervura central; E: parênquima paliçádico; F: parênquima lacunoso. A: barra=40μm; B: barra=20μm; C: barra=110μm; D, E e F: barra=80μm.....	30
3	**Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima fagifolia***. A: visão geral; B: mesofilo; C: feixe vascular; D: nervura central; E: aparelho estomático do tipo paracítico. A: barra=110μm; B, C e D: barra=80μm; E: barra= 20μm.....	31
4	**Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima basiloba***. A: visão geral; B: cristais de oxalato de cálcio da nervura central (setas); C: mesofilo; D: cristais de oxalato de cálcio no parênquima lacunoso de uma nervura secundária (setas); E: pêlo tector unicelular em forma de Y; F: aparelho estomático do tipo paracítico. A: barra=110μm; B, C e D: barra=80μm;E, F e G:barra=20μm.....	32
5	**Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima intermedia***. A: visão geral; B: mesofilo; C: aparelho estomático do tipo paracítico (setas); D: cristais de oxalato de cálcio no parênquima lacunoso (setas); E: nervura central. A e B: barra=110μm; D e E: barra=80μm; C: barra=20μm.....	33
6	**Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima crassa***. **A: controle para substâncias lipofílicas**; B: lipídios totais (sudan III); C: esteróides (tricloreto de antimônio); D: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); E: terpenóides com grupo carbonila (2,4-DNF); **F: controle para substâncias hidrofílicas**; G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H: compostos fenólicos (dicromato de potássio); I: taninos (vanilina clorídrica); J: alcalóides (reagente de Dragendorff); L: polissacarídeos gerais (PAS); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). A, F, L: barra=110μm; B, C, D, E, G, H, J e M: barra=80μm; I: barra=20μm.....	37

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

7 **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima fagifolia*. A: controle para substâncias lipofílicas**; B: lipídios totais (Sudan III); C: esteróides (tricloreto de antimônio); D: lactonas sesquiterpênicas (ác.sulfúrico/glicerina); E: terpenóides com grupo carbonila; **F: controle para substâncias hidrofílicas;** G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H: compostos fenólicos (dicromato de potássio); I: taninos (vanilina clorídrica); J: alcalóides (reagente de Dragendorff); L: polissacarídeos gerais (PAS); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). A e F: barra=110µm; C, D, E, G, H, I, J, L e M: barra=80µm; B: barra=40µm..... 38

8 **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima basiloba*. A: controle para substâncias lipofílicas**; B: esteróides (tricloreto de antimônio); C: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); **D, E e F: controle para substâncias hidrofílicas;** G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H e I: compostos fenólicos (dicromato de potássio); J e L: alcalóides (2,4-DNF); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). D, I, J: barra=110µm; A, B, C, E, G, H e L: barra=80µm; F e M: barra=40µm..... 39

9 **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima intermedia*. A e C: controle para substâncias lipofílicas**; B e D: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); **E: controle para substâncias hidrofílicas**; F: compostos fenólicos (cloreto férrico); G: compostos fenólicos (dicromato de potássio); H: alcalóides (reagente de Dragendorff); I: polissacarídeos gerais (PAS). A, B, D, F, G e I: barra=80µm; C, E e H: barra=110µm..... 42

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Resultados dos testes histoquímicos realizados nas folhas das espécies de *Byrsonima* por meio de corantes ou reagentes identificadores de substâncias lipofílicas.....	36
2	Localização de estruturas anatômicas utilizando corantes ou reagentes com características apolares em folhas de *Byrsonima spp*.....	36
3	Resultados dos testes histoquímicos realizados nas folhas das espécies *Byrsonima* por meio de reagentes identificadores de substâncias hidrofílicas.....	41
4	Localização das substâncias químicas nas estruturas anatômicas foliares utilizando corantes ou reagentes com características polares em folhas de *Byrsonima spp*.....	41
5	Determinação da CIM pelo MABA das frações de extratos clorofórmicos da região foliar de *B. basiloba*, *B. crassa*, *B. fagifolia* e *B. intermedia* expressa em $\mu g \cdot mL^{-1}$, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.....	43
6	Determinação da CIM pelo MABA dos compostos isolados das frações hexânica, diclorometânica e metanólica dos extratos clorofórmicos da *B. fagifolia* expressa em $\mu g \cdot mL^{-1}$, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.....	44
7	Valores de IC_{90} e IC_{50} dos extratos clorofórmicos das espécies de *Byrsonima* frente a linhagem J774.....	44
8	Valores de IC_{90} e IC_{50} das frações metanólica, diclorometânica e hexânica dos extratos clorofórmicos das espécies de *Byrsonima*.....	45
9	Valores de IC_{90} e IC_{50} dos compostos isolados da espécie de *B. fagifolia* frente a linhagem J774.....	45
10	Valores de CIM, IC_{50}, e de IS dos extratos clorofórmicos e frações das espécies de *Byrsonima*.....	46
11	Valores de CIM, IC_{50} e de IS dos compostos isolados da espécie de *B. fagifolia*.....	46
12	Relação entre reação histoquímica, atividade antimicobacteriana, citotoxicidade e IS dos extratos clorofórmicos e frações das espécies de *Byrsonima*.....	48
13	Relação entre atividade antimicobacteriana, citotoxicidade e IS dos compostos da espécie de *B. fagifolia*.....	48

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

LISTA DE FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA		PÁGINA
1	Fluxograma esquemática da obtenção de extratos, frações e isolamento de compostos das espécies *Byrsonima*.....	20

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2,4-DNF	2,4-Dinitrofenilhidrazina
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima 90%
B. basiloba	*Byrsonima basiloba*
B. crassa	*Byrsonima crassa*
B. fagifolia	*Byrsonima fagifolia*
B. intermedia	*Byrsonima intermedia*
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Extrato clorofórmico microemulsionado
FAA 50	50% etanol, 5% ácido acético glacial, 10% formalina e 35% água
IC	Índice de Citotoxicidade
IC_{50}	Índice de Citotoxicidade 50%
IC_{90}	Índice de Citotoxicidade 90%
INH	Isoniazida
IS	Índice de Seletividade
LJ	Lowenstein Jensen
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
OADC	Oleic Acid, Albumin, Dextrose and Catalase
PAS	Ácido periódico/ Reagente de Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TB	Tuberculose

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

RESUMO

HIGUCHI, C.T. ***Byrsonima spp*: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados**. Araraquara. 2007. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

As espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) são popularmente conhecidas como "murici-vermelho" ou "murici-cascudo" e os frutos são usados como sucos, geléias e licores no Norte e no Nordeste do Brasil. Nos mercados da região amazônica, inúmeras plantas nativas são comercializadas com propósitos medicinais e alimentares. O gênero *Byrsonima* predominantemente ocorre no Cerrado e contém inúmeras espécies medicinais, cujos frutos e cascas são utilizados para fins terapêuticos. São poucos os estudos relativos a identificação anatômica e a investigação histoquímica das espécies do Cerrado. Até o momento poucos estudos químicos, biológicos e farmacológicos foram realizados com os extratos destas espécies. Assim os dados obtidos neste estudo podem contribuir para um melhor entendimento das plantas dessa região. Os objetivos do presente trabalho visaram descrever a anatomia da região mediana das folhas das espécies *B. basiloba* A.Juss*., B. crassa* Niedenzu (IK)*, B. fagifolia* Nied. e *B. intermedia* Juss.; estudar a histoquímica das espécies citadas; avaliar a atividade antimicobacteriana utilizando a técnica da microdiluição em placa com Alamar Blue®; avaliar o Índice de Citotoxicidade (IC) dos extratos, frações e compostos isolados das espécies que apresentaram promissores resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e verificar o Índice de Seletividade (IS) dos extratos, frações e compostos isolados. Anatomicamente, as espécies estudadas apresentam mesofilo dorsiventral, formado por 1 a 3 camadas de células no parênquima paliçádico; grandes espaços intercelulares no parênquima lacunoso na *B. intermedia* e arranjos compactos em outras espécies; cristais (drusas) em 2 das 4 espécies e esclerênquima presente nas nervuras de todas espécies. A análise histoquímica revelou que os principais constituintes químicos presentes foram lipídios totais, esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides para substâncias apolares; e compostos fenólicos, taninos, alcalóides, polissacarídeos totais e proteínas totais para substâncias polares, com diferentes intensidades de reação em cada espécie. Em relação a atividade antimicobacteriana, foram encontrados valores de CIM mais promissores nas frações metanólica (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$) e diclorometânica (1,95$\mu g \cdot mL^{-1}$) da *B. fagifolia*, fração em diclorometano da *B. basiloba* (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$) e fração em metanol da *B. crassa* (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$). Em ensaio subsequente, foi determinada a CIM dos compostos de *B. fagifolia*. O ácido bássico (2,5$\mu g \cdot mL^{-1}$) apresentou elevada atividade antimicobacteriana. Em relação a citotoxicidade, foram obtidos melhores IS na fração em diclorometano das espécies *B. fagifolia* (2,06) e *B. basiloba* (1,46). Os estudos anatômicos e histoquímicos foram importantes para a identificação botânica das espécies ressaltando a localização das substâncias ativas nos tecidos vegetais. Em particular, destaca-se a espécie *B. fagifolia* a qual observou-se, por testes histoquímicos, a presença de terpenóides e esteróides, correlacionando-se com o ácido bássico isolado, apresentando elevada atividade antimicobacteriana e média citotoxicidade.

Palavras-chave: *Byrsonima spp*, atividade antimicobacteriana, anatomia foliar, estudo histoquímico e citotoxicidade

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

ABSTRACT

HIGUCHI, C.T. ***Byrsonima spp*: Anatomical and histochemical leaf study, antimicobacterial activity and citotoxicity of extracts and its derivates**. 2007. (Master in Pharmaceutical Sciences) State University "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

The species of the *Byrsonima* genus (Malpighiaceae) popularly are known as "murici-vermelho" or "murici-cascudo" and fruits are used as juices, jellies and liquores in the North and the Northeast of Brazil. In the markets of the Amazon region, innumerable native plants are commercialized with medicinal and alimentary intentions. *Byrsonima* genus predominantly occurs in the Cerrado and contains innumerable medicinal species, whose fruits and barks are used for therapeutical purposes. The relative studies are few the anatomical identification and histochemical inquiry from species of the plants of this region. Until the moment few chemical, biological and pharmacological studies had been carried through with extracts of these species. In this direction the data in this study can contribute over all for the best agreement of the plants from Cerrado of the *Byrsonima* genus. The objectives of the present work had aimed at to describe the anatomy of the medium region of leaves of species *B. basiloba* A. Juss., *B. crassa* Niedenzu (IK), *B. fagifolia* Nied. and *B. intermedia* Juss.; to study the histochemistry of the cited species; to determine the sensitivity profile using itself it technique of the MABA; to evaluate the Index of Citotoxicity (IC) of extracts, fractions and isolated compounds of the species that had presented promising results of MIC and to determine the Selectivity Index (SI) of extracts, isolated fractions and compounds. Anatomically, it was verified that mesophyll is joined, possessing from 1 to 3 layers of cells in palisade parenchyma, palisade parenchyma is loosened; there are crystals (drusean) in 2 of 4 studied species and sclerenchyma presents in ribbings of all species. Histochemical analysis disclosed to the main chemical constituent presents had been general lipids, steroids, sesquiterpene lactones and terpenoids for lipophilic substances; and phenolic compounds, tannins, alkaloids, polysaccharides and total proteins for hydrophilic substances with different intensities of reaction in each species. In relation the antimycobacterial activity, it had been found more promising values of MIC in the methanolic fractions (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$) and dicloromethanolic (1,95$\mu g \cdot mL^{-1}$) of the *B. fagifolia*, dicloromethanolic fraction of the *B. basiloba* (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$) and methanolic fraction of the *B. crassa* (7,81$\mu g \cdot mL^{-1}$). In next assay it was determined the MIC of compounds of *B. fagifolia*. The compound bassic acid (2,5$\mu g \cdot mL^{-1}$) had presented high antimycobacterial activity. In relation the citotoxicity, it had been gotten better IS in the dicloromethanolic fraction of the species *B. fagifolia* (2,06) and *B. basiloba* (1,46). The anatomical and histochemical studies had been important for the botanical identification of the species standing out the localization of active substances in vegetal tissue. In particular, it is distinguished *B. fagifolia* species which was observed, for histochemical tests, the presence of terpenoids and steroids, correlating themselves with the bassic acid isolated, presenting raised antimicobacterial activity and citotoxicity average.

Key-words: *Byrsonima spp*, antimycobacterial activity, leaf anatomy, histochemical study and citotoxicity

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro apresenta cerca de 6500 espécies vegetais das quais mais de duzentas já têm atribuída alguma importância econômica. A complexidade vegetal e diversidade de fisionomias propicia variações na população vegetal deste bioma, aumentando, por exemplo, as expressões fenotípicas devido a influência dos componentes ambientais. Esta variação é muito importante por tornar os vegetais aptos a sobreviverem quando submetidos a fortes pressões seletivas (Brasil, 2004).

Em decorrência da busca de substâncias novas ativas biologicamente, o interesse sobre a biodiversidade existente da região do Cerrado cresceu nos últimos anos. Esta exploração dos recursos biológicos naturais, ou seja, a exploração da biodiversidade é denominada de bioprospecção. Ela propicia conhecimento da biodiversidade e do seu potencial, pode fornecer substâncias importantes ao ser humano e melhorar o nível científico do país.

Assim, a bioprospecção pode ser definida como um método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local, tendo como objetivo principal, a busca de estruturas moleculares, recursos genéticos e bioquímicos. O processo de bioprospecção deve obedecer princípios ideológicos para que haja uma credibilidade científica. Neste contexto, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – apoiou um projeto temático denominado “Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores” tendo como objetivo pesquisar e realizar a bioprospecção da região do Cerrado.

Neste projeto, dentre as muitas investigações executadas, destaca-se o estudo da atividade antimicobacteriana dos extratos vegetais de *Byrsonima spp*. Por meio de técnicas de bioprospecção, estas espécies foram selecionadas e pesquisadas tendo-se como critério os conhecimentos populares de uso medicinal.

A tuberculose, há tempos foi declarada em estado emergencial no mundo, sendo ainda na atualidade a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Cerca de dois bilhões de pessoas, correspondendo a um terço da população mundial, está infectada pelo *M.*

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

tuberculosis. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (WHO, 2007).

Apesar da existência de esquemas terapêuticos eficazes, muitos pacientes não se curam, porque interrompem o tratamento ou usam irregularmente os medicamentos. Estes fatores induzem a seleção de cepas de *M. tuberculosis* mutantes resistentes elevando as taxas de resistência tanto primária quanta adquirida e, consequentemente causando falência no tratamento.

Neste sentido, novas alternativas terapêuticas vêm sendo estudadas destacando-se a pesquisa de novos fármacos. Em decorrência da complexa biodiversidade da região do Cerrado, ressalta-se seu potencial na busca de plantas que podem apresentar alguma atividade antimicobacteriana.

Em 2007, a OMS anunciou o acréscimo de um novo fármaco contra a tuberculose, o Cycloserine® (4-aminoisoxazolidin-3-ona), em sua lista de medicamentos recomendados, com o objetivo de melhorar as distintas opções de produtos de qualidade que existem para atacar a doença e que se torna importante para combater os tipos de tuberculose resistente aos tratamentos básicos (WHO, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Malpighiaceae

Muitas plantas pertencentes às mais variadas famílias têm sido empregadas popularmente na região do Cerrado no tratamento de diversas doenças como, por exemplo, as plantas da família Malpighiaceae (Almeida *et al.*, 1998). Esta família compreende aproximadamente 66 gêneros e 1200 espécies de árvores e lianas, sendo que 32 gêneros com aproximadamente 300 espécies (Araújo, 1994) encontram-se distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais no Brasil (Cronquist, 1981), sendo uma das dez famílias mais bem representadas no Cerrado (Mendonça

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

et al. 1998), bioma que apresenta carência de estudos de anatomia vegetal, especialmente no que se refere aos frutos e sementes.

A morfologia das flores de Malpighiaceae é bastante homogênea, mas seus frutos possuem extrema diversidade (Anderson, 1979), ocorrendo frutos indeiscentes, secos e carnosos e frutos secos deiscentes, que podem ser alados ou não, glabros ou pilosos. Os frutos carnosos evoluíram separada e repetidamente em diversas épocas (Anderson, 1990); acredita-se que isso ocorreu devido ao advento de pássaros pequenos, típicos dispersores destes frutos (Anderson, 1977). Com relação às sementes, nota-se que poucas espécies foram estudadas em detalhe. Singh (1964) referiu o estudo da estrutura seminal de *Malpighia glabra* L. e *Thryallis glauca* (Cav.) Kuntze, enquanto Corner (1976) relatou também a de *Heteropterys angustifolia* Griseb. e *Tristellateia australasiae* A. Rich. Segundo Corner (1976), as espécies de Malpighiaceae apresentam sementes tégmicas, com exotégmen fibroso e endotégmen esclerótico, sendo que, em determinadas espécies, uma ou ambas as características tégmicas podem estar ausentes. Estudando *Janusia guaranitica* (Malpighiaceae), Lorenzo (1981) descreveu um único tegumento que se diferencia, com a epiderme formada por células grandes com alto conteúdo de compostos fenólicos.

O gênero *Byrsonima* Rich. *ex* H.B.K. possui mais de 15 espécies (Anderson 1977), com frutos drupóides de pirênio único dividido em três lóculos (Barroso *et al.* 1984). Suas espécies são popularmente conhecidas como murici, murici-vermelho ou murici-cascudo e apresentam rápido crescimento, flores vistosas e frutos adocicados e suculentos que atraem aves, com grande potencial para uso ornamental e para recuperação de áreas degradadas (Ribeiro *et al.* 1999). Nos mercados da região amazônica, inúmeras plantas nativas são comercializadas com propósitos medicinais e alimentares, sendo usadas no preparo de sucos, geléias e liquores no Norte e no Nordeste do Brasil. Elas são famosas devido ao aroma exótico, sabor agridoce e polpa suculenta. No Nordeste brasileiro, as espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, anti-térmicas e resolutivas em infecções da pele (Caceres *et al.*, 1993). Os índios da Amazônia as utilizam no tratamento de doenças respiratórias e também como laxantes (Silva, 1991).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonóidicos (*B. verbascifolia*), no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente no gênero (Cantrell *et al*., 1996). Em estudos farmacológicos, foram verificadas atividades bactericidas, antifúngicas, espamogênicas e anti-protozoárias associadas aos triterpenóides (ácido betulínico e lupeol), flavonóides (hiperina), quercetina, sulfonoglicosídeo, esteróides aromáticos, aminoácidos e proantocianinas [1-6] (Felício *et al.*, 1995). Em investigação fitoquímica do extrato metanólico de folhas de *B.crassa* foram isoladas catequinas e glicosídeos flavonóidicos (Sannomiya *et al*., 2004 e 2005).

Há inúmeras propriedades atribuídas ao caule e às folhas de *B. crassa* incluindo ação antiemética, diurética e tratamento de úlcera, gastrite e diarréia (Silva *et al*., 2001). Berger *et al*. (1998) relatou também a atividade tripanomicida destas espécies. Heinrich (2003) também confirmou que a atividade antiespamódica desta planta é devido a sua fração rica em flavonóides. Outras espécies, como *B. verbascifolia* apresentaram atividade antiviral (Lopez *et al*., 2001). Investigações fitoquímicas de *B. crassifolia*, *B. microphylla* e *B. verbascifolia* revelaram a ocorrência de sulfonoglicolipídios, esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proantocianidinas (Gottlieb *et al*., 1975; Amarquaye *et al*., 1994; Geiss *et al*., 1995; Rastrelli *et al*., 1997; Mendes *et al*., 1999).

