

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

RODOLFO MARCCHIORI SANCHEZ

**Estudo fitoquímico e Propriedades Biológicas da *Dipteryx alata* Vogel
(baru)**

Ilha Solteira

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

RODOLFO MARCCHIORI SANCHEZ

**Estudo fitoquímico e Propriedades Biológicas da *Dipteryx alata* Vogel
(baru)**

Orientadora: Prof. Dr^a Rosangela da Silva de Laurentiz

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia -
UNESP – Campus de Ilha Solteira, para obtenção do
título de Mestre em Ciência dos Materiais.
Área de conhecimento: Química dos Materiais

Ilha Solteira

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S211e Sanchez, Rodolfo Marcchiori.
Estudo fitoquímico e propriedades biológicas da *Dipteryx alata* Vogel (baru)
/ Rodolfo Marcchiori Sanchez. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2014
96 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciências dos Materiais, 2014

Orientador: Rosangela da Silva de Laurentiz
Inclui bibliografia

1. Fitoconstituintes. 2. Doenças negligenciadas. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade esquistossomicida. 5. Conteúdo fenólico. 6. Atividade leishmanicida.

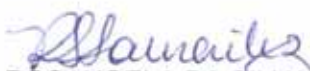
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo fitoquímico e propriedades biológicas da *Dipteryx alata* Vogel (baru)

AUTOR: RODOLFO MARCCHIORI SANCHEZ

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Materiais ,
Área: QUÍMICA DOS MATERIAIS, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. JEAN RICHARD DASNOY MARINHO
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Profa. Dra. LIZANDRA GUIDI MAGALHÃES
Departamento de Química / Universidade de Franca

Data da realização: 08 de julho de 2014.

DEDICO

Aos meus pais, irmãos e minha namorada, exemplos de compreensão, força e alicerce, responsáveis pelo meu crescimento intelectual e maior ainda meu crescimento humano, para que sempre se lembrem de que fizeram parte de mais um degrau.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus onipotente, absoluto e infinito, pela força dada, por me fornecer a capacidade de aprender, conhecer e dividir meus conhecimentos e experiências.

Aos meus pais Izaias e Edineuza, pela vida dada a mim, pelo carinho, amor e exemplos de vida que sigo e sempre seguirei, ensinando-me que o caminho do bem sempre foi a humildade e a honestidade com meus princípios, modeladores de minha formação cultural, profissional e espiritual.

Ao meu irmão Humberto, verdadeiro companheiro, que por um olhar simples, sei que estará sempre ali ao meu amparo. Ao meu irmão Luiz Augusto, obrigado por fazer parte de nossa família, que veja que através desta longa caminhada, serão colhidos bons frutos, que o único caminho sempre será a educação e o trabalho.

À minha namorada Lilian. Obrigado por muitas vezes compreender que não eu estaria presente em muitos momentos, por inúmeras vezes o trabalho e o estudo tomavam o lugar de uma simples conversa nossa. Obrigado por compartilhar, compreender e motivar sempre.

Aos meus avós e tios que saibam que o caráter que adquiri é espelho do vosso, que sempre me mostraram que a humildade e a simplicidade fazem de uma criança um indivíduo de caráter.

A minha orientadora Dr^a Rosangela da Silva de Laurentiz, agradeço a paciência, aprendizado conhecimento compartilhado e sinceridade, que valido muito.

Agradeço aos professores Drs. Keizo Yukimitu, Newton L. D. Filho, Rafael Zadarosny, Jean R. D. Marinho, Márcia R. Auoda, Enes F. Júnior pelo conhecimento e estrutura laboratorial compartilhado que foi de grande colaboração para conclusão do trabalho.

Aos companheiros de disciplinas e laboratórios por dividir momentos de alegrias e dificuldades, conhecimentos e ideais.

Aos técnicos de laboratório, Simone Hiraki, Funcionários da UNESP, por terem feito parte deste projeto para que o trabalho fosse concluído.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência
é o período mais difícil da vida de alguém”.

Dalai Lama

RESUMO

Devido à importância do bioma cerrado, inclusive para a manutenção de outros biomas interligados, nas últimas décadas pesquisadores das mais variadas áreas vêm propondo alternativas de uso das espécies do cerrado como forma de preservar a fauna e flora local. Uma das formas para auxiliar na preservação dessas espécies está o estudo sobre constituintes fitoquímicos e propriedades medicinais de plantas desse bioma usadas na medicina tradicional. O objetivo desse estudo é a confirmação do potencial terapêutico bem como da toxicidade dessas plantas usadas na medicina tradicional local, bem como estudar o potencial medicinal de plantas ainda não investigadas. A espécie *Dipteryx alata* Vogel (baru) é uma das espécies nativas do cerrado que apresenta grande potencial nutricional e farmacológico a ser investigado, pois segundo a medicina tradicional ela é utilizada no combate à bronquite, diarreia, disenteria, dor, dor de garganta, gripe, picada de cobra, tosse e como cicatrizante, entretanto, apenas a atividade contra picada de cobra foi cientificamente comprovada.

Desta forma, na tentativa de aliar o valor nutricional da polpa dos frutos do baru a um possível efeito terapêutico, foram realizados estudos sobre os fitoconstituintes presentes nesta parte da planta, a fim de guiar estudos sobre as possíveis propriedades biológicas valorizando o fruto como um alimento nutracêutico, em áreas de ocorrência da planta que apresentam elevados índices de doenças negligenciadas.

Os resultados dos estudos fitoquímicos mostraram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos e saponinas em consideráveis concentrações e antraquinonas em baixa concentração. A presença desses fitoconstituintes forneceu suporte para a realização de ensaios para a determinação do potencial antiparasitário. A atividade antimicrobiana também foi avaliada devido ao uso medicinal da planta para infecções do trato urinário. Além disso, a citotoxicidade da polpa dos frutos foi também avaliada sobre células LLC-MK₂ a fim de dar suporte quanto ao uso seguro do fruto.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando as cepas bacterianas *Proteus sp.*, *E.coli*, *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.*, removidas de amostras de urinas contaminadas, entretanto não houve atividade antibacteriana da polpa do baru sobre as cepas avaliadas.

A atividade antiparasitária foi avaliada a partir de ensaios para determinação da atividade tripanocida, leishmanicida e esquistossomicida do extrato bruto. Dentre essas atividades antiparasitárias avaliadas o extrato apresentou resultados moderados somente para

a avaliação esquistossomicida sendo inativo para as outras duas. O extrato bruto apresentou atividade esquistossomicida sobre o *S. mansoni* com 87% de mortalidade sobre esquistossômulos e 100% sobre os vermes adultos. O extrato bruto foi então particionado com outros solventes e novamente submetido ao ensaio esquistossomicida usando vermes adultos, entretanto nenhuma das frações apresentou atividade. Desta forma, esses resultados mostraram que a atividade esquistossomicida apresentada pelo extrato bruto é provavelmente devido ao sinergismo entre os fitoconstituintes presentes na polpa do fruto. Esses ensaios *in vitro*, apesar de serem preliminares, fornecem suporte para a realização de estudos *in vivo* a fim de comprovar o potencial esquistossomicida da polpa.

O extrato da polpa apresentou excelente atividade antioxidante comparável ao da vitamina C com $IC_{50} = 0,082\mu\text{g/mL}$. Esta atividade antioxidante provavelmente está relacionada ao alto teor de compostos fenólicos apresentado pela polpa 568 mg/EAG por 100g de polpa úmida.

Em conclusão, o estudo mostrou que a polpa dos frutos do baru é rica em fitoconstituintes, com potencial esquistossomicida, *in vitro*, não apresenta citotoxicidade considerável, possui uma alta concentração de compostos fenólicos e excelente atividade antioxidante. Esses resultados podem contribuir para o maior conhecimento da fruta e suas propriedades elevando o consumo e com isso ajudando na preservação da espécie.

Palavras chaves – Cerrado. *Dipteryx alata* Vogel. Fitoconstituintes. Doenças negligenciadas. Atividade antioxidante. Conteúdo fenólico. Atividade esquistossomicida e antimicrobiana.

ABSTRACT

Due to the importance of the cerrado biome, including the maintenance of other interconnected biomes in recent decade's researchers from different fields have proposed alternative use of the cerrado species as a way to preserve the local fauna and flora. One way to help the preservation of species is the study of the medicinal properties of plants of this biome used in traditional medicine. The objective of these studies is to confirm the therapeutic potential and the toxicity of these plants used in traditional local medicine as well as studying the medicinal potential of plants yet to be investigated. The specie *Dipteryx alata* Vogel (baru) is a native species of the cerrado with great nutritional and pharmacological potential to be investigated, because according to traditional medicine it is used to combat bronchitis, diarrhea, dysentery, pain, sore throat, flu, snakebite, cough and as cicatrizant, however, only the activity against snakebite has been scientifically proven.

Therefore, trying to combine the nutritional value of baru fruits pulp to the potential therapeutic effect, studies on the determination of phytochemicals present were performed to guide studies on possible biological properties valuing the fruit as a nutraceutical food in areas of occurrence of the plant that show high negligible diseases indices.

The results of the phytochemical studies showed the presence of alkaloids, tannins, flavonoids, saponins and cardiotoxic glycosides in considerable amounts and anthraquinones at low concentration. The presence of these phytochemicals has given support for conducting tests to determine the antiparasitic potential. Antimicrobial activity was also evaluated due to the medicinal use of the plant for the urinary tract infections. In addition, the cytotoxicity of the pulp was also evaluated on LLC- MK₂ cells to support the safe use of the fruit.

Antimicrobial assays were performed using the bacterial strains *Proteus sp.*, *E. coli*, *Enterobacter sp.* and *Staphylococcus sp.* obtained from contaminated urine samples, however the baru pulp showed no antibacterial active on these strains at the concentrations evaluated.

The antiparasitic activity of the crude extract was evaluated using tests for trypanocidal, antileishmanial and schistosomicidal activity. Among these antiparasitic activities evaluated the extract showed moderated results only for schistosomicidal evaluation being inactive for the other two. The crude extract showed schistosomicidal activity on *S. mansoni* with 87% mortality against schistosomules and 100% against the adult worms.

The crude extract was then partitioned with other solvents and again subjected to the schistosomicidal test using adult worms, however none of the fractions showed activity. Therefore, these results showed that the schistosomicidal activity presented by crude extract is probably due to the synergism between the phytochemicals present in the pulp of the fruit.

These *in vitro* assays although preliminary, provide support for conducting *in vivo* studies in order to confirm the schistosomicidal potential of the pulp.

The pulp extract displayed excellent antioxidant activity comparable to vitamin C with $IC_{50} = 0.082$ mg / mL. This antioxidant activity is probably related to the high amount of phenolic compounds presented by the pulp of 568 mg / GAE per 100 g of wet pulp.

In conclusion, the study showed that the baru fruit pulp is rich in phytochemicals with schistosomicidal potential *in vitro*, no present significant toxicity, has a high concentration of phenolic compounds and excellent antioxidant activity. These results may contribute to a better understanding of the fruit and its properties contributing to the increase in consumption and thus help in the preservation of the species.

Keywords – Savannah. *Dipteryx alata* Vogel. Phytochemicals. negligible diseases. Antioxidant activity. Phenolic content. Antimicrobial and schistosomicidal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Área de abrangência do cerrado brasileiro.....	18
Figura 2 – Foto digital da espécie adulta de <i>Dipteryx alata</i> Vogel (baru) Município Aparecida D'Oeste – SP.....	20
Figura 3 – Frutos da espécie <i>Dipteryx alata</i> Vogel (baru) ainda verdes.....	21
Figura 4 – Frutos maduros e amêndoa exposta de <i>Dipteryx alata</i> Vogel (baru).....	21
Figura 5 - Esqueleto estrutural base dos principais metabólitos secundários (fitoconstituintes) produzidos pelas plantas aos quais estão correlacionadas propriedades biológicas.....	27
Figura 6 - Ciclo de vida do <i>Tripanossoma cruzi</i> no inseto e no homem.....	33
Figura 7 - Ciclo de vida do <i>Leishmania sp.</i> , no hospedeiro invertebrado e humano.....	34
Figura 8 – Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.....	35
Figura 9 – Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i> no homem e no caramujo.....	36
Figura 10 - Indivíduo com sintomas crônicos de esquistossomose, apresentando hepatomegalia (aumento Fígado) e esplenomegalia (aumento do Baço).....	37
Figura 11 - Esqueleto químico do fármaco Praziquantel (A) e esqueleto químico do fármaco Oxamniquina (B).....	38
Figura 12 - Esqueletos químicos dos principais grupos de flavonoides.....	41
Figura 13- Foto ampliada de esquistossômulo (quadrante em negrito).....	51
Figura 14 - Foto ampliada de casal de vermes. A- fêmea B-macho.....	52
Figura 15 - Teste positivo para a presença de alcaloides (A-E), esteróides e triterpenos (F), glicosídeos cardiotônicos (G), flavonoides (H - I), saponinas (J), taninos (L-M) e antraquinonas (N-O).....	58
Figura 16 – Representação da reação da redução do MTT em cristais de formazan.....	59
Figura 17 - Gráfico referente aos resultados dos ensaios de citotoxicidade celular. % de viabilidade celular x concentração do extrato.....	61
Figura 18 - Resultado da avaliação de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de <i>S.mansoni</i>	65
Figura 19 – Resultado de IC ₅₀ da avaliação do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de <i>S.mansoni</i>	67
Figura 20 – Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de vermes adultos de <i>S.mansoni</i>	69

Figura 21 – Representação IC ₅₀ do efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de vermes adultos de <i>S.mansoni</i>	60
Figura 22 – Gráfico de absorvância x concentração do ácido gálico. Determinação da equação da reta.....	75
Figura 23 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico em ensaio de DPPH.....	76
Figura 24 – Atividade antioxidante do extrato da polpa fresca de baru em ensaio de DPPH..	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Usos do fruto do baru.....	22
Tabela 2- Composição centesimal aproximada (base seca) da polpa e sementes do baru.....	23
Tabela 3- Composição em aminoácidos (g / 16GN*) da polpa e da semente do baru.....	25
Tabela 4 - Principais propriedades biológicas de fitoconstituintes isolados de plantas.....	29
Tabela 5 - Resultado da prospecção fitoquímica para a polpa dos frutos do baru.....	57
Tabela 6 - Resultado da avaliação da citotoxicidade do extrato sobre células LLC- MK ₂ . Viabilidade celular (%) x concentração do extrato (µg/mL).....	60
Tabela 7 - Resultados dos ensaios antimicrobianos do extrato hidroalcoólico da polpa de baru.....	62
Tabela 8- Resultado da avaliação da atividade tripanocida do extrato e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	64
Tabela 9-Resultado da avaliação da atividade leishmanicida do extrato sob formas promastigotas do <i>L.amazonensis</i>	64
Tabela 10 - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de <i>S.mansoni</i>	66
Tabela 11 – Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a motilidade de vermes adultos de <i>S.mansoni</i>	68
Tabela 12 – Resultados obtidos da avaliação da fração hexânica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do <i>S. mansoni</i>	71
Tabela 13 – Resultados obtidos da avaliação da fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do <i>S. mansoni</i>	72
Tabela 14 – Resultados obtidos da avaliação da fração butanólica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do <i>S. mansoni</i>	73
Tabela 15 – Resultados das análises de polifenóis totais na amostra de baru (polpa úmida)...	75
Tabela 16 – Resultados das medidas de absorvância do ácido ascórbico e % de inibição do radical no ensaio de DPPH (Atividade antioxidante).....	76
Tabela 17 – Resultados das análises da absorvância da polpa dos frutos em ensaios de DPPH.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitro
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BrMTT	brometo de 3-(-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
cm	Centímetros
DMSO	Dimeltilsulfóxido
DPPH	di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium
EROs	Espécies reativas de oxigênio
et al.	et alli (significa e outros)
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
g	Gramas
g / 16GN	Cálculo da quantidade de aminoácido: g de aminoácido por 16 gramas de Nitrogênio
h	Horas
HEPES	(N-(2-hidroetil) piperazina-N-(2-ácido etanosulfônico) – (meio de cultura celular)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
Kcal	Quilocaloria
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LE	Luiz Evangelista
LLC- MK ₂	Linhagem de células de Rim de macaco <i>Rhesus</i>
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MeOH	metanol
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
mg/mL	Miligramas/ mililitros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	Páginas
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>S. mansoni</i>	<i>Shistosoma mansoni</i>
SI	Sem Inibição
U/mL	Unidade por mililitro
UFC	Unidade formadora de colônia
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Cu	Cobre
K	Potássio
L	Litro
Mg	Magnésio
P	Fósforo
Zn	Zinco
CO ₂	Dióxido de Carbono
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Bioma cerrado.....	17
1.2 Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vogel).....	19
1.3 Fitoconstituintes.....	27
1.4 Citotoxicidade.....	29
1.5 Doenças negligenciadas.....	31
1.5.1 Doença de Chagas.....	31
1.5.2 Leishmaniose.....	33
1.5.3 Esquistossomose.....	35
1.6 Atividade antioxidante.....	40
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAS E MÉTODOS	44
3.1 Reagentes, material biológico, equipamentos e materiais utilizados.....	44
3.1.1 Reagentes.....	44
3.1.2 Material biológico.....	44
3.1.3. Materiais e equipamentos.....	44
3.2 Coleta dos frutos e preparo do extrato hidroalcoólico da polpa e frações.....	45
3.3 Prospecção de constituintes fitoquímicos.....	45
3.4 Citotoxicidade sobre células de mamíferos.....	45
3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	46
3.5.1 Preparo do extrato em diferentes concentrações	46
3.5.2 Preparo dos discos para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco.....	46
3.5.3 Preparação das placas para os ensaios de atividade antimicrobiana.....	47
3.6 Atividade tripanocida	47
3.7 Atividade leishmanicida	48
3.8 Atividade esquistossomicida.....	49
3.8.1 Manutenção do ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	49
3.8.2 Obtenção dos esquistossômulos	49
3.8.3 Avaliação <i>in vitro</i> dos esquistossômulos.....	50

3.8.4 Avaliação <i>in vitro</i> frente aos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	51
3.9 Partição do extrato hidroalcoólico bruto com solventes de diferentes polaridades.....	52
3.10 Compostos fenólicos.....	53
3.10.1 Polifenóis totais.....	53
3.10.2 DPPH ensaio de eliminação de radicais.....	53
3.11 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Prospecção fitoquímica e citotoxicidade.....	55
4.2 Atividade antibacteriana.....	61
4.3 Avaliação das atividades antiparasitárias.....	63
4.4 Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante.....	74
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
GLOSSÁRIO.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioma Cerrado

As plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade há milhares de anos em busca de alívio para suas dores e cura de doenças através da ingestão direta (folhas, casca, raiz e frutos) ou pelo preparo de chás e unguentos (PETROVSKA, 2012). Muitas das plantas utilizadas para essas finalidades foram descobertas observando o comportamento dos animais que consumiam determinadas plantas que não faziam parte da sua dieta apenas em algumas ocasiões geralmente relacionadas à situação de enfermidade (HUFFMAN, 2003).

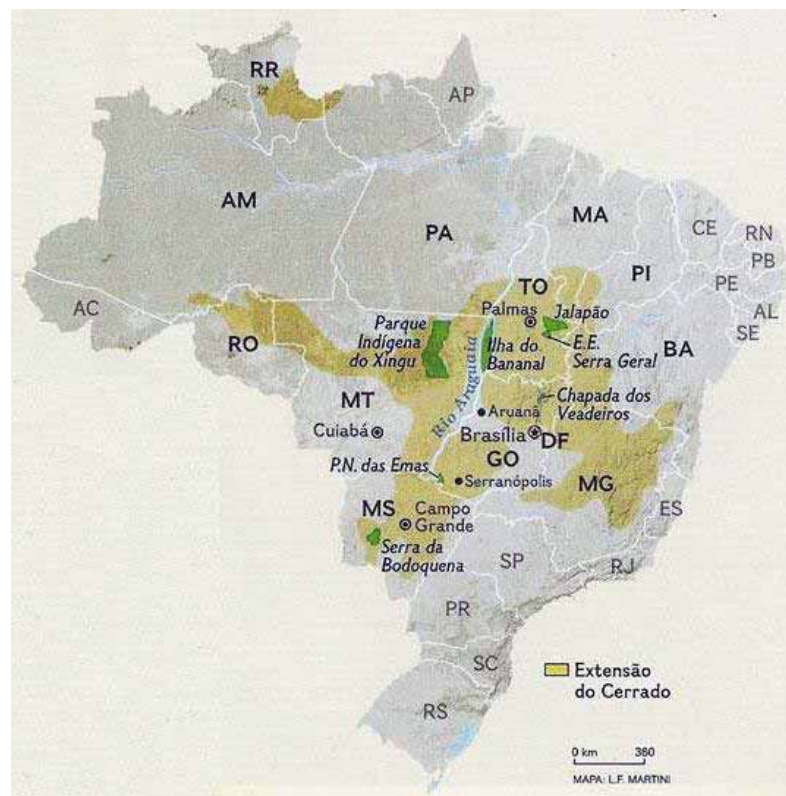
A partir dessas observações e também da sua própria investigação e experimentação o homem passou a buscar nas plantas a cura para seus males. Entretanto, não são todas as plantas que apresentam propriedades biológicas e, dentre as que possuem, muitas são tóxicas e devem ser utilizadas com cautela (GEORGE, 2011). Tanto as propriedades biológicas das plantas quanto sua toxicidade estão ligadas, diretamente à presença de metabólitos secundários. Metabólitos secundários ou metabólitos especiais são compostos orgânicos (fitoquímicos), que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta, mas sim desempenham importante papel secundário na planta atuando contra microrganismos, parasitas, outras plantas (aleloquímica) e choques mecânicos, portanto, atuando diretamente nos mecanismos de defesa da planta (BOURGAUD et al., 2001). Com base nesse papel de proteção que esses metabólitos secundários desempenham nas plantas é possível que também possam apresentar efeitos benéficos (ou não) em outros organismos. O entendimento desses efeitos benéficos ou não desses componentes fitoquímicos em outros organismos diferentes de plantas pode abrir caminho para o desenvolvimento de fármacos e fitoterápicos para uso humano e também animal (SALIM et al., 2008).

Neste sentido o cerrado brasileiro é uma fonte promissora de plantas, muito usadas na medicina tradicional e na etnobotânica. Dentre as 12 mil espécies de plantas vasculares existentes no cerrado, ainda há espécies sem qualquer estudo relacionado a esse propósito (MENDONÇA et al., 2008).

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro (primeiro bioma, Amazônia), que se estende por 1/4 do território nacional, contendo pouco mais de 200 milhões de hectares (WHO, 2002; 2006) e abrigando um rico patrimônio de recursos naturais renováveis adaptados às duras condições climáticas, edáficas e hídricas que determinam sua própria existência (MMA, 2014). Desse total, 155 milhões de hectares estão no Planalto central e 38,8

milhões de hectares no Nordeste, dos quais a maior parte (30,3 milhões) na região Meio-Norte na qual 43,3% da superfície do Maranhão são compostas de cerrado e 64,7% da área total do estado do Piauí. Existem ainda áreas de cerrado em Rondônia, Roraima, Amapá e Pará. O Estado de São Paulo, devido à localização entre a região tropical e subtropical, e por suas formas de relevo, possui biodiversidade considerada como uma das mais elevadas do país sendo importante ressaltar que floresta estacional e cerrado foram os tipos de vegetação mais devastados nesse estado, ambos atualmente exibindo menos de 10% de sua cobertura original e relativamente pouco representados em unidades de conservação, não representadas no mapa (DURIGAN et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1- Área de abrangência do Cerrado brasileiro



Fonte: Novaes, (National Geographic Brasil, 2008).