2.2. Estudo morfológico das espécies *Byrsonima*

As espécies pertencentes à família Malpighiaceae geralmente apresentam folhas simples, pecioladas ou sésseis, opostas, com duas ou mais glândulas visíveis a olho nu, que se localizam no pecíolo ou na superfície abaxial da lâmina foliar (Judd, 1999). Segundo Anderson (1990), as estruturas secretoras nos órgãos foliares são denominadas nectários extraflorais, tanto para espécies do hemisfério norte quanto para as do hemisfério sul.

Na família Malpighiaceae, o mesofilo pode ser dorsiventral ou isobilateral, podendo também apresentar células armazenadoras de água de localização variável.

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Os feixes vasculares das nervuras podem ou não apresentar tecido de sustentação (Attala, 2004). Nas folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae), nativa da região do Cerrado, o mesofilo apresenta simetria bilateral, com 1 a 2 camadas de parênquima paliçádico na face adaxial e 2 a 3 camadas de parênquima lacunoso na face abaxial (Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro, 2005).

Nas espécies do gênero *Byrsonima*, é comum a ocorrência de células com presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas (Metcalfe e Chalk, 1950; Giuletti, 1971) dispersos aleatoriamente na região mesofílica. Este tipo de disposição também se encontra na família Melastomaceae, ocorrendo também em regiões superficiais ou próximas aos feixes vasculares (Keating, 1984). No mesofilo ovariano, muitos cristais do tipo drusa são observados, onde também ocorrem diversos idioblastos, contendo compostos fenólicos. Camadas mais internas apresentam células muito delgadas, colapsadas na maioria das regiões, que se tornam nítidas quando apresentam cristais prismáticos. Na região mesocárpica externa do fruto observa-se cristais dispersos do tipo drusa (Souto e Oliveira, 2005).

A espécie *B. intermedia* apresenta tricomas característicos da família Malpighiaceae no receptáculo floral, sendo que estes permanecem associados ao fruto, entre o pericarpo e o cálice persistente característico da família. Também deve ser destacado que, no ovário, a cutícula se torna mais espessa à medida que se distancia da base desse órgão; tal variação é mantida no fruto até sua maturidade. Considerando-se que tricomas tectores e cutícula espessa estão relacionados à proteção contra a perda de água e a predação, pode-se constatar que *B. intermedia* apresenta maior investimento no espessamento da cutícula na região em que o ovário e, posteriormente, o pericarpo, ficam expostos ao ambiente, sem estarem recobertos e protegidos pelos tricomas receptaculares (Souto e Oliveira, 2005). Os tricomas, de formas variadas e complexas, constituem um importante auxílio na identificação dos gêneros e espécies (Metcalfe & Chalk 1950).

As folhas da espécie *Byrsonima* podem ser glabras ou pilosas, podendo os tricomas serem persistentes ou caducos, filamentosos ou em forma de T, estes últimos comumente denominados “pêlos malpiguiáceos”, por serem muito freqüentes nesta família botânica. Eles se caracterizam por serem unicelulares, apresentando

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

dois braços de tamanhos iguais ou desiguais mais ou menos horizontais e ligados a planta por uma haste curta ou longa (Metcalfe e Chalk, 1950).

Os estômatos são do tipo paracítico e estão normalmente presente na face abaxial das folhas, mas podem ocorrer em ambas as faces como em *Byrsonima subterranea* Brade e Mark (Giulietti, 1971), *Caucanthus edulis* Forsk e *Triaspsis spp* Burchell (Metcalfe e Chalk, 1950). A grande maioria das espécies de *Forsteronia* apresenta predominantemente estômatos paracíticos restritos à face inferior. Esses caracteres foram anteriormente registrados para as folhas de *Allamanda neriifolia* Hook. (hoje *A. schottii* Pohl), *Thevetia peruviana* (Pers.) K.Schum e *Vinca minor* L., consideradas xeromórficas por Fjell (1983).

Embora as glândulas sejam freqüentemente referidas nos trabalhos, para a maioria das espécies não há sequer o conhecimento a respeito da natureza do produto secretado ou mesmo, evidências da atividade secretora das glândulas presentes no cálice e folhas. Ainda hoje, são poucas as espécies da família Malpighiaceae que foram investigadas quanto à estrutura anatômica de seus orgãos e também quanto à ultra-estrutura das células. Escassos são também os estudos a respeito das glândulas foliares e calicinais das espécies americanas (Subramanian *et al.*, 1990; Laskowski e Bautista; 1999). Subramanian *et al*. (1990) estudaram as glândulas das folhas e dos cálices de *Galphimia sericea* e concluíram que as folhas em conseqüência da secreção ser rica em açúcares são consideradas como nectários extraflorais; no cálice, a secreção é lipídica.

Estudando as sementes de *J. guaranitica* (Malpighiaceae), Lorenzo (1981) descreveu um único tegumento que se diferencia, com a epiderme formada por células grandes com alto conteúdo de compostos fenólicos. Em *B. intermedia* também existe uma camada de células com compostos fenólicos mas, diferentemente do que ocorre em *J. guaranitica*, os dois tegumentos se diferenciam. Corner (1976) registrou as sementes bitegumentadas como características das Malpighiaceae.

Nos frutos e sementes, observa-se uma grande concentração de idioblastos contendo compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são considerados um tipo de defesa química contra a herbivoria (Swain, 1979). Essa grande concentração é importante, principalmente no Cerrado, ambiente onde esta planta é freqüente e que

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

sofre predação dos frutos e sementes por herbívoros. Os compostos fenólicos são abundantes nas folhas de *G. arborescens*; entre eles, a maior distribuição é de lignina e flavonóides. Zuanazzi (2001) classificou os flavonóides como pigmentos polifenólicos diversificados, os quais podem exercer diversas funções no vegetal. Para Harborne (1966), a classe dos flavonóis parece estar mais presente em espécies arbóreas, enquanto as flavonas e flavanonas aparecem mais em espécies herbáceas; em Amaranthaceae já foram encontradas isoflavonas, normalmente incolores. Zuanazzi (2001) relacionou as flavanonas com o sabor amargo e as flavonas e flavonóis com a co-pigmentação em flores e proteção anti-UV nas folhas.

A presença de lactonas sesquiterpênicas nas estruturas secretoras é mencionada pela *Artemisia nova* (Kelsey e Shafizadeh, 1980) e *A. umbelliformis* (Cappelletti *et al*., 1986). Estes compostos também são encontrados em partes aéreas de algumas espécies de *Stevia* (Zdero *et al.,* 1991; Hernández *et al*., 1997) e apresentam uma relativa importância na proteção vegetal.

Como a demanda e a comercialização de plantas medicinais se intensificaram, é necessário por muito empenho ampliar o conhecimento botânico da flora do Cerrado que é consumida *in natura* como medicinal, visando esclarecimento da real potencialidade econômica de plantas não cultivadas, especialmente as coletadas integralmente como *G. arborescens.* A determinação da real potencialidade fitoterápica da espécie e da eventual toxicidade devem ser efetuadas por meio de investigações fitoquímicas e farmacológicas específicas. Os testes histoquímicos realizados nas folhas podem nortear esses estudos (Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro, 2005).

2.3. *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias são bacilos finos, diferentes das demais bactérias em uma série de propriedades, muitas das quais estão diretamente relacionadas com a quantidade e tipos de lipídios complexos que estes organismos contêm na parede. Calcula-se que 60% do peso da parede do *M. tuberculosis* seja devidos a ácidos

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

graxos e ceras (ésteres de ácidos graxos). As micobactérias são mais resistentes do que outras bactérias ao hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e a certos anti-sépticos (Trabulsi *et al*., 1999). Os lipídios podem também explicar a maior resistência das micobactérias a muitos antibióticos (Trabulsi *et al*., 1999). Devido ao caráter crônico da doença, os pacientes com tuberculose necessitam de terapias específicas com 3 drogas (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida) e de longa duração (6 meses) (Collins e Franzblau, 1997). Estes fatores associados com a AIDS prejudicam a adesão do paciente ao esquema terapêutico. A necessidade de desenvolvimento de drogas mais efetivas para reduzir o tempo de terapia combinada e tratamento de infecções emergentes resistentes a drogas têm sido bem reconhecidas, mas negligenciadas há décadas (Protopopova *et al.*, 2005).

2.4. Pesquisa de novas alternativas terapêuticas para tuberculose

Os pesquisadores, na busca de novas drogas, têm encontrado nas plantas, princípios ativos com atividade antibacteriana (Cowan, 1999). Atualmente, produtos naturais são responsáveis diretamente ou indiretamente por cerca de 40% dos fármacos disponíveis no mercado, sendo 70% antibióticos e antitumorais (Yunes e Calixto, 2001). A pesquisa de novas substâncias menos tóxicas e mais ativas para o tratamento da tuberculose tem motivado os pesquisadores a buscar soluções para o tratamento desta doença, que desde a antiguidade vem dizimando populações. A abundante quantidade de fitoterápicos expressa o intenso estudo de substâncias oriundas de plantas (Andrade *et al*., 1994; Belickas, 1994; Cunha *et al*., 1994).

O estudo de plantas pode envolver pesquisas diferentes como identificação botânica, determinação da composição e estruturas químicas envolvidas e da ação farmacológica. Esses estudos são condicionados aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade dos princípios ativos vegetais (Miguel e Miguel, 2000).

As plantas através de várias vias metabólicas secundárias produzem alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e óleos, que, por vezes, são específicos a determinadas famílias,

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

gêneros ou espécies. Estes conjuntos químicos podem estar presentes nas distintas partes das plantas. Dessa maneira, é interessante o estudo da totalidade da planta, além de verificar em quais regiões se encontram as maiores concentrações do constituinte a ser estudado (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

Várias espécies de plantas têm sido pesquisadas e algumas classes de compostos como os terpenóides (Cantrell *et al*., 2001) e fisalinas (Pietro *et al*., 2000; Januário *et al*., 2002) já foram detectadas como sendo os responsáveis pela atividade biológica contra micobactérias. Análises fitoquímicas relatam que os triterpenóides e esteróides possuem potencial atividade antimicobacteriana (Okunade *et al*., 2004). As plantas do gênero *Byrsonima* possuem uma quantidade razoável de compostos derivados de flavonóides, dentre eles os triterpenos (Teixeira e Machado, 2000). Assim, os estudos evidenciam a importância dos extratos vegetais e seus componentes na síntese de novos produtos farmacêuticos que possam ser eficientes no combate às infecções (Calixto *et al*., 2001).

Neste sentido, dentro do projeto temático “Uso sustentável de biodiversidade brasileira: Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores” foi incluída a avaliação da atividade dos extratos contra a *M. tuberculosis*. Dentro deste projeto, com o auxílio da bolsa de iniciação científica foram avaliados extratos de diferentes plantas do Cerrado, verificando que os extratos clorofórmicos de *B. basiloba, B. crassa, B. fagifolia e B. intermedia* apresentaram resultados promissores com CIM de 125$\mu g \cdot mL^{-1}$; 62,5$\mu g \cdot mL^{-1}$; 62,5$\mu g \cdot mL^{-1}$ e 250$\mu g \cdot mL^{-1}$ respectivamente (Higuchi *et al*., 2004).

Visto que os extratos clorofórmicos apresentaram CIM menores do que os extratos obtidos com outros solventes extratores, realizou-se a continuidade do trabalho para a obtenção de frações e compostos purificados dos extratos clorofórmicos. O objetivo do fracionamento dirigido foi de encontrar valores de CIM cada vez menores pela obtenção de derivados mais puros e mais ativos.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

2.5. Método de determinação do perfil de sensibilidade utilizando Alamar Blue®

A pesquisa da atividade antimicobacteriana de extratos vegetais é realizada preferencialmente pela técnica de microdiluição em placa denominada de Microplate Alamar Blue Assay (MABA). Nesta técnica é determinada a CIM capaz de inibir o crescimento de 90% das células de micobactérias, empregando o corante Alamar Blue® como revelador da sensibilidade bacteriana frente aos componentes analisados (Collins e Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998). Esta técnica tem sido empregada por diversos autores para a determinação da atividade antimicobacteriana de vários princípios ativos naturais (Pietro *et al.*, 2000; Januário *et al.*, 2002; Leal *et al*., 2003) e de novas drogas sintéticas (de Souza *et al.*, 2001a, 2001b, 2002; Stephens *et al.*, 2001; Rando *et al.*, 2002; Ulusoy, 2002).

O Alamar Blue® (Resazurina) é um composto capaz de indicar, por uma reação de óxido-redução, a presença de crescimento microbiano, ocorrendo a passagem de coloração azul não-fluorescente (resazurina) para rosa altamente fluorescente (resorufina). Acredita-se que princípio da técnica baseia-se na redução da atividade enzimática mitocondrial, provavelmente em meio intracelular, na superfície externa da membrana plasmática ou apenas no meio como reação química. A utilização do MABA, frente a outras técnicas, tem como benefícios a rapidez nos resultados, custo baixo e alta sensibilidade. Por ser uma técnica colorimétrica de fácil manejo, apresenta reprodutibilidade e emprega uma quantidade reduzida de extratos vegetais, além de possibilitar o teste de vários compostos concomitantemente (Collins e Franzblau, 1997; Franzblau *et al*., 1998; Januario *et al*., 2002).

2.6. Avaliação de citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade é um procedimento importante na pesquisa de substâncias menos tóxicas e seletivas com atividade antimicobacteriana, sendo

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

fundamental que as elas atuem sobre o *M. tuberculosis*, porém seja inócua ao hospedeiro. Dessa maneira, a determinação do IC de substâncias pode ser realizada *in vitro* sobre células eucarióticas (Sato, 2003). O IC_{90} é um índice que determina 90% de viabilidade celular e é definido como o ponto no qual ocorre a mudança de coloração do reagente Alamar Blue®, da azul para a rosa. O IC_{50} é definido como a concentração onde ocorre 50% de morte celular e é calculado a partir do IC_{90} (Pietro, 2000).

Desde 1993, tem-se utilizado o corante Alamar Blue® (Fields *et al*., 1993) para a determinação da viabilidade celular. Este corante não é citotóxico, pois não é necessária a morte celular para se obter resultados dos ensaios, ao contrário do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). O método é simples, rápido, eficiente, confiável, sensível e seguro. O corante não deve interferir com o composto a ser testado. (Cantrell *et al*., 1996; Arechabala *et al*., 1999).

A partir dos valores obtidos de IC_{50} e CIM_{90} é calculado o Índice de Seletividade (IS) através da razão da primeira pela segunda com o objetivo de se estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio *in vitro* e a passagem segura para ensaio *in vivo* de compostos sintéticos ou naturais (Protopopova *et al*, 2005).

Esta estimativa favorece também a determinação e o acompanhamento da atividade do processo de fracionamento de bioensaios dos princípios ativos (Orme, 2001; Falzari *et al*., 2005).

2.7. Determinação da toxicidade aguda

A toxicidade aguda determina os efeitos que se produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma única dose ou várias doses de uma substância. Esta toxicidade ocorre num período de 14 dias, observando-se o comportamento do animal em 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e a cada 24h até o fim do período estabelecido, sendo incluída também a morte do animal.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Esse estudo é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultante de uma exposição de curta duração pela via escolhida, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação tóxico (Brito, 1994).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

3. OBJETIVOS

- Descrever a anatomia da região mediana das folhas das espécies *B. basiloba* A.Juss.*, B. crassa* Niedenzu (IK)*, B. fagifolia* Nied. e *B. intermedia* Juss.;
- Estudar a histoquímica das espécies citadas, por meio de técnicas convencionais para a identificação de princípios ativos vegetais;
- Avaliar a atividade antimicobacteriana das frações e compostos de *Byrsonima spp* utilizando-se a técnica de microdiluição em placas com Alamar Blue®;
- Avaliar o IC dos extratos, frações e compostos isolados das espécies de *Byrsonima* citadas que apresentaram resultados promissores de CIM;
- Verificar o IS dos extratos, frações e compostos isolados das espécies de *Byrsonima*;
- Determinar a concentração da toxicidade aguda de uma formulação experimental (ECM) desenvolvida para um extrato clorofórmico das espécies de *Byrsonima* estudadas.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material botânico

As folhas de *B. crassa* e *B. fagifolia* foram colhidas de plantas localizadas na Estrada do Brejinho do Nazaré, no município de Porto Nacional (10º42'29''S e 48º25'02''O), Estado do Tocantins; sendo identificadas pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos, e as exsicatas depositadas no Herbário da UNITINS (Universidade de Tocantins) recebendo os seguintes tombos 3377 e 6398, respectivamente (Figura 1, do anexo).

As folhas de *B. basiloba* e *B. intermedia* foram colhidas de plantas da região do município de Pratânia (22º48'28''S e 48º39'57''O),, Estado de São Paulo, pelo então doutorando Luís Fernando Rolim de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu, SP) e identificadas pelo Sr. José Clemente de Campos (IB-Botucatu); as respectivas exsicatas se encontram depositadas no Herbário Irina Delanova De Gemtchujnicov, em Botucatu, recebendo os seguintes tombos 24163 e 24164 (Figura 1, do anexo).

Os estudos anatômicos e histoquímicos deste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Botânica, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento.

4.2. Estudo anatômico

Para a análise anatômica de *Byrsonima spp*, o limbo foi dividido em três regiões: terço superior, mediano e inferior. Os terços superior e inferior foram desprezados para esta análise. O terço mediano do limbo foliar foi sub-amostrado em aproximadamente 9mm^2 da área próxima à nervura central, tendo-se o cuidado de amostrar também a fração adjacente à nervura.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Em seguida, o material foi fixado em FAA 50 por 24 horas e após este período, procedeu-se a transferência para uma solução de álcool etílico 70% procedendo-se, no mínimo, 3 lavagens consecutivas (Jensen, 1962). O material foi estocado em etanol 70%. Após uma desidratação em série etílica (Johansen, 1940), o material foi submetido à pré-infiltração e à infiltração em resina sintética glicol metacrilato, segundo Kraus e Arduin (1997), sendo observadas as recomendações do fabricante da resina – Leica®.

Os blocos contendo o material incluído foram cortados em micrótomo para obtenção de secções com 7μm de espessura. Após a secagem e aderência em lâminas de vidro, as secções foram coradas com azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 (Kraus e Arduin, 1997). Após a coloração, as secções foram montadas em resina sintética Permount®. Procedeu-se o estudo anatômico com o auxílio de microscópio com captura de imagens e do programa DC Viewer utilizado para o registro digital das mesmas.

O microscópio e o programa foram concedidos pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas, coordenado pelo Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

Para a caracterização da pubescência foliar, a análise dos pêlos foi feita mediante observação das faces adaxial e abaxial. Os mesmos foram retirados por raspagem das superfícies foliares com estilete, corados com azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 e montados em lâminas de vidro contendo solução de glicerina e tampão fosfato pH 6,8 (1:1) (Kraus e Arduin, 1997).

Para análise dos estômatos, realizou-se a técnica de dissociação com HNO_3, reagindo por 72h em estufa a 65ºC. Posteriormente, procedeu-se 3 lavagens sucessivas em água destilada, neutralização com NaOH 1% e novamente lavagem em água. Clarificou-se em hipoclorito de sódio 2% em 5 minutos, 3 e 2 lavagens em água acética (1:500) e tampão fosfato pH 6,8 durante 5 minutos, respectivamente. Corou-se com azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8. Fez-se a lavagem em tampão fosfato e montou-se em lâminas de vidro contendo glicerina e do mesmo tampão (1:1). (Ghouse e Yunus, 1972; Ruzin, 1999).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.3. Estudo histoquímico

Em relação ao estudo histoquímico, cortes transversais à mão livre foram realizados em folhas frescas, examinados e fotografados com auxílio do microscópio e do programa DC Viewer.

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações propostas por Ascensão (2003), tanto para identificação de substâncias apolares como para as polares. Os reagentes empregados para evidenciar as substâncias apolares foram: Sudan III (Johansen, 1940) para lipídios totais; sulfato azul do Nilo (Cain, 1947) para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; tetróxido de ósmio (Ganter e Jollés, 1969 e 1970) para a identificação de lipídios insaturados; reagente de NADI (David e Carde, 1964) para identificação de óleos essenciais e oleoresinas; tricloreto de antimônio (Hardman e Sofowora, 1972; Mace *et al*., 1974) para identificação de esteróides; ácido sulfúrico (Geissman e Griffin, 1971) incluindo-se glicerina a 50% para identificação de lactonas sesquiterpênicas, e 2,4–dinitrofenilhidrazina (Ganter e Jollés, 1969-1970) para identificação de terpenóides com grupo carbonila. Para substâncias polares foram empregados: cloreto férrico (Johansen, 1940) e dicromato de potássio (Gabe, 1968) para a identificação de compostos fenólicos totais; vanilina clorídrica (Mace e Howell, 1974) para a identificação de taninos, reagente de Dragendorff (Svendsen e Verpoorte, 1983) para identificação de alcalóides; PAS (McManus, 1948) para identificação de polissacarídeos totais; lugol (Jensen, 1962) para a identificação de amido; vermelho de rutênio (Johansen, 1940) para identificar pectinas e azul brilhante de Comassie (Fischer, 1968) para identificar proteínas totais.

Neste trabalho foi modificado o procedimento para detecção das lactonas sesquiterpênicas, adicionando a glicerina a 50%, pois a solução concentrada de ácido sulfúrico proposta pelos autores Geissman e Griffin (1971) não permitia a visualização do material de estudo em longo período de tempo, pois as estruturas celulares da folha se desintegravam rapidamente.

Como controle para identificação de substâncias apolares, as secções foram tratadas por 5 minutos em cada passagem da série etanólica 25%, 50%, 75% e

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

100% e cetônica (50% em etanol e 100%), seguida de reidratação gradual (Lewinsohn *et al*., 1998).

Como controle para identificação de substâncias polares, as secções foram tratadas com banho em solução comercial de hipoclorito de sódio (máximo 2%) por 15 minutos, seguido de 3 banhos consecutivos em solução água destilada:ácido acético (1:500).

De acordo com Kraus e Arduin (1997), os testes usados nos estudos anatômicos para o reconhecimento de metabólitos celulares, em geral, reagem a mais de uma substância, gerando a necessidade de testes complementares, com controle, para garantir correta interpretação. Em razão dessa recomendação, foram realizadas de uma a três repetições para cada substância, sendo considerados passíveis de testes complementares aqueles compostos determinados por apenas uma reação de coloração.

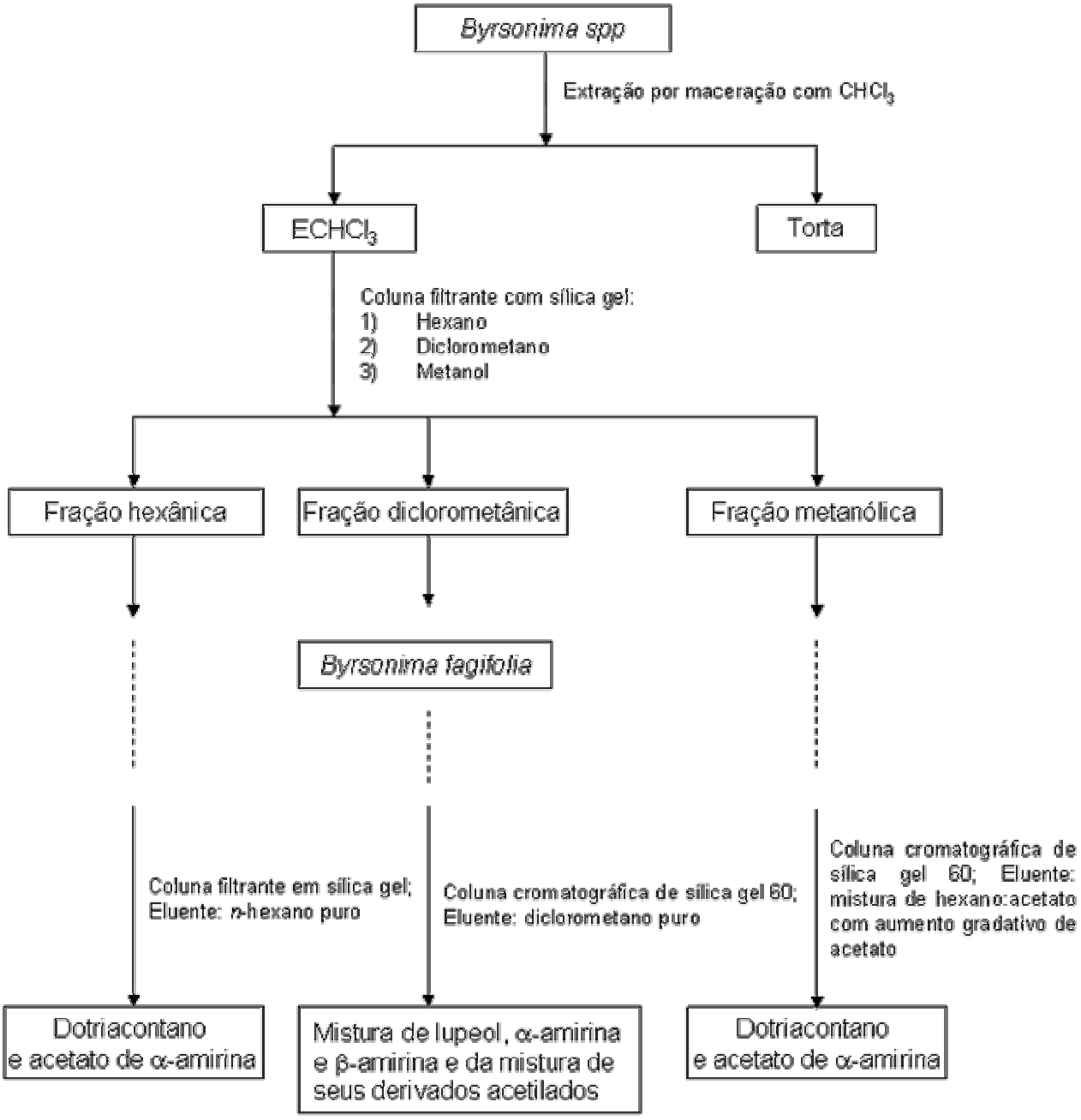
4.4. Avaliação da atividade antimicobacteriana

Os extratos, as frações e os compostos isolados das folhas das espécies *Byrsonima* foram preparados neste trabalho seguindo-se a sequência ilustrada no fluxograma 1, analisados neste trabalho, são oriundos do projeto temático “Uso sustentável de biodiversidade brasileira: Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores”, processo FAPESP 02/05503-6. Os mesmos foram obtidos no laboratório de Química Orgânica, coordenado por Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara.

As frações e compostos isolados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana sobre o *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC27294, pelo MABA, usando-se a isoniazida como droga de referência.

Todos os procedimentos de avaliação de atividade antimicobacteriana foram realizados no Laboratório de Micobactérias Prof. Dr. Hugo David, coordenado pelo Prof[a]. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, Departamento Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image



Fluxograma 1: fluxograma esquemática da obtenção de extratos, frações e isolamento de compostos das espécies *Byrsonima*.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.4.1. Preparo das frações e compostos isolados

As frações sólidas do extrato clorofórmico das respectivas espécies de *Byrsonima* da região da folha foram solubilizadas em DMSO a 10% (solução estoque 4000$\mu g \cdot mL^{-1}$) e os compostos isolados de *B. fagifolia* solubilizados em solução a 10% de Tween 80 (solução estoque 1000$\mu g \cdot mL^{-1}$). Para a completa solubilização submeteu-se a amostra no ultra-som por 10 minutos. Todas as frações e compostos foram armazenados em frascos âmbar e guardados sob refrigeração a 4ºC até o momento do uso. A isoniazida foi diluída em água destilada (solução estoque 10000$\mu g \cdot mL^{-1}$).

As soluções estoques foram diluídas no meio 7H9 para se obter concentrações iniciais de frações (1000$\mu g \cdot mL^{-1}$) e compostos (250$\mu g \cdot mL^{-1}$). A concentração final nunca excedeu a 2,5% de DMSO (Sato, 1998; Arantes, 2005).

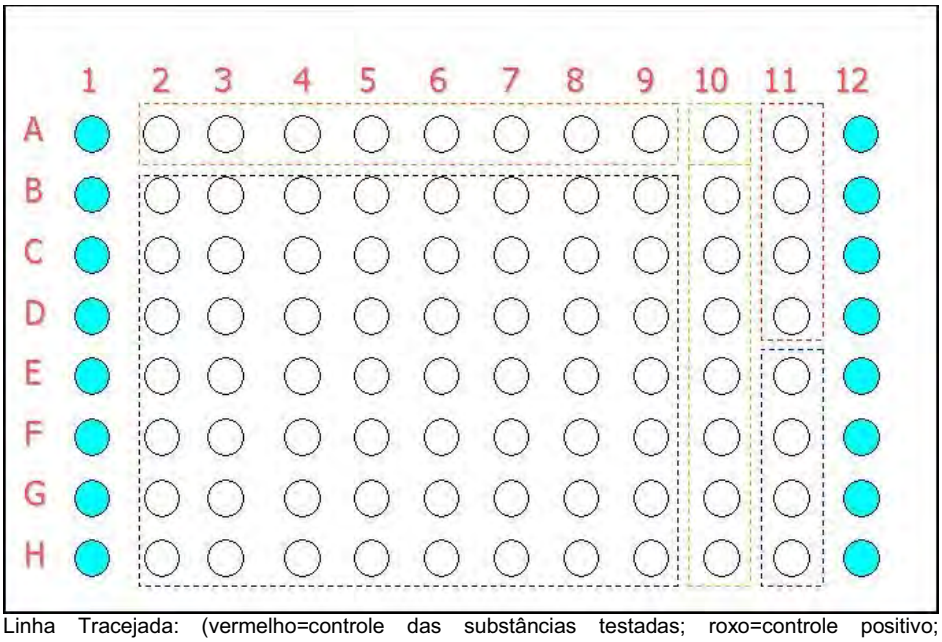
4.4.2. Preparo das suspensões bacilares

A cultura de *M. tuberculosis* $H37R_V$ ATCC27294 foi mantida no meio sólido de LJ em incubação a 37ºC por pelo menos 15 dias até se obter quantidade suficiente para uma alçada que correspondesse a 5,0mg de peso seco bacteriano. Posteriormente procedeu a retirada desta quantidade e transferiu para o meio líquido contendo 40mL do meio 7H9 com 5mL de OADC, incubando-se por 10 dias (no mínimo) na mesma temperatura até obtenção de uma suspensão bacteriana comparada à escala nº. 1 de MacFarland (10^5 UFC/mL). A solução bacteriana foi transferida para tubos de 10mL e centrifugada a 3000rpm durante 30 minutos. O sedimento formado foi ressuspendido e lavado duas vezes com PBS pH 7,0 com solução esterilizada de Tween 80 (Sato, 1998; Arantes, 2005).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.4.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro*

Para se determinar a atividade antimicobacteriana foram utilizadas placas estéreis com 96 orifícios por meio da técnica de microdiluição com corante revelador Alamar Blue. Na Figura 1 está representada esquematicamente a preparação desta técnica (Sato, 1998; Arantes, 2005).



Linha Tracejada: (vermelho=controle das substâncias testadas; roxo=controle positivo; azul=controle negativo; verde=controle da droga de referência; preto=diluição seriada das substâncias testadas); Orifício preenchido: (azul claro=água destilada).

Figura 1: Representação esquemática da preparação das frações e compostos isolados utilizando-se a técnica de microdiluição em placas contendo Alamar Blue.

Nas colunas de 1 e 12 nas linhas de A a H foram acrescentadas 200µL de água destilada estéril, para se evitar uma provável perda de água das substâncias testadas.

Os orifícios das linhas de A a D da coluna 11 receberam 100µL de meio 7H9, de E a H da mesma coluna receberam 200µL do mesmo meio de cultura. Da linha A

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

das colunas de 2 a 10 receberam 150µL (controle das substâncias testadas) e das linhas B a H das colunas 2 a 10 receberam 100µL.

Os orifícios da linha A das colunas 2 a 10 receberam 50µL da diluição das soluções estoques das frações e compostos. Os orifícios da linha B das colunas de 2 a 9 receberam 100µL das substâncias testadas e na coluna 10, a droga de referência. Após a homogeneização da linha B, procedeu-se a diluição em série das linhas B a H das colunas de 2 a 10, e por fim desprezou-se 100µL da última linha. As concentrações das frações variaram de 1000 a 1,25$\mu g \cdot mL^{-1}$. As concentrações dos compostos isolados variaram de 250 a 0,4$\mu g \cdot mL^{-1}$ e as da isoniazida de 1,0 a 0,015$\mu g \cdot mL^{-1}$.

Por fim, adicionou-se 100µL de suspensão bacteriana, obtida na escala nº. 1 de MacFarland diluída 1:25 no meio 7H9, nos orifícios de colunas de 2 a 10 das linhas de B a H e nos orifícios das linhas A a D da coluna 11.

As placas foram seladas com filme de polietileno e incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC. No quinto dia de incubação, os orifícios A11 e E11 receberam 25µL da solução reveladora de Alamar Blue® e solução de Tween 80 a 10% na proporção 1:1 (v/v).

A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rósea, como de multiplicação bacteriana. As placas que apresentaram orifícios violetas, foram reincubadas por mais 24 horas, e se a cor mudasse para róseo, foi considerado positivo para crescimento bacteriano. Caso persistisse a cor inicial, o resultado foi considerado negativo. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor azul para rósea.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.5. Determinação da citotoxicidade

4.5.1. Crescimento e manutenção dos macrófagos J774

Macrófagos murinos J774 foram empregados para se determinar a citotoxicidade de extratos e frações das 4 espécies de *Byrsonima* e dos compostos isolados de *B. fagifolia*. Os macrófagos foram mantidos em freezer a -80ºC até o início do experimento. No momento do uso, foi imediatamente descongelada em banho-maria a 37ºC e vertida num frasco de 50mL contendo 10mL de RPMI 1640. Procederam-se duas centrifugações na velocidade de 1500rpm por 5 minutos. Após a lavagem, desprezou-se o sobrenadante e na ressuspensão adicionaram-se aos macrófagos 10mL de RPMI 1640 enriquecido com soro bovino fetal 10 %, 10μL de estreptomicina/ampicilina (solução estoque 10000μg·mL^{-1}) e 10μL de anfotericina B (solução estoque 5,6μg·mL^{-1}) em uma garrafa de cultura com superfície de 12,5cm^2. Incubou-se numa estufa de CO_2 a 5%, a 37ºC por 7 dias, realizando a troca do RPMI 1640 enriquecido em dias alternados, verificando a ausência ou presença de contaminação. Completado o sétimo dia, foi desprezado o RPMI enriquecido da garrafa de cultura. Por meio de raspagem, adicionou-se 5mL de RPMI 1640 para retirar o tapete celular formado. O conteúdo foi transferido da garrafa para um frasco e centrifugado a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo compactado foi ressuspenso em um volume aproximado de 2mL de RPMI 1640. Diluiu-se na proporção de 1:10 e adicionou uma gota de corante Turk, para realizar a contagem do número de células (Pietro, 2000; Sato, 2003).

4.5.2. Determinação da concentração celular

As células foram contadas na câmara de Neubauer e posteriormente foram diluídas em RPMI 1640 enriquecido para se obter concentração final de 1x10^5

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

células·mL^{-1}. Na microplaca 1 foi adicionada, em todos os orifícios, 200μL da suspensão celular obtida e incubou-se na estufa nas mesmas condições de temperatura e concentração de CO_2 por, pelo menos, 48 horas. Observou-se a formação do tapete celular para dar continuidade ao experimento (Pietro, 2000; Sato, 2003).

4.5.3. Ensaio de citotoxicidade propriamente dito

Placas estéreis com 96 orifícios foram utilizadas para se realizar o ensaio de citotoxicidade. O ensaio foi determinado a partir de macrófagos J774 de acordo com Sato (2003) e utilizou-se o Alamar Blue® como agente revelador preconizado por O'Brien *et al.* (2000).

Os extratos clorofórmicos e frações das 4 espécies de *Byrsonima* foram solubilizados em DMSO a 10% (solução estoque 4000μg·mL^{-1}) e os compostos isolados de *B. fagifolia* solubilizados em Tween 80 a 10% (solução estoque 1000μg·mL^{-1}). Todos os materiais foram armazenados em frascos âmbar e guardados sob refrigeração a 4ºC até o momento do uso. As soluções estoques foram diluídas em RPMI 1640 para se obter concentrações iniciais de extratos (1000μg·mL^{-1}), frações (1000μg·mL^{-1}) e compostos (1000μg·mL^{-1}). A concentração final nunca excedeu a 2,5% de DMSO. RMPI 1640 foi utilizada como controle.

Na microplaca 2 foram adicionados100μL de RPMI 1640 em todos os orifícios. Na linha A foi adicionada 100μL das substâncias a serem avaliadas e diluídas em série das linhas A e H e nas últimas linhas foram desprezadas 100μL. As concentrações dos extratos, frações e compostos isolados variaram de 1000 a 15,62μg·mL^{-1}; 1000 a 1,95μg·mL^{-1} e 1000 a 7,81μg·mL^{-1}, respectivamente. Todo o volume da microplaca 2 foi transferido para a microplaca 1. Nesta microplaca retirou-se anteriormente 100μL de todos os orifícios, depois que, pelo menos, o tapete celular fosse formado. Após a transferência, incubou-se por 24h nas mesmas condições de temperatura e concentração de CO_2, e adicionaram-se, em todos os orifícios, 15μL da solução reveladora Alamar Blue® e água destilada na proporção

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

1:1 (v/v), procedendo à leitura após 6h de incubação. Estes experimentos foram realizados em triplicatas e em dias diferentes. O IC_{50} foi determinado por cálculos matemáticos utilizando a proporção de morte celular de IC_{90} (90% de morte celular) para o IC_{50} (50% de morte celular) (Pietro, 2000; Sato, 2003).

4.5.4. Determinação do índice de seletividade

De acordo com Protopopova (2005), o índice de seletividade é calculado a partir da razão dos valores de IC_{50} sobre CIM para estudos de compostos sintéticos. No entanto, neste trabalho foi avaliado a CIM de extratos, frações e compostos e por este motivo foi estabelecido o IS a partir do cálculo da razão logarítmica dos respectivos valores de acordo com Case *et al.* (2006), alterando de CIM_{50} para CIM, pois apresenta resultados mais rigorosos e substâncias mais seletivas. A fórmula utilizada foi a seguinte:

$$IS = \log \frac{IC_{50}}{CIM}$$

Foi considerado que, quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais promissor contra o bacilo da tuberculose, apresentando menor efeito citotóxico. Por outro lado, quando apresentam valores com IS negativos possuem maior citotoxicidade e baixa prioridade para atividade antimicobacteriana.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

4.6. Avaliação de toxicidade

4.6.1. Seleção dos animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), sendo cada grupo formado por 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) com 60 dias de idade, pesando entre 20 e 25g para o ensaio de toxicidade aguda, os quais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista. Cada animal foi pesado, observando o detalhe de não ultrapassar 20% em relação ao peso médio. As fêmeas eram nulíparas e não-grávidas.

Os animais sofreram adaptação experimental por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. Os animais, com livre acesso à alimentação e à água, foram mantidos em temperatura controlada (20ºC±1ºC), umidade monitorada e fotoperíodo de 12h claro/escuro. No dia do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 3h e receberam água *ad libitum* (Brito, 1994).