Devido à sua localização, o cerrado, compartilha espécimes com a maioria dos biomas brasileiros (floresta amazônica, caatinga e floresta atlântica), por isso possui uma biodiversidade comparável à da floresta amazônica. Foram registradas mais de 12 mil espécies de plantas no cerrado onde muitas têm ocorrências restritas a esse bioma (4.400 espécies) (MENDONÇA et al., 2008). Além dos aspectos ambientais, o cerrado tem grande

importância social. Populações que moram em áreas de cerrado sobrevivem de seus recursos naturais, incluindo etnias indígenas, geraizeiros, ribeirinhos, babaqueiras, vazanteiros e comunidades quilombolas que, juntas, fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro, e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade (MMA 2014).

Mais de 220 espécies de plantas têm uso na medicina tradicional e mais 416 podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento e proteção contra a erosão ou para criar habitat de predadores naturais de pragas. Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são regularmente consumidos pela população local e vendidos nos centros urbanos, como os frutos do Pequi (*Caryocar brasiliense*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), Mangaba (*Hancornia speciosa*), Cagaita (*Eugenia dysenterica*), Bacupari (*Salacia crassifolia*), Cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), Araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do baru (*Dipteryx alata* Vogel) (MMA, 2014).

Nas últimas décadas pesquisadores e ambientalistas vêm tentando manter a integridade do bioma cerrado através do estudo de plantas e animais mostrando a importância dessas espécies não só para esse bioma, mas para a preservação de outros biomas relacionados. A grande maioria das plantas do cerrado que apresentam uso medicinal não têm comprovação científica do seu uso e nem mesmo da sua toxicidade. Muitas plantas apesar de possuírem propriedades medicinais podem apresentar grande toxicidade, fato que muitas vezes é ignorado pela população ao considerar as plantas livres de toxicidade por serem de origem natural (VEIGA JÚNIOR et al., 2005). Desta forma, existe a necessidade de estudar o potencial terapêutico dessas plantas usadas na medicina tradicional bem como explorar outras espécies ainda sem uso medicinal.

A importância do estudo dessas espécies pode resultar no conhecimento de novas fontes de princípios ativos bem como substâncias que fornecem modelos para o planejamento de novos fármacos ou desenvolvimento de fitoterápicos, fortalecendo ainda mais a importâncias da conservação desse bioma que entre suas espécies vegetais pode conter a cura para males ainda sem tratamento eficiente como as doenças tidas como negligenciadas e a cura para o câncer.

1.2 Baru (*Dipteryx alata* Vogel)

O cerrado é uma das mais promissoras fontes de plantas com propriedades biológicas, entretanto, muitas espécies deste bioma ainda não foram exploradas quanto a esse potencial. Dentre essas espécies se encontra a *Dipteryx alata* Vogel popularmente conhecida como baru

(Figura 2), cumbaru, cumaru, castanha de burro, viagra do cerrado, coco barata ou coco feijão dependendo da região do cerrado onde ela ocorre.

Figura 2 - Foto digital da espécie adulta de *Dipteryx alata* Vogel (baru) município Aparecida D'Oeste-SP



Fonte: Próprio autor, (2014).

Esta planta é nativa do cerrado brasileiro e de faixas de transição da Mata Atlântica para o cerrado sendo bastante comum nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (RIBEIRO et al., 2006). Classificada como leguminosa arbórea pertencente à família *Leguminosae* e subfamília *Faboideae*, é uma árvore hermafrodita densa e arredondada que pode chegar até 25 metros de altura, com tronco de até 70 centímetros de diâmetro e copa medindo de 6 a 11 metros de diâmetro. Possui folhas compostas por 6 a 12 folíolos, alternos ou subpostos, de coloração verde intensa, apresenta inflorescência na panícula terminal e nas axilas das folhas superiores, com cerca de 200 a 1000 flores. Suas flores são pequenas de coloração alva e esverdeada, possui fruto tipo legume, com 5 a 7 cm de comprimento por 3 a 5 cm de diâmetro, de cor marrom-claro com a amêndoa e polpa comestível. Possui uma única semente de cor marrom-claro a marrom-escuro brilhante com forma elipsoide com cerca de 2 a 2,5 cm de comprimento (Figuras 3 e 4) (SANO et al., 2004).

Figura 3- Frutos da espécie *Dipteryx alata* Vogel (baru) ainda verdes



Fonte: Takemoto et al., (2001).

Figura 4 – Frutos maduros e amêndoa exposta de *Dipteryx alata* Vogel (baru)



Fonte: Takemoto et al., (2001).

A primeira frutificação acontece quando a planta atinge em média seis anos, entretanto, este período é influenciado pelas condições de solo e clima, a safra acontece de agosto a novembro, mas pode variar na intensidade de produção dos frutos de ano para ano (safra boa a cada dois anos). Dos frutos, que pesam em média 25 g, é possível aproveitar a polpa (39%), endocarpo (65%) e semente (5% amêndoa) como mostra a tabela 1.

O sabor da polpa dos frutos é um misto de amendoim com chocolate, sendo bastante agradável. Entretanto o uso da polpa ainda é pouco explorado, apesar de em algumas regiões ser utilizada como farinha no preparo de pães e bolos, em outras regiões somente a amêndoa é utilizada, sendo a polpa utilizada para alimentação animal ou simplesmente descartada (Tabela 1).

Tabela 1- Usos do fruto do baru

Amêndoa e subprodutos	Usos	Polpa e subprodutos	Usos
Crua	Alimentação animal Alimentação humana Medicinal/farmacêutico Agrícola (produção mudas)	<i>In natura</i>	Alimentação humana e animal Medicinal/farmacêutico
Pasta/manteiga	Alimentação humana	Desidratada	Alimentação humana e animal
Torrada, farinha e leite.	Alimentação humana	Farinha	Alimentação humana e animal Medicinal/farmacêutico
Óleo	Medicinal/farmacêutico Cosmético Industrial	Álcool/Cachaça	Consumo humano Medicinal/farmacêutico Cosmético Industrial
Torta	Alimentação humana Medicinal/farmacêutico Cosmético e industrial	Resíduos	Agrícola (adubo orgânico)

Fonte: Adaptada de (ALMEIDA et al., 1987).

Segundo Filgueiras e Silva (1975), Vallilo et al. (1990) e Takemoto et al. (2001), os frutos do baru são fonte de carboidratos, proteínas, lipídios e minerais. A polpa apresenta valor calórico de aproximadamente 300 Kcal/100g, principalmente devido a seu alto conteúdo em carboidratos (63%) com predominância de amido, fibras insolúveis e açúcares. A polpa é rica em, potássio, ferro e cobre. A semente (amêndoa) é rica em cálcio, fósforo e manganês e tem maior valor energético do que a polpa, de 480 a 560 Kcal/100g, devido ao seu alto conteúdo em lipídios (40,2%), também apresenta proteínas (26%), fibras solúveis e uma pequena quantidade de açúcares (7%) (Tabela 2).

Tabela 2- Composição centesimal aproximada (base seca) da polpa e sementes do baru

Componentes	Polpa	Semente
Proteínas	5,59	29,6
Lipídios neutros	3,40	40,2
Cinzas	2,99	2,83
Fibras totais	29,5	19,0
Solúvel	1,3	4,9
Insolúvel	28,2	14,1
Açúcares totais	20,4	7,3
Amido	38,0	0,99

Fonte: (TOGASHI; SGARBIERI, 1994).

Das amêndoas do baru é possível extrair um óleo que possui alto grau de instauração (RIBEIRO et al., 1987; 1998; 2006) com propriedades medicinais e sudoríferas, utilizado como antirreumático, aromatizante de fumo e regulador da menstruação (SILVA et al., 2001; BARROS, 2011). Esse óleo rico é em ácidos graxos insaturados (80%), sendo o componente principal o ácido oleico (ômega 9) (44,53%) seguido do linoleico (ômega 6) (31,7%), palmítico (7,16%), esteárico (5,33%) e outros, além da vitamina E (13,62 mg/100 g) (TOGASHI 1994 citado por ALMEIDA et al., 1998; VERA, et al., 2009). O óleo do baru também age como um ótimo hidratante para a pele e atenua a presença de estrias. É excelente óleo de massagem, pois é fino e de rápida absorção pela derme. Protege a pele dos raios solares e regenera a pele deformada por queimaduras devido à presença de vitamina E (α -tocoferol, o valor encontrado 5,00 mg/100 g) e ácidos graxos. Amacia e proporciona um toque aveludado a pele por mais tempo melhorando a sua elasticidade (ANDRADE, 2003).

Além do valor energético as amêndoas apresentam um alto teor de macro e microconstituintes K (811), P (317), Mg (143), Mn (9,14), Fe (5,35), Zn (1,04) e Cu (1,08), valores em mg/ 100g (VALLILO et al., 1990 citado por ALMEIDA et al., 1998; VERA, et al., 2009).

O baru é utilizado na medicina tradicional no combate à bronquite, diarreia, disenteria, dor, dor de garganta, gripe, picada de cobra, tosse e como cicatrizante (BIESKI et al., 2012). Entretanto, não há relatos na literatura que comprovem a grande maioria desses usos medicinais (SANO, 2004).

Com base no teor de ferro da amêndoa a ingestão de 200g/dia atenderia as necessidades diárias de ferro tanto de crianças como adultos do sexo masculino. Além disso, o teor proteico da amêndoa é superior ao encontrado para leguminosas comuns como ervilha, feijão comum, feijão de corda, grão de bico, castanha do Pará e castanha de caju (TOGASHI; SGARBIERI, 1994). A amêndoa é utilizada para várias finalidades, e dentre a que possui maior destaque está o consumo da castanha torrada que, em época de safra, gera renda extra a famílias que possuem a planta em seus quintais ou que fazem a coleta de árvores nativas no cerrado, pois não existem plantações comerciais da árvore (SANO et al., 2004).

A amêndoa torrada do baru substitui com equivalência a castanha de caju, servindo como ingrediente em receitas de pé-de-moleque, rapadura e paçoquinha. O fruto todo serve tanto para a para a alimentação humana quanto animal e o resíduo de seu beneficiamento ainda podem ser utilizados como adubo orgânico, ou seja, todas as partes do fruto podem ser utilizadas, proporcionando benefícios a quem utiliza o baru como fonte de renda, além do consumo pelo seu valor nutricional (ALMEIDA et al., 1987).

Na polpa foram detectados altos valores de taninos, entretanto esses valores decrescem com o amadurecimento do fruto, nas sementes não foram encontrados taninos, mas foram encontradas grandes quantidades de substâncias anti-nutricionais como fatores de inibição de tripsina, mas que perdem sua atividade quando a semente é torrada. Tanto a semente quanto a polpa apresentam significativo conteúdo em aminoácidos com destaque para as quantidades de prolina e ácido aspártico na polpa e ácido glutâmico na semente (Tabela 3) (TOGASHI; SGARBIERI, 1994).

Apesar de seu valor nutricional e paladar agradável, outra característica da planta que chama a atenção é o potencial econômico devido à qualidade da sua madeira de origem superior, resistente à chuva, sol e pragas sendo, portanto, muito procurada por madeireiros (TORRES et al., 2003). A qualidade dessa madeira é o principal fator que leva o baru a estar, em algumas regiões, na lista de espécies em extinção devido ao extrativismo predatório. Tem

alta densidade, é compacta, com alta durabilidade, elevada resistência ao apodrecimento, sendo própria para construção civil e naval. Entretanto, a recente utilização do baru para reflorestamento de áreas devastadas e de pastagens, bem como em assentamentos tem contribuído para diminuir esse quadro além de possibilitar o aumento de renda de famílias das áreas reflorestadas (LORENZI, 2002; 2006).

Tabela 3- Composição em aminoácidos (g / 16GN*) da polpa e da semente do baru

Aminoácidos	Polpa	Semente	
		Crua	Torrada
Valina	3,25	4,49	4,53
Isoleucina	2,46	3,00	2,79
Leucina	4,38	7,15	7,04
Treonina	2,35	3,04	2,95
Cisteína	0,00	0,00	0,00
Metionina	0,41	0,74	0,84
Tirosina	0,87	2,34	2,10
Fenilalanina	2,37	4,20	4,20
Histidina	1,47	2,10	1,95
Lisina	4,84	5,65	4,17
Triptofano	0,53	1,26	0,92
Ácido Aspártico	10,06	7,47	7,56
Serina	2,67	3,03	2,91
Ácido glutâmico	8,11	19,18	19,30
Prolina	17,91	4,17	4,20
Glicina	2,98	3,79	3,80
Alanina	3,84	3,64	3,67
Arginina	3,50	7,26	6,99

*Valores médios de análises em triplicata.

Fonte: (TOGASHI; SGARBIERI, 1994).

O reflorestamento usando baru aliado a um aumento do conhecimento sobre o valor nutricional de seus frutos pode contribuir para que essa espécie seja preservada, entretanto um impacto ainda maior seria aliar o uso nutricional ao potencial medicinal desses frutos. No

entanto, são poucos os estudos sobre propriedades biológicas dos frutos do baru na sua maioria relacionados ao uso da casca, óleo e folhas (RIBEIRO et al., 1987; 1998; 2006).

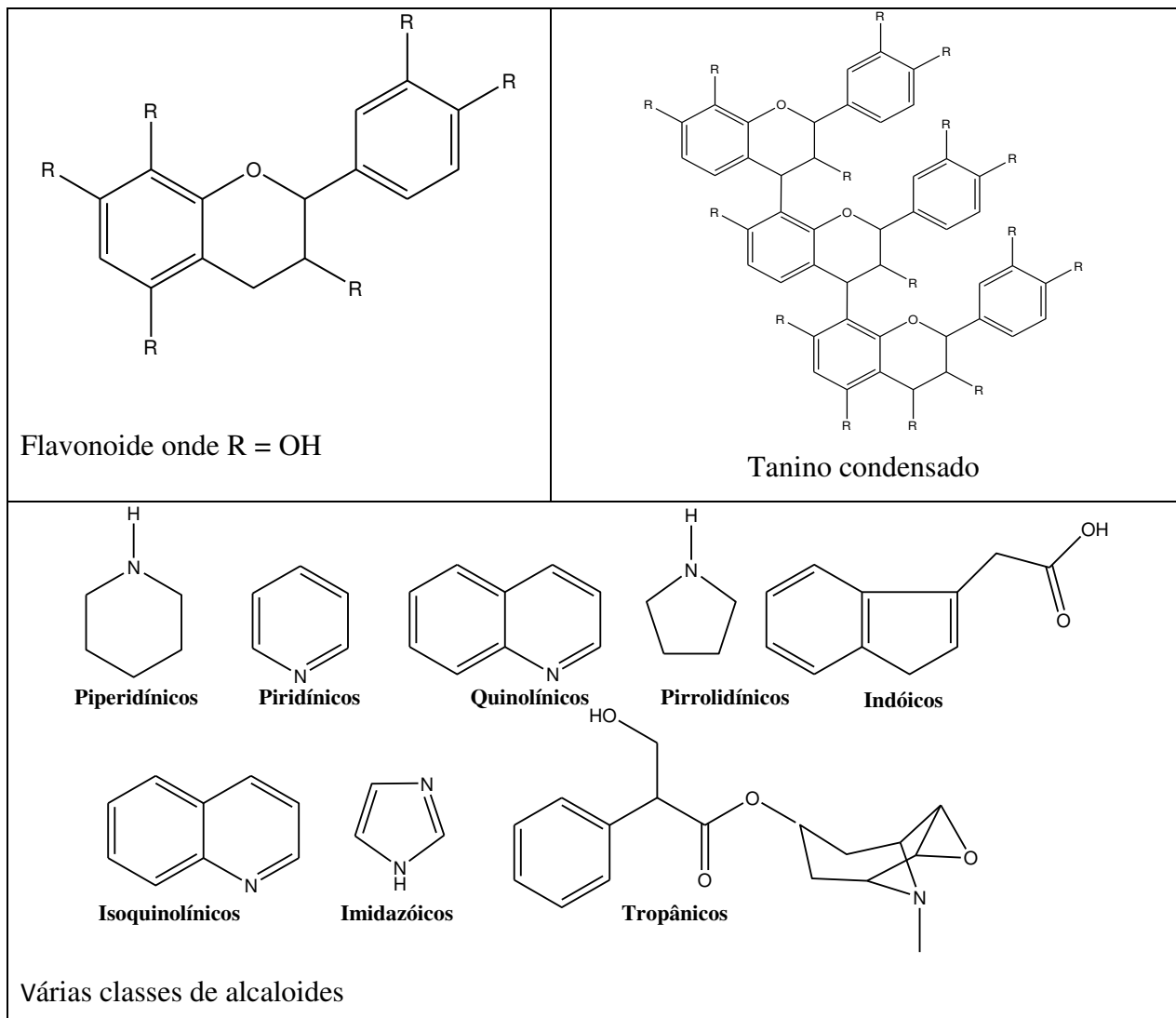
Dentre os poucos estudos científicos sobre as propriedades biológicas do Baru se encontra o estudo sobre a atividade inibidora *in vitro* do bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno da serpente *Bothrops jararacuçu* (jararaca). A neutralização dos efeitos do veneno dessa serpente foi atribuída às substâncias fenólicas e triterpenóides do tipo lupano, presentes na fração diclorometanólica do extrato hidroalcoólico da casca desta espécie (NAZATO et al., 2010; PUEBLA et al., 2010). A segurança do uso da casca do Baru foi posteriormente estudada através da administração de 0,5 mg/kg em ratas grávidas cujos fetos não apresentaram nenhum problema relativo a efeitos mutagênicos (ESTEVES -PEDRO et al., 2012).

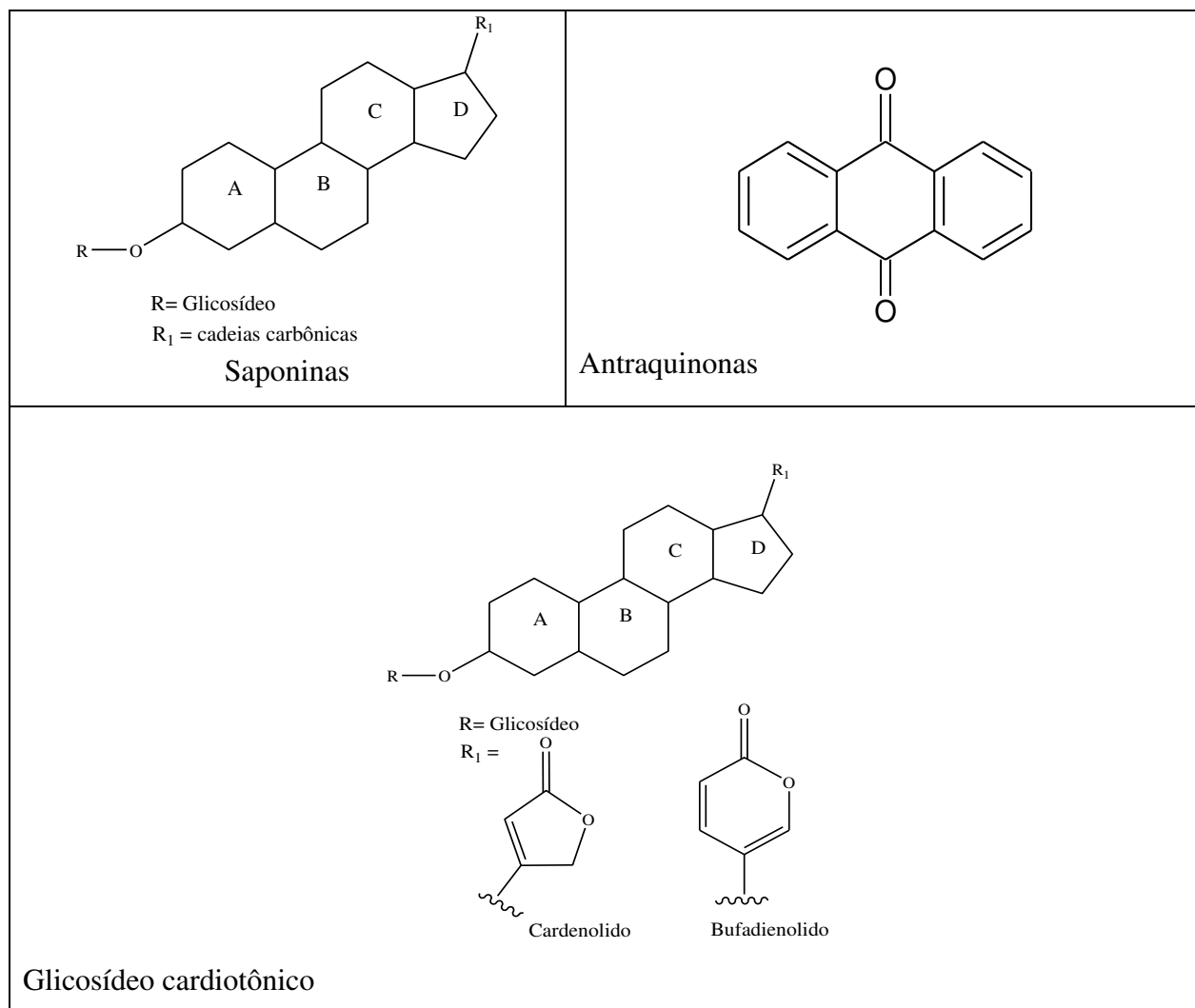
Apesar destes trabalhos sobre propriedades biológicas da casca do baru (árvore), não há dados na literatura recente sobre o uso medicinal da polpa dos frutos. O uso da casca pode também ser prejudicial à espécie, pois, a retirada incorreta da casca pode afetar a planta de tal forma que ela pode morrer. Dessa forma, é preciso valorizar a espécie *Dipteryx alata* Vogel, investigando possíveis usos medicinais principalmente aliando seu potencial nutricional a um possível efeito terapêutico, incentivando o consumo da fruta *in natura* (ou após processamento) como um alimento nutracêutico, principalmente, em regiões mais carentes e com alto índice de doenças negligenciadas que estão diretamente ligadas às péssimas condições de saneamento básico e infraestrutura, atendimento médico e acesso restrito à medicação química.

1.3 Fitoconstituintes

Fitoconstituintes são substâncias orgânicas envolvidas no metabolismo secundário das plantas (metabólitos secundários ou metabólitos especiais) que são produzidos em resposta a agentes externos como fungos, parasitas, insetos, plantas (atividade aleloquímica), fatores ambientais e de solo (nutrientes). A ação desses fatores faz com que exemplares da mesma planta crescendo em locais diferentes produzam metabólitos diferentes ou em menores quantidades o que afeta diretamente as propriedades biológicas apresentadas por uma em relação à outra. Dentre os principais metabólitos secundários produzidos pelas plantas estão os taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, antraquinonas além das substâncias terpênicas (Figura 5).

Figura 5 - Esqueleto estrutural base dos principais metabólitos secundários (fitoconstituintes) produzidos pelas plantas aos quais estão correlacionadas propriedades biológicas





Fonte: Elaborado pelo autor.

Desta forma, é possível guiar ensaios para avaliação biológica de uma determinada planta com base na natureza e quantidade de seus fitoconstituintes. Por exemplo, a atividade anti-inflamatória e analgésica de muitas plantas está relacionada à presença de substâncias fenólicas como flavonoides e polifenóis (KUMAR; PANDEY, 2013). A analgesia central (atividade analgésica sob o sistema nervoso central) apresentada por algumas plantas geralmente está associada à presença de alcaloides (WILLIAMS, 2012; FAROUK et al., 2008); e a atividade antimicrobiana à presença de substâncias fenólicas (KIM et al., 2003); (TOGASHI et al., 2010; NITIEMA et al., 2012) e terpênicas. Plantas contendo grandes quantidades de taninos (classe de polifenóis) geralmente apresentam atividade anti-helmíntica e antimicrobiana, assim como a atividade antioxidante, apresentadas pelas plantas, geralmente está relacionada à presença de compostos fenólicos como flavonoides e polifenóis (Tabela 4).