4.6.2. Extrato microemulsionado

Os extratos clorofórmicos das folhas das espécies de *B. basiloba, B. crassa, B. intermedia e B. fagifolia*, por apresentarem uma baixa solubilidade e alta viscosidade a partir da concentração inicial de 2000mg·kg^{-1}, foram conduzidos para um tratamento farmacotécnico sugerido pelo Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara.

Tal tratamento constou da elaboração de uma formulação composta por laurilsulfato de sódio, etanol absoluto e água destilada, nas proporções de 180mg; 180μL e 620μL, respectivamente, para cada 200mg de extrato clorofórmico. A partir

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

da formulação anterior, foram preparadas concentrações de 1000mg·kg^{-1}, 500mg·kg^{-1} e 250mg·kg^{-1}.

Apesar da formulação proposta ter melhorado a solubilidade e a viscosidade dos extratos das 4 espécies vegetais em estudo, apenas a *B. fagifolia* mostrou-se viável para a administração oral, pois permitiu a passagem da formulação na agulha de gavagem. As demais não foram testadas.

4.6.3. Avaliação da toxicidade aguda

A formulação foi administrada em uma única vez, por via oral, nas doses de 250mg/kg, 500mg/kg, 1000 mg/kg e 2000mg/kg da solução do ECM nos camundongos. Nos animais controle foi administrada a formulação microemulsionada. Como preconizada por Brito (1994), se na dose de 2000mg/kg de massa corpórea animal não houver mortalidade, em seis machos e seis fêmeas, esta solução será considerada pouco tóxica.

Os animais foram monitorados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e, depois, a cada 24 horas por 14 dias, para observação de alterações em pêlos, pele e mucosas, sistema respiratório e comportamento. Atenção especial foi dada em relação aos sintomas, tais como: tremores, convulsões, salivação, diarréia, letargia e coma (Brito, 1994).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara através do parecer nº. 26/2005 (Anexo).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

5. RESULTADOS

5.1. Descrição microscópica

Em corte transversal feito no terço mediano do limbo foliar, as folhas das 4 espécies de *Byrsonima* são revestidas por cutículas espessas nas duas faces (Figuras 2C, 3B, 4C e 5D). A epiderme é uniestratificada, sendo as células da face adaxial maiores que a abaxial variando de quadradas a retangulares (Figuras 2C, 3B, 4C e 5D). O mesofilo é dorsiventral, formado por 1-3 camadas de células no parênquima paliçádico, sendo uma camada em *B. basiloba* e *B. crassa* (Figura 4C e Figura 2C, respectivamente), duas, na *B. fagifolia* (Figura 3B) e três, na *B. intermedia* (Figura 5D). Em *B. crassa* foi verificada a presença de uma hipoderme bem evidenciada pelo corante azul de Toluidina. Esta hipoderme, na estrutura foliar, aparece interrompida pela extensão da bainha dos feixes vasculares (Figuras 2C, 2E e 2F). O parênquima paliçádico ocupa aproximadamente 50% da espessura do mesofilo. O parênquima lacunoso apresenta grandes espaços intercelulares na *B. intermedia* (Figura 5D) enquanto que nas outras espécies apresentam arranjos compactos com poucos espaços intercelulares (Figuras 2C, 3B e 4C). Observa-se que, em algumas dessas células, frequentemente se encontram aglomerados de cristais de oxalato de cálcio, tanto na *B. intermedia* (Figura 5D) quanto em *B. basiloba* (Figuras 4D). Em todas as espécies estudadas, o mesofilo é permeado por feixes vasculares colaterais, os quais são circundados por uma bainha parenquimática (Figuras 2D, 3A, 3D, 4A e 5A). Exceto em *B. basiloba*, essa bainha do feixe atinge a epiderme de ambas as superfícies da folha, constituindo a extensão da bainha (Figuras 2C, 2F, 3B, 3C, 4A, 4B, 5A e 5E).

A nervura principal, no terço mediano do limbo foliar, é aproximadamente bi-convexa nas espécies *B. basiloba, B. intermedia* e *B. fagifolia* (Figuras 3A, 3D, 5A, 5E, 2A e 4D). Na *B. crassa*, a região abaxial é irregularmente plana em sua porção central e côncava nas laterais (Figura 2D). A cutícula mantém-se delgada e o tamanho das células da epiderme adaxial é maior que na abaxial. O sistema

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

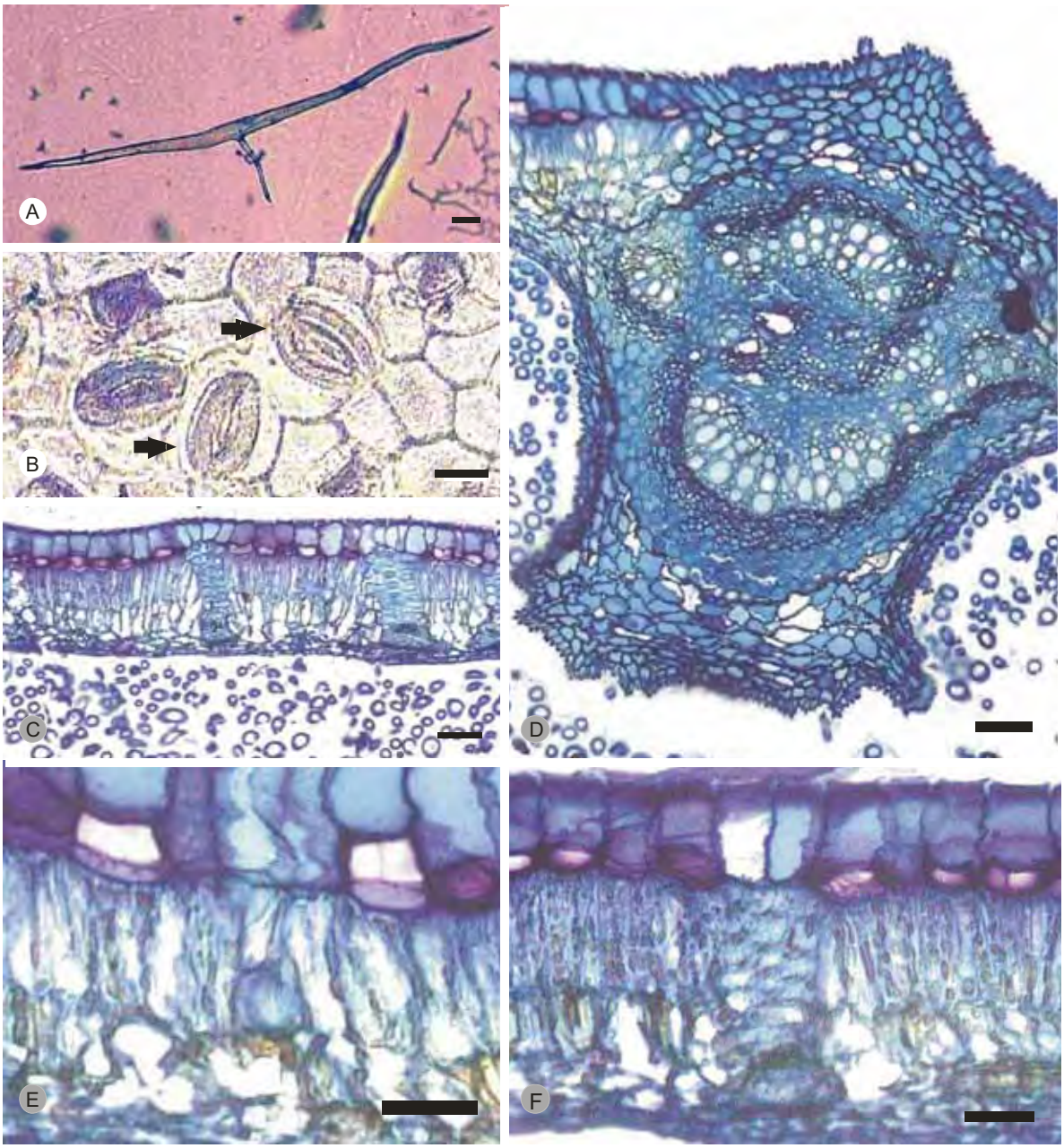


Figura 2: **Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima crassa***. A: detalhe do pêlo tector unicelular em forma de T; B: aparelho estomático do tipo paracítico (seta); C: mesofilo; D: nervura central; E: parênquima paliçádico; F: parênquima lacunoso. A: barra=40 µm; B: barra=20 µm; C: barra=110 µm; D, E e F: barra=80 µm.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

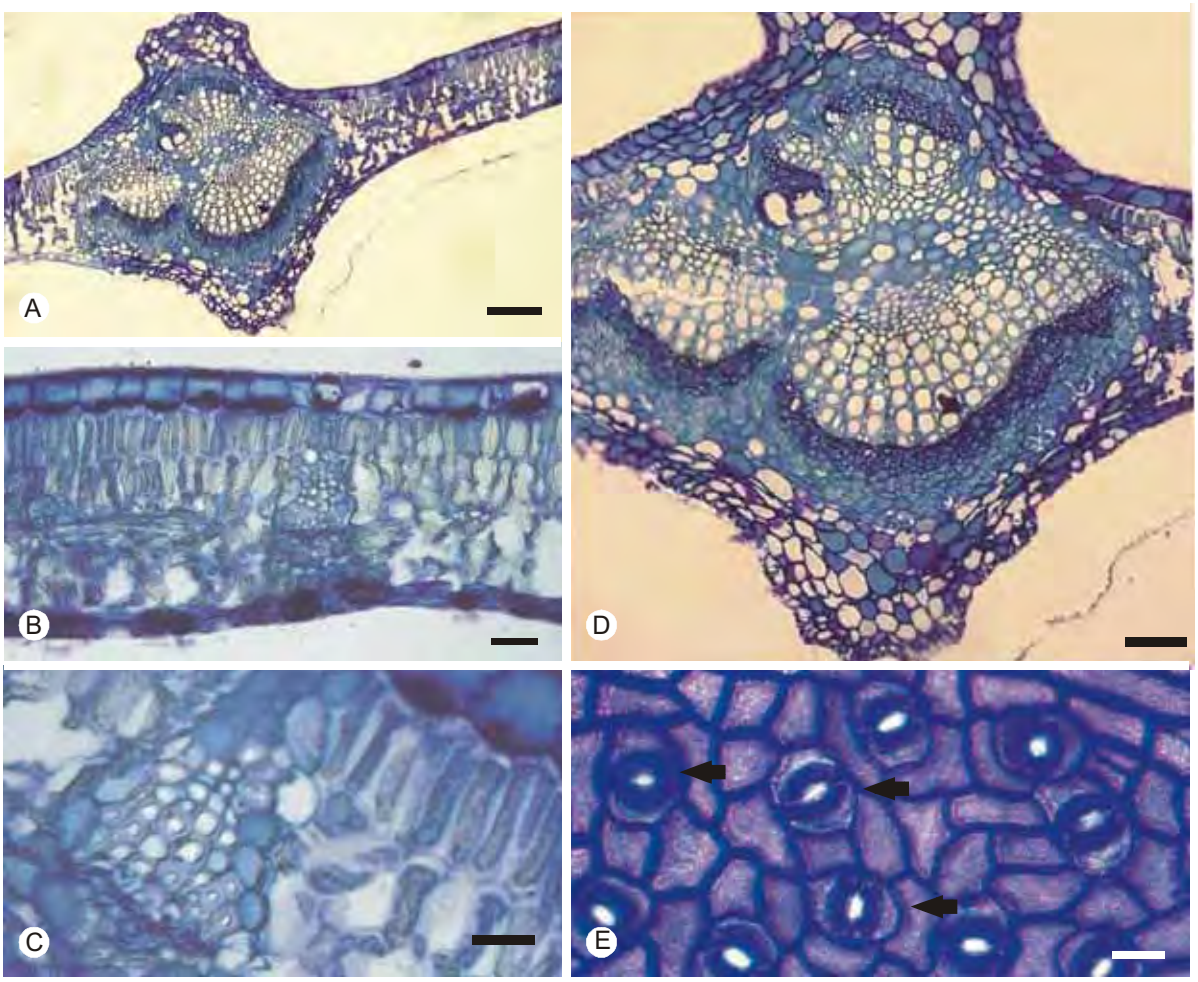


Figura 3. **Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima fagifolia***. A: visão geral; B: mesofilo; C: feixe vascular; D: nervura central; E: aparelho estomático do tipo paracítico. A: barra=110 m; B, C e D: barra=80 m; E: barra= 20 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

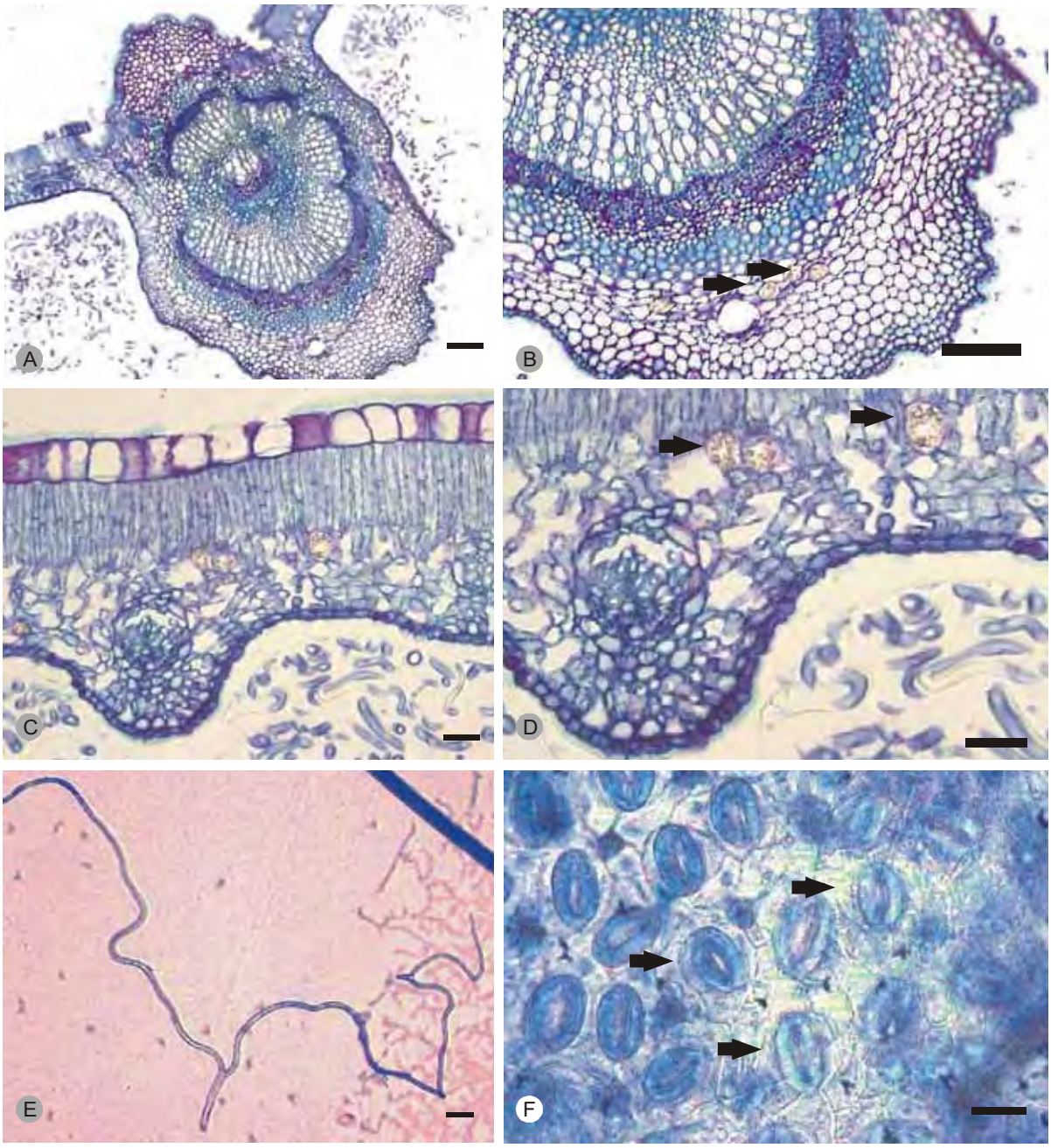


Figura 4: **Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima basiloba***. A: visão geral; B: cristais de oxalato de cálcio da nervura central (setas); C: mesofilo; D: cristais de oxalato de cálcio no parênquima lacunoso de uma nervura secundária (setas); E: pêlo tector unicelular em forma de Y; F: aparelho estomático do tipo paracítico. A: barra=110 m; B, C e D: barra=80 m; E, F e G: barra=20 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

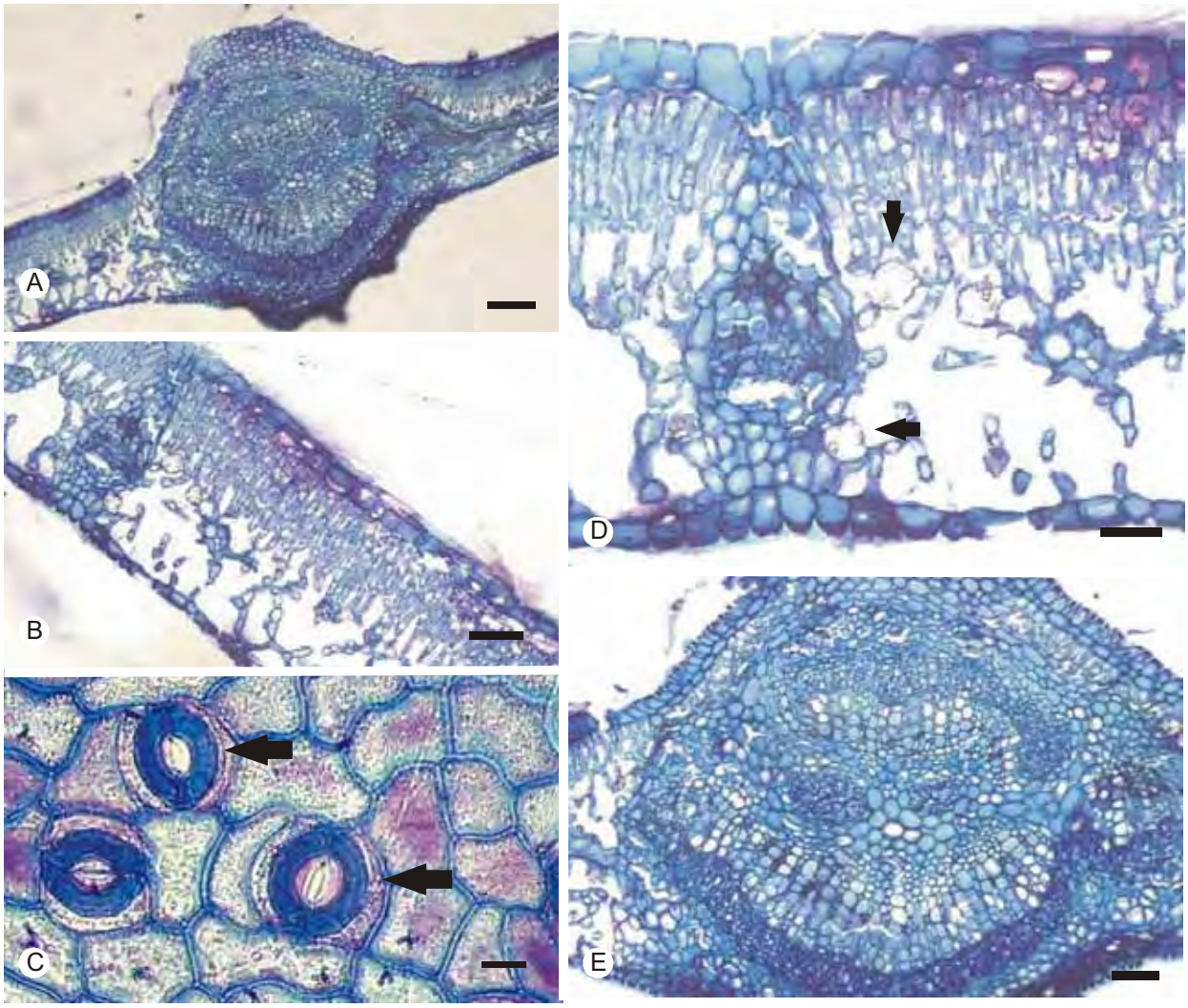


Figura 5: **Secções transversais e paradérmicas da região da nervura central e do mesofilo da folha de *Byrsonima intermedia***. A: visão geral; B: mesofilo; C: aparelho estomático do tipo paracítico (setas); D: cristais de oxalato de cálcio no parênquima lacunoso (setas); E: nervura central. A e B: barra=110 m; D e E: barra=80 m; C: barra=20 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

vascular é formado por feixes colaterais para as 4 espécies estudadas (Figuras 2D, 3D, 4A e 5A), apresentando-se na forma de arco quase fechado nas espécies *B. basiloba* e *B. intermedia* (Figuras 4A e 5A). Nas espécies *B. fagifolia* e *B. crassa* o arco próximo à face abaxial acompanha a extensão das nervuras de 2ª ordem em direção ao mesofilo (Figuras 3A, 3D e 2D). No xilema, os elementos de vaso tanto das faces adaxial e abaxial das 4 espécies dispõem-se de modo enfileirado. Observam-se 3 a 11 camadas de colênquima angular adjacentes à superfície abaxial (Figuras 2D, 3D, 4A e 5A) ou à superfície abaxial e adaxial, onde esse tecido interrompe o parênquima paliçádico (Figuras 2D, 3D, 4A e 5A).

Células esclerificadas cobrem praticamente toda a região da nervura principal das 4 folhas das espécies de *Byrsonima* e cristais de oxalato de cálcio em grupos na forma prismática na região colênquimática inferior, particularmente na espécie *B. basiloba* (Figura 4B).

Em toda a extensão da face abaxial das folhas de *B. basiloba* encontram-se pêlos tectores unicelulares longos em forma de Y com hastes muito longas, contínuas e sinuosas (figura 4E) e de *B. crassa*, pêlos tectores unicelulares em forma de T com braços e hastes curtos e retos típicos de Malpighiaceae (Figura 2A). Nas duas espécies citadas, os tricomas são muito abundantes formando um emaranhado que dificulta a observação desta superfície. As espécies *B. fagifolia* e *B. intermedia* não apresentaram pêlos tectores.

Nos fragmentos da epiderme dissociada, observou-se em todas as espécies de *Byrsonima* estudadas, a presença de estômatos do tipo paracítico, assim como folhas hipoestomáticas (Figuras 2B, 3E, 4F e 5C).

5.2. Estudo histoquímico

A Tabela 1 mostra as principais substâncias químicas identificadas com características lipofílicas por meio de corantes ou reagentes identificadores nas espécies *B.crassa, B.fagifolia, B.basiloba e B.intermedia*. A Tabela 2 mostra as

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

principais substâncias com características lipofílicas por meio de reagentes identificadores nas espécies estudadas, no local onde foram observadas.

Por meio de reações histoquímicas, observou-se nas Figuras de 6 a 9 as imagens registradas, localizando-se as substâncias químicas da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima* estudadas, comparando os resultados com os controles respectivos para substâncias lipofílicas e hidrofílicas.

Quanto as principais substâncias lipofílicas, foram encontradas pontualmente gotas de lipídios no citoplasma de células isoladas dos tecidos parenquimáticos e nas células da epiderme da superfície adaxial, evidenciadas pelo Sudan III (Tabelas 1 e 2), nas espécies *B. crassa* (Figura 6B) e *B. fagifolia* (Figura 7B).

Não foram encontrados lipídios ácidos, neutros e insaturados nem óleos essenciais e oleoresinas (Tabelas 1 e 2).

Esteróides (Tabelas 1 e 2) foram encontrados predominantemente na região do parênquima paliçádico das espécies *B. fagifolia*, *B. crassa* e *B. basiloba* (Figuras 7C, 6C e 8B). O parênquima lacunoso também foi corado nas espécies *B. fagifolia* (Figura 7C) e *B. crassa* (Figura 6C). Por fim, foi indicada a presença de esteróides na região epidérmica da *B. basiloba* (Figura 8B).

A reação nos tecidos submetidos ao ácido sulfúrico 50% com glicerina para a detecção de lactonas sesquiterpênicas (Tabelas 1 e 2) revelou resultado positivo (cor vermelho-acastanhado) em regiões diferentes em cada uma das espécies. A região epidérmica foi corada nas espécies *B. basiloba* (Figura 8C) e *B. fagifolia* (Figura 7D). Os parênquimas também ficaram evidenciados na *B. fagifolia* (Figura 7D), na região lacunosa, e *B. intermedia* (Figuras 9B e 9D), na região paliçádica. Os feixes vasculares da *B. intermedia* (Figuras 9B e 9D) e *B. crassa* (Figura 6D) mostraram possuir uma coloração vermelho-acastanhada, mas considerou-se resultado inconclusivo, pois não há certeza de composição nesta região. A cutícula foi corada na *B. crassa* (Figura 6D).

A epiderme e células parenquimáticas do mesofilo impregnaram-se com coloração vermelho-alaranjada indicando possivelmente terpenóides com grupo carbonila (Tabelas 1 e 2) na *B. fagifolia* (Figura 7E). Na *B. crassa* (Figura 6E), a reação ocorrida nos feixes vasculares foi considerada inconclusiva, pois não há certeza da composição nesta região.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 1: Resultados dos testes histoquímicos realizados nas folhas das espécies de *Byrsonima* por meio de corante ou reagentes identificadores de substâncias lipofílicas.

Reagente/Corante	Identificação	Cor (resultado positivo)	*B.crassa*	*B.fagifolia*	*B.intermedia*	*B.basiloba*
Sudan III	Lipídios totais	Vermelho	+	+	-	-
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos e neutros	Rosa (ácido)/Azul (neutro)	-	-	-	-
Tetróxido de ósmio	Lipídios insaturados	Preto	-	-	-	-
Reagente de NADI	óleos essenciais e oleoresinas	Azul (óleos)/Vermelho (resinas)	-	-	-	-
Tricloreto de antimônio	Esteróides	Vermelho-alaranjado	++	++	-	++
Ácido sulfúrico/glicerina	Lactonas sesquiterpênicas	Vermelho-acastanhado	++	++	++	++
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenóides com grupo carbonila	Vermelho-alaranjado	-	++	-	-

(-) reação negativa; (+) reação em células isoladas e/ou que necessita de confirmação (pouco característico); (++) reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana; (++++) reação em todo o tecido e/ou com intensidade forte.

Tabela 2: Localização das substâncias químicas nas estruturas anatômicas foliares utilizando corantes ou reagentes com características apolares em folhas de *Byrsonima spp*.

identificação	lipídios totais				esteróides				lactonas				terpenóides			
tecido/estrutura anatômica									sesquiterpênicas				com grupo carbonila			
	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.
epiderme	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
cutícula	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
parênquima lacunoso	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	++	-	-
parênquima paliçádico	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-
pêlos tectores simples	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
identificação geral	-	+	-	+	++	++	-	++	++	++	++	++	-	++	-	-

(-) reação negativa para o composto; (+) reação em células isoladas e/ou que necessita de confirmação (pouco característico); (++) reação em grupos células e/ou com intensidade mediana; (++++) reação em todo o tecido e/ou com intensidade forte. B.b.: *Byrsonima basiloba*; B.f.:*Byrsonima fagifolia*; B.i.: *Byrsonima intermedia*; B.c.: *Byrsonima crassa*

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

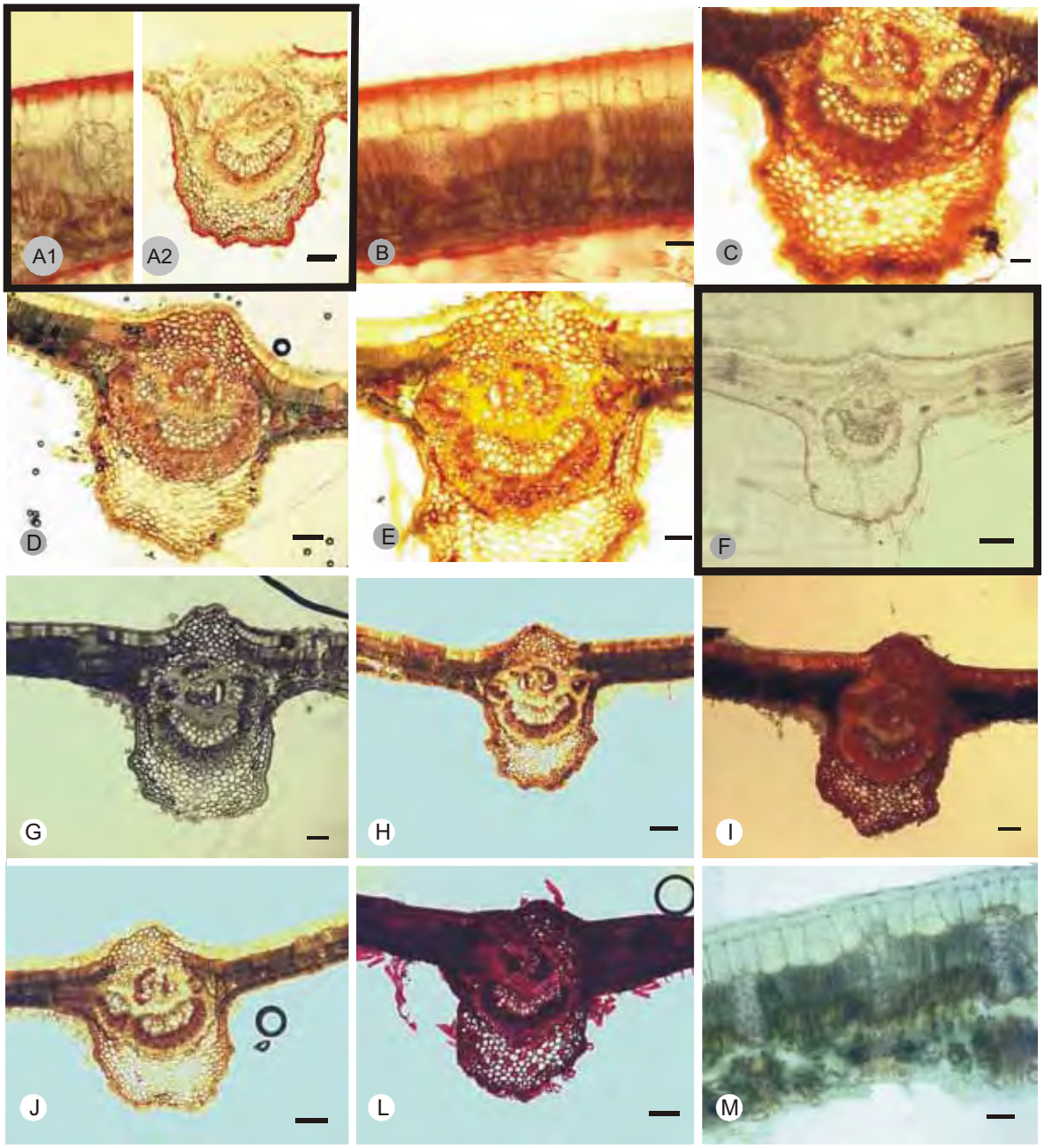


Figura 6: **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima crassa*. A1 e A2: controle para substâncias lipofílicas**; B: lipídios totais (sudan III); C: esteróides (tricloreto de antimônio); D: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); E: terpenóides com grupo carbonila (2,4-DNF); **F: controle para substâncias hidrofílicas**; G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H: compostos fenólicos (dicromato de potássio); I: taninos (vanilina clorídrica); J: alcalóides (reagente de Dragendorff); L: polissacarídeos gerais (PAS); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). A, F e L: barra=110µm; B, C, D, E, G, H, J e M: barra=80µm; A2 e I: barra=20 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

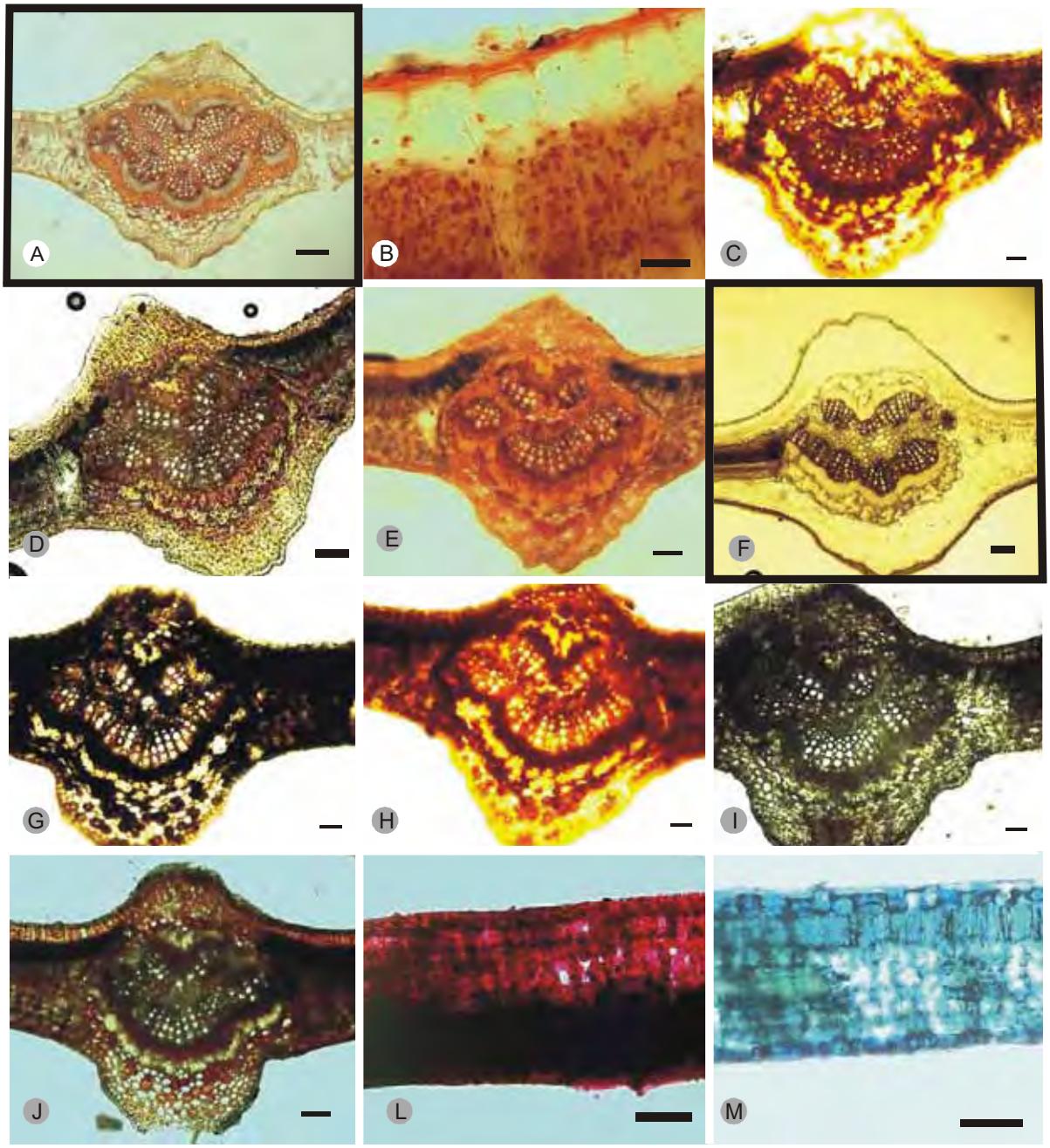


Figura 7: **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima fagifolia*. A: controle para substâncias lipofílicas**; B: lipídios totais (Sudan III); C: esteróides (tricloreto de antimônio); D: lactonas sesquiterpênicas (ác.sulfúrico/glicerina); E: terpenóides com grupo carbonila; **F: controle para substâncias hidrofílicas;** G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H: compostos fenólicos (dicromato de potássio); I: taninos (vanilina clorídrica); J: alcalóides (reagente de Dragendorff); L: polissacarídeos gerais (PAS); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). A e F: barra=110µm; C, D, E, G, H, I, J, L e M: barra=80µm; B: barra=40 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

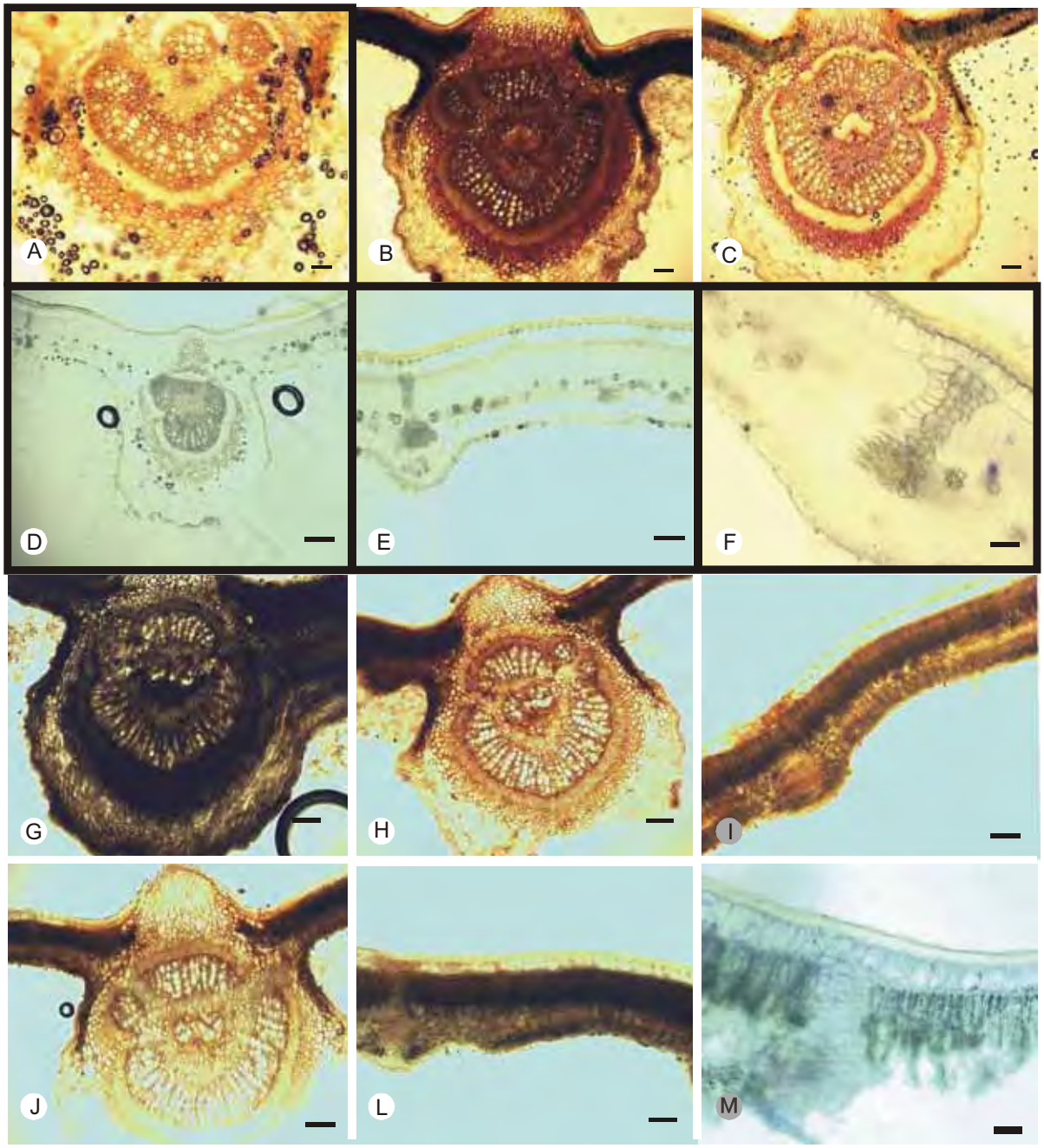


Figura 8**: Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima basiloba*. A: controle para substâncias lipofílicas**; B: esteróides (tricloreto de antimônio); C: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); **D, E e F: controle para substâncias hidrofílicas;** G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H e I: compostos fenólicos (dicromato de potássio); J e L: alcalóides (2,4-DNF); M: proteínas (azul brilhante de Comassie). D, I, J: barra=110µm; A, B, C, E, G, H e L: barra=80µm; F e M: barra=40 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

A Tabela 3 mostra as principais substâncias com características hidrofílicas por meio de reagentes identificadores nas espécies *B. crassa, B. fagifolia, B. basiloba e B. intermedia*. Na Tabela 4 organizaram-se os resultados obtidos em função de sua ocorrência nas estruturas anatômicas das folhas de *Byrsonima spp* de acordo com os reagentes utilizados.