Tabela 4 - Principais propriedades biológicas de fitoconstituintes isolados de plantas

Fitoconstituente	Propriedade biológica	Referência
Flavonoides	Antioxidante, hepatoprotetora, anti-inflamatória, anticâncer.	antibacteriana, analgésica, antifúngica (KIM et al., 2003); (TOGASHI et al., 2010); (NITIEMA et al., 2012), (KUMAR; PANDEY, 2013).
Taninos	Antimicrobiana, anti-helmíntica.	antitumoral e (OKUDA; ITO, 2011); (SULAIMAN, et al., 2011); (KATIKI et al., 2013); (SALUNKHE, 1990); (DESHPANDE et al., 1986).
Saponinas	Citotoxicidade sobre células tumorais	(THAKUR et al., 2011).
Alcaloides	Anestésica, anti-inflamatória	(SOUTO et al., 2011); (WILLIAMS, 2012); (FAROUK et al., 2008); (CHEN et al., 2012); (FOSSATI et al., 2014); (DEWIK, 2002).
Antraquinonas	Antifúngica	(BARROS et al., 2009); (PRIMO, 2010).
Glicosídeos cardiotônicos	Anticâncer, Cardioativos	(KEPP et al., 2012); (PRASSAS, 2008); (BARREIRO, 2002).

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4 Citotoxicidade

Apesar das várias atividades biológicas atribuídas aos inúmeros fitoconstituintes presentes nas plantas, a eles também são atribuídos muitos dos efeitos tóxicos relacionados ao uso de plantas na medicina tradicional (MICHAELRAJ; SHARMA, 2006 citado por OOTANI et al., 2011). Entretanto, o efeito tóxico das plantas geralmente se deve a quantidade

da planta administrada. Desde muito tempo antes de Cristo o homem utilizava plantas como forma de combater seus males acreditando apenas nos seus efeitos terapêuticos sem acreditar que a mesma planta poderia lhe causar algum efeito tóxico (CUNHA et al. 2003). Na idade média o famoso médico suíço Paracelsus (viveu entre os anos de 1493 e 1541) argumentou que *“Todas as substâncias são venenos, não há uma que não seja. A dose correta é que diferencia um veneno de um remédio”*.

Apesar dessa famosa frase de Paracelsus muitos vegetais usados na medicina popular, continuam sendo usados de forma irracional ou negligente podendo desencadear efeitos tóxicos mais pronunciados do que os efeitos terapêuticos.

Desta forma, como as plantas são bastante acessíveis para o uso como medicamento, surgiu a necessidade de se estabelecer metodologias a fim de dosar a quantidade de um determinado material vegetal a ser utilizando para que o mesmo apresente o efeito terapêutico esperado, mas sem efeitos tóxicos. Com esse intuito foram desenvolvidos procedimentos e protocolos visando quantificar dosagens adequadas não só do material vegetal como de compostos isolados ou sintéticos a serem administrados a um organismo de acordo com a patogenia apresentada.

A descoberta deve ser baseada no propósito de proporcionar o efeito terapêutico com mínimos efeitos colaterais e a determinação da toxicidade é um parâmetro indispensável, para que uma nova droga seja lançada no mercado (FRANCISCO, 2010). Entretanto, existem no mercado substâncias contra o câncer altamente tóxicas ao paciente, porém neste caso a toxicidade da droga é menor do que a agressividade e devastação que a doença pode causar na ausência de tratamento (TÔRRES et al., 2005; SOUZA et al., 2000).

Estudos de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, dose letal são alguns dos mais comuns entre vários outros procedimentos relacionados ao estabelecimento da barreira que separa remédios de venenos (ROGERO et al., 2003; PITOZZI et al., 2006; MUGHAL et al, 2010)

A determinação da citotoxicidade em diferentes culturas de linhagens de células passou a ser uma das ferramentas mais rápidas e baratas a fim de determinar a segurança ou toxicidade de um possível fármaco ou fitoterápico, pois envolve células e não organismos vivos como cobaias. A citotoxicidade é determinada através da medida da viabilidade celular de células expostas ao agente em estudo (COSTA; NASCIMENTO, 2003). O resultado dessa avaliação é expresso em termos de IC_{50} que é tido como a concentração capaz de inviabilizar 50% das células. Substâncias ou extratos com valores de IC_{50} menores que 100 $\mu\text{g/mL}$ são

considerados citotóxicos e nestes a dose a ser administrada deverão ser estudadas para que o uso da planta possa ser seguro.

1.5 Doenças negligenciadas

O termo doenças negligenciadas ou doenças de populações negligenciadas é utilizado para se referir a um conjunto de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) que são endêmicas em populações de baixa renda. Em 2013 a Organização Mundial de Saúde (OMS) lista em seu portal 17 doenças negligenciadas, que afetam cerca de 1 bilhão de pessoas em todo mundo, sendo elas a Dengue, Raiva, Tracoma, Úlcera de Buruli, Sífilis, Hanseníase, doença de Chagas (Tripanossomíase Americana), Tripanossomíase Humana Africana, Cisticercose, Leishmaniose, Dracunculíase (dracunculose), Equinococose cística, Filariose Linfática, Oncocercose, Esquistossomose, Helmintíases transmitidas pelo solo e Trematodíases (infecção causadas por trematódeos).

Não obstante algumas dessas doenças não apresentarem altas taxas de mortalidade, apresentam uma elevada taxa de morbidade promovendo doenças graves, debilitando milhões de pessoas ao redor do mundo e tornando o HIV e a tuberculose mais letais. Essas doenças também são chamadas de negligenciadas devido ao pouco interesse das indústrias farmacêuticas em desenvolver medicamentos mais eficazes por se tratar de doenças que afetam populações carentes.

1.5.1 Doença de Chagas

Descrita em 1909 por Carlos Chagas, ex-pesquisador e ex-diretor do Instituto Oswaldo Cruz (que deu origem à atual FIOCRUZ), a doença de Chagas também é conhecida como tripanossomíase ou tripanossomíase americana (terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças, a NID). Diz-se tripanossomíase qualquer enfermidade causada por protozoários do gênero *Tripanosoma*, que parasitam o sangue e os tecidos de pessoas e animais (FIOCRUZ, 2013).

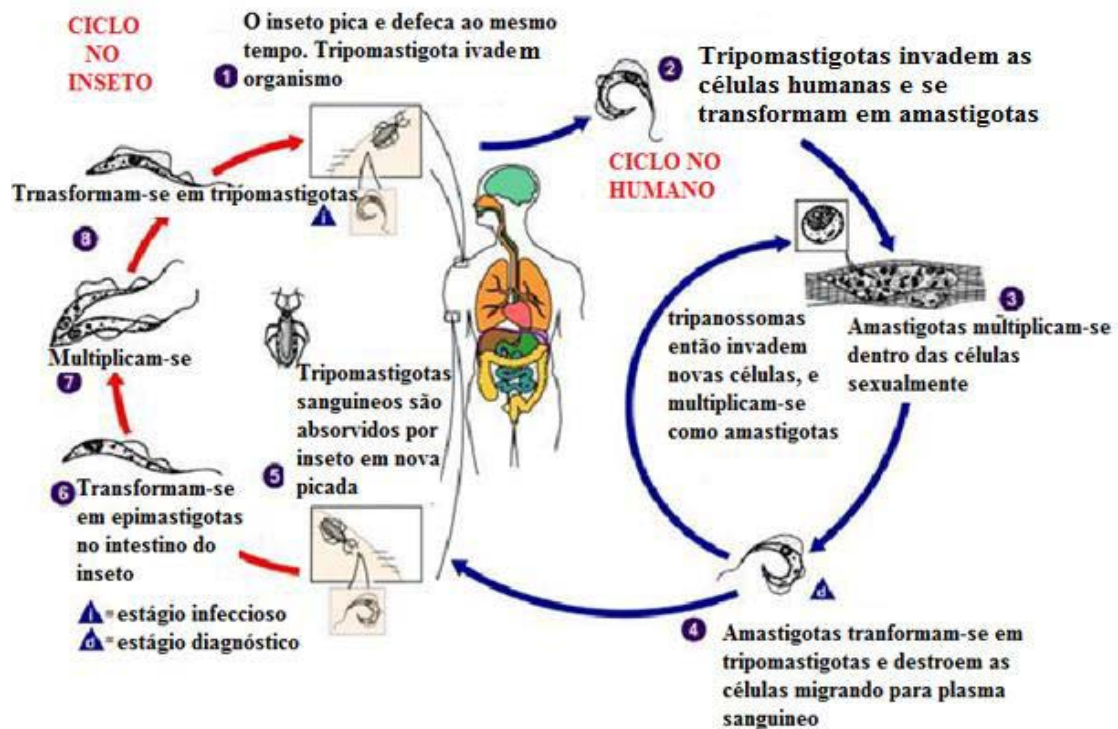
Na década de 70, a área endêmica no Brasil com risco de transmissão da doença de Chagas pela presença de vetores infectados incluía 18 estados e mais de 2,2 mil municípios, nos quais se comprovou a presença de triatomíneos e destes 711 com presença do *Triatoma infestans* (inseto transmissor do *Tripanossoma cruzi*, agente etiológico da doença), principal vetor estritamente domiciliar no Brasil (FIOCRUZ, 2013).

Ações sistematizadas de controle químico foram instituídas a partir de 1975 mantidas em caráter regular, e desde então levaram a uma expressiva redução da presença de *Triatoma infestans* e, simultaneamente, da sua transmissão às pessoas. Em reconhecimento, o Brasil recebeu em 2006 a certificação internacional de interrupção da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*, concedida pela Organização Panamericana da Saúde e Organização Mundial da Saúde. Atualmente, o perfil epidemiológico da doença mudou apresentando um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos de maior proporção na Amazônia Legal por transmissão vetorial e oral pelo consumo de alimento contaminado com *Tripanosoma* (formas tripomastigotas) (FIOCRUZ, 2013).

O parasita tem o barbeiro (*Triatoma infestans*) como hospedeiro invertebrado, e o homem como hospedeiro vertebrado, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, poderão causar vários sintomas (Figura 6) no homem. A doença de Chagas apresenta as formas aguda e crônica, sendo a forma aguda geralmente assintomática com sintomas leves como febre, vermelhidão, mal estar, inflamação e dor nos gânglios. Na fase crônica a pessoa contaminada pode permanecer com quadro assintomático, num período que pode variar de 5 a 30 anos. No entanto, neste período o parasita se reproduz lentamente, mas continuamente, causando danos sérios ao baço, intestino, sistema nervoso, coração, e causa também pequenos danos no pulmão devido à reação de inflamação. O fígado, apesar de ser danificado, como tem capacidade de autorregeneração os problemas provenientes da doença são raros.

Os resultados desses danos começam a ser aparentes após uma ou duas décadas de progressão, com aparecimento gradual de demência (3% dos casos iniciais), cardiomiopatia (em 30% dos casos), ou dilatação do trato digestivo (6% dos casos iniciais), devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos, responsável pelo seu tônus muscular. Quando o cérebro começa a apresentar granulomas a doença neste estágio é frequentemente fatal, mesmo com tratamento, geralmente devido à cardiomiopatia (insuficiência cardíaca). Estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas, cerca de 2 a 3 milhões no Brasil (FIOCRUZ, 2013). No entanto o tratamento pode aumentar a esperança e qualidade de vida de pessoas contaminadas com este parasita (FIOCRUZ, 2013). O tratamento da doença é feito pelo uso dos medicamentos Benzonidazol e Nifurtimox, ambos com graves efeitos colaterais (CASTRO; DIAS, 1998; VIOTTI et al, 2009).

Figura 6 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no inseto e no homem



Fonte : Adaptado de Center for Diseases Control and Prevention (CDC), (2014).

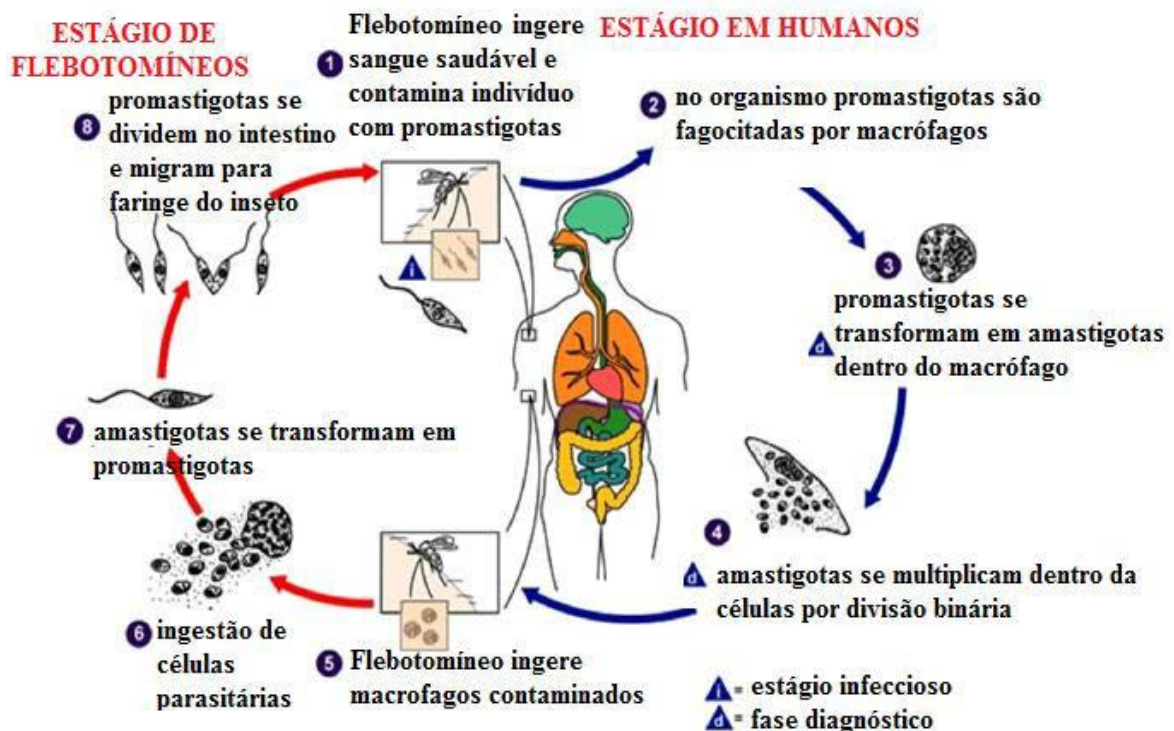
1.5.2 Leishmaniose

A leishmaniose é outra doença negligenciada com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo, causada por protozoários flagelados, decorrentes de diversas (20 espécies) espécies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. peruviana* entre outras), é transmitida pela picada de um inseto, o mosquito flebotomíneo fêmea (gênero *Lutzomyia* como hospedeiros invertebrados na América e *Plebotomus* no velho mundo) que pica o animal contaminado (cães e animais mamíferos silvestres, que são seus hospedeiros vertebrados) com o parasita (*Leishmania*). Desta forma o mosquito se infecta e ao picar o homem transmite a forma promastigota do parasita a este (Figura 7). O parasita entra na corrente sanguínea e vai para órgãos como o baço, fígado e a medula óssea atacando as células. A Leishmaniose apresenta quatro formas clínicas diferentes, a leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e a visceral que afeta órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestinos. A leishmaniose visceral (LV) é a manifestação clínica mais grave e difícil de ser diagnosticada, e se não tratada precocemente pode causar o óbito em até 90% dos casos (WHO, 2013). No homem a doença leva de dois a quatro meses para apresentar os primeiros

sintomas, tem cura, mas o tratamento é longo e doloroso, entretanto, para os animais infectados não há cura (eutanásia).

O tratamento para leishmaniose é limitado, são tóxicos e podem apresentar inúmeros efeitos adversos. Os tratamentos consistem em 10-20mg/kg de Antimoniato de N-metil glucamina por 20 dias para Leishmaniose cutânea, 20mg/kg de Antimoniato de N-metil glucamina para Leishmaniose difusa por 20 dias e 20 mg/kg de Antimoniato de N-metil glucamina para Leishmaniose mucocutânea por 30 dias. O Desoxicolato de Anfotericina B para infecção inicial de Leishmaniose tegumentar Americana seria 1mg/kg/dia ou dias alternados até a dose máxima de 50mg. Para Leishmaniose visceral administra-se Anfotericina B lipossomal 3mg/kg/dia durante 7 dias ou 4mg/kg/dia durante 5 dias por infusão venosa, e para a Leishmaniose tegumentar americana 1mg/kg/dia com dose máxima de 50mg (PELISSARI et al., 2011).

Figura 7 - Ciclo de vida do *Leishmania sp.*, no hospedeiro invertebrado e humano



Fonte: Adaptado de Center for Diseases Control and Prevention (CDC), (2014).

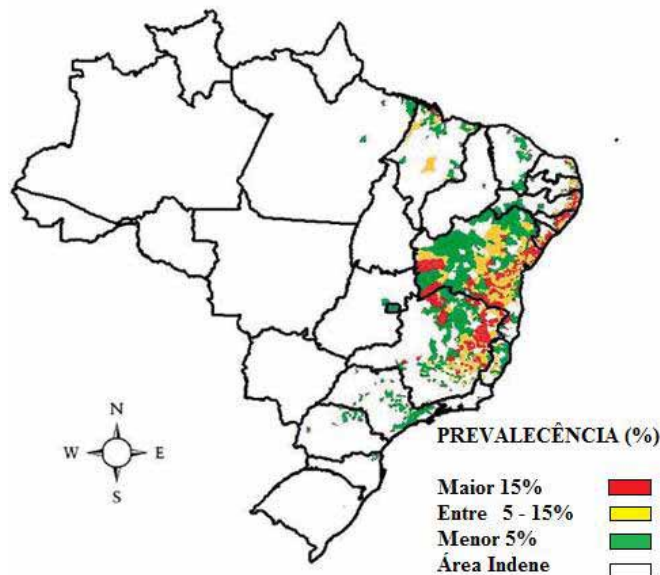
Na década de 90 a Região Nordeste era responsável por cerca de 90% dos casos de LV no Brasil, entretanto atualmente atinge locais onde no passado nunca haviam sido notificados casos da doença como as regiões sul e sudeste. O estado de São Paulo é um dos estados onde

focos da doença se manifestaram recentemente nas cidades de Bauru, Araçatuba e cidades da região de São José do Rio Preto. Estados das regiões centro-oeste também apresentam focos da doença (animais domésticos contaminados) (MATSUMOTO, et al., 2013).

1.5.3 Esquistossomose

Apesar da Doença de Chagas e da Leishmaniose serem doenças negligenciadas de grande risco e alto poder de contaminação a esquistossomose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a segunda doença parasitária mais devastadora no mundo com cerca de 200 milhões de pessoas contaminadas, atrás apenas da malária (RAGHAVAN, 2003; FERREIRA, et al., 1998). No Brasil mais de 63 mil pessoas foram infectadas no ano de 2011, segundo dados do Ministério da Saúde, sendo que a área endêmica da esquistossomose abrange 19 estados, com cerca de 30 milhões de habitantes expostos ao risco de contrair a doença e aproximadamente 2 milhões de pessoas infectadas. Essa doença ocorre de forma endêmica no estado do Maranhão a Minas Gerais, com certa penetração no estado do Espírito Santo como representado no mapa da figura 8.

Figura 8 - Áreas endêmicas da Esquistossomose mansônica no Brasil

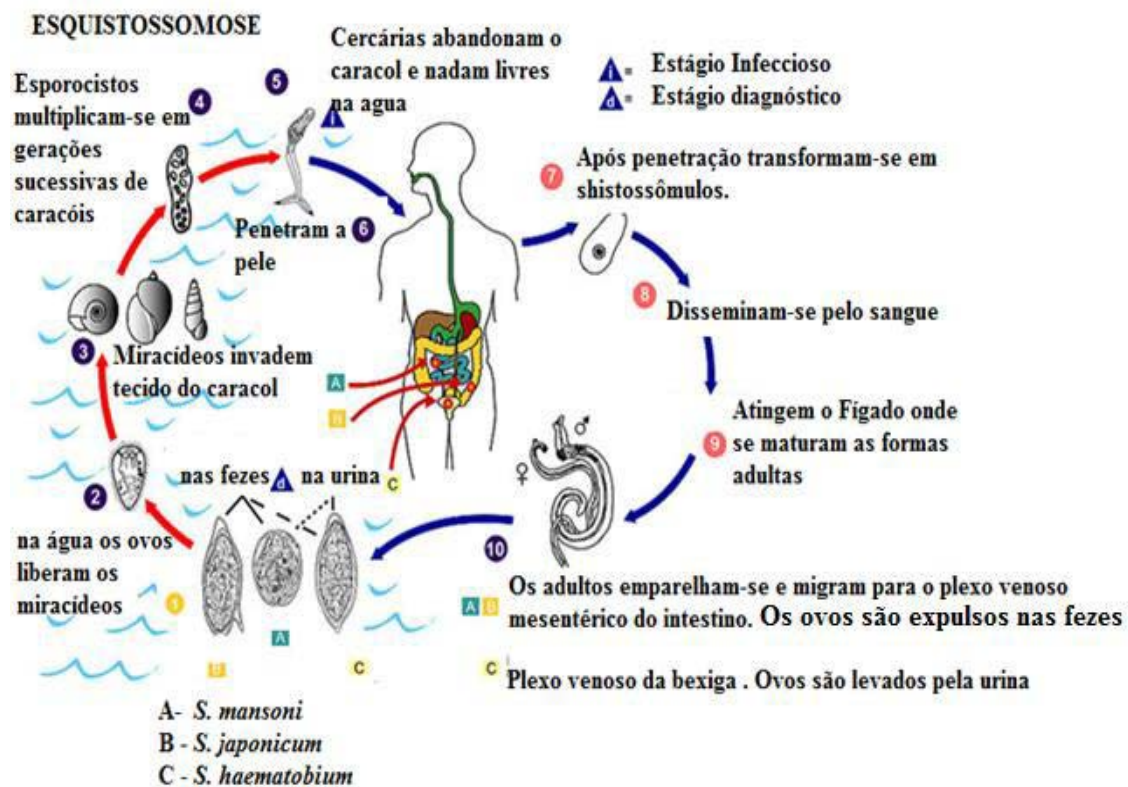


Fonte: Adaptado de (AMARAL, et al., 2006).

Além disso, focos isolados nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Rio Grande do Sul já foram relatados (FERRARI et al., 2003). Popularmente conhecida como barriga d'água, é uma doença

associada à falta de saneamento básico, permitindo às populações residentes em zonas endêmicas o contato direto com águas contaminadas por caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário desta verminose. Portanto, no ciclo biológico da esquistossomose o homem contamina os caramujos *Biomphalaria glabrata* ao eliminar suas fezes contendo os ovos do *Schistosoma mansoni* verme achatado do grupo dos trematódeos, que contaminam indivíduos via cercárias, eliminadas pelos caramujos infectados, quando em contato com as águas contaminadas durante o uso diário ou lazer (Figura 9).

Figura 9 - Ciclo do *Schistosoma mansoni* no homem e no caramujo (*Biomphalaria glabrata*)



Fonte: Adaptado de (FREITAS, et al., 2010).

Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem causar a esquistossomose no homem, entretanto somente a espécie *S. mansoni* é encontrada no continente americano com maior incidência no Brasil nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (FREITAS et al., 2010; LUTZ, 1919).

A fase de penetração da cercaria na pele é frequentemente assintomática, exceto em indivíduos já infectados anteriormente quando ocorre o surgimento de eritema (rubor), dermatite (inflamação derme) e prurido (coceira), pele avermelhada ou pápulas na pele no

local penetrado que podem durar alguns dias. Na fase inicial ou aguda caracterizado pela disseminação das larvas pelo sangue e principalmente o início da postura dos ovos, sintomas mais graves como mal estar, dores de cabeça, fraqueza, dor abdominal, diarreia sanguinolenta, falta de ar, tosse com sangue, aumento de gânglios linfáticos, dores nas articulações e aumento no tamanho do baço e fígado causados pelo aumento da resposta imunológica pelo organismo (síndrome de Katayama), configuram o início da enfermidade (MAHMOUD, 2008).