Nas 4 espécies estudadas os compostos fenólicos (Tabelas 3 e 4) foram encontrados em quase todos os tecidos foliares, com maior ou menor intensidade (Figuras 6G, 6H, 7G, 7H, 8G, 8H, 8I, 9F e 9G) e parcialmente na região cambial da nervura principal ao utilizar os reagentes cloreto férrico e dicromato de potássio.

Os taninos (Tabelas 3 e 4) apareceram principalmente nas células parenquimáticas do mesofilo das espécies *B. fagifolia* (Figura 7I) e *B. crassa* (Figuras 6I), sendo mais intensa na última espécie. Na *B. fagifolia,* os taninos apareceram em células isoladas do mesofilo. A epiderme da *B. crassa* (Figura 6I) foi mais evidenciada em relação à espécie *B. fagifolia* (Figura 7I).

Os alcalóides (Tabelas 3 e 4) foram encontradas na região epidérmica nas 3 espécies de *Byrsonima* (Figuras 7J, 8J, 8L, 9H), exceto na *B. crassa* (Figura 6J). O parênquima lacunoso foi corado em castanho-avermelhado nas espécies *B. fagifolia* (Figura 7J) e *B. intermedia* (Figura 9H) e parênquima paliçádico e cutícula na *B. crassa* (Figura 6J).

O PAS (Tabelas 3 e 4) corou intensamente a epiderme, cutícula, parênquima clorofiliano da região do mesofilo da espécie *B. crassa* (Figura 6L) indicando a presença de polissacarídeos totais. Nas espécies *B. fagifolia* (Figura 7L) e *B. intermedia* (Figura 9I) verifica-se o mesmo somente na região epidérmica, estendendo até o parênquima paliçádico.

Foram detectadas proteínas totais (Tabelas 3 e 4), por meio da coloração azulada, nas regiões epidérmicas das espécies *B. fagifolia*, *B. crassa* e *B. basiloba* (Figuras 6M, 7M e 8M). A região parenquimática do mesofilo da *B. basiloba* (Figura 8M) também apresentou reação positiva para proteínas.

Não foram verificados grãos de amido e pectinas nas folhas estudadas das espécies de *Byrsonima* (Tabelas 3 e 4).

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 3: Resultados dos testes histoquímicos realizados nas folhas das espécies *Byrsonima* por meio de reagentes identificadores de substâncias hidrofílicas.

Reagente	**Identificação**	**Cor (resultado positivo)**	***B.crassa***	***B.fagifolia***	***B.intermedia***	***B.basiloba***
Cloreto férrico	Compostos fenólicos totais	Preto	++	++++	++++	++++
Dicromato de potassio	Compostos fenólicos totais	Castanho avermelhado	++	++++	++	++
Vanilina clorídrica	Taninos	Vermelho	++	+	-	+
Reagente de Dragendorff	Alcalóides	Castanho-avermelhado	+	+	+	+
PAS	Polissacarídeos totais	Rosa intenso	++	++	+	-
Lugol	Amido	Roxo	-	-	-	-
Vermelho de rutênio	Pectinas	Rosa intensa	-	-	-	-
Azul brilhante de Comassie	Proteínas	Azul	+	+	-	+

(-) reação negativa para o composto; (+) reação em células isoladas e/ou que necessita de confirmação (pouco característico); (++) reação em grupos de células e/ou com intensidade mediana; (++++) reação em todo o tecido e/ou com intensidade forte.

Tabela 4: Localização das substâncias químicas nas estruturas anatômicas foliares utilizando corantes ou reagentes com características polares em folhas de *Byrsonima spp*.

Identificação tecido/estrutura anatômica	Compostos fenólicos totais				taninos				alcalóides				polissacarídeos totais				proteínas totais			
	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.	B.b.	B.f.	B.i.	B.c.
epiderme	+	++++	++++	+	+	+	-	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
cutícula	++++	++++	++++	++	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
parênquima lacunoso	++++	++	++++	++++	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
parênquima paliçádico	++++	++++	++++	++++	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
pêlos tectores simples	–	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identificação geral	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

(-) reação negativa para o composto; (+) reação em células isoladas e/ou que necessita de confirmação (pouco característico); (++) reação em grupos células e/ou com intensidade mediana; (++++) reação em todo o tecido e/ou com intensidade forte. B.b.: *Byrsonima basiloba*; B.f.:*Byrsonima fagifolia*; B.i.: *Byrsonima intermedia*; B.c.: *Byrsonima crassa*

.

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

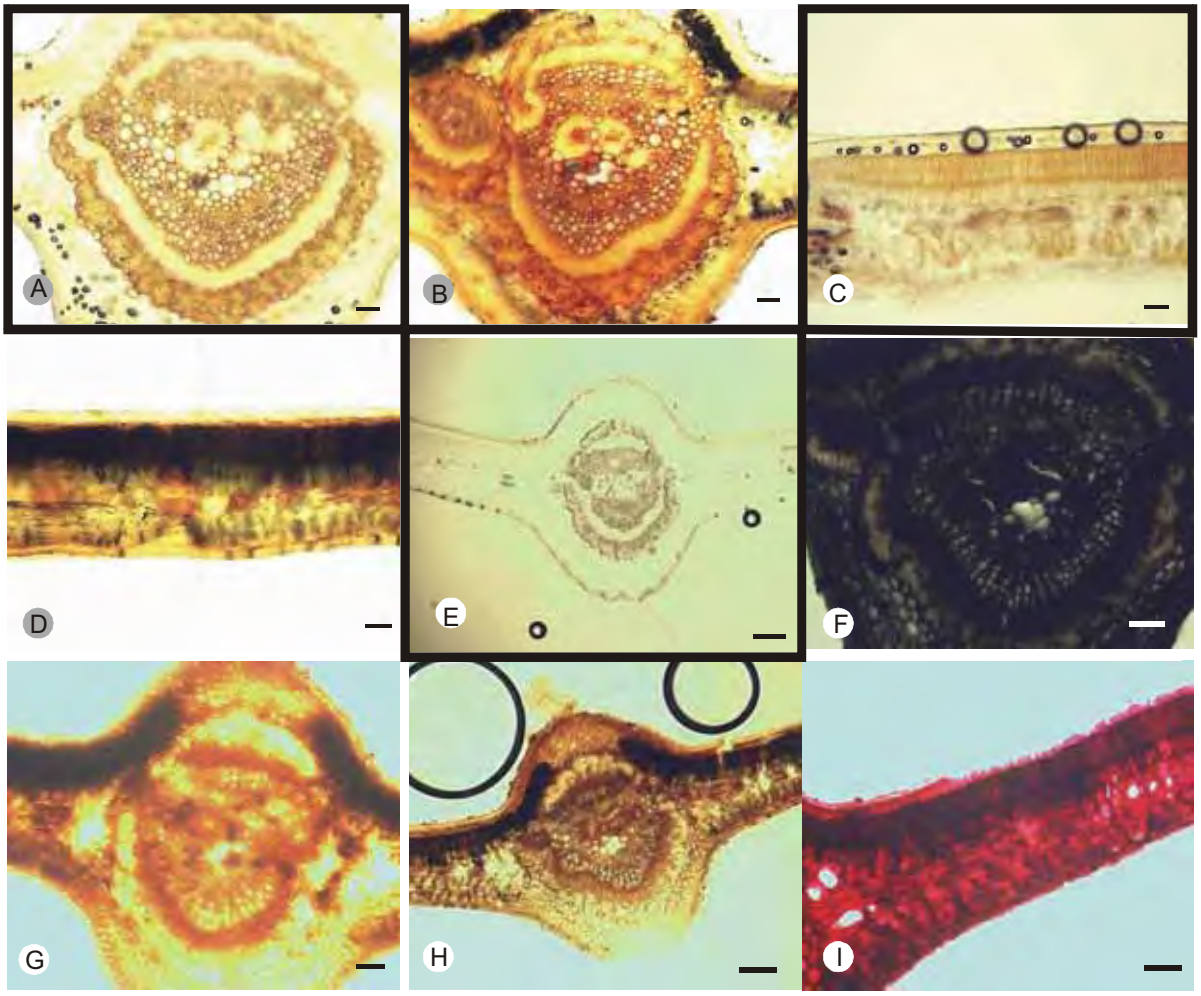


Figura 9: **Reações histoquímicas. Aspectos gerais da região da nervura central e do mesofilo das folhas de *Byrsonima intermedia*. A e C: controle para substâncias lipofílicas**; B e D: lactonas sesquiterpênicas (ácido sulfúrico/glicerina); **E: controle para substâncias hidrofílicas**; F: compostos fenólicos (cloreto férrico); G: compostos fenólicos (dicromato de potássio); H: alcalóides (reagente de Dragendorff); I: polissacarídeos gerais (PAS). A, B, D, F, G e I: barra=80 m; C, E e H: barra=110 m.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

5.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro*

Os resultados de CIM das frações de *Byrsonima spp* são apresentados na Tabela 5. As frações, dos extratos clorofórmicos das espécies *Byrsonima*, foram consideradas promissoras quando os valores obtidos de CIM eram iguais ou menores que 15,6$\mu g \cdot mL^{-1}$ (Protopopova, 2005). Franzblau *et al*. (1998) sugerem como faixa de corte para extratos com valor de CIM igual ou inferior a 200$\mu g \cdot mL^{-1}$.

Tabela 5: Determinação da CIM pelo MABA das frações de extratos clorofórmicos da região foliar de *B. basiloba, B. crassa, B. fagifolia* e *B. intermedia* expressa em $\mu g \cdot mL^{-1}$, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294.

Espécies	Frações ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		
	hexânica	metanólica	diclorometânica
B. fagifolia	31,25	**7,81**	**1,95**
B. basiloba	NT	31,25	**7,81**
B. crassa	62,5	**7,81**	250
B. intermedia	500	NT	NT

NT: Não testada

Os resultados indicam que as frações metanólica e diclorometânica da *B. fagifolia*, fração em diclorometano da *B. basiloba* e fração em metanol da *B. crassa* apresentaram atividade antimicobacteriana promissoras com valores de CIM inferiores a 15,6$\mu g \cdot mL^{-1}$.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de CIM dos compostos isolados das frações hexânica, diclorometânica e metanólica dos extratos clorofórmicos de *B. fagifolia*.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 6: Determinação da CIM pelo MABA dos compostos isolados das frações hexânica, diclorometânica e metanólica dos extratos clorofórmicos de *B. fagifolia* expressa em $\mu g \cdot mL^{-1}$, empregando-se o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294.

Frações	compostos isolados	CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
hexânica	acetato de α-amirina	62,5
	Dotriacontano	250
diclorometânica	mistura a	31,25
	mistura b	31,25
metanólica	ácido bássico	2,5

mistura a: mistura de lupeol, α-amirina e β-amirina; mistura b: mistura de acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina; dotriacontano: $C_{32}H_{66}$

5.4. Avaliação de citotoxicidade

Nas Tabelas 7, 8 e 9 são apresentados, respectivamente, os valores de IC_{90} e IC_{50} dos extratos clorofórmicos e frações das espécies *Byrsonima,* e compostos da *B. fagifolia*.

Tabela 7: Valores de IC_{90} e IC_{50} dos extratos clorofórmicos das espécies *Byrsonima* sobre a linhagem J774.

Espécie	IC_{90} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
Byrsonima fagifolia	62,5	112,5
Byrsonima basiloba	125	225
Byrsonima crassa	62,5	112,5
Byrsonima intermedia	125	225

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 8: Valores de IC_{90} e IC_{50} das frações metanólica, diclorometânica e hexânica dos extratos clorofórmicos das espécies de *Byrsonima*.

Espécie	Frações	IC_{90} (μg/mL)	IC_{50} (μg/mL)
Byrsonima fagifolia	metanólica	31,25	56,25
	diclorometânica	125	225
	hexânica	125	225
Byrsonima basiloba	metanólica	NT	NT
	diclorometânica	125	225
	hexânica	NT	NT
Byrsonima crassa	metanólica (+tóxica)	7,81	14,05
	diclorometânica	15,62	28,11
	hexânica	125	225
Byrsonima intermedia	metanólica	NT	NT
	diclorometânica	NT	NT
	hexânica (-tóxica)	250	450

NT: Não testada

Tabela 9: Valores de IC_{90} e IC_{50} dos compostos isolados da espécie *B. fagifolia* sobre a linhagem J774.

Frações	Compostos isolados	IC_{90} (μg·mL^{-1})	IC_{50} (μg·mL^{-1})
hexânica	acetato de α-amirina	500 (-tóxica)	900
	dotriacontano	NT	NT
diclorometânica	mistura a	31,25 (+tóxica)	56,25
	mistura b	62,5	112,5
metanólica	ácido bássico	31,25 (+tóxica)	56,25

mistura a: mistura de lupeol, α-amirina e β-amirina; mistura b: mistura de acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina; dotriacontano: $C_{32}H_{66}$ (NT: Não testada).

5.5. Determinação do Ìndice de Seletividade

Na tabela 10 são apresentados comparativamente os valores de CIM, IC_{50} e de IS dos extratos e frações e na Tabela 11 aqueles dos compostos isolados.

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 10: Valores de CIM, IC_{50} e IS dos extratos clorofórmicos e frações das espécies de *Byrsonima.*

Espécie	Extrato	Fração	CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$)[a]	IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)[b]	IS[c]
B. fagifolia	Clorofórmico		62,5	112,5	0,26
		hexânica	31,25	225	0,86
		Metanólica	7,81	56,25	0,86
		diclorometânica	1,95	225	2,06
B. basiloba	Clorofórmico		125	225	0,26
		hexânica	NT	NT	NT
		metanólica	31,25	NT	NT
		diclorometânica	7,81	225	1,46
B. crassa	Clorofórmico		62,5	112,5	0,26
		hexânica	62,5	225	0,56
		metanólica	7,81	14,05	0,26
		diclorometânica	250	28,11	-0,95
B. intermedia	Clorofórmico		250	225	-0,05
		hexânica	500	450	-0,05
		metanólica	NT	NT	NT
		diclorometânica	NT	NT	NT

a: Concentração Inibitória Mínima 90%; b: Índice de Citotoxicidade 50%; c: Índice de Seletividade é definido como a razão logarítmica de IC_{50} sobre CIM (NT: Não testada).

Tabela 11: Valores de CIM, IC_{50} e de IS dos compostos isolados da espécie de *B. fagifolia.*

Frações	compostos isolados	CIM ($\mu g/mL$)[a]	IC_{50} ($\mu g/mL$)[b]	IS[c]
hexânica	Acetato de α-amirina	62,5	900	1,15
	dotriacontano	250	NT	NT
diclorometânica	mistura a	31,25	56,25	0,25
	mistura b	31,25	112,5	0,55
metanólica	ácido bássico	2,5	56,25	1,35

a: Concentração Inibitória Mínima 90%; b: Índice de Citotoxicidade 50%; c: Índice de Seletividade é definido como razão logarítmica de IC_{50} sobre CIM; mistura a: mistura de lupeol, α-amirina e β-amirina; mistura b: mistura de acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina; dotriacontano: $C_{32}H_{66}$. (NT: Não testada).

Dos 4 extratos, 12 frações e 5 compostos estudados somente o extrato clorofórmico de *B. intermedia* e as frações diclorometânica de *B. crassa* e hexânica de *B. intermedia* apresentaram os valores de IS menor que zero, o que significa que apresentam mais citotóxicos que ativos contra *M. tuberculosis*. Frações como as diclorometânica de *B. fagifolia* e *B. basiloba* e o ácido bássico apresentaram boa atividade antimicobacteriana e baixa citotoxicidade.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

A fração em diclorometano do extrato clorofórmico de *B. fagifolia* apresentou o melhor valor de IS seguido pela fração também diclorometânica de extrato clorofórmico de *B. basiloba*.

Em relação aos compostos isolados obtidos a partir da espécie *B. fagifolia*, apresentaram os melhores resultados de IS, o acetato de α-amirina, seguida da mistura b. Em referência a droga padrão utilizada, o valor de IS da isoniazida é de 1,46 (Protopopova, 2005).

Na Tabela 12 estão apresentados comparativamente os resultados obtidos na reação histoquímica de esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides com grupo carbonila, atividade antimicobacteriana, citotoxicidade e Índice de Seletividade de extratos e frações das espécies *Byrsonima*. Os três grupos de metabólitos secundários foram selecionados, pois as substâncias majoritariamente isoladas e identificadas pertencem a estes grupos.

Na Tabela 13 são apresentados também comparativamente os resultados obtidos da atividade antimicobacteriana, citotoxicidade e Índice de Seletividade dos compostos da espécie *B. fagifolia*.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Tabela 12: Relação entre reação histoquímica, atividade antimicobacteriana (CIM), citotoxicidade (IC_{50}) e IS dos extratos clorofórmicos e frações das espécies de *Byrsonima*.

Espécie	Reação Histoquímica			CIM ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				IS			
	Esteróides	Lactonas sesquiterpênicas	Terpenóides com grupo carbonila	Ec	Fração			Ec	Fração			Ec	Fração		
					H	M	D		H	M	D		H	M	D
B.crassa	++	++	-	62,5	62,50	7,81	250	112,5	225	14,05	28,11	0,26	0,56	0,26	-0,95
B.fagifolia	++	++	++	62,5	31,25	7,81	1,95	112,5	225	56,25	225	0,26	0,86	0,86	2,06
B.intermedia	-	++	-	250	500	NT	NT	225	450,0	NT	NT	-0,05	-0,05	NT	NT
B.basiloba	++	++	-	125	NT	31,25	7,81	225	NT	NT	225	0,26	NT	NT	1,46

Ec: extrato clorofórmico; H: hexânica; M: metanólica; D: diclorometânica; NT: não testada

Tabela 13: Relação entre atividade antimicobacteriana, citotoxicidade e IS dos compostos da espécie *B. fagifolia*.

Espécie *B.fagifolia*	Compostos	CIM_{90} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)				IS			
		Ec	Fração			Ec	Fração			Ec	Fração		
			H	M	D		H	M	D		H	M	D
		62,5	31,25	7,81	1,95	112,5	225	56,25	225	0,26	0,86	0,86	2,06
	acetato de α-amirina	-	62,5	-	-	-	500	-	-	-	0,90	-	-
	dotriacontano	-	NT	-	-	-	NT	-	-	-	NT	-	-
	mistura a	-	-	-	31,25	-	-	-	56,25	-	-	-	0,25
	mistura b	-	-	-	31,25	-	-	-	112,5	-	-	-	0,55
	ácido bássico	-	-	2,5	-	-	-	31,25	-	-	-	0,79	-

Ec: extrato clorofórmico; H: hexânica; M: metanólica; D: diclorometânica; mistura a: mistura de lupeol, α-amirina e β-amirina; mistura b: mistura de acetato de lupeol, acetato de α-amirina e acetato de β-amirina; dotriacontano: $C_{32}H_{66}$. NT: não testada

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

5.6. Determinação da toxicidade aguda

Observou-se, pelo menos, nos dois primeiros dias de experimento, algumas mortes animais já com as doses de menor concentração dos extratos clorofórmicos microemulsionados testados. Nas doses de 250mg·kg^{-1} morreram 6 (60%), em 500mg·kg^{-1}, 6 (60%), em 1000mg·kg^{-1}, 8 (80%) e em 2000mg·kg^{-1}, 7 (70%), num total de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas). Em relação aos animais controle foi administrada, em volume por massa corpórea animal, a formulação microemulsionada, ocorrendo 6 (60%) mortes animais.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

6. DISCUSSÃO

São poucos os estudos relativos à identificação anatômica e à investigação histoquímica das espécies da região do Cerrado. O gênero *Byrsonima* ocorre, predominantemente, no Cerrado e contém inúmeras espécies medicinais, cujos frutos e cascas são utilizados para fins terapêuticos (Caceres *et al*., 1993; Amarquaye *et al.*, 1994). Até o momento, poucos estudos químicos, biológicos e farmacológicos foram realizados com os extratos destas espécies. Neste sentido os dados obtidos neste estudo são inéditos e contribuem para o melhor conhecimento das plantas do Cerrado sobretudo do gênero *Byrsonima*.

Em relação ao estudo anatômico, foram verificadas algumas características anatômicas marcantes das plantas da região do Cerrado e encontradas nas *B. intermedia*, *B. basiloba*, *B. crassa* e *B. fagifolia*. Uma das características observadas foi a presença de pouco espaço intercelular na região do parênquima lacunoso. O parênquima paliçádico apresentou-se mais desenvolvido que o lacunoso e verificou-se a presença de tecido esclerenquimático desenvolvido. A presença de poucos espaços intercelulares no mesofilo é um aspecto típico de plantas xeromórficas (Fahn, 1978). Nas espécies estudadas, três apresentaram este tipo de característica e somente na *B. intermedia* foi encontrada grandes espaços intercelulares. Além disso, nas espécies de *Byrsonima* estudadas foram encontradas diferenças quanto ao número de estratos no parênquima paliçádico. Em *B. basiloba* e *B. crassa* verificou-se uma camada de células enquanto que na *B. fagifolia* foram encontradas duas e na *B. intermedia* foram encontradas três. Estas diferenças observadas talvez possam ser justificadas por meio das influências dos fatores externos ambientais, visto que esses podem causar mudanças anatômicas, morfológicas e químicas nos vegetais (Myers *et al*., 1987; Mendes *et al*., 2001; Oguchi *et al*., 2003).

Plantas de ambiente seco (xerófitas) apresentam parênquima paliçádico mais desenvolvido do que o lacunoso, ou então, somente a ocorrência de paliçádico e pequenos espaços intercelulares (Esau, 1974). Mendes *et al.* (2001) acreditam que quanto maior o desenvolvimento do parênquima paliçádico, mais eficiente será a

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

fotossíntese, pois nesta região concentram-se as estruturas celulares responsáveis por esta reação. Na espécie *B. crassa* foi verificada a presença de uma hipoderme. Na questão de identificação desta espécie, este é um quesito importante, pois a diferencia das demais aqui estudadas, uma vez que estas últimas não apresentaram este caractere.

As espécies *B. basiloba* e *B. crassa* apresentaram pêlos somente na face abaxial, porém de acordo com a Attala (2004), nas folhas jovens de *B*. *variabilis*, *B. stellaris*, *B. subterranea* encontram-se tricomas na região adaxial da lâmina foliar, provavelmente tendo como função a proteção durante este período, uma vez que os mesmos não persistem nas folhas adultas. Em *B. subterranea*, poucos tricomas são persistentes.

Segundo Anderson (1982) pêlos em forma de Y são denominados de pubescência velutínea e, em T com braços e hastes curtos e retos, serícea, como foi observada nas espécies *B. basiloba* e *B. crassa*, respectivamente.

Todas as folhas das espécies de *Byrsonima* estudadas são hipoestomáticas e apresentam aparelhos estomáticos paracíticos, os quais são comuns na família Malpighiaceae. As folhas xeromórficas, geralmente, contêm maior número de estômatos do que as hidrófitas. Em muitas xerófitas, os estômatos estão posicionados em depressões na superfície abaxial das folhas como estratégia de sobrevivência num ambiente com restrição de água. As depressões podem também conter muitos pêlos epidérmicos. Juntas, estas duas características podem servir para reduzir a perda de água pela folha (Raven *et al*., 2001). Em *B. variabilis*, *B. stellaris* e *B. reticulata* os estômatos estão situados acima do nível da epiderme na face abaxial; em *B. subterranea* apresentam-se no nível da epiderme, situados abaixo de projeções cuticulares (Attala, 2004).

Na análise anatômica foi também verificada presença de cristais de oxalato de cálcio na região paliçádica das folhas das espécies *B. basiloba* e *B. intermedia*. Estes cristais possuem propriedades reflexivas, isto é, refletem uniformemente a radiação solar (Larcher, 2000). Neste sentido, a presença de oxalato de cálcio nas folhas das espécies *B. basiloba* e *B. intermedia* pode indicar uma estratégia destas espécies frente a intensa radiação solar. Outros autores afirmam que os cristais são freqüentemente classificados, segundo Esau (1977), como produtos de excreção

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

mas, possivelmente, parte do cálcio é reciclada. Segundo Metcalfe (1989), há opiniões divergentes em relação ao papel desempenhado pelos cristais, pois vários significados metabólicos são atribuídos à sua freqüência, como por exemplo, proteger o vegetal contra herbivoria, dar suporte mecânico aos tecidos em época de seca e até neutralizar grande quantidade de ácido oxálico nocivo à planta. A presença de cristais de oxalato de cálcio do tipo prismático na região colênquimática da nervura principal da espécie *B. basiloba* pode ser usada como um caráter capaz de delimitar estes táxons. Metcalfe e Chalk (1950) afirmam que diferenças na estrutura da epiderme e no mesofilo podem contribuir para ter grande valor para a identificação de espécies.

Em relação aos testes histoquímicos executados foram estudadas as principais classes de compostos apolares (lipídios, esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides) e polares (compostos fenólicos, alcalóides, taninos, polissacarídeos e proteínas).

Em duas espécies, *B. fagifolia* e *B. crassa*, foram encontradas pequenas quantidades de gotas de lipídios, empregando-se a técnica de Sudan III. Os lipídios não correspondem a uma das classes de compostos predominantes no gênero *Byrsonima*. Os testes realizados para identificação de lipídios ácidos, neutros e insaturados não detectaram estas substâncias em nenhuma das espécies analisadas.

Os terpenóides com grupo carbonila foram encontrados somente na *B. fagifolia*, principalmente na região clorofiliana estando ausentes nas demais espécies. Uma das prováveis justificativas da ausência de terpenóides nas outras espécies analisadas seria possivelmente a sensibilidade reduzida do reagente 2,4-DNF em detectar pequenas quantidades de terpenóides. Neste sentido, apenas concentrações significativas de terpenóides na região foliar puderam ser detectadas por esta técnica. Por outro lado, na análise química, através da cromatografia gasosa dos extratos clorofórmicos (dados ainda não publicados) foram identificados triterpenos em todas as espécies estudadas.

Os terpenóides são chamados de inseticidas naturais, como integrantes desta classe encontram-se os limonóides, o limoneno e o mirceno, desempenhando um papel de proteção às plantas contra a ação dos insetos. Os terpenos são formados

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

por unidades básicas de isopentenil-pirofosfato ou isopreno ativo, originando os triterpenos e os sesquiterpenos já citados na literatura como substâncias dotadas de ação bactericida (Pietro *et al.,* 2000; Januario *et al.,* 2002). Gottlieb *et al* (1975) isolaram triterpenos do tronco de *B. verbascifolia*. As folhas de *B. microphylla* forneceram triterpenos esterificados com ácidos graxos, ácidos triterpênicos, quercetina e galato de metila (Mendes *et al*., 1999). Vários estudos relatam a química de *B. crassifolia,* da qual foram isolados compostos voláteis dos frutos, glicolipídios, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas e flavonóides obtidos das folhas (Amarquaye *et al*., 1994; Rastrelli *et al*., 1997) e do tronco, proantocianidinas e taninos (Geiss *et al*., 1995). Os esteróides e as lactonas sesquiterpênicas foram encontrados abundantemente nas espécies de *Byrsonima* estudadas. Os testes histoquímicos evidenciaram a presença de lactonas sesquiterpênicas nos vegetais estudados em diferentes regiões da folha e esteróides em quase todas as espécies, excetuando-se a *B. intermedia*, concentrados principalmente na região do parênquima clorofiliano. Atualmente, os fitoesteróis têm mostrado alto potencial como imunoestimuladores e reguladores da migração celular (Bouic, 2002).

Entretanto, o grupo de Química Orgânica, cooordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, em estudo realizado com os mesmos extratos clorofórmicos de *B. basiloba*, *B. intermedia*, *B. crassa* e *B. fagifolia* das espécies estudadas, através da cromatografia gasosa, não confirmou a presença de lactonas sesquiterpênicas (dados ainda não publicados). Esta diferença nos resultados pode indicar que o reagente utilizado tenha evidenciado substâncias com estruturas similares, mas não lactonas sesquiterpênicas, ou que são substâncias instáveis e sofreram degradação nos procedimentos de camada gasosa.

Em relação aos compostos fenólicos, estes foram evidenciados em todos os tecidos da folha das espécies de *Byrsonima*, sendo alguns resultados mais intensos do que outros. Os compostos fenólicos são citados por Fahn (1979) e Esau (1985) como um grupo heterogêneo de substâncias presentes em quase todos os tecidos vegetais. Os autores referem que os mesmos estão relacionados com a proteção ao dessecamento ou ao aparecimento e ataque de animais, embora hajam dúvidas quanto a totalidade de suas funções. Os produtos químicos de defesa são

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

produzidos em consequência da ativação de rotas específicas e constituem a maioria dos princípios ativos como: óleos essenciais, alcalóides, taninos e flavonóides (Krivenko *et al*., 1989).

Os taninos foram, majoritariamente, encontrados na região parenquimática das espécies *B. fagifolia* e *B. crassa.* A função biológica dos taninos tem sido investigada e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e microrganismos patogênicos. Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias, destacando-se as ações bactericida e fungicida (Scalbert, 1991; Chung *et al*., 1998).

Os alcalóides foram encontrados em diferentes regiões das espécies de *Byrsonima* estudadas. Os alcalóides indoloterpênicos, típicos do gênero *Aspidosperma* são de origem biossintética mista (chiquimato/mavalonato) e, geralmente, possuem atividade biológica marcante (Robbers *et al*.,1997).

Apesar da dificuldade na identificação de polissacarídeos, pela variedade de carboidratos encontrados nas células e devido a falta de métodos válidos, estes foram fortemente encontrados na região do parênquima paliçádico, intimamente relacionado com o processo de fotossíntese. O PAS, responsável pela reação, deve estar presente em quantidade suficiente para serem corados (os polissacarídeos) (Svendsen e Verpoorte, 1983).

Pela aplicação do azul brilhante de Comassie, as proteínas totais foram encontradas, principalmente, na região epidérmica das folhas de *Byrsonima*. As proteínas podem ser localizadas nos tecidos ou células vegetais de duas formas: técnicas que demonstram o conjunto de todas as proteínas ou métodos que coram aminoácidos específicos (Fischer, 1968).

O estudo histoquímico é uma importante ferramenta para um direcionamento fitoquímico mais aprofundado, pois revela as principais classes de metabólitos, possivelmente presentes numa estrutura celular (Fank-de-Carvalho e Graciano-Ribeiro, 2004).

A necessidade da realização do controle com todas as substâncias testadas são cuidados necessários para se determinar qual região realmente reagiu com o

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

corante ou reagente de interesse. Devido a natureza de cada reagente, as estruturas foliares sofrem reações mais intensas ou menos.

Além da visualização das características microscópicas das folhas existem outras ferramentas complementares que direcionam a identificação e a caracterização química como a cromatografia e reações de identificação de grupos de princípios ativos.

Para determinar a atividade antimicobacteriana das frações e compostos com os extratos de *B. basiloba*, *B. intermedia*, *B. crassa* e *B. fagifolia*, foi utilizada o MABA. Esta metodologia oferece inúmeras facilidades, frente às outras técnicas tradicionais, por apresentar fácil manejo, reprodutibilidade dos resultados e baixo custo. Sendo uma microtécnica, a quantidade de extrato utilizada é bem inferior àquelas empregadas em outros testes. Outras vantagens que podem ser citadas são: menor tempo de espera, a não alteração da constituição dos componentes termolábeis e a possibilidade de se avaliar concentrações múltiplas de diversos extratos simultaneamente (Franzblau *et al.*,1998).

Pela Tabela 10 verifica-se que valores de CIM mais promissores foram encontrados nas frações metanólica (7,81 $\mu g \cdot mL^{-1}$) e diclorometânica (1,95 $\mu g \cdot mL^{-1}$) da *B. fagifolia*, fração em diclorometano da *B. basiloba* (7,81 $\mu g \cdot mL^{-1}$) e fração em metanol da *B. crassa* (7,81 $\mu g \cdot mL^{-1}$). Em ensaio subsequente, foi determinada a CIM dos compostos de *B. fagifolia* (Tabela 12). O composto ácido bássico (2,5 $\mu g/mL$) apresentou elevada atividade antimicobacteriana. Este valor é altamente promissor uma vez que os quimioterápicos vigentes, como, a isoniazida, a rifampicina, a estreptomicina e o etambutol apresentaram valores de CIM de 0,05 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 0,25 $\mu g \cdot mL^{-1}$, 2,0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ e 3,8 $\mu g \cdot mL^{-1}$, respectivamente (Franzblau *et al.*,1998).

A elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presente na parede de micobactérias provavelmente funcionou como uma barreira para os compostos polares, justificando os valores mais promissores para os extratos apolares (Tossi e Ellner, 1998; Rodrigues *et al*., 2003; Arantes, 2005). Os componentes ativos lipofílicos, provavelmente atravessaram mais facilmente a barreira lipídica presente na parede das micobactérias.

No presente estudo, o acetato de α-amirina e as misturas a e b apresentaram CIM maior em relação a fração de origem (Tabela 13), sugerindo que as substâncias

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

ativas foram perdidas durante o processo de fracionamento fitoquímico como, por exemplo, a fração diclorometânica com valor de CIM de 1,95 $\mu g \cdot mL^{-1}$comparada com as misturas a e b que apresentaram valor de 31,25 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Por outro lado, pode-se considerar a ação sinérgica dos constituintes como, por exemplo, a mistura de lupeol, α-amirina e β-amirina que apresentou valor de CIM de 31,25 μg/mL e a presença somente do lupeol que apresenta valor de 64 μg/mL (Cantrell *et al*., 2001). Portanto, de cada fração de extratores diferentes (hexano, metanol e diclorometano) foi isolada uma mistura de substâncias possivelmente ativa ao *M. tuberculosis* (Tabela 12). O ácido bássico foi um dos compostos que apresentou maior atividade em relação a fração correspondente, com valor de IS mediano em relação a isoniazida, sendo dessa maneira uma substância promissora para uma continuidade na pesquisa contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Além de se determinar a atividade antimicobacteriana, foi determinada a citotoxicidade dos extratos, frações das espécies *Byrsonima* e compostos da *B. fagifolia*. Foram obtidos melhores IS na fração em diclorometano (Tabela 10) das espécies *B. fagifolia* (2,06) e *B. basiloba* (1,46). O IS é uma ótima ferramenta para selecionar candidatos promissoras em atividades antivirais (Chiang *et al*., 2003) e antimicobacterianos (Protopopova *et al*., 2005) para realização de ensaios subseqüentes.

Na Tabela 12, foram correlacionados os valores de CIM dos extratos clorofórmicos de *Byrsonima* com a presença de esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides verificados na análise histoquímica. A *B. fagifolia* apresentou os três grupos metabólitos com valor de CIM de 62,5 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Por outro lado, na *B. intermedia* foram identificadas somente as lactonas sesquiterpênicas, apresentando CIM de 250 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Portanto, a reação histoquímica possibilita uma relação com atividade biológica e dessa maneira, pode direcionar a identificação de prováveis compostos secundários.

Em relação a toxicidade aguda testada nos animais, o sistema microemulsionado proposto para o extrato clorofórmico dos vegetais estudados não possibilitou na solubilização completamente, portanto não foi testado nos animais. Excetuando, o extrato clorofórmico microemulsionado da *B. fagifolia*. Porém, observou-se durante o acompanhamento do estudo a morte dos animais controle.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

Os estudos anatômicos e histoquímicos ressaltam a preocupação de identificação das espécies, buscando características anatômicas inerentes à planta. Esta etapa é fundamental para o estudo de direcionamento para outras investigações como, por exemplo, a busca de novas atividades biológicas.

O fracionamento direcionado, do extrato até a obtenção de princípios ativos, resultou na obtenção de compostos mais ativos e substâncias mais puras. Porém em alguns casos ocorreu a redução da atividade, denotando perda de atividade durante o fracionamento ou então que a atividade estava relacionado com o efeito sinérgico de 2 ou mais componentes.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

7. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos do trabalho conclui-se que:

- o estudo anatômico foram encontradas estruturas morfológicas que podem ser utilizados como caracteres identificadores;
- o estudo histoquímico revelou que os principais constituintes químicos presentes foram lipídios totais, esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides para substâncias apolares; e compostos fenólicos, taninos, alcalóides, polissacarídeos totais e proteínas totais para substâncias polares, com diferentes intensidades de reação em cada espécie;
- quanto a atividade antimicobacteriana, as frações diclorometânicas das espécies *B. fagifolia* e *B. basiloba* apresentaram maior atividade antimicobacteriana em relação as outras frações;
- o ácido bássico apresentou elevada atividade antimicobacteriana e moderada atividade citotóxica;
- os extratos clorofórmicos das espécies estudadas não solubilizaram completamente no sistema microemulsionado proposto, exceto para *B. fagifolia.* Porém, observou morte dos animais controle nesta última espécie.

Como desdobramento das conclusões é possível afirmar que a estrutura anatômica seja uma estratégia para evitar a perda de água ao meio externo. Quimicamente, a busca de compostos ativos ressalta a importância do estudo biodirecionado: desde do extrato ativo, passando pela fração e buscando o composto ativo. Por fim, é importante salientar que a atividade antimicobacteriana e a citotoxicidade apresentam relações estritas, pois quanto melhor a atividade e menor deve ser a citotoxicidade, portanto é fundamental realizar estas duas atividades.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (NORMA ABNT NBR 6023)

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. ***Cerrado*: espécies vegetais úteis**: 38-9, Planaltina:EMBRAPA, 1998. 465p.

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Med.***,* v. 60, n. 1, p. 85-86, 1994.

ANDERSON, W. R. Byrsonimoideae, a new sub-family of Malpighiaceae. **Biotropica** v. 7, p. 5-18. 1977.

ANDERSON, W. R. Byrsonimoideae, a new subfamily of the Malpighiaceae. **Leandra**. v. 7, p. 5-18. 1979.

ANDERSON, C. A monograph of the genus *Peixotoa* (Malpighiaceae). Contribution from the University of Michigan Herbarium v. 15. p. 1-92, 1982.

ANDERSON, W. R. The origin of the Malpighiaceae – The evidence from morphology. **Mem. N. J. Bot. Gard.** v. 64, p. 210-224. 1990.

ANDRADE, F. J. L.; MELO DINIZ, M. F. F.; OLIVEIRA, R. A. G. **Plantas que atuam no trato respiratório**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994 Fortaleza, Ceará. Anais. Universidade Federal do Ceará.