Figura 10 - Indivíduo com sintomas Crônicos de Esquistossomose, apresentando hepatomegalia (aumento Fígado) e esplenomegalia (aumento do Baço).

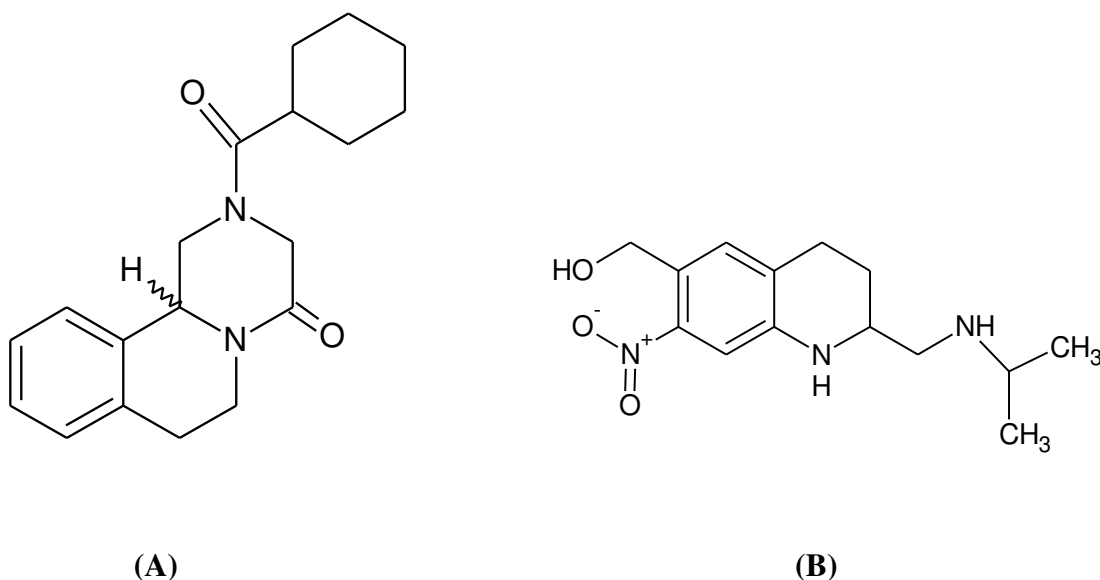


Fonte: Jorge, (2010).

Os sintomas crônicos são quase todos devidos à produção de ovos imunogênicos; estes são destrutivos por si mesmos com o seus espinhos e enzimas, mas é a inflamação com que o sistema imunitário lhes reage que causa os maiores danos. As formas adultas não são atacadas porque usam moléculas “*self*” do próprio hospede para se camuflar. Os sintomas desta fase crônica podem ser as hepatopatias/enteropatias com hepatomegalia, esplenomegalia, ascite (acúmulo de fluídos na cavidade peritoneal) e diarreia sanguinolenta (Figura 10). As formas mais graves consistem em hepatomegalia e hipertensão portal, que são as principais causas de morte por esquistossomose no Brasil. Outras formas de esquistossomose graves são as formas ectópicas cujas mais importantes são neurológicas que pode ser medular, conhecida como mielopatia esquistossomótica ou esquistossomose medular, ou cerebral, quando atingem o cérebro, existem também casos de esquistossomose ectópica na pele, pulmão, tuba uterina e outras vísceras (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A contaminação se dá devido às péssimas condições de saneamento básico, portanto, uma das formas de profilaxia consiste em melhorar essas condições, combatendo o desenvolvimento dos caramujos que são hospedeiros intermediários da doença e alertar a população sobre os mecanismos de transmissão da doença. Quando a doença é confirmada o tratamento é feito com antiparasitários como Praziquantel e Oxamniquina (Figura 11) que apesar de matar o parasita não impedem uma nova contaminação por nova exposição às cercárias do *S. mansoni*. A Oxamniquina não é mais usada no Brasil para tratamento de esquistossomose mansônica (PRATA et al., 1976; 1980).

Figura 11 - Esqueleto químico do fármaco Praziquantel (A) e esqueleto químico do fármaco Oxamniquina (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O Praziquantel apresenta efeitos colaterais de fracos aos moderados em cerca de 40% dos pacientes em uso. Entretanto, pessoas seriamente debilitadas quando tratadas com Praziquantel apresentam sérios efeitos colaterais (FREZZA et al., 2007; GARCIA et al., 2011). O Praziquantel é o medicamento mais utilizado no tratamento da esquistossomose, entretanto, o aparecimento de cepas de *Schistosoma mansoni* resistentes a esse medicamento traz a necessidade da pesquisa e do desenvolvimento de novas substâncias com potencial terapêutico para o tratamento da doença. Formas jovens do parasita são menos susceptíveis ao Praziquantel (UTZINGER et al., 2003; GARCIA et al., 2011). Neste sentido, existem na literatura científica inúmeros trabalhos sobre a promissora atividade esquistossomicida de

alguns extratos de plantas e produtos naturais isolados dessas contra o *S. mansoni* (CANTANHEDE et al., 2010; YOUSIF et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; VÉRAS et al., 2012, 2013; MAGALHÃES et al., 2012).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem a investigações sobre o uso na medicina tradicional e popular (etnobotânica), investigação farmacológica de extratos (farmacologia), isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (fitoquímica), transformações químicas de princípios ativos (síntese orgânica); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação e dosagem (química medicinal e farmacológica), ensaios clínicos avançados (testes em animais e humanos) e finalmente a obtenção de novos fármacos químicos (processo que geralmente dura de 10 a 12 anos). Para a obtenção de um fitoterápico o processo é mais rápido, pois não existe a necessidade de isolamento de princípios ativos ou alteração química nesses, entretanto, ensaios para determinação da toxicidade e dosagens bem como testes clínicos também são de extrema importância (ALVES, 2013).

Apesar de promissor o uso das plantas como fonte de moléculas bioativas para o tratamento da esquistossomose não desperta o interesse da indústria farmacêutica por se tratar de doenças de cunho social com medicamentos de baixo custo sem a obtenção de grandes lucros como preza esse setor. Portanto o uso de plantas na forma de xaropes, chás ou como alimento nutracêutico, poderia ser uma das formas mais acessíveis para que essa população possa ter acesso para o tratamento de muitas doenças e entre elas a esquistossomose.

Dessa forma, a busca por fitoterápicos ou alimentos nutracêuticos que possam ter efeito contra o *S. mansoni*, *Leishmania*, e Doença de Chagas passa a ter um apelo ainda maior, pois envolve menor custo do que o isolamento de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos e incentiva o consumo de alimentos mais saudáveis, o que também melhora a condição do portador da doença (FUNARI; FERRO, 2005; VILLAS BÔAS et al., 2007).

Neste sentido, o baru é uma planta que possui frutos de alto valor nutricional ocorrendo em áreas de cerrado dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Minas Gerais, sendo estas, áreas acometidas por grande incidência de doenças negligenciadas. Portanto, visando contribuir para a preservação dessa espécie, através do aumento do consumo do fruto, foi avaliado o potencial antiparasitário do extrato da polpa do fruto contra *Tripanossoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Shistosoma mansoni*, a fim de avaliar o valor nutricional a um possível efeito terapêutico no controle dessas doenças.

1.6 Atividade antioxidante

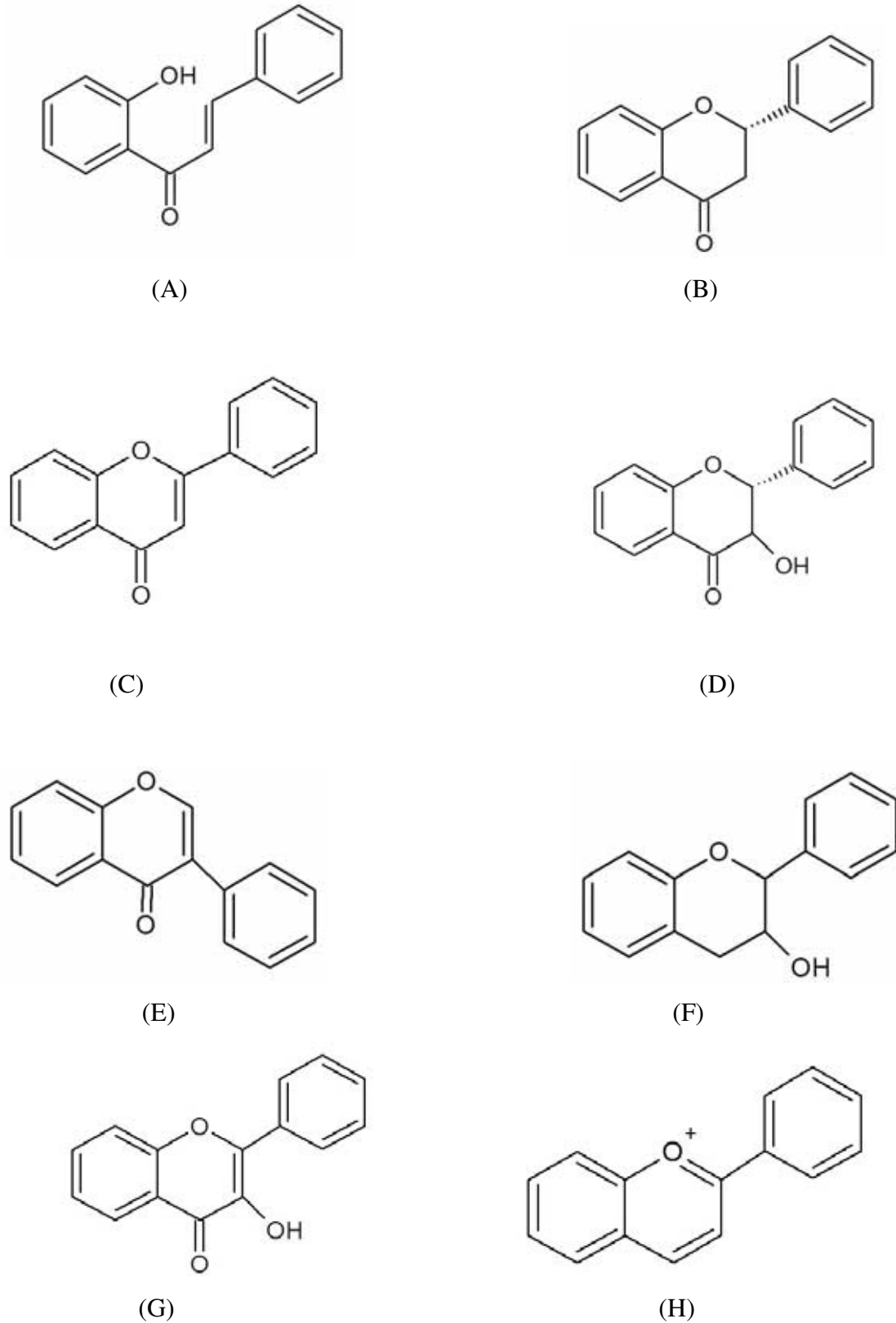
Espécies de oxigênio reativo (EROS) são gerados a partir de inúmeros processos redox e são conhecidos por serem os principais radicais livres no corpo humano. Recentes estudos têm demonstrado a participação desses radicais em mecanismos que causam a inflamação e dor (devido a apoptose), e que os altos níveis de EROS no organismo também podem induzir o surgimento da dor aguda (FIDANBOYLU et al., 2011; YOWTAK et al., 2011, KUMAR, 2011).

Substâncias antioxidantes têm a capacidade de sequestrar estes radicais livres e, assim, prevenir o dano oxidativo intracelular que resulta em dor (VALKO et al., 2007). Outros estudos demonstram que substâncias com propriedades antioxidantes também apresentam atividade antitumoral (destroem células cancerígenas por indução de apoptose) (NOLDIN, et al., 2003), atuam sobre o sistema cardiovascular e têm sido, portanto, amplamente utilizadas tanto na prevenção quanto no tratamento de diversas doenças (TSAU et al., 2005 citado por SOARES et al., 2008).

As substâncias antioxidantes podem atuar de várias formas sobre os radicais livres, sendo, a forma mais comum, pela doação de átomos de hidrogênio, ou de elétrons transformando espécies instáveis em substâncias mais estáveis (SIES, 1997; HALLIWELL, 2009), prevenindo que esses radicais venham a causar danos nos compostos lipídicos que compõem a membrana celular (ALVAREZ-PARRILLA et al, 2007 citado por SILVA, 2011), impedindo processos oxidativos, tal processo ligado diretamente no aparecimento de tumores e envelhecimento celular (CHANDRA, et al., 2000; NACZK; SHAHIDI, 2004 citado por NOVAES et al. 2013).

Dentre os fitoquímicos presentes nas plantas, a atividade antioxidante é geralmente atribuída as substâncias fenólicas (HALLIWELL, 2001). Essa classe se divide em duas categorias, as dos fenóis e polifenóis, determinada pelo número de unidades de fenol presentes na molécula. Em relação às substâncias fenólicas, os flavonoides, estes são os mais estudados e os mais encontrados nas plantas com propriedades antioxidantes (JAMISON, 2003; DALL'ANTONIA; ARCHELA, 2013). Mais de cinco mil flavonoides de ocorrência natural já foram descritos e classificados a partir de suas estruturas químicas, com relação ao grau de oxidação nos anéis aromáticos (Figura 12). Subdividem-se em grupos como chalconas, flavanonas, flavonas, flavononois, isoflavonas, flavan-3-óis, flavonóis e antocianidinas (SILVA; JORGE, 2011).

Figura 12 - Esqueletos químicos dos principais grupos de flavonoides. (A) chalconas, (B) flavanonas, (C) flavonas, (D) flavononois, (E) isoflavonas, (F) flavan-3-óis e (G) flavonois e (H) antocianidinas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na planta a síntese dessa classe de fitoconstituente está diretamente ligada à resposta biológica perante fatores externos que venham causar danos ao tecido vegetal, estes danos podem ser provocados por lesões teciduais por choques mecânicos, invasão de fungos e/ou agentes bacterianos, insetos e radiação UV (NAVICKIENE, et al., 2006).

Compostos fenólicos podem atuar como inibidores em vários processos de desenvolvimento da planta em nível celular, influência no metabolismo de lipídios e no mecanismo bioquímico da respiração, inibindo o transporte de glicose e a síntese de celulose (CASTRO et al., 2004 citado por FANTI, 2008).

No que se refere à floração, existem evidências experimentais da participação direta dos compostos fenólicos nesse processo, por meio de sua inter-relação com hormônios, podendo tanto inibir quanto estimular a floração (atividade estrogênica ligada à função hormonal e interrupção endócrina), dependendo do tipo de composto e de sua concentração. Portanto o período de desenvolvimento da planta também afeta a disponibilidade de seus fitoconstituintes não só os fenólicos como todos os outros (LADEIRA et al., 1987). Desta forma existe a necessidade de dosar a quantidade dos fenóis da planta antes de uma avaliação da atividade antioxidante.

A medida da atividade antioxidante de uma planta ou de uma substância pura extraída da mesma pode ser avaliada a partir de vários modelos *in vitro* sendo o método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) o mais utilizado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo geral explorar o potencial biológico da polpa dos frutos da *Dipteryx alata* Vogel (baru), a partir do extrato hidroalcoólico bruto, a fim de aliar o potencial nutricional a um possível efeito terapêutico como meio de contribuir para a preservação da espécie e fornecer informações sobre benefícios do uso nutracêutico do fruto.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar através de estudos fitoquímicos os principais constituintes presentes no extrato hidroalcoólico bruto da polpa do baru;
- Determinar a citotoxicidade;
- Determinar o potencial antimicrobiano;
- Avaliar o potencial antiparasitário do extrato bruto da polpa do baru e das partições em ensaios para a determinação da atividade tripanocida (Doença de Chagas), leishmanicida (Leishmaniose) e esquistossomicida para esquistossômulos e vermes adultos (Esquistossomose);
- Avaliar o potencial antioxidante (diretamente da polpa fresca).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, material biológico, equipamentos e materiais utilizados

3.1.1 Reagentes e Meios de cultura

Etanol, magnésio metálico (Mg), ácido clorídrico (HCl), cloreto de alumínio (AlCl₃), cloreto férrico (FeCl₃), hidróxido de sódio (NaOH), clorofórmio, hexano, butanol, hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), éter etílico, hidróxido de amônio (NH₄OH), acetato de chumbo (Pb(AcO)₂), anidrido acético (C₄H₆O₃) e isopropanol, (todos com grau analítico), Reagente de Bouchardat, reagente de Bertrand, reagente de Mayer, reagente de Dragendorf (Synth), meio RPMI 1640 (Invitrogen), HEPES (Gibco), Penicilina e estreptomicina (Gibco), meio M199 (Invitrogen), soro bovino fetal (Invitrogen, Gibco), BrMTT (Sigma-Aldrich), L-glutamina (Sigma-Aldrich), DMSO (Merck), reagente de Folin- Ciocauteau, nitrogênio líquido, DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), metanol, ácido gálico (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (Aldrich), meio de cultura bacteriano ágar Müller Hinton, discos estéreis de papel filtro Framex389 faixa preta marca DME(Diagnóstico microbiológico de especialidades) (Amoxicilina+ Ácido Clavulânico, Ácido Nadíxico, Ciprofloxacino e Ceftriaxona) com 6mm de diâmetro, discos inertes de papel de filtro estéreis 6 mm marca DME(Diagnóstico microbiológico de especialidades), Praziquantel (Sigma-Aldrich), Anfotericina (Sigma-Aldrich), e Benzonidazol(Sigma-Aldrich).

3.1.2 Material biológico

Células LLC- MK₂, formas tripomastigotas de cepas Y do *Trypanosoma cruzi*, Cepa P48 de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/P48), cepa Luiz Evangelista de *Schistosoma mansoni*, camundongos albinos, cepa *Proteus sp.*, *E. coli*, *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp* (cepas bacterianas de isolados clínicos).

3.1.3 Materiais e equipamentos

Estufa de ar circulante (MARCONI MA033), vidrarias em geral, rotaevaporador (BUCHI - Switzerland), Placas de cultura de 24 poços (TPP), câmara de segurança biológica (QUIMIS Q216F2-RB2), estufa de CO₂ (MARCONI) operando a 37°C com 5% de CO₂, microscópio de luz invertida (BEL - Alemanha), placas de Petri, bico de Bunsen, Swab, alça para semeadura, leitor de placas (SUNRISE-TECAN), Espectrofotômetro (6705 UV/Vis JENWAY), centrífuga (MARCONI NT810) e mesa de agitação (OXY-301).

3.2 Coleta dos frutos e preparo do extrato hidroalcoólico da polpa e frações

Os frutos foram coletados na cidade de Selvíria-MS, no mês de setembro, oriundos de plantas nativas em zona de cerrado pertencente à Fazenda de Ensino e Pesquisa da FEIS-UNESP. Foram coletados os frutos caídos ao chão observando-se o aspecto externo para selecionar apenas os frutos recém - caídos (maduros). Os frutos foram lavados, descascados e a polpa separada do endocarpo/semente. A polpa foi seca em estufa de ar circulante a 50°C por 48 horas, em seguida pulverizada em processador até a obtenção de um pó fino. Este pó foi guardado em vidro âmbar no congelador (-10°C) até a preparação do extrato. Para a preparação do extrato 200 g do pó da polpa foram adicionados a 1L de Etanol 70%. A mistura foi mantida sob agitação em recipiente recoberto por papel alumínio para evitar degradação de componentes pela exposição à luz. Após 7 dias a mistura foi filtrada em funil de vidro e papel de filtro, o filtrado rotaevaporado para remoção do solvente fornecendo 39,6 g de extrato (19,8%).

Para as frações inicialmente 10g de extrato bruto hidroalcoólico foi pesado colocado em um gral e pulverizado com 10 mL de hexano por um período de 10 minutos, repetidos por mais duas vezes o procedimento (triplicata). Após o processo a parte líquida foi coletada e rotaevaporada obtendo a fração hexânica do extrato bruto hidroalcoólico. O mesmo processo foi feito com clorofórmio e butanol, obtendo suas respectivas frações. O resíduo foi descartado. O extrato foi submetido aos estudos fitoquímicos e ensaio de citotoxicidade, atividade antiparasitária e antibacteriana, quanto às frações foram submetidas ao ensaio esquistossomicida (procedimento 3.9).

3.3 Prospecção de constituintes fitoquímicos

A prospecção de fitoconstituintes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Harborne (1998) que se baseia na adição de reagentes específicos para cada classe de fitoconstituintes. A presença ou ausência de uma determinada classe de fitoconstituintes é evidenciada pela alteração de cor ou formação de precipitados. Foram utilizados testes para determinação de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas.

3.4 Citotoxicidade sobre células de mamíferos

As células de fibroblasto LLC- MK₂ foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 100U/mL de penicilina, 100 µg / mL de estreptomicina e 5 % de soro fetal bovino inativado e mantido a 37 °C sob atmosfera a 5 % de CO₂. A suspensão de células foi

semeada a uma concentração de 1×10^6 células / mL em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI 1640. Posteriormente, as células foram tratadas com o extrato hidroalcolico bruto da polpa dos frutos do baru em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Foi adicionado 5mg/ml de solução de MTT nas placas e incubadas a 37 °C durante 24 horas em ambiente escuro. Após esta incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan (MOSMANN, 1983), resultantes da redução do MTT, são dissolvidos numa solução de HCl 0,04 N em isopropanol e o valor de absorbância é medido a um comprimento de onda de 570 nm.

RPMI 1640 + 25% DMSO + células e meio RPMI 1640 + células foram utilizados como controles positivos (verificação de mínima viabilidade celular) e negativos (verificação de máxima viabilidade celular), respectivamente (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = [1 - (Y - N) / (P - N)] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que Y = absorbância dos poços que contêm as células e o extrato em diferentes concentrações; N = controle negativo; P = controle positivo.

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.5.1 Preparo do extrato em diferentes concentrações

Para os ensaios de atividade antimicrobiana o extrato bruto do baru foi avaliado em 10 diferentes concentrações (1000; 500; 250; 125; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg/mL) preparadas por diluição da maior concentração de 1000 mg/mL (10g de extrato bruto diluído em 10 mL de metanol).

Todos os frascos contendo as diluições do extrato foram anteriormente lavados e mantidos em estufa à 120°C durante 24 horas para evitar qualquer tipo de contaminação.

3.5.2 Preparo dos discos para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco

Para o ensaio antimicrobiano foram utilizados como controle positivo discos estéreis de papel filtro Framex 389 Faixa Preta com 6 mm de diâmetro, impregnados com doses conhecidas de antibióticos (Amoxicilina+ Ácido Clavulânico, Ácido Nadíxico, Ciprofloxacino e Ceftriaxona) e para controle negativo utilizou-se disco inerte estéril Framex

6 mm impregnado com 50 µl de metanol (solvente usado na diluição do extrato). Para preparo dos discos com extrato utilizamos discos inerte Framex 6 mm e impregnou-se 50 µl de extrato hidroalcoólico nas concentrações diluídas previamente em 6 discos para cada concentração. Após a adição do extrato nos discos os mesmos foram transferidos, individualmente para cada concentração, para frascos estéreis e levados à estufa à 50°C por 24 horas para volatilização do metanol. (NCCLS, 2003).

3.5.3 Preparação das placas para os ensaios de atividade antimicrobiana

Placas de Ágar Müeller Hinton (15mL/ espessura aproximada de 4 mm) foram semeadas previamente com suspensões das cepas Teste ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) que foram recuperadas de amostras de urina e classificadas pela bioquímica Márcia de Faria (responsável técnica pelo Laboratório de Análises Bioquímicas ISALAB) como *Proteus sp.*, *Escherechia coli*, *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.*, principais agentes que causam infecções em vias urinárias. Foram realizados testes de sensibilidade com vários antibióticos sobre as cepas avaliadas (individualmente) a fim de se determinar quais eram os mais adequados para a utilização como controles positivos nos ensaios antimicrobianos. Para cada ensaio com as diferentes cepas foram utilizados dois antibióticos como controles positivos. Em placas semeadas individualmente para cada bactéria foram adicionados os discos das várias concentrações do extrato e discos dos dois controles positivos. A seguir as placas foram incubadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ$ C. Os resultados são expressos a partir da medida do halo de inibição formado ao redor de cada disco. Extratos de plantas são considerados com atividade antimicrobiana quando apresentam halos de inibição acima de 9 mm o que varia também em função da cepa utilizada, por isso a necessidade em se comparar os resultados obtidos com o dos controles positivos. Para cada cepa o procedimento foi realizado em triplicata e o valor do halo final foi determinado pela média dos valores obtidos (SEJAS et al., 2003; GONÇALVES et al., 2005).

3.6 Atividade tripanocida

Os ensaios sobre as formas tripomastigotas de cepas Y do *Trypanosoma cruzi* multiplicadas em fibroblastos de linhagem LLC-MK₂ (PEREIRA da SILVA; NUSSENZWEIG, 1953). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 2mM de L-glutamina, 10mM de NaHCO₃, 100U/mL de penicilina, 100µL/mL de estreptomicina e 5% de soro bovino fetal inativado, em garrafas de cultura a 37°C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. As formas tripomastigotas obtidas de

camundongos contaminados foram adicionadas à cultura, onde permaneceram incubadas por um período de 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com meio de cultura, restando somente as células infectadas pelo parasita. Após cerca de 5 dias de cultivo (quando se inicia o processo de lise celular e se observam as formas tripomastigotas no meio) o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas foi removido.

Em uma microplaca de 96 poços, esse sobrenadante contendo as formas tripomastigotas do parasita foi aliqotado (por câmara de Neubauer em 1×10^6 parasitas/mL), e adicionaram-se o extrato em análise; após 24h de incubação foi realizada a verificação da atividade biológica utilizando a técnica colorimétrica pelo [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difeniltetrazólio] que se baseia na interação do sal tetrazólio com mitocôndrias ativas, produzindo o composto formazan.

De acordo com a técnica, foram adicionados 10 μ L de BrMTT na concentração de 5mg/mL/poço, com incubação a 37°C, por 4 horas. Após esse período, adicionou-se isopropanol ácido (100 μ L de HCl 0,04N em isopropanol) e realizou-se leitura de microplaca em leitor Sunrise-Tecan, em filtro de 570 nm e referência 630 nm, com valores processados pelo programa Magelan 3.

Soluções estoques foram preparadas pela dissolução em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), de modo a obter uma concentração final de 2 mg/mL. Alíquotas desta solução estoque após diluição foram adicionadas ao meio infectado, de forma a se obter concentrações finais de 8; 32; 128 μ g/mL (MUELAS-SERRANO et al., 2000).

Os ensaios foram realizados em triplicata. Foi utilizado Benzonidazol como controle positivo e meio RPMI-1640 em 1% DMSO como controle negativo.

3.7 Atividade leishmanicida

Os bioensaios foram realizados com *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/P48). Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cedidas e realizadas na Universidade de Franca-UNIFRAN) foram incubadas em meio M199 (Invitrogen), suplementado com L-glutamina (2 mM), NaHCO₃ (10 mM), penicilina (100 UI / mL), estreptomicina (100 μ g / mL) e 5% de soro fetal bovino (Gibco). Após 6 dias de inoculação, formas promastigotas iniciais (2×10^6 parasitas/mL) foram incubadas em placa de microtitulação de 96 poços que contêm as amostras testadas. O extrato foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluiu-se com o meio, para dar concentrações finais de 6,25 a 400 μ g/mL. A placa foi incubada a 22°C durante 24 h, e a porcentagem de lise foi determinada por um método colorimétrico BrMTT. Os bioensaios foram realizados em triplicata, utilizando meio M199 com 0,5% de DMSO

como controle negativo e Anfotericina B como grupo de controle positivo (SCHMEDA-HIRSCHMAN et al., 1996; CAMACHO et al., 2003 citado por BEZERRA et al., 2006)

3.8 Atividade esquistossomicida

Os ensaios *in vitro* de avaliação antiparasitária foram realizados no Laboratório de Ensaios Antiparasitários do Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade de Franca, sob a supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Lizandra Guidi Magalhães.

3.8.1 Manutenção do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O ciclo biológico de *S.mansoni*, cepa LE (Luiz Evangelista) é rotineiramente mantido pela passagem seriada em moluscos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro invertebrado e em camundongos BALB/c como hospedeiro vertebrado no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Universidade de Franca. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade de Franca, (protocolo n°020/13).

Os ovos de *S. mansoni* presentes nas fezes de camundongos previamente infectados com o parasito foram recolhidos pelo método de Hoffmann e expostos por aproximadamente 1 hora sob luz, para a liberação dos miracídios. Os miracídios foram utilizados para infectar o hospedeiro intermediário, que após 38 a 45 dias liberam a forma infectante do parasito, as cercarias, que por sua vez infectaram o hospedeiro vertebrado. Cerca de 200 cercarias foram inoculadas nos camundongos via subcutânea e após 21 ou 49 dias, os vermes jovens do fígado ou vermes adultos foram recuperados do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas por perfusão (SMITHERS; TERRY, 1965). Após a coleta, os parasitos foram mantidos em meio RPMI 1640 (Gibco) até o momento do uso.

3.8.2 Obtenção dos esquistossômulos

Cercarias foram transformadas em esquistossômulos segundo o método descrito por Harrop e Wilson, (1993). Para essa finalidade, aproximadamente 120.000 cercarias foram transferidas para um béquer de vidro de 100 mL e incubadas em gelo por duas horas para sedimentar. Transcorrido este período, o sobrenadante foi aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur e, as cercarias presentes no fundo do tubo foram transferidas para um tubo de poliestireno de 15 mL. Em seguida, as cercarias foram ressuspensas em 10 mL de água desclorada autoclavada e deixadas em gelo por 10 minutos. O processo de lavagem com água desclorada e descarte do sobrenadante foi repetido por três vezes. Posteriormente, a água foi

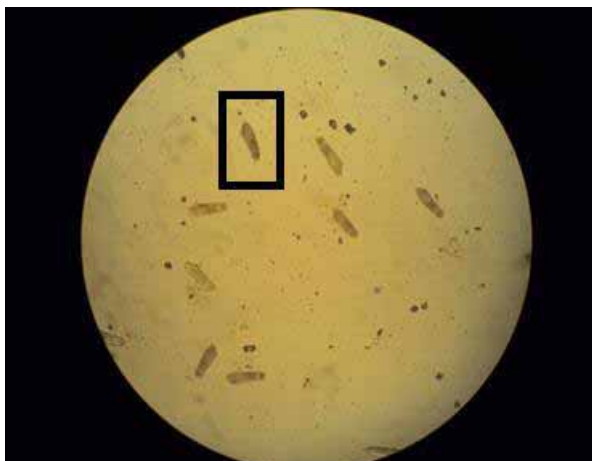
retirada e foram adicionados 6 mL de meio RPMI 1640 (Gibco). Para a transformação mecânica, as cercarias foram vigorosamente agitadas em vórtex sob velocidade máxima, durante 90 segundos para a indução do rompimento das cercarias em corpos cercarianos e caudas.

Em condições estéreis, os corpos e caudas cercarianas foram ressuspensos e transferidos para um frasco de cultura de 40 mL contendo 3,0 mL do meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com Penicilina Cristalina G (1000 U/mL), estreptomicina (1000 µg/mL) (Invitrogen) e, em seguida incubados em estufa umidificada contendo 5% CO₂, a 37°C, durante um período de 4 horas. Após o período de incubação, aproximadamente 28 mL do sobrenadante foi aspirado e descartado; cerca de 2,0 mL restantes foram distribuídos em dois tubos de 2,0 mL. Para a remoção das caudas, 1,0 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) foi adicionado em cada tubo contendo os corpos cercarianos e as caudas. Estes sofreram cerca de 5 lavagens com meio RPMI 1640 (Gibco), com um intervalo de quatro minutos entre cada lavagem, para sedimentação dos mesmos e remoção das caudas presentes no sobrenadante. As lavagens foram acompanhadas em microscópio de luz invertida (Leitz, Wetzlar, Alemanha).

3.8.3 Avaliação *in vitro* dos esquistossômulos

Cerca de 100 esquistossômulos/poço foram transferidos para placas contendo 2 mL do meio RPMI 1640 suplementando com 10% de soro bovino fetal, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/µL de penicilina. Após o período de 3 horas de incubação para adaptação dos parasitos ao meio, o extrato foi previamente dissolvido em DMSO e adicionado nas concentrações 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL aos respectivos poços contidos na placa com os esquistossômulos, essa placa foi incubada a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ durante 96 horas e a mortalidade foi determinada nos períodos de 24, 48 e 72 horas usando microscópio invertido (Zeiss) (Figura 13). Os parasitos foram considerados mortos quando se apresentaram sem movimento por mais de 2 minutos de observação (MANNECK et al., 2010). Como controle negativo, foram utilizados esquistossômulos mantidos em meio RPMI e em meio RPMI com 0.1% de DMSO e como controle positivo foram utilizados esquistossômulos incubados com 3,9 µg/mL de Praziquantel. Foram avaliados quatro poços de cultura por concentração.

Figura 13- Foto ampliada de esquistossômulo (quadrante em negrito)



Fonte. Próprio autor, (2014).

3.8.4 Avaliação *in vitro* frente aos vermes adultos de *S. mansoni*

Casais de vermes adultos (Figura 14) foram recuperados de camundongos BALB/c via perfusão do sistema porta-hepático em condições assépticas após 58 dias de infecção. Em seguida, os parasitas foram lavados em RPMI 1640 tamponados com HEPES 20 μ M, pH 7,5, suplementados com penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e 10% de soro bovino fetal.

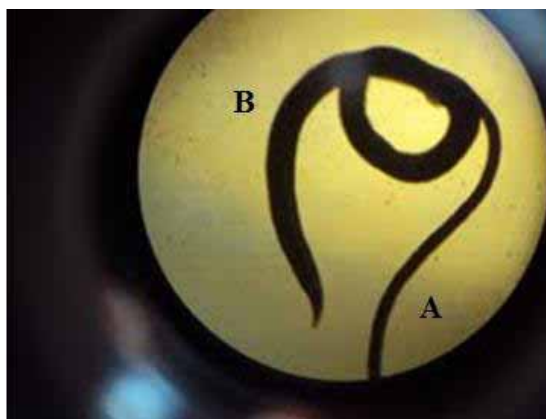
Posteriormente, um casal de vermes adultos foi transferido por poço em uma placa de cultura de 24 poços contendo o mesmo meio descrito anteriormente e incubados em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% CO₂. Após 24 horas de incubação o extrato foi previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado ao meio RPMI 1640 em uma faixa de concentração variando de 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ g/mL.

Os parasitos foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente por 120 horas e monitorados a cada 24 horas usando um microscópio invertido (Zeiss) para avaliar as condições gerais dos parasitos. A viabilidade dos parasitos foi determinada usando a escala de viabilidade de 0-3 como descrito por Ramirez et al., (2007) sendo: 3 = vermes com movimentação normal, 2 = atividade motora diminuída, 1 = atividade motora mínima com movimentos ocasionais; 0 = morte de todos os vermes, sem movimento por mais de 2 minutos de observação.

Para a confirmação da mortalidade, após a ausência de movimento por mais de 2 minutos, os parasitos foram lavados com o meio RPMI, transferidos para placas de cultura com o mesmo meio sem extrato e monitorados como descrito anteriormente (PICA-MATTOCIA; CIOLI, 2004).

Como controle negativo, foram utilizados vermes adultos mantidos em meio RPMI 1640 + 0.1% de DMSO e como controle positivo, foram utilizados vermes adultos incubados com 12,5µg/mL de Praziquantel (Sigma Aldrich). Foram realizados três experimentos independentes, sendo avaliados oito poços de cultura por concentração (MAGALHÃES et al., 2009).

Figura 14 - Foto ampliada de casal de vermes. A- fêmea B-macho



Fonte: Próprio autor, (2014).

3.9 Partição do extrato hidroalcoólico bruto com solventes de diferentes polaridades

Este ensaio tem como intuito particionar o extrato bruto hidroalcoólico em polaridades distintas de acordo com cada solvente, de modo, a isolar uma determinada classe de fitoconstituente. Posteriormente submeter ao ensaio *in vitro* descrito nos procedimentos antiparasitários para verificação em qual parte do extrato se encontra os compostos que podem ocasionar atividade biológica antiparasitária e antibacteriana.

O extrato bruto (10g) foi pulverizado num almofariz com 10 mL de hexano e macerado durante 10 minutos. O sobrenadante obtido desse procedimento foi removido para um balão e rotaevaporado (esse procedimento foi repetido três vezes). Ao resíduo que sobrou no almofariz foram adicionados 10 mL de clorofórmio sendo macerado por 10 minutos. O sobrenadante resultante dessa operação foi removido para um balão e rotaevaporado (procedimento repetido por três vezes). Ao resíduo do tratamento com o clorofórmio no pistilo foram adicionados 10 mL de butanol e o mesmo procedimento descrito acima foi realizado. Ao resíduo do tratamento com butanol foram adicionados 10 mL de água e o mesmo procedimento realizado para os outros solventes foi seguido. Desta forma, foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica, butanólica e aquosa do extrato hidroalcoólico da polpa. Estas frações serão submetidas a testes mediante comprovação da atividade biológica positiva para os procedimentos.

3.10 Compostos fenólicos

3.10.1 Polifenóis totais

A determinação dos polifenóis totais foi realizada através da extração desses fitoconstituintes diretamente da polpa do fruto congelada em nitrogênio líquido pela adição de 3 mL de metanol a 300 mg de polpa ainda congelada. Essa amostra foi agitada por 1h a 200 rpm acondicionada em gelo ao abrigo da luz (caixa de isopor). A seguir a amostra foi dividida em 2 eppendorfes e centrifugada por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Este procedimento de extração foi realizado sem iluminação diretamente incidindo sobre as amostras para evitar degradação de substâncias fotossensíveis.

A amostra para a análise da determinação dos polifenóis foi preparada num tubo a partir da adição de 240 µL de extrato obtido acima, 360 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:1 V/V em água) e após 3 minutos a adição de 2400 µL da mistura de 0,4% de NaOH e 2,0% Na₂CO₃ em água destilada (SWAIN; HILLIS, 1959).

Como branco foi utilizado 240µL de metanol substituindo o extrato. Após 1 hora de reação o conteúdo foi transferido para uma cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 750 nm.

Para a construção da reta padrão de ácido gálico (composto usado como referência para a determinação de polifenóis totais) Foram preparadas soluções de ácido gálico em seis concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 µg/mL) sendo cada uma delas submetidas ao mesmo procedimento acima descrito para o extrato, com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Neste método o reagente Folin-Ciocalteu que consiste na mistura de dois ácidos inorgânicos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico ao oxidar os compostos fenólicos sofre redução produzindo óxidos de tungstênio e molibdênio que possuem cor azul e absorvem no comprimento de onda de 760 nm. Todas as análises realizadas em triplicata.

O valor obtido de absorvância obtida para o extrato deve ser interpolado na curva de Absorvância x Concentração do ácido gálico. Os valores de polifenóis totais são expressos em termos de equivalentes em mg de ácido gálico por 100 g de polpa úmida.

3.10.2 DPPH ensaio de eliminação de radicais

Para medir a atividade antioxidante do extrato e padrões (ácido gálico e metanol), o ensaio de eliminação de radicais utilizando o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi realizado de acordo com o procedimento descrito anteriormente (BLOIS, 1958; ALVARENGA et al., 2013), com ligeiras modificações. Inicialmente foi realizada a extração da amostra partindo-se de 150 mg de polpa fresca congelada em nitrogênio líquido, adicionando 2 ml de metanol e

agitando por 1h a 200 rpm a 4°C. A seguir a amostra foi dividida em 2 ependorfes de 2mL e levadas à centrífuga por mais 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C.

Para as análises uma solução estoque de DPPH foi preparada pela mistura de 24 mg de DPPH em 100 mL de MeOH. O espectrofotômetro UV/VIS a 515 nm foi zerado com metanol, a seguir a leitura da solução foi feita ajustando o aparelho a $1,1 \pm 0,02$ no mesmo comprimento de onda.

Para a atividade antioxidante foram preparadas as amostras a serem avaliadas pela mistura de DPPH (5,6 mL) com a solução a ser avaliada (0,3mL). As amostras foram mantidas no escuro por 40 minutos e então foram analisadas no espectrofotômetro a 515 nm. Para a obtenção da curva do padrão do ácido ascórbico foram preparadas seis diferentes concentrações e realizadas as leituras como descrito acima (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

A partir da medida da leitura da absorvância das várias concentrações do ácido ascórbico é possível calcular a % de inibição do DDPH em função da concentração de ácido ascórbico como na equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = (\text{branco} - \text{Abs. Amostra}) / (\text{branco}) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Os resultados da avaliação são expressos em termos de equivalente em mg de ácido ascórbico por 100g de polpa úmida.

3.11 Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram comparados pela análise de variância com um fator seguido pela determinação significativa entre o grupo controle e os tratados (pós-teste Dunnett). O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significantes. As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPadSoftware, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção fitoquímica e citotoxicidade

As plantas vêm sendo usadas pelo homem para cura de seus males desde os primórdios da humanidade. O homem tinha na observação de hábitos alimentares de animais doentes seu principal guia no uso de plantas com propriedades biológicas. Com o passar do tempo o homem desenvolveu a capacidade de, a partir da sua própria experimentação, escolher plantas para a cura de seus males distinguindo aquelas que poderiam ajudar e outras que lhes trariam maior desconforto (ALVES, 2013).

As propriedades medicinais e /ou tóxicas apresentadas pelas plantas estão diretamente relacionadas aos metabólitos secundários produzidos por estas, em resposta a ferimentos, ataques de parasitas, insetos, outras plantas e condições ambientais (ALVES, 2013). Outros metabólitos são produzidos quando a planta sofre agressões ambientais como falta ou excesso de água, nutrientes no solo, temperatura e exposição excessiva ao sol. Esses fatores atuam de forma que a mesma planta crescendo em condições ambientais diferentes pode apresentar metabólitos secundários diferentes e, portanto, propriedades biológicas relacionadas à presença desses metabólitos também diferentes (KEUTGEN; PAWELZIK, 2007).

Dentre os metabólitos secundários mais comuns encontrados em plantas que apresentam propriedades biológicas estão os flavonoides, polifenóis, taninos, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides além de outros.

Entretanto, as propriedades biológicas apresentadas por uma determinada planta podem ser atribuídas não só à presença de um metabólito secundário em particular, mas geralmente ao sinergismo entre alguns deles (EFFERTH; KOCH, 2011). A tabela 4 mostra as principais propriedades biológicas atribuídas a metabólitos secundários de maior ocorrência em plantas.

A realização da prospecção fitoquímica é feita para se ter conhecimento dos fitoconstituintes presentes para a avaliação preliminar do potencial biológico de uma planta guiando o ensaio biológico ao qual ela deve ser submetida. Após a constatação do potencial biológico do extrato os fitoconstituintes podem ser isolados (metabólitos secundários) e então avaliados individualmente a fim de se determinar qual desses metabólitos é responsável pela propriedade biológica observada para o bruto. Muitas vezes é possível constatar que substâncias isoladas do extrato apresentam atividade, entretanto em alguns casos o sinergismo entre os vários metabólitos presentes neste extrato fornece uma resposta biológica mais efetiva (MIRANDA et al., 2013).

As plantas produzem os metabólitos secundários ou metabólitos especiais com a finalidade de defender seu organismo e não o do homem, portanto, alguns metabólitos secundários podem ser tóxicos mesmo em baixas concentrações na planta (NAVICKIENE, et al., 2006) e outros podem se tornar tóxicos se ingeridos sem controle ou em doses inadequadas. Portanto, a quantidade de um determinado metabólito secundário numa planta também pode determinar sua toxicidade. Plantas com altos teores de taninos, além de conferir sabor extremamente amargo à planta podem ser tóxicas devido à propriedade dos taninos em complexar metais e proteínas (KARAMAC, 2009).

Deste modo, para a avaliação da segurança e eficácia no uso de plantas ou de metabólitos secundários isolados são necessários estudos de toxicidade e adequação dose/resposta, inicialmente em estudos *in vitro* e no caso de resposta promissora destes ensaios, a realização de estudo *in vivo*, que muitas vezes não fornece os mesmos resultados obtidos na avaliação *in vitro* devido aos processos metabólicos que ocorrem no organismo do animal (cobaia) em que o ensaio foi realizado (SMITH, 1994; MASIMIREMBWA et al., 2003). Ainda assim, os ensaios *in vitro* (quando disponíveis) são uma boa indicação sobre o potencial biológico de plantas e compostos isolados.

A prospecção fitoquímica realizada com a polpa do baru teve por objetivo determinar a presença dos principais fitoconstituintes a fim de guiar nossos estudos para alguns ensaios biológicos específicos. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5) a polpa do baru apresenta flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides e glicosídeos cardiotônicos em grandes quantidades, terpenóides e antraquinonas em quantidades variando de média a baixa, respectivamente, de acordo com padrões estabelecidos na literatura (HARBORNE, 1998).

Os fitoconstituintes presentes na polpa do baru podem isoladamente ou em sinergismo com outros apresentar inúmeras propriedades biológicas (Tabela 5 e Figura 15).

A presença e a quantidade de taninos e flavonoides nos frutos direcionaram os estudos para a avaliação das atividades antiparasitárias devido à possibilidade de vincular o consumo da polpa ao uso terapêutico contra a Doença de Chagas, Leishmaniose e Esquistossomose, que aparecem com focos endêmicos em regiões de ocorrência do baru. Além disso, a presença de flavonoides e alcaloides pode ser um indicativo de atividade analgésica que é um dos usos tradicionais da planta.