ARANTES, V. P. **Estudo da atividade antimicobacteriana de extratos vegetais do cerrado brasileiro**. Araraquara, 2005. Dissertação (Mestrado). Área de concentração: Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara. 75p.

ARAÚJO, A. R. B. **Morfologia de frutos, sementes e plântulas, tipo e aspectos da germinação de algumas espécies de Malpighiaceae**. Campinas, 1994. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, São Paulo. 95p.

ARECHABALA, B.; COIFFARD, C.; RIVALLAND, P.; COIFFARD, L.J.; de ROECK-HOLTZHAUER, Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **J. of Appl. Toxicol**., v. 19, p. 163-165, 1999.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20 p. (mimeogr).

ATTALA, N. C. A. **Morfoanatomia da lâmina foliar, estrutura e histoquímica das glândulas foliares e calicinais em espécies de Malpighiaceae de cerrado**. Botucatu, 2004. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, São Paulo. 85p.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil. v.2. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

BELICKAS, T. A saúde que vem das plantas.**Jornal da Unesp**, n. 89, p. 6-7, 1994.

BERGER, I., BARRIENTOS, A. C.; CACERES, A., HERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol**., v. 62, p. 107–115, 1998.

BOUIC, P .J. D. Sterols and sterolins: new drugs for the immune system? **Drug Discov. Today**, Londres, v.7, n.14,p.775-778, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA. Disponível em <URL:http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/ecossistemas/cerrado/index_html/mostra_documento> [20/10/2004].

BRASIL. Ministério da Saúde. WHO. 2007. World Health Organization. Disponível em <URL: http://www.who.int/health-topics/tb.htm> [01/05/2006].

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. São Paulo: Ed. Da Unicamp, 1994. p.122.

CACERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. Plants used in guatemala for the treatment of respiratory-diseases. In: Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **J. Ethnopharmacol**., v. 39, n.1, p. 77-82, 1993.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Q. J. Microsc. Sci.**, v.88, p.383-392, 1947.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: R.A. YUNES E J.B. CALIXTO. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Editora Argos. 2001. p. 297-315.

CANTRELL, C. L.; LU, T., FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H.; ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S.G.; Antimycobacterial cycloartanes from *Borrichia frutescens*. **J. Nat. Prod.**, v.59, p.1131-1136, 1996.

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids**. Planta Med.**, v. 67, p. 1-10, 2001.

CAPPELLETTI, E. M., CANIATO, R.; APPENDINO, G. Localization of the cytotoxic hydroperoxyeudesmanolides in *Artemisia umbelliformis*. **Bioch. System. Ecol**., v.14, p. 183-190, 1986.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **J. Ethnopharmacol**., v., 106, p. 82-89, 2006.

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

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; LIU, M. C.; LIN, C. C. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p. 194-198, 2003.

CHUNG, K. T.; LU, Z.;CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bactéria. **Food Chem. Toxicol.,** v. 36, p. 1053-1060, 1998.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium.* **Antimicrob. Agents Chemother.** , v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge, University Press, 2v. 1976.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents**. Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, G.M.A.; VIANA, G.S.B.; RAO, V.S.N.; MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M.C.F.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Cróton* e *Psidium*. IN: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL,13, 1994. Fortaleza, Ceará, Anais: Universidade Federal do Ceará.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle dês inclusions lipidique et terpeniques dês pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires dês Séances de l' Academie dês Sciences Paris. Série D**, v. 258, p.1338-1340, 1964.

DE SOUZA, A. O.; ALDERETE, J. B.; SCHIMIDT, F.; SATO, D. N.; DURAN, N. Structure-activity relationship analysis of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmethanone derivatives and activity against *Mycobacterium tuberculosis.* **Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 12, p. 1025-1029, 1999.

DE SOUZA, A. O.; SANTOS Jr, R. R.; FERREIRA-JULIO, J. F.; RODRIGUEZ, J. A.; MELHO, P. S.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Synthesis, antimycobacterial activities and cytotoxicity on V79 of 3-[4'-Y-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N,dimethyl-3-(4-X-phenyl)-propen-1-amine derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 843-850, 2001a.

DE SOUZA, A. O.; SANTOS JR, R. R.; MELO, P. S.; ALDERETE, J. B.; De CONTI, R.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Antimycobacterial activity of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmethanone derivatives, and their acute toxicity and cytotoxicity. **Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 871-874, 2001b.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

DE SOUZA, A. O.; HEMERLY, F. P.; BUSOLLO, A. C.; MELO, P. S.; MACHADO, G. M.; MIRANDA, C. C.; SANTA-RITA, R. M.; HAUN, M.; LEON, L. L.; SATO, D. N.; De CASTRO, S. L.; DURAN, N. 3-[4'-Bromo-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N,dimethyl-3-(2-thienyl)2-propen-1-amine: synthesis, cytotoxicity and leishmanicidal, trypanocidal and antimycobacterial activities. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 629-637, 2002.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgar Blüncher, p. 294. 1974.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2 ed. New York: John Wileys and Sons, 1977. 550p.

ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona: Omega, 1985. 779 p.

FAHN, A. **Anatomia vegetal**. Madrid: H. Blume. 1978. 643p.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press. 1979. p.302

FALZARI, K.; ZHU, Z.; PAN, D.; LIU, H.; HONGMANEE, P.; FRANZBLAU, S.G. *In vitro* and *in vivo* activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 49, p. 1447–1454, 2005.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Aramanthaceae). **Acta Bot. Bras.** v.19, p. 377-390. 2005.

FELÍCIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*, **Arq. Inst. Biol.,** v.62, n. 1,2, p.91-92, 1995.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie,** v. 16, p. 92-96, 1968.

FIELDS, R.D.; LANCASTER, M.V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. **Am. Biotechnol. Lab.,** v.11, p.48-50, 1993.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

FJELL, I. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda neriifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). **Nordic J. Bot**. v. 3. p.383-392. 1983.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M.B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; QUENZER, V.K.; FEERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technologiy MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson e Cie, 1968. 1113p.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique.** Gauthier – Paris, Villars. 1969-1970. 2v.

GATES, B. Banisteriopsis, diploterys (Malpighiaceae). **Flora Neotropica.** v. 30, p. 1-237, 1982.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**. v. 39, p. 635–643, 1995.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry,** v.10, p.2475-2485, 1971.

GHOUSE, A. K. M.; YUNUS, M. Preparation of epidermal peels from leaves of gymnosperms by treatment with hot, 60% HNO_3. **Stain Technol**. v. 47, p. 322-324, 1972.

GIULIETTI, A.M. *Byrsonima* do Distrito Federal. In: III Simpósio sobre o Cerrado. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p.133-149, 1971.

GOTTLIEB, O.R.; HENRIQUES MENDES, P.; TAVEIRA MAGALHÃES, M. Triterpenoids from *Byrsonima vebascifolia*. **Phytochemistry**. v.14, n.5-6, p.1456-1456, 1975.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

HARBORNE, J.B. The evolution of flavonoid pigments in plants. In: T. Swain (ed.). **Comparative Phytochemistry**. London: Academic Press. p. 271-295. 1966.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technol**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? **Current Top Med Chem,** v. 3, p. 141–154. 2003.

HERNÁNDEZ, Z.N.J., HERNÁNDEZ, L.R., CATALÁN, C.A.N., GEDRIS, T.E. & HERZ, W. Guaianolides and germacradienolides from *Stevia sanguinea.* **Phytochemistry.,** v. 46, p. 721-727, 1997.

HIGUCHI, C.T.; VILEGAS, W.; SATO, D.N.; FERNANDES, W.O; SANNOMIYA, M.; LEITE, C.Q.F. **Antimycobacterial activity of *Byrsonima spp*. leaves extracts**. Campinas: ISMAP, 2004. 3p.

JANUÁRIO, A. H.; FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408p.

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

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics: A phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates. Publishers, 1999. 576p.

KEATING, R.C. Leaf histology and its contribution to relationships in the Myrtales. **Annals Missouri Botanical Garden**. v. 71, p.801-823, 1984.

KELSEY, R.G. AND F. SHAFIZADEH. Glandular trichomes and sesquiterpene lactones of *Artemisia nova* (Asteraceae). **Biochem. Syst Ecol.** v. 8, p. 371-377, 1980.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, v.1,1997, p.198.

KRIVENKO, V.V.; POTEBNIA, G.P.; LOIKO, V.V. Experience in treating digestive organ diseases with medicinal plants. **Vrach Delo**, v. 3, p. 76-78, 1989.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, São Carlos. 2000. 531p.

LASKOWSKI, L.; BAUTISTA, D. Características anatómicas de raíces adventicias en estacas de semeruco (*Malpighia emarginata* DC) tratadas con ácido indolbutírico. **Bioagro** v. 11, p. 88-96, 1999.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2520-2525, 2003.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR I.; RAVID U.; PUTIEVSKY E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., Poaceae). **Ann. Bot.** v. 81, p. 35-39, 1998.

LOPEZ, A., HUDSON, J.B., TOWERS, G.H.N.,. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** v. 77, p. 189–196. 2001.

LORENZO, E. Sobre la inflorescência, morfologia floral y embriologia de *Janusia guaranitica* (Malpighiaceae). **Kurtziana.** v. 14, p. 101-124. 1981.

MACE, M.E.; BELL, A.A.;STIPANOVIC, R.D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin percursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technol.**, v. 23, p. 99-108, 1948.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P. Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla.* **Quim. Nova***.* v.22, n.2, p. 185-188, 1999.

MENDES, M.M.; GAZARINI, L.C.; RODRIGUES, M.L.; Acclimation of Myrtus communis to contrasting Mediterranean light environments - effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. **Environ. Exp. Bot.** v.45, n.2, p.165-178, 2001.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA, M. C.; REZENDE, A. R.; FILGUIERAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M, ALMEIDA, S. P., (Eds.). **Cerrado ambiente e flora**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 286-556. 1998.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950. 724p.

METCALFE, C. R. Secreted mineral substances. In: Metcalfe, C.R.; L. Chalk. **Anatomy of the Dicotiledons**. Clarendon Press: Oxford, 1989. v.2.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O G. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** São Paulo: Probe, 2000.

MYERS, B.J.; R. H. ROBICHAUX, R.H.; UNWIN, G.L.; CRAIG, I.E. Leaf water relations and anatomy of a tropical rainforest tree species vary with crown position. **Oecologia**, Berlim, v. 74, p. 81-85, 1987.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Enr. J. Biochem**., v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T.; Does the photosynthetic light-acclimation need changes in leaf anatomy? **Plant Cell Environ.**, v. 26, n. 4, p. 505-509, 2003

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 7017-1032, 2004.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 45, p. 1943–1946. 2001.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**: preparative and optical technology. 4th ed. Longman Group, 1980. v.2.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; SAMALA, R.; CHEN, P.; GEARHART, J.; EINCK, L.; NACY, C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **J Antimicrob Chemother.**, v. 56, p. 968-974, 2005.

RASTRELLI. L.; DETOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A; SARAVIA, A; DE SIMONE, F.; Glicolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**., v. 45, n. 4, p. 647-650, 1997.

RANDO, D. G.; SATO, D.N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C.Q.F.; Do AMARAL, A. T..; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 557-560, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RIBEIRO, J.E.L.S., HOPKINS, M.J.G., VICENTINI, A., SOTHERS, C.A., COSTA, M.A.S., BRITO, J.M., SOUZA, M.A.D., MARTINS, L.H.P., LOHMANN, L.G., ASSUNÇÃO, P.A.C.L., PEREIRA, E.C., SILVA, C.F., MESQUITA, M.R. & PROCÓPIO, L.C. Floresta da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Inpa, Manaus, p. 505-511. 1999.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo, Editorial Premier. 1997. 372p.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

RODRIGUES, M.A.V.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; ALVES, S.L.; SOUZA, M.P.M.; KIPNIS, A.; SERAFINI, A.B. Identificação e teste de susceptibilidade a drogas de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes provenientes de hospital público de referência, Goiânia/GO. **Ver. Bras. Anal. Clinicas,** v. 35, n. 2, p.59-62, 2003.

RUZIN, S.E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York: Oxford University Press, 1999. 322p.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; COELHO, R.G.; SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, S.A.R.M.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). J. **Chromatogr**., v. 1035; p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; DA SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; DOS SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, S.A.R.M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from Byrsonima crassa leaves extracts. **J. Ethnopharmacol**., v. 97, p. 1-6, 2005.

SATO, D.N. **Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.** São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 86p.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da luciferase**. Araraquara, 2003. Tese (Doutorado). Instituto de Química, UNESP, São Paulo. 76p.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SILVA, S. ***Frutas Brasil Frutas*, empresa das artes**. São Paulo: Edições Artísticas, 1991. 166p.

SILVA, S.R.; SILVA, A.P.; MUNHOZ, C.B.; SILVA JR.; M.C.; MEDEIROS, M.B.; (Eds.). **Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. WWF, Brasilia. 2001.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

SINGH, B. Development and structure of Angiosperm seed - I. **Bull. Nat. Bot.Gard.**, v. 89, p.1-115, 1964.

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

STEPHENS, C. E.; TANIOUS, F.; KIM, S; WILSON, W. D.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; FRANZBLAU, S. G.; BOYKIN, D. W. Diguanidino and "reversed"diguanidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 11, p. 1741-1748, 2001.

SUBRAMANIAN, R. B.; ARUMUGASAMY, K.; INAMDAR, J. A. Studies in the secretory gland of *Hiptage sericea* (Malpighiaceae). **Nord. J. Bot.** v. 10. p. 57–62, 1990**.**

SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids.** New York: Elsevier Scientific Publishing, 1983. p. 276.

SWAIN, T. Tanins and lignins. *In* Herbivores: their interaction with secondary plant metabolities (G.A. Rosenthal & D.H. Janzen, eds.). New York, **Academic Press**, p.657-674. 1979.

TEIXEIRA, L.A.G.; MACHADO, I.C. Pollination and reproductive system of *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae*).* **Acta Bot. Bras**, v.14, n. 03, p. 347-357, 2000.

TOSSI, Z.; ELLNER, J. J.H. Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Front Biosci**. v. 25, n. 3, p. 133-140, 1998.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**, 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

ULUSOY, N. Synthesis and antituberculosis activity of cycloalkyllidenehydrazide and 4-aza-1-thiaspiro[4.5]decan-3-one derivatives of imidazo[2,1-b]thiazole. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 7, p. 565-571, 2002.

VEJA, A.S.; CASTRO, M.A.; ANDERSON, W.R. Occurence and phylogenetic significance of látex in the Malpighiaceae. **Am. J. Bot.,** v. 11, p. 1725-1729, 1989.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001, Cap. 1-2. p. 48-99.

ZDERO, C., BOHLMANN, F. & NIEMEYER, H.M. Guaianolides and other constituents from *Stevia* species. **Phytochemistry,** v. 30, p. 693-695, 1991.

ZUANAZZI, J.A.S. 2001. Flavonóides. In: C.M.O. SIMÕES; E.P. SCHENKEL; G. GOSMANN; J.C.P. MELLO; L.A. MENTZ & P.R. PETROVICK (eds.). **Farmacognosia** – **da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre, Ed. UFRGS/ Florianópolis: Ed. da UFSC. p. 499-526.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

A N E X O

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

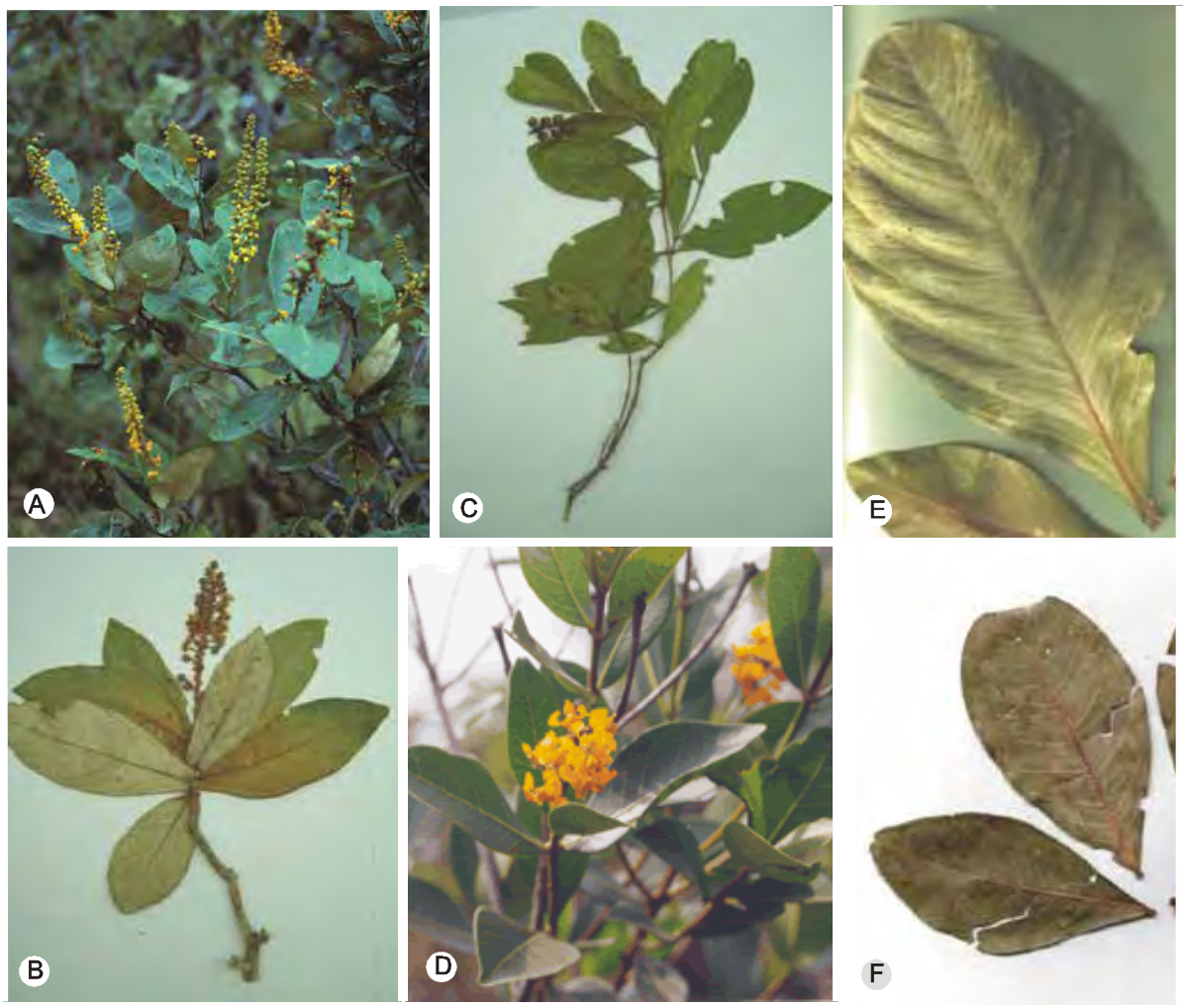


Figura 1: A: vista geral de *Byrsonima basiloba*; B: folhas de *Byrsonima basiloba*; C: folhas de *Byrsonima intermedia*; D: vista geral de *Byrsonima intermedia*; E: folhas de *Byrsonima crassa*; F: folhas de *Byrsonima fagifolia*.

created using
BCL easyPDF
Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 22/2005 – Animais em Pesquisa
Interessado: CÉLIO TAKASHI HIGUCHI
Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento
Projeto: ESTUDO DE *BYRSONIMA SPP* QUANTO A MORFOLOGIA CELULAR, ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E TOXICIDADE

Parecer nº 26/2005 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo de *Byrsonima spp* quanto a morfologia celular, atividade antimicobacteriana e toxicidade", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 23 de setembro de 2005.

Profª. Drª. MARIA VIRGINIA SCARPA GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP

created using BCL easyPDF Printer Driver
Click here to purchase a license to remove this image