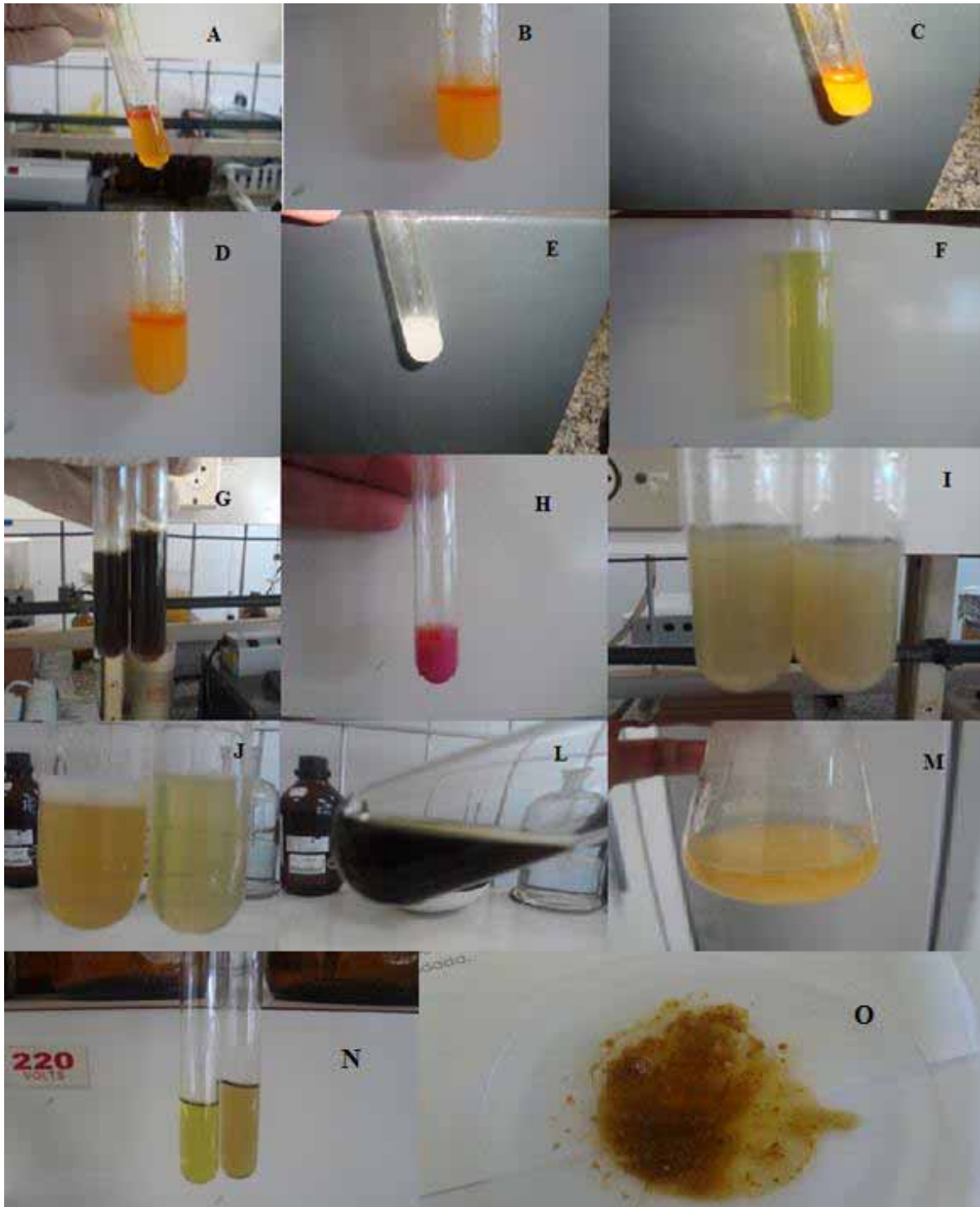
Tabela 5 - Resultado da prospecção fitoquímica para a polpa dos frutos do baru

Metabólito secundário	Reativo/ Teste-Figura	Material vegetal
		Resultados
Alcaloides	Mayer (E)	+++
	Bouchardat (C)	+++
	Bertrand (B)	+++
	Dragendorf (A e D)	+++
Antraquinonas	Bornträger (N)	-
	Hidróxido de sódio (O)	+
Flavonoides	Magnésio + HCl (Reação de Shinoda) (H)	+++
	Cloreto Férrico (I)	++
	Glicosídeos Lieberman-Burchard (G)	+++
Saponinas	Teste da espuma (J)	+++
Taninos	Cloreto férrico (M)	+++
	Acetato de chumbo (L)	+++
Terpenóides/ Esteroides	Lieberman-Burchard (F)	++

* (-) Não detectado, (+) concentração Baixa, (++) presente em concentração moderada, (+++) presente em alta concentração.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Teste positivo para a presença de Alcaloides (A-E), esteróides e triterpenos (F), glicosídeos cardiotônicos (G), flavonoides (H - I), saponinas (J), taninos (L-M) e antraquinonas (N-O)

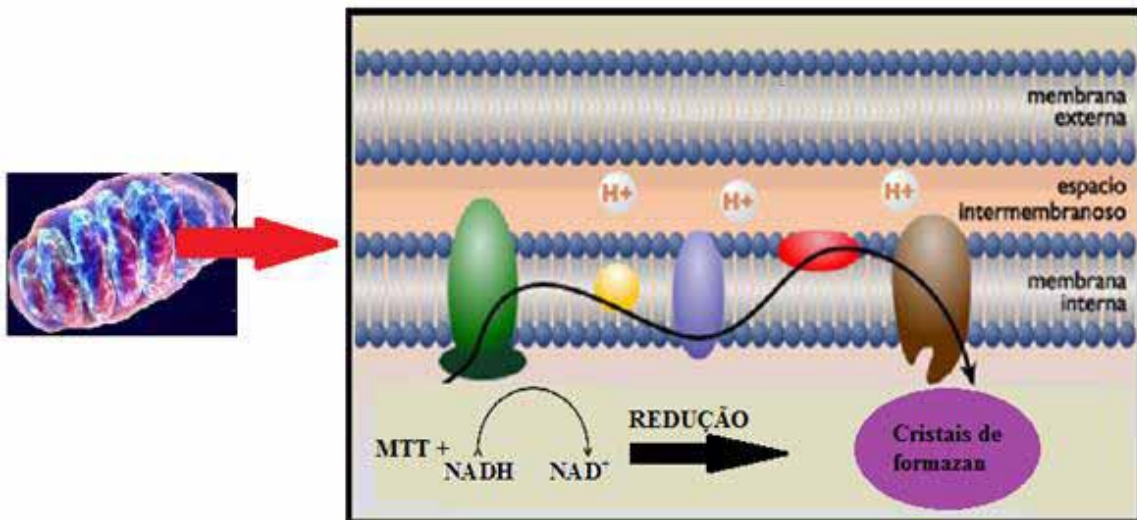


Fonte: Elaborado pelo autor

Para que uma planta possa ser considerada um alvo de estudo, como no presente caso para o desenvolvimento de fitoterápico ou alimento nutracêutico, é preciso que tenha efeito terapêutico, mas que também não apresente toxicidade.

A fim de avaliar a segurança do consumo da polpa foram realizados ensaio de citotoxicidade usando o teste de MTT sobre células de fibroblastos de mamífero LLC- MK₂ em várias concentrações do extrato. Este teste fornece informações importantes sobre o efeito tóxico de compostos químicos presentes no extrato, em contato direto com a cultura de células. As células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em formazan de cor púrpura com um máximo de absorção próximo a 570 nm (Figura 16). Quando as células morrem, elas perdem a capacidade de converter o MTT em formazan o que serve como um marcador útil e conveniente de células viáveis, sendo este um dos testes mais comumente utilizados para determinar a citotoxicidade de drogas (RISS et al., 2013).

Figura 16 – Representação da reação de redução do MTT em cristais de formazan



Fonte: Elaborado pelo autor.

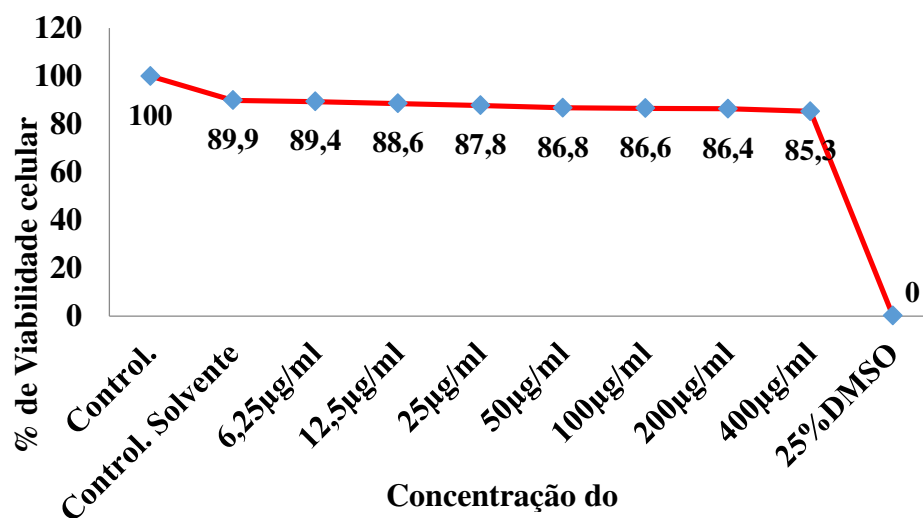
Tabela 6 - Resultado da avaliação da citotoxicidade do extrato sobre células LLC- MK₂.
Viabilidade celular (%) x concentração do extrato (µg/mL)

Extrato (µg/mL) e controles	Absorbâncias (570nm)			Viabilidade celular %
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	
Control	1,208	1,210	1,211	100
Control Solvente	1,101	1,105	1,104	89,9
6,25	1,100	1,097	1,094	89,4
12,5	1,091	1,087	1,089	88,6
25	1,074	1,079	1,080	87,8
50	1,071	1,069	1,072	86,8
100	1,066	1,071	1,068	86,6
200	1,068	1,065	1,064	86,4
400	1,055	1,051	1,056	85,3
25% DMSO	0,159	0,150	0,1489	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na tabela 6 são mostrados os resultados das medidas de absorbâncias para os controles e para o extrato nas concentrações utilizadas. A partir desses dados foi possível determinar a % de viabilidade celular em cada concentração como mostra a figura 17. Após 24 h de exposição das células às várias concentrações do extrato foi possível observar que apenas o controle positivo (DMSO 25%) apresentou toxicidade significativa com $p < 0,05$ mostrando que a polpa do fruto do baru não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas ($IC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$) sobre células LLC- MK₂.

Figura 17 - Gráfico referente aos resultados dos ensaios de citotoxicidade celular % de viabilidade celular x concentração do extrato



Efeito do EPB sobre a viabilidade de células de fibroblastos LLC- MK₂. A citotoxicidade foi determinada usando ensaios MTT após 24 h de tratamento com as concentrações indicadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio de citotoxicidade utilizando células é uma opção bastante viável em relação ao uso de cobaias em um estudo preliminar, entretanto, ensaios para determinação de dose máxima via oral a ser utilizada ainda carecem de estudos com animais. Esses ensaios visam avaliar principalmente efeitos hepáticos, intestinais e renais nas cobaias submetidas a doses excessivas do extrato. Portanto, a citotoxicidade não determina a dose máxima administrada por um organismo vivo, o resultado obtido com a cultura de células é um estudo apenas preliminar que fornece indicativos de toxicidade da planta a nível celular (FRESHNEY, 2000; MARTINS et al., 2009)

Portanto, a determinação de ausência de citotoxicidade no extrato hidroalcoólico bruto da polpa do baru, aliada à presença de seus constituintes deram suporte para a realização dos estudos das propriedades biológicas do baru.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Dentre os vários usos tradicionais do baru na medicina popular se encontra a indicação para infecções do trato urinário. Desta forma, o extrato foi submetido a ensaios antimicrobianos utilizando o método de difusão em disco sobre diferentes cepas bacterianas coletadas de amostras de urina.

Neste tipo de teste a ação antimicrobiana é verificada pela formação de halos de inibição ao redor do disco de papel (contendo o extrato) colocado no meio de cultura com a

bactéria alvo após incubação por 24 horas. Portanto quanto maior o halo formado mais ação antimicrobiana tem o extrato naquela dose avaliada.

Na tabela 7 são apresentados os resultados da avaliação antimicrobiana com o extrato nas várias concentrações. Neste ensaio não foi observada atividade antimicrobiana do extrato sobre nenhuma das cepas avaliadas. Somente os antibióticos usados como controles positivos foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das cepas avaliadas.

Tabela 7 - Resultados dos ensaios antimicrobianos do extrato hidroalcoólico da polpa de baru

Cepa Bacteriana	Halos de inibição (mm)														
	Concentração do extrato (mg/ml) e controles positivos											C1	C2	C3	C4
	1000	500	250	125	100	50	25	12,5	6,25	3,12					
<i>Proteus sp.</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	15	12	-	-
<i>Escherechia coli</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	9	-	20	-
<i>Enterobacter sp.</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	10	-	16	-
<i>Staphylococcus sp.</i>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	-	-	17	17

*Controles positivos: C1-Amoxicilina + Ácido Clavulânico; C2- Ácido Nadíxico; C3 Ciprofloxacino; C4-Ceftriaxona (Resultados de C1; C2; C3; C4 = mm).

SI - Sem Inibição.

(-) não apresentou halo de inibição.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nossos resultados mostraram que apesar da polpa apresentar substâncias com potencial antimicrobiano (Tabelas 4 e 5) o extrato hidroalcoólico bruto da polpa não apresentou atividade sobre nenhum dos patógenos avaliados. Para que um extrato apresente uma determinada atividade biológica não basta apenas à presença do(s) metabólito(s) secundário(s) biologicamente ativo, é também necessária quantidade suficiente para que essa atividade seja manifestada numa baixa concentração evitando problemas de toxicidade em doses mais elevadas. No caso do baru foram testadas doses de 1000 mg/mL a 3,125 mg/mL, entretanto, extratos são considerados com atividade antimicrobiana em concentrações abaixo

do valor da dose máxima avaliada (HOLETZ et al., 2002). Porém, existem trabalhos, principalmente na literatura nacional, que classificam como bioativos, extratos em concentrações de até 1000 mg/mL (SUFFREDINI et al., 2006; JANDÚ et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Os relatos populares que descrevem o uso do baru para tratamento de infecções urinárias não deixam claro qual parte da planta é utilizada, portanto, a comparação do nosso resultado em relação ao uso tradicional fica comprometida. Entretanto, a partir dos nossos resultados é possível verificar que a polpa não apresenta atividade antimicrobiana sobre as cepas bacterianas avaliadas não sendo então recomendada para esse uso.

4.3 Avaliação das atividades antiparasitárias

O extrato da polpa foi avaliado *in vitro* contra os parasitas causadores da Doença de Chagas (*T. cruzi*), Leishmaniose (*L. amazonensis*) e Esquistossomose (*S. mansoni*) devido à presença de algumas classes específicas de fitoconstituintes conhecidamente antiparasitárias como taninos e pela ocorrência do baru em áreas acometidas por essas três parasitoses (KATIKI, 2013).

A avaliação da atividade tripanocida não verificou nenhum efeito do extrato sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* em nenhuma das concentrações avaliadas (Tabela 8). O ensaio avalia a porcentagem de lise parasitária causada pela exposição do parasita ao extrato nas diferentes concentrações, neste ensaio apenas o controle positivo Benzonidazol apresentou resultado positivo nas concentrações avaliadas.

Pesquisa recentes tem demonstrado em estudos *in vitro* que várias classes de substâncias extraídas de plantas apresentam atividade contra as várias formas de desenvolvimento do *T. cruzi* como diterpenos (ESPÍNDOLA et al, 2004; AMBRÓSIO et al, 2008), lignanas (SOUZA et al, 2005; SARAIVA et al, 2007) e flavonoides (MARÍN et al, 2011). Apesar do extrato da polpa apresentar substâncias fenólicas, ele não apresentou ação tripanocida contra as formas tripomastigotas.

Tabela 8- Resultado da avaliação da atividade tripanocida do extrato e benzonidazol sob as formas tripomastigotas do *T. cruzi*

Extrato e controles	Concentração ($\mu\text{g/mL}$) x % de lise ($\pm\text{SD}$)		
	8	32	128
Extrato	5,2 \pm 2,5	7,5 \pm 3,4	9,9 \pm 2,5
Controle positivo	68 \pm 1,7	69,0 \pm 4,0	70,1 \pm 1,2
Controle negativo	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na avaliação leishmanicida o extrato apresentou 60% de atividade sob as formas promastigotas do *L. amazonensis* na maior concentração avaliada (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado da avaliação da atividade leishmanicida do extrato sob formas promastigotas do *L. amazonensis*

Extrato e controles	% de lise ($\pm\text{SD}$) x Concentração ($\mu\text{g/mL}$)							IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
Extrato	0	4,356	8,183	13,84	31,42	52,11	60,01	130,02

Controle positivo (Anfotericina) IC₅₀ = 0.15 $\mu\text{g/mL}$. Controle negativo 0% de lise.

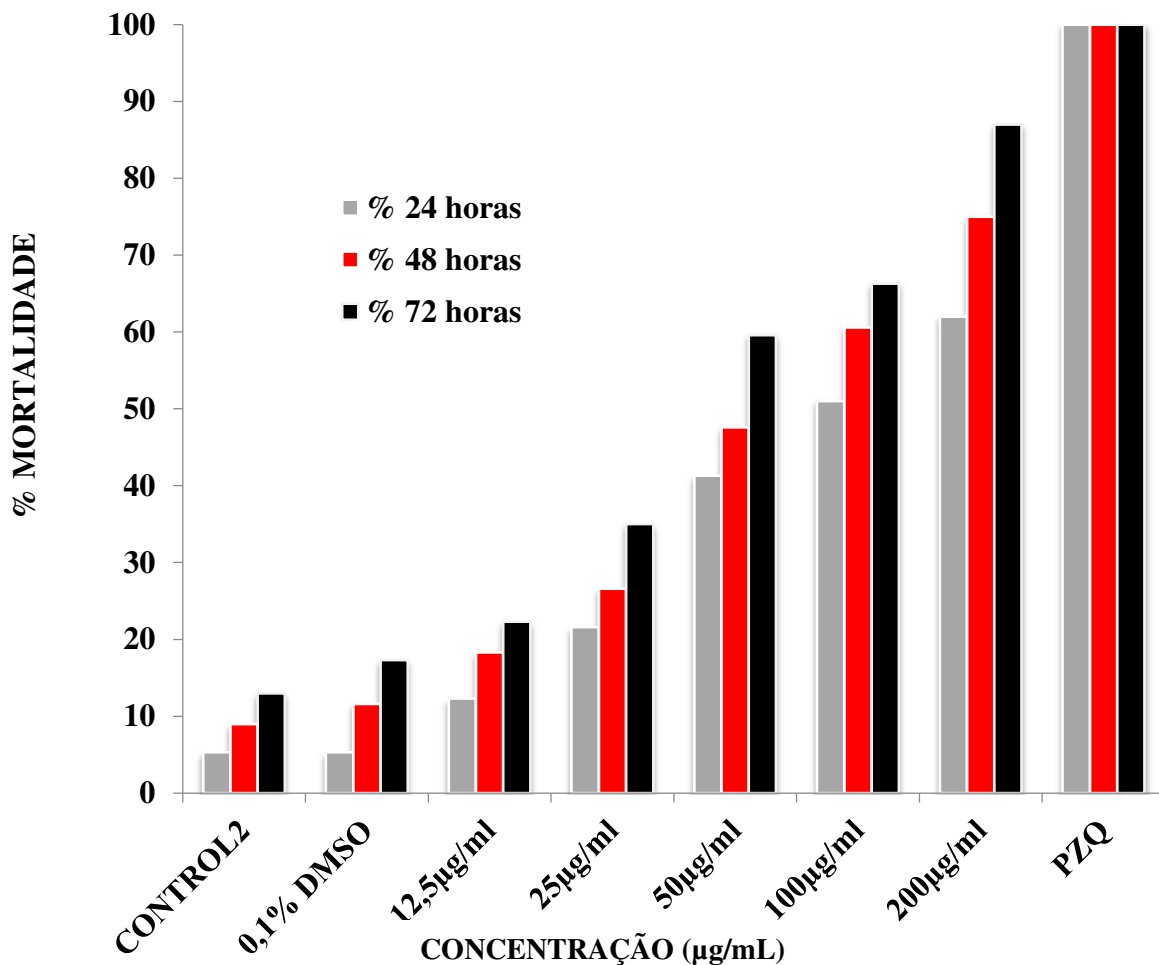
Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato bruto da polpa apresentou um IC₅₀ de 130 $\mu\text{g/mL}$ e de acordo com dados da literatura, para que um extrato seja considerado ativo é necessário que apresente valor de IC₅₀ < 10 $\mu\text{g/mL}$ (QUATTARA et al., 2014). Desta forma, o extrato não mostrou ação leishmanicida satisfatória que justificasse uma investigação mais profunda com o isolamento de compostos e novas avaliações biológicas.

Apesar do extrato não apresentar atividade tripanocida e ter apresentado fraca atividade leishmanicida na avaliação da atividade esquistossomicida mostrou-se muito promissor. Para a determinação da avaliação esquistossomicida do extrato da polpa foram utilizados ensaios sobre esquistossômulos e vermes adultos do parasita *S. mansoni*.

Na avaliação sobre os esquistossômulos o extrato apresentou atividade em todas as doses avaliadas, sendo a porcentagem de mortalidade dose dependente com valores mais significativos a partir da dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18).

Figura 18 – Resultado da avaliação de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de *S.mansoni*



Fonte: Resultados obtidos pelo autor.

A dose de 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 87% de mortalidade após 72h de exposição dos parasitas ao extrato, enquanto o Praziquantel na dose de 3,9 $\mu\text{g/mL}$, usado como controle positivo apresentou 100% de mortalidade nas primeiras 24 h de exposição (Tabela 10).

A partir dos resultados obtidos da Tabela 10 calculou-se o IC_{50} do extrato no ensaio com os esquistossômulos. Foram obtidos os valores de IC_{50} de 126,0 $\mu\text{g/mL}$; 79,0 $\mu\text{g/mL}$; 52,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para 24, 48 e 72h de exposição dos esquistossômulos ao extrato (Figura 19). Os resultados se mostram dependente tanto em relação ao tempo de exposição

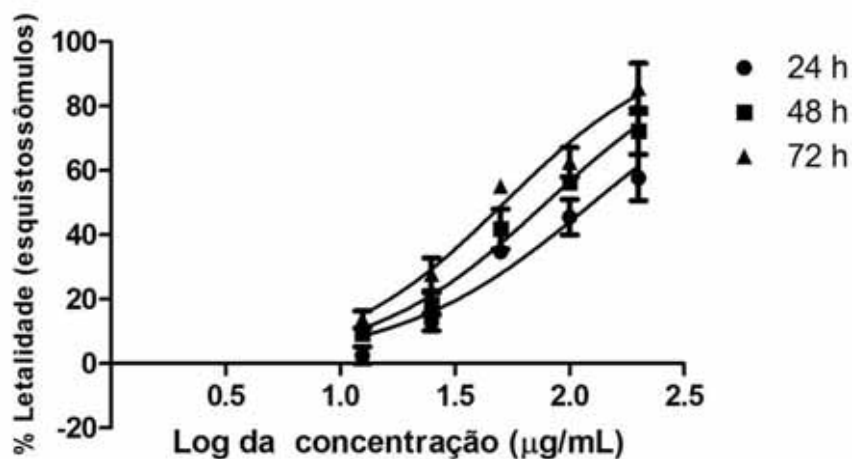
quanto em relação à concentração do extrato, ou seja, quanto maior o tempo de exposição e quanto maior a dose, maior a atividade do extrato sobre essa forma de vida do parasita.

Tabela 10 - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de *S. mansoni*

Concentração	Tempo de incubação (h)	% de vermes mortos
Controle 2	24	5,3
	48	9,0
	72	13
0,1% DMSO	24	5,3
	48	11,6
	72	17,3
Praziquantel	24	100
	24	12,3
	48	18,3
12.5µg/mL	72	22,3
	24	21,6
	48	26,6
25µg/mL	72	35,0
	24	41,3
	48	47,6
50µg/mL	72	59,6
	24	51,0
	48	60,6
100µg/mL	72	66,3
	24	62,0
	48	75
200µg/mL	72	87,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19– Resultado de IC₅₀ da avaliação do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de esquistossômulos de *S.mansoni*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para o ensaio com os vermes adultos foi observado que mesmo nas concentrações mais baixas, o extrato atua sobre o verme dificultando sua atividade motora o que pode ser um indicativo que o verme teria dificuldade de se acoplar ao seu parceiro para a ovoposição (diminuindo a carga parasitária) em um hospedeiro na presença do extrato (Tabela 11).

Na dose de 50 µg/mL a partir de 24 h de exposição dos vermes ao extrato 50% deles tem sua atividade motora reduzida ao mínimo Na dose de 100 µg/mL com 24 h de exposição, a mortalidade dos vermes é de 50 % e a partir de 48 h 100% de mortalidade (Figura 20).

O fato de o extrato ter diminuído a motilidade dos vermes adultos pode estar relacionada à presença dos alcaloides que podem atuar sobre o sistema nervoso do parasita causando paralisia motora (MIRANDA, 2010).

Os resultados obtidos até o momento (Tabela 11), apesar de preliminares, indicam uma moderada atividade da polpa do baru sobre o *S. mansoni* adulto, sendo os valores de IC₅₀ obtidos neste ensaio de 100 e 75,82 µg/mL, respectivamente para 24h e 48 h de exposição dos vermes ao extrato (Figura 21).

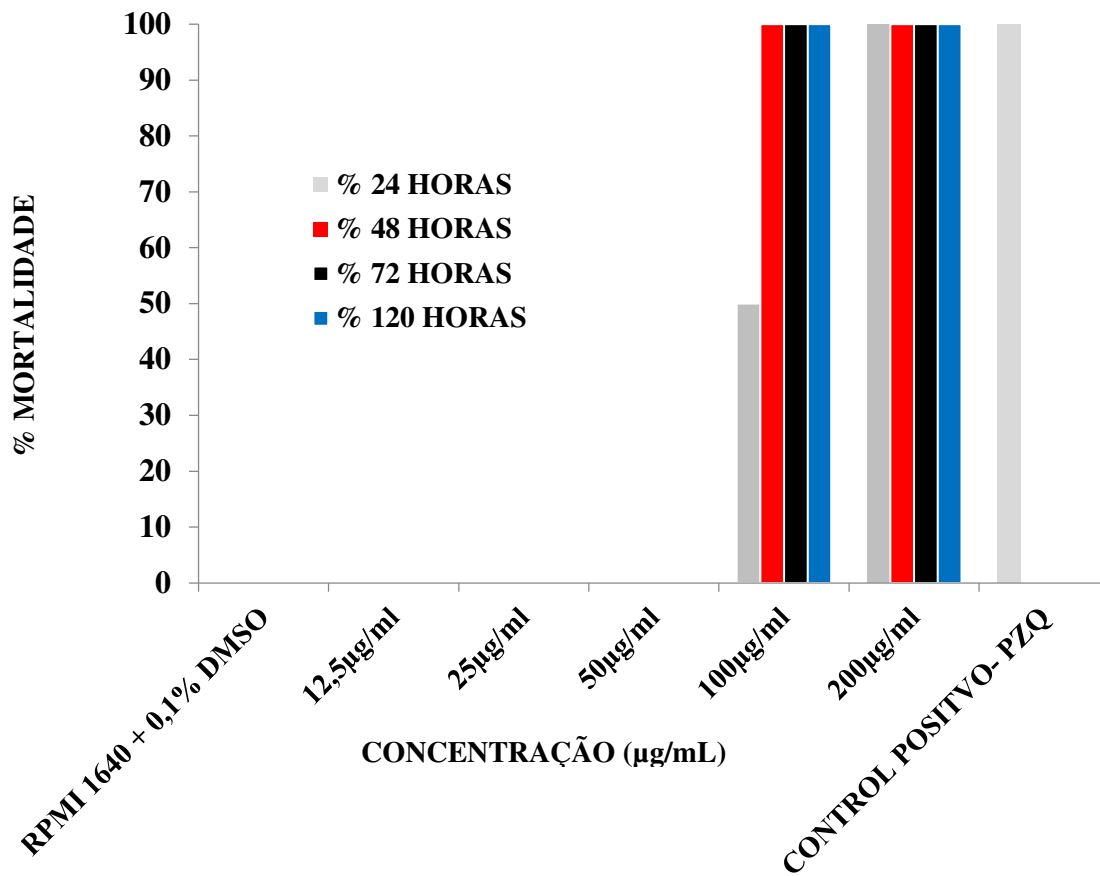
A atividade do extrato sobre a mortalidade dos vermes adultos pode estar relacionada à presença de taninos e saponinas que são conhecidos por sua atividade anti-helmíntica (KATIKI et al., 2013).

Tabela 11 – Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de vermes adultos de *S.mansoni*

Concentração	Incubação (h)	% de vermes mortos	Atividade motora	
			Diminuído	Mínimo
Controle Negativo	24	0	0	0
	120	0	0	0
Controle positivo	24	100	0	0
12,5 µg/mL	24	0	100	0
	48	0	100	0
	72	0	100	0
	120	0	100	0
25 µg/mL	24	0	100	0
	48	0	100	0
	72	0	100	0
	120	0	100	0
50µg/mL	24	0	0	50
	48	0	0	50
	72	0	0	50
	120	0	0	50
100 µg/mL	24	50	0	50
	48	100	0	0
	72	100	0	0
	120	100	0	0
200 µg/mL	24	100	0	0
	48	100	0	0
	72	100	0	0
	120	100	0	0

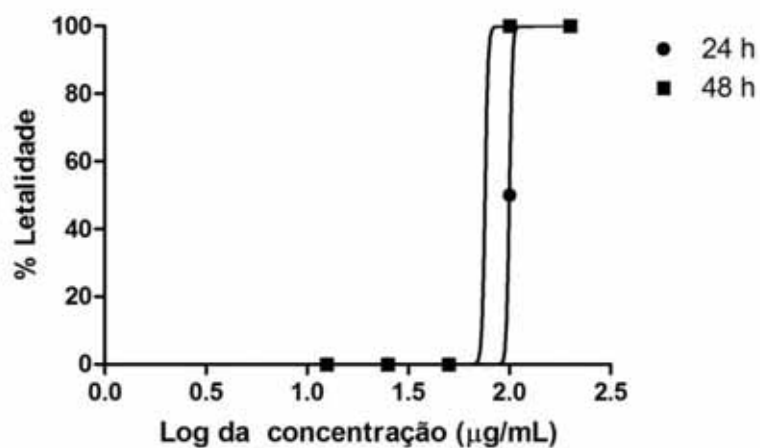
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de vermes adultos de *S.mansoni*



Fonte: Resultados obtidos pelo autor.

Figura 21 – Representação IC_{50} do efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do baru sobre a mortalidade de vermes adultos de *S.mansoni*



Fonte: Resultados obtidos pelo autor.

Tendo como base os resultados da avaliação esquistossomicida do extrato bruto, as frações obtidas deste foram também avaliadas sobre os vermes adultos. A partição do extrato bruto com os vários solventes de diferentes polaridades promove a remoção seletiva das substâncias solúveis nesses solventes. A partição com hexano forneceu a fração hexânica composta por substâncias apolares. Com o clorofórmio são extraídos compostos de polaridade intermediária solúveis em clorofórmio e com butanol compostos de alta polaridade, mas pouco solúveis em água (SIMÕES et al., 2007). Com este procedimento seria possível, após novos ensaios biológicos, determinar em qual fração se encontraria o princípio ativo que deu origem à atividade do extrato bruto e isolá-lo (coluna ou HPLC). No entanto, os resultados da avaliação das partições sobre os vermes adultos foram contrários ao esperado, pois nenhuma das frações avaliadas apresentou atividade (Tabelas 12, 13 e 14). Esses resultados nos levam a crer que a atividade apresentada pelo extrato bruto está relacionada ao sinergismo entre os vários fitoconstituintes presentes no extrato e não a uma substância ou classe ou compostos agindo isoladamente.

Recentemente inúmeros trabalhos descrevem a atividade esquistossomicida de extratos de plantas e óleos essenciais (YOUSSIF et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; SALLOUM et al., 2012), entretanto, em grande parte desses trabalhos a atividade apresentada pelo extrato está relacionada a um composto específico diferente dos resultados obtidos em nossa pesquisa.

O resultado obtido *in vitro*, a princípio, indica um possível uso da polpa como auxiliar no controle da doença, pois o Praziquantel apesar de eficaz não impede uma nova contaminação e, além disso, o uso muito frequente do Praziquantel pode desenvolver linhagens de parasitas cada vez mais resistentes, o que já vem ocorrendo em alguns locais onde existe a endemia (ARAÚJO, 2010).

O paladar agradável da polpa aliado a seu potencial nutricional e terapêutico (até o momento confirmado em ensaios *in vitro*) sobre o *S. mansoni*, poderá contribuir ainda mais para que a espécie seja preservada. Entretanto, a afirmação do uso terapêutico da polpa contra o parasita só virá após confirmação através da realização de ensaios *in vivo*.

Tabela 12 – Resultados obtidos da avaliação da fração hexânica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do *S. mansoni*

Concentração	Incubação (h)	% de vermes mortos	Atividade motora	
			Diminuído	Mínimo
Controle Negativo	24	0	0	0
	120			
Controle positivo	24	0	0	0
12,5 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
25 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
50µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0
100 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0
200 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	50	0
	120	0	50	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13 – Resultados obtidos da avaliação da fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do *S. mansoni*

Concentração	Incubação (h)	% de vermes mortos	Atividade motora	
			Diminuído	Mínimo
Controle Negativo	24	0	0	0
	120			
Controle positivo	24	0	0	0
12,5 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
25 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
50µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
100 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0
200 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	50	0
	72	0	50	50
	120	0	50	50

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14 – Resultados obtidos da avaliação da fração butanólica do extrato hidroalcoólico da polpa de baru frente aos vermes adultos do *S. mansoni*

Concentração	Incubação (h)	% de vermes mortos	Atividade motora	
			Diminuído	Mínimo
Controle	24	0	0	0
Negativo	120			
Controle positivo	24	0	0	0
12,5 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
25 µg/mL	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	120	0	0	0
50µg/mL	24	0	0	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0
100 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0
200 µg/mL	24	0	25	0
	48	0	25	0
	72	0	25	0
	120	0	25	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante

Além dos efeitos biológicos sobre parasitas e microrganismos que afetam o homem muitas plantas também têm despertado o interesse devido a seu poder antioxidante. Dentre as plantas com propriedades antioxidantes, maior destaque tem sido dado àquelas que apresentam compostos fenólicos, principalmente frutas e hortaliças, sendo que grande parte da atividade antioxidante está relacionada à presença de flavonoides. Recentes estudos sugerem que a ingestão de flavonoides pode reduzir o risco de tumores da mama, cólon, pulmão, próstata, e pâncreas além de prevenir doenças cardiovasculares (ROMAGNOLO; SELMIN, 2012).

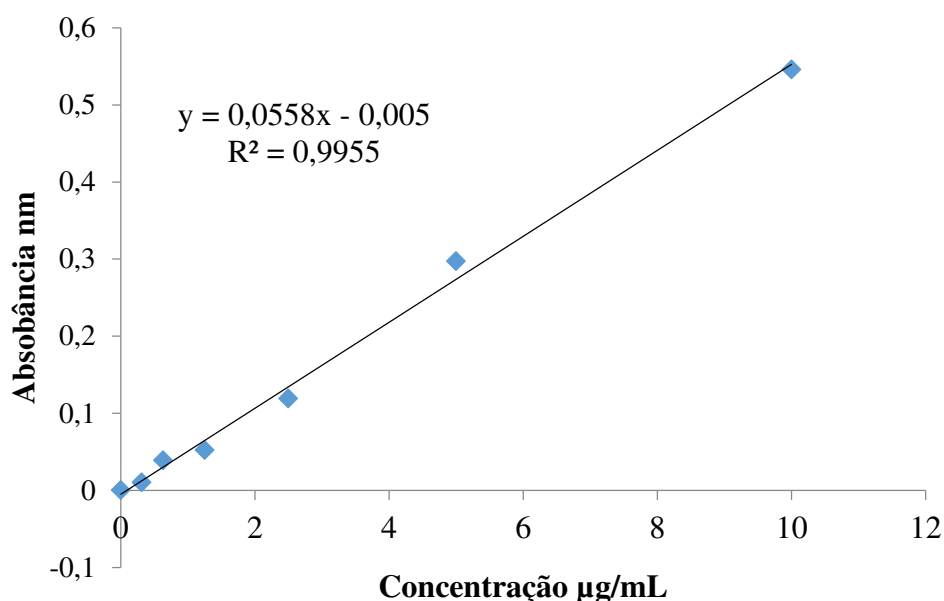
O consumo de frutas contendo compostos fenólicos tem um apelo ainda maior devido a potente propriedade antioxidante dessas substâncias na prevenção de doenças relacionadas ao stress oxidativo como câncer e processos inflamatórios (DAI; MUMPER, 2010; FIDANBOYLU et al., 2011).

A capacidade antioxidante de alimentos é determinada por uma mistura de diferentes antioxidantes, com diferentes mecanismos de ação, que pode ser determinada por uma variedade de metodologias com base nestes diferentes mecanismos. Dentre essas metodologias o método DPPH é um dos mais utilizados (ALÍ et al., 2008; ALMEIDA et al., 2011; KUSKOSKI et al., 2005; DU et al., 2012).

Visando a propagação dos benefícios do consumo da polpa do baru foram determinadas a quantidade de polifenóis totais e a atividade antioxidante da polpa utilizando o modelo DPPH.

Os resultados da avaliação de polifenóis totais é expresso em termos de mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100g de fruta úmida (FU). Com base na absorbância das amostras de ácido gálico (em várias concentrações com o reagente de Folin) foi possível construir uma curva cuja equação de reta foi utilizada para a determinação da quantidade de polifenóis totais. O resultado de $R=0,9955$ mostra a concordância entre os valores obtidos entre as análises (Figura 22).

Figura 22 – Gráfico de absorvância x concentração do ácido gálico. Determinação da equação da reta



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base na equação da reta e medida da absorvância da amostra foi encontrado o valor de 5,68 mg de ácido gálico por g de fruta fresca, logo em 100g de fruta o valor de fenóis totais passa a ser 568 mg EAG/100g FU. De acordo com os resultados apresentados o conteúdo de fenólicos totais na polpa do fruto é bastante elevado quando comparado a outras frutas como a maçã com valores de 118 mg EGA/100g FU e ainda de acerola de diversas variedades com valores entre 174 a 375 mg EGA/100g FU (KIM et al, 2003).

Tabela 15 – Resultados das análises de absorvância da amostra de baru (polpa úmida)

Amostra	Quantidade de amostra (g)	Quantidade de amostra/mL	Abs. da amostra da polpa a 750 nm
1	0,15	0,05	0,304
2	0,15	0,05	0,304
3	0,15	0,05	0,303
Média	0,15	0,05	0,3036 ± 0,0103

Fonte: Elaborado pelo autor.

A determinação da atividade antioxidante da polpa do baru foi realizada usando como padrão de atividade antioxidante o ácido ascórbico (vitamina C) sendo o resultado expresso IC₅₀. Com base na absorvância das amostras de ácido ascórbico, após reação com DPPH, foi

possível construir uma curva cuja equação de reta que foi utilizada para a determinação do IC₅₀ (Tabela 16 e Figura 23) do ácido ascórbico para posterior comparação com o IC₅₀ encontrada para a polpa da fruta.

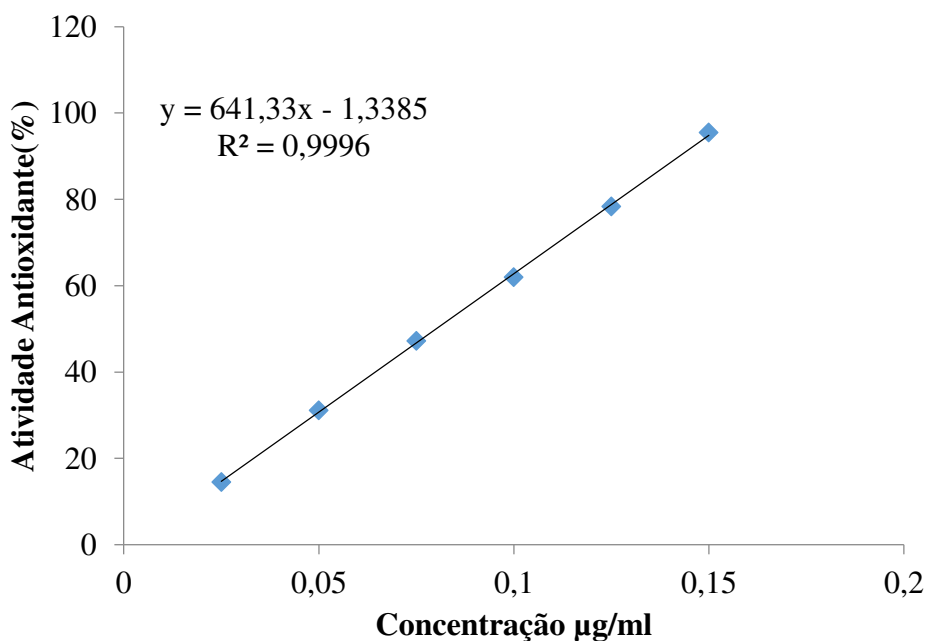
Tabela 16 – Resultados das medidas de absorbância do ácido ascórbico e % de inibição do radical no ensaio de DPPH (Atividade Antioxidante)

Ácido ascórbico µg/mL	Absorbância da amostra 515 nm	% de Inibição
0,025	0,885 ± 0,006	14,543 ± 0,625
0,05	0,713 ± 0,011	31,113 ± 1,121
0,075	0,546 ± 0,014	47,232 ± 1,407
0,1	0,394 ± 0,007	61,936 ± 0,728
0,125	0,224 ± 0,014	78,342 ± 0,541
0,15	0,0466 ± 0,003	95,495 ± 0,331

Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultado de R=0,9956 para a reta do ácido ascórbico mostra a concordância entre os valores obtidos entre as análises.

Figura 23 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico em ensaio de DPPH



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da reta obtida é possível substituir no lugar do y o valor de 50% que fornecerá em x a dose necessária para que essa substância forneça 50% de atividade antioxidante correspondendo ao IC₅₀. Fazendo essa operação o valor encontrado para o ácido ascórbico foi de IC₅₀ = 0,08 µg/mL.

Esse resultado mostra a capacidade da vitamina C em inibir radicais, ou seja, sua atividade antioxidante, pois quanto menor o valor de IC₅₀ maior é o poder oxidante.

Assim como para o ácido ascórbico o extrato também foi submetido ao mesmo procedimento com DPPH fornecendo dados de absorvância e a partir deles os valores de % de inibição (Tabela 17 e Figura 24).

Tabela 17 – Resultados das análises da absorvância da polpa dos frutos em ensaios de DPPH

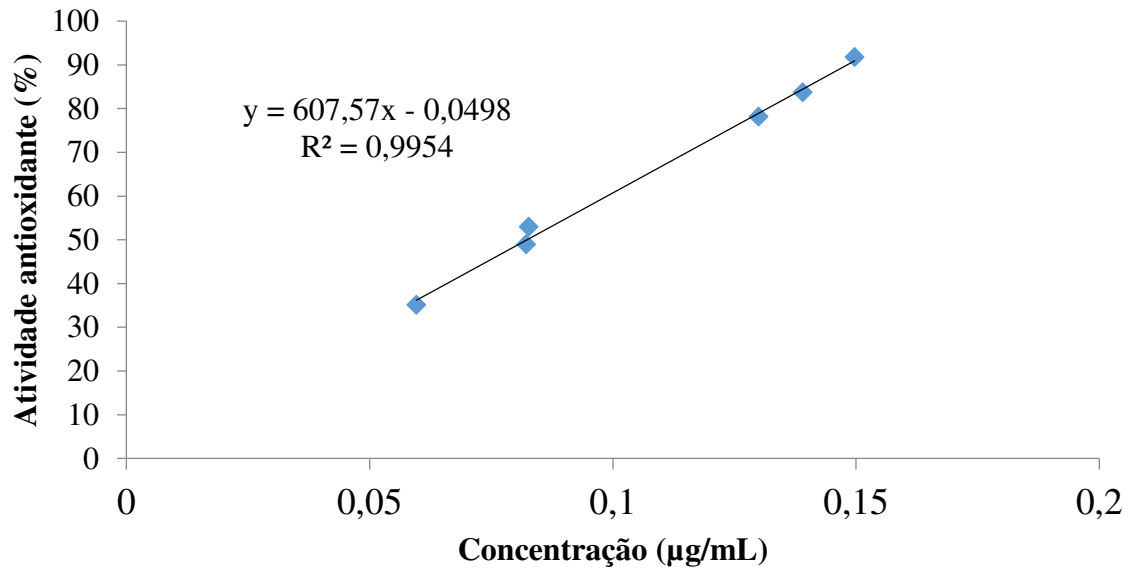
Amostra da polpa µg/mL	Absorvância da amostra nm	% de Inibição
0,05962	0,672 ± 0,042	35,111 ± 4,073
0,08224	0,529 ± 0,044	48,938 ± 4,250
0,08275	0,331 ± 0,031	53,011 ± 3,009
0,130004	0,226 ± 0,0561	78,137 ± 5,423
0,139122	0,168 ± 0,044	83,711 ± 4,29
0,149741	0,085 ± 0,026	91,763 ± 2,56

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados de % de inibição em função da concentração do extrato foi feita o gráfico pra a obtenção da reta para o cálculo do IC₅₀ para o extrato.

Utilizando a equação $y = 607,57x - 0,0498$ chegou-se ao valor de IC₅₀ = 0,082 µg/mL. Esse resultado mostra que o extrato possui excelente atividade antioxidante comparável à da vitamina C e que a grande quantidade de substâncias fenólicas determinada anteriormente pode ser responsável por esse resultado tão expressivo.

Figura 24 – Atividade antioxidante do extrato da polpa fresca de baru em ensaio de DPPH



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 CONCLUSÕES

A polpa dos frutos do baru apresentou taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas em grandes quantidades;

A polpa dos frutos não apresentou citotoxicidade sobre células de fibroblastos de mamífero LLC- MK₂ nas concentrações avaliadas;

O extrato da polpa não apresentou atividade antimicrobiana sobre bactérias que causam infecção urinária não sendo recomendado seu uso medicinal para essa finalidade;

A polpa não apresentou atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*;

A polpa apresentou fraca atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas do *L. amazonensis*;

A polpa dos frutos apresentou moderada atividade esquistossomicida *in vitro* com IC₅₀ de 52 µg/mL sobre os esquistossômulos e 76 µg/mL sobre os vermes adultos, sendo um indicativo para a realização de ensaios *in vivo*, esta atividade pode ser atribuída ao sinergismo entre os fitoconstituintes presentes e não a compostos atuando isoladamente.

A polpa apresentou grande quantidade de compostos fenólicos (568mgEAG/100g FU);

A polpa apresentou excelente atividade antioxidante com IC₅₀=0,082 µg/mL igual à obtida para a vitamina C.

A partir dos resultados dessa pesquisa foi possível verificar algumas das propriedades biológicas do baru. A divulgação desses resultados pode proporcionar aumento do consumo da fruta como alimento nutracêutico contribuindo para sua preservação, com destaque para a sua atividade antioxidante, visto que a atividade esquistossomicida deve ainda ser confirmada em ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALÍ, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, Indian, v.41, p.1–15, 2008.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 464 p.,1998.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 83 p.,1987.
- ALMEIDA, M. M.; SOUSA, P. H; ARRIAGA, A. M.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits northeastern. **Food Research International**, Brazil, v.44, p. 2155–2159, 2011.
- ALVARENGA, S. F. M. C.; ANDRADE, J.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; TEIXEIRA, M. L.; GOMES, M. S.; SILVA, L. F. Quantificação fenólica, atividade antifúngica e antioxidante de extratos provenientes da aceroleira (*Malpighia emarginata DC.*). **Magistra**, Bahia, v.25, n.3/4, p.276-284, 2013.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v.5, n.3, p. 450-513, 2013.
- AMARAL R. S; TAIUIL L. D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impacto f the shistosomiasis control programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, p.79-85, 2006.
- AMBRÓSIO, S. R.; ARAKAWA, N. S.; ESPERANDIM, V.R.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA COSTA, F. B. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy reserch**, v.10, p.1413-1415, 2008.
- ANDRADE, C.; PEITZ, C.; SILVA, C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KEBER, V. A. Revisão do gênero Acácia – Atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**, Curitiba-PR, v.4, n.1, p.47-56, 2003.
- ARAÚJO, N. **Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental da Esquistossomose mansoni**. Belo Horizonte-MG, 144p., 2010.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.25, n.6 B, p.1172-1188, 2002.
- BARROS, I. B.; REZENDE, M. I.; SOUZA, J. F. de D.; FERREIRA, D. T. **Avaliação do potencial antifúngico de extratos de *Coccoloba mollis* (Polygonaceae)**, Londrina, 126p., 2009.

BARROS, M.A.M. O Baru e os Camponeses: Uma frutífera do cerrado e a agricultura familiar sob o jugo do capital. **Revista Da Faculdade Montes Belos**, Montes Belos-MG, v.4, n.1, 2011.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G. C; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C.D.S.; PATRÍCIO F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N.M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R.F. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Maranhão, v.16, p.631-637, 2006.

BIESKI I. G. C. SANTOS F. R., OLIVEIRA R. M., ESPINOSA M. M., MACEDO M., ALBUQUERQUE U. P., MARTINS D.T. de O. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Mato Grosso, ed.1, v.1, p.36, 2012.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plants of Science**, Vandoeure-France, v.161, n.5, p. 839-851, 2001.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science Technology- **Lebens Mittel Wiss. Technology**. v.28, p.25-30, 1995.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, S.L.; CROFT, P.N.; MARSHALL, S.J.; GHAZANFAR, S.A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal Ethnopharmacology**, v.89, p.185- 191, 2003.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A.de M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Niterói-RJ, p.282-288, 2010.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomedical and Environmental Science**, Buenos Aires, v.1, n.1, p. 19-33. 1988.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. Viçosa-MG, 2ªed, 2004.

Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em 20 de abril de 2014.

Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acesso em 20 de abril de 2014.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S.; Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, **Free Radicals Biology and Medicine**, Stockholm- Sweden, v.29 n. 3- 4, p.323-333, 2000.

CHEN, J.; WANG, X.; QU, Y.; CHEN, Z. ; CAI, H.; XIU, X.; XU, F.; TU-LIN L.; BAO-CHANG, C. Analgesic and anti-inflammatory activity and pharmacokinetics of alkaloids from seeds of *Strychnos nux-vomica* after transdermal administration: Effect of changes in alkaloid composition. **Journal of Ethnopharmacology**, China, v. 139, n.1, p.181–188, 2012.

COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C. Atividade Citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae), **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Recife, v. 22 n.2, 2003.

CUNHA, A.P., SILVA, A.P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 701p., 2003.

DAI, J.; MUMPER, R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, Lexington – Kentucky, v.15, p.7313-7352, 2010.

DALL'ANTONIA, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193, 2013.

DESHPANDE, S. S., CHERYAN, M., SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.24, n.4, p.401-449, 1986.

DEWIK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. Chichester, 2ed., 2002.

DU, B. I. N; SHI, P. B.; LI, F. Y.; LI, J.; ZHU, F. M. Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. **Journal of Medicinal Plants Research**, Qinhuangdao - China, v.17, p.3381-3387, 2012.

DURIGAN, G.; MAMEDE, M. C. H.; IVANAUSKAS, N. M.; SIQUEIRA, M. F. de S.; JOLY, C. A.; MOURA, C. de; BARROS, F. de; SOUZA, F. M. de; VILELA, F. E. S. P.; ARZOLLA, F. A. R. dal P.; FRANCO, G. A. D. C.; CORDEIRO, I.; KOCH, I.; BAITELLO, J. B.; LOMBARDI, J. A.; LIMA, L. R. de; LOHMANN, L. G.; BERNACCI, L. C.; ASSIS, M. A. de; AIDAR, M. P. M.; WANDERLEY, M. das G. L.; TONIATO, M. T. Z.; RIBEIRO, M.; GROppo, M.; CAVASSAN, O.; SANO, P. T.; RODRIGUES, R. R.; FISCH, S. T. V.; MARTINS, S. E. Fanerógamas. In: RODRIGUES, R. R.; BONONI, V. L. R. **Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica, p.104-109, 2008.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, EUA, v.12, n.1, p. 122-32. 2011.

ESPÍNDOLA, L. S.; VASCONCELOS JÚNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris*. **Herbal Medicine**, New York, v.70, n.11, p.1093-1095, 2004.

ESTEVEES-PEDRO, N. M.; BORIM, T.; NAZATO V. S., V. S.; SILVA, M. G.; LOPES, P. S.; SANTOS, M. G.; DAL BELO, C. A.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; GROppo, F. C.; GERENUTTI, M.; FRANCO, Y. O. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 12, n. 9, 2012.

FANTI, F. P. **Aplicação de extratos de folhas e de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae) e de auxinas sintéticas na estaquia caular de *Duranta repens* L. (Verbenaceae)**, Curitiba, 58p., 2008.

FAROUK, L.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; CHAIT, A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**. Marrakech, v.115, ed.3, p.449-454, 2008.

FERRARI, M. L. A.; COELHO, P. M. Z.; ANTUNES, C. M. F.; TAVARES, C. A. P.; CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 81, n.3, p.190-195, 2003.

FERREIRA, L. A.; LIMA F.L.; ANJOS M.R.; COSTA, J. M. L. Forma tumoral encefálica esquistossomótica: apresentação de um caso tratado cirurgicamente. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, p.89-93, 1998.

FIDANBOYLU, M.; GRIFFITHS, L. A.; FLATTERS, S. J. L. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **Plos One**, Califórnia, v.6, n. 9, 25212 p., 2011.

FILGUEIRAS, T. S.; SILVA, E. Estudo preliminar do baru (*Leg. Faboideae*). **Brasil Florestal**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 33-39, 1975.

FIOCRUZ - ARAÚJO-JORGE, T.; LANNES, J.; SOEIRO, N.; **Clássicos em doença de Chagas: história e perspectivas no centenário da descoberta**, Rio de Janeiro, ed.FIOCRUZ, 556p., 2009.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. Atualização em doença de Chagas. Rio de Janeiro, ed. Fiocruz, 2013. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/search/site/oque%C3%A9%20doen%C3%A7a%20de%20chagas>

FOSSATI, E.; EKINS, A.; NARCROSS, L.; YUN, Z.; FALGUEYRET, J.; BEAUDOIN, G. A. W. ; FACCHINI, P.; MARTIN, V. J. J. Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Communications**, United States of American, v.5 n.3283, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513861>. htm. Acesso em 14 de abr.2014.

FRANCISCO, K. M. S. Fitotherapy: an option in odontological treatment. *Revista Saúde, Araçatuba - Brasil*, v.4, n.1, 2010.

FREITAS, A. R. R.; OLIVEIRA, A. C. P.; SILVA, L. J. Schistosomal myeloradiculopathy in a low-prevalence area: 27 cases (14 autochthonous) in Campinas, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Campinas, v. 105, n.4, p.398-408, 2010.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, Indianópolis, 4 ed., 2000.

FREZZA, T. F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. L.; GREMIÃO, M. P. D.; ALLEGRETTI, S. M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28. n.2, 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Joao Pessoa, v.15, n.2, p.178-182, 2005.

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G. DE; AUREA, A. P.; SANTOS, C. F. DOS; ALMEIDA, R. F. **Epidemiologia das Doenças Negligenciadas no Brasil e Gastos Federais com Medicamentos**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília, 2011.

GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. Coimbatore-India, v. 01, ed.6, p. 40-44, 2011.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, p.353-358, 2005.

HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. **Drugs & Aging**, Singapore, v.18, n.9, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, Singapore, v. 46, p.531-542, 2009.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern technique of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 302 p., 1998.

HARROP, R.; WILSON, R. A. Protein synthesis: a release by cultures schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Cambridge, v.103, p.265-274, 1993.

HOLETZ F. B.; PESSINI G. L, SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.7, n.7, p.1027-1031, 2002.

HUFFMAN, M. A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.62, p.371-381, 2003.

JANDÚ, J. J. B.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, A. P. C.; SOUZA, R. M.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; BRESSAN, R. C.; FIGUEIREDO, Q.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, p. 413-418, 2013.

JORGE, S. G. Ascite na doença hepática. **Hepatologia Médica**. 2010. Disponível em: <http://http://www.hepcentro.com.br/ascite.htm>. Acesso em 25 de abr. 2014.

JAMISON, J. R. **Clinical Guide to Nutrition and Dietary Supplements in Disease Management**, Churchill Livingstone, p. 525, 2003.

KARAMAĆ, M. Chelation of Cu (II), Zn (II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.10, p.5485-5497, 2009.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F.; GONZALEZ, J. M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.192, n.1-3, p.218-227, 2013.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. **Esquistossomose, xistosa, barriga d'água**. Ciência e Cultura, São Paulo, v.55, n.1, 2003.

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Modifications of Strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Germany, v.55, p.4066- 4072, 2007.

KEPP, O.; MENGER, L.; KROEMER, G. Anticancer activity of cardiac glycosides. **Oncoimmunology**, Austin-USA, v. 1, n. 9, p. 1640-1642, 2012.

KIM, D.-O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Kidlington, v.81, p.231-326, 2003.

KUMAR, D. Antiinflammatory, analgesic, and antioxidant activities of methanolic wood extract of *Pterocarpus santalinus* L. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v.2, p.200-202, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. **The Scientific World Journal**, New York, v.2013, p.1-16, 2013.

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar a actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LADEIRA, A. M.; ZAIDAN, L. B. P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. *Ageratum conyzoides* L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Hoehnea** v. 15, p. 53-62, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2.ed, v.1, 51p., 2002.

LORENZI, H. BACHER; L.; LACERDA; M.; SARTORI; S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum, 640p., 2006.

LUTZ, A.M.D. *Schistosoma mansoni* and Schistosomiasis observed in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, c.11, p.109-140, 1919.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B. C.; SOARES, C. S.; SILVA, S. H.; SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, Franca-SP, v. 104, p. 1197-1202, 2009.

MAGALHÃES, L. G.; DE SOUZA J. M.; WAKABAYASHI, K. A. L.; LAURENTIZ, R. DA S.; VINHÓLIS, A. H. C.; REZENDE, K. C. S.; SIMARO, G. V.; BASTOS, J. K.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; CUNHA, W. R.; SILVA; M. L. A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Ribeirão Preto, v.10, n.5, p. 1747 – 1754, 2012.

MAHMOUD, A. A. F. BRAUNWDD, E.; KASPER, D. L. Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. **Harrison Medicine Intern**, Rio de Janeiro, ed.17, v.1, p.1330-1336, 2008.

MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula adult flukes on *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Cambridge, v.137, p.85-98, 2010.

MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; LÓPEZ-CÉSPEDES, A.; OLMO, F.; VILLEGAS, N.; DÍAZ, J. G.; ROSALES, M. J.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas disease. **Journal of Nature Products**, Granada – Espanha, v.25, n.74, p.744-750, 2011.

MARTINS, D.M.; MARQUES, M.M; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; PAVESI, S.C.; WADT, N.S.; FERNANDES, K.P.; Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientide Saúde**, São Paulo, v.8, n.11, p.99-104, 2009.

MASIMIREMBWA, C. M.; BREDBERG, U.; ANDERSSON, T. B. Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. **Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics & Bioanalytical Chemistry Clinic Pharmacokinetic**, Sweden, v. 42, p. 515, 2003.

MATSUMOTO, P. S. S; LIMA, J.; CASAGRANDE, B. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. Hygeia, v.9, n.17, p.195-203, 2013- Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia>.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. & FAGG, C. W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Cerrado: ecologia e flora. **Embrapa Informação e Tecnologia**, Brasília, v.2, p.423-1279, 2008.

MIRANDA, M.A. **Avaliação do potencial antiparasitário do extrato e de alcaloides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil.**, Ribeirão Preto, 79p., 2010.

MIRANDA, G.S.; SANTANA, G.S.; MACHADO B.B.; COELHO, F.P.; CARVALHO, C.A. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MMA- Ministério do Meio ambiente acesso em 17 de abril de 2014. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.

MORAES, J.de. **Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Shistosoma mansoni***. São Paulo, 185 p., 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Rockville Pike – USA, v.16, p.55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology**, v.86, p.999–1002, 2000.

MUGHAL, A.; VUKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. B. Micronucleus and comet assay and peripheral blood in juveniles rat: establishment of assay feasibility time of sampling and the induction of DNA damage. **Mutation Research**, Indian, v. 700, n.1-2, p.86-94, 2010.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI E. V. S.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v.29, n.3, p.467-470, 2006.

NAZATO, V. S.; MAURO, L. R.; VIEIRA, N. A. G.; ROCHA-JUNIOR, D. S.; SILVA, M. G.; LOPES, P. S.; DAL-BELO, C. A.; COGO, J. C.; SANTOS, M. G.; HÖFLING, M. A. C.; FRANCO, Y. O. *In Vitro* Antiophidian Properties of *Dipteryx alata* Vogel Bark Extracts. **Molecules**, Basel, v.15, p.5956-5970, 2010.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. **Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão: Norma aprovada**. ed. 23, 2003.

NITIEMA, L. W.; SAVADOGO, A.; SIMPORE, J.; DIANOU, D.; TRAORE, A.S. In vitro Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. **International Journal of Microbiological Research**, Ouagadougou, ed.3, n.3, p.183-187, 2012.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, Florianópolis, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NOVAES, W. Cerrado: um drama em silêncio. **National Geographic Brasil**, São Paulo, n. 103, p. 54-67, 2008.

NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; ACHKAR, M. T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.11, n.2, p.535-539, 2013.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W. de S.; MELLO, A.V. de; DIDONET, J.; PORTELLA A. C. F.; NASCIMENTO, I. R. do. Toxicidade de óleos essenciais de eucalipto e citronela sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia- Brasil, v. 27, n. 4, p. 609-618, 2011.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants: hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, Basel, v.16, p.2191-2217, 2011.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L.; SANTOS OLIVEIRA, A. S.; JUNIOR, I. M.; DE CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L.; JERALDO, V. L.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, Campinas, ed.132, n.2, p.135-143, 2012.

QUATTARA, L. P.; SANON, S.; MAHIU-LEDDET, V.; GANSANÉ, A.; BAGHDIKIAN, B.; TRAORÉ, A.; NÉBIÉ, I.; TRAORÉ, A. S.; AZAS, N.; OLLIVIER, E.; SIRIMA, S. B. In vitro antiplasmodial activity of some medicinal plants of Burkina Faso. **Parasitology Research**, Burkina Faso, v. 113, n. 1, p. 405-416, 2014.

PELISSARI, M.D.; CECHINEL, P.M.; SOUSA-GOMES, M.L.; LIMA JÚNIOR, F.E.F. Treatment of Visceral Leishmaniasis and American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Epidemiology**, Brasília, v.20, n.1, p.107-110, 2011.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica e Biologica**, Uberaba, v. 20, 191-208, 1953.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, Bulgaria, ed. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro Praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**, London, v.34, p.527-533, 2004.

PITOZZI, V.; PALLOTTA, S.; BALZI, M.; BUCCIOLINI, M.; BECCIOLINI, A.; DOLARA, P.; GIOVANNELLI, L. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. **Free Radical Research**, London, v.40, n.11, p.1149-1156, 2006.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews**, London, v.7, p.925-935, 2008.

PRATA, A. Experience in Brazil with the use of available schistosomicides in mass treatment campaigns. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Alecrim - MG, v.10, p. 355-360, 1976.

PRATA, A.; BINA, J. C.; BARRETO, A. C.. Attempt to control schistosomiasis transmission by Oxammiquine, in a hyperendemic locality. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Alecrim-MG, v. 22, s. 4, p. 65-72, 1980.

PRIMO, A. V. P. **Efeito antifúngico do “Baru” (*Dipteryx alata* Vogel) no controle da pinta preta na cultura do tomateiro**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2010.

PUEBLA, P. FRANCO, Y. O.; FRANCO, L. M.; SANTOS, M. G.; SILVA, R. V.; MAURO, L. R.; SAN FELICIANO, A. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, in active species against *Bothrops jararacussu* Venom. **Molecules**, Basel, v.15, p.8193-8204, 2010.

RAGHAVAN, N. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre-and post-exposure to miracidium of *Shistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Rockville-USA, v. 126, n. 2, p. 181-191, 2003.

RAMIREZ, B.; BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M.A.; NWAKA, S. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opinion Drugs Discovery**, Geneva - Switzerland, ed. 2, v. 5, c. 61, 2007.

RIBEIRO, J. F; ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Aproveitamento Alimentar de Espécies Nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1987. 83 p.

RIBEIRO, J. F ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. **Cerrado: Espécies Vegetais Úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464 p.

RIBEIRO, J. F; SANO, S. M.; BRITO, M. A. de; VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.75-99, 2006.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J., MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual. (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, Bethesda, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>.

ROGERO, S.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade. Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O. I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, Arizona, v. 31, p. 206–238, 2012.

SALIM, A. A.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Plants. **In: Bioactive Molecules and Medicinal Plants**, Ohio- USA, c.1, 1-24p., 2008.

SALLOUM, A. I. O.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; MEDEIROS, J.; SILVA, M. L. A.; MAGALHÃES, L. G.; CUNHA, W. R. In vitro schistosomicidal activity of *Usnea steineri* extract and its major constituent (+)-usnic acid against *Schistosoma mansoni*. **Herbal Medicine**, Franca – SP, v.78, 2012.

SALUNKHE, D. K., CHAVAN, J. K., KADAM, S. S. **Dietary tannins: consequences and remedies**, Boca Raton, Flórida, 130p., 1990.

SANO, S. M.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. F. Baru. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Baru: biologia e uso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, p. 75-99, 2004.

SARAIVA, J.; VEGA, C.; ROLON, M.; DA SILVA, R.; SILVA, M. L.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; GOMEZ-BARRIO, A.; DE ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Reserch**, Ribeirão Preto, v. 100, p. 791-795, 2007.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; MUNOZ, V. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentada* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. **Phytotherapy**, v.10, p.375-378, 1996.

SIES, H. Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Experimental Physiology**, Germany, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILVA, C.; SILVA, A. P. C. M.; SANTOS, F. A.; SANTOS, A. S. A.; SOUZA, V. S. E. **A Aveira *Dipteryx alata* Voguel**, ed. Lisboa:Tipografia Guerra-Viseu, 180 p, 2001.

SILVA, A. C. DA; JORGE, N. Mushrooms: Bioactive Compounds and Antioxidant Properties. **IBILCE, Ciências Biológicas e Saúde**, São José do Rio Preto, v.13, p.375-84, 2011.

SILVA, A. C. O.; SANTANA, E. F.; SARAIVA, A. M.; COUTINHO, F. N.; CASTRO, R. H. A.; PISCIOTTANO, M. N. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 9 p., 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.;MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. da UFSC e UFRGS, ed.6, 1102 p., 2007.

SMITH, D. A. Design of drugs through a consideration of drug metabolism and pharmacokinetics. **European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics**, Sandwich-UK, v.19, n.3, p.193, 1994.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The killing of adult *Shistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, London, v. 55, p. 65, 1965.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p.727-732, 2008.

SOUTO, A. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE FILHO, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids. **Molecules**, Basel, v.16, p.8515-8534, 2011.

SOUZA, C. A.; VIGORITO, A. C.; ARANHA F. J. P.; OLIVEIRA, G. B.; EID, K. A. B.; RUIZ, M. A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, Campinas, v.22, n.2, p. 123-128, 2000.

SOUZA, V. A.; DA SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SARAIVA, J. MONTANHEIRO, M.; DE SOUZA, G. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 303–307, 2005.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Antibacterial activity of Brazilian amazon plant extracts. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. São Paulo, v.10, p.400-402, 2006.

SULAIMAN, S.; IBRAHIM, D.; KASSIM, J.; SHEH-HONG, L. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. **Journal of Chemical Pharmaceutical Research**, Malaysia, v.3, n.4, p.436-444, 2011.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus pérsica domestic*: the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.10, p.63-68, 1959.

TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipterix alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo v.60, n.2, p.113-117, 2001.

THAKUR, M.; MELZIG, M. F.; FUCHS, H.; WENG, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. **Botanics: Targets and Therapy**, Macclesfield, v.1, p.19–29, 2011.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.15, n.1, p. 66-69, 1995.

TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Caracterização química parcial do fruto do baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.14, n.1, p.85-95, 1994.

TOGASHI, N.; HAMASHIMA, H.; SHIRAIISHI, A.; INOUE, Y.; TAKANO, A. Antibacterial Activities Against *Staphylococcus aureus* of Terpene Alcohols With Aliphatic Carbon Chains. **Journal of Essential Oil Research**. Tokyo, v.22, n.3, p.3069-3076, 2010.

TORRES, G. A.; DA VIDE, L. C.; BEARZOTI, E. Sincronização do ciclo celular em maristema radicular de baru. **Ciências Agrotécnicas de Lavras**, Minas Gerais, v.27, p.398 – 405, 2003.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v.6, n.3, p. 279–285, 1987.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; XIAO, S. H; TANNER, M.; SINGER, B. H. Combinação terapia da esquistossomose em estudos de laboratório e testes clínicos. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Whashington DC, v. 47, p.1487-1495, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in the normal physiological functions and human diase. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto de cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.). Caracterização do óleo e da semente. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.2, n.2, p.115-125, 1990.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERA, R.; SOARES JUNIOR, M. S. NAVES, R. V.; SOUZA, E. R. B.; FERNANDEZ, E. P.; ALIARI, M. LEANDRO, W. M. Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.1, p.112-118, 2009.

VÉRAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; GUIMARÃES, M. A.; VIEIRA, M. M. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **Plos One**, Califórnia, v.8, n.6, 2013.

VILLAS BÔAS, G.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderneta de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p.1463-1471, 2007.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review Anti Infect Therapy**, v.7, n.2, p.157-163, 2009.

WHO, World Health Organization. **Prevention and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis**, Report of a WHO Expert Committee, Geneva, 73 pp. 2002.

WHO, World Health Organization. **Prevention and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis**, Report of a WHO Expert Committee, Geneva, 73 pp., 2006.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis**, Geneva, 2013 Disponível em: http://search.who.int/search?q=leishmaniose&ie=utf8&site=who&client=_en_r&proxystylesh eet=_en_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8&getfields=doctype. Acesso em 21 de Maio de 2014.

WILLIAMS, P. Review of modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.75, n.6, p.1261–1261, 2012.

YOUSIF, F.; WASSEL, G.; BOULOS, L.; LABIB, T.; MAHMOUD, K.; EL-HALLOUTY, S.; EL BARDICY, S.; MAHMOUD, S.; RAMZY, F.; GOHAR, L.; EL-MANAWATY, M.; EL GENDY, M. A.; FAYAD, W.; EL-MENSHAWI, B. Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.6, p.732-9, 2012.

YOWTAK, J.; LEE, K. Y.; KIM, H. Y.; WANG, J.; KIM, H. K.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, v.152, n.4, p.844-852, 2011.

GLOSSÁRIO

Ágar Müeller Hinton	meio de cultura microbiológico rico em proteínas.
Agente etiológico	agente causador de uma doença.
Aleloquímica	Substâncias liberadas por algumas espécies vegetais que afetam o crescimento de outras espécies.
Alimento nutracêutico	alimento ou parte de alimento com apelos médicos ou de saúde.
Antirreumático	eficaz contra reumatismo.
Ascite	acúmulo anormal de líquidos dentro da cavidade peritoneal – um espaço entre os órgãos abdominais e os tecidos que revestem o abdômen.
Ateroma	ateromas são placas, compostas especialmente por lipídios e tecido fibroso, que se formam na parede dos vasos.
Aterosclerose	doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de ateromas dentro dos vasos sanguíneos.
Bloqueio neuromuscular	interrompe ou simula a transmissão dos impulsos nervosos na junção neuromuscular esquelética, causando paralisia dos músculos esqueléticos afetados.
Células LLC- MK ₂	Linhagem de células de Rim de macaco <i>Rhesus</i> .
Cercarias	forma infectante do parasita da esquistossomose no homem.
Citotoxicidade	tóxico em células.
Disenteria	doença inflamatória do intestino, especialmente do cólon, que resulta fortes dores abdominais, ulceração das mucosas, tenesmo e diarreia, sempre acompanhada de muco e sangue, após estágio inicial de diarreia aquosa. Se não for tratada, a disenteria pode ser fatal.
Endemia	doença localizada em um espaço limitado denominado “faixa endêmica”.
Esquistossômulos	forma do parasita da esquistossomose após penetração presente na corrente sanguínea.
Etnobotânica	ciência, que estuda simultaneamente as contribuições da botânica e da etnologia, evidenciando as interações entre as sociedades humanas.

Eutanásia	prática pela qual se abrevia a vida de um enfermo incurável de maneira controlada e assistida.
Fitoterápico	aquele alcançado de plantas medicinais, onde utiliza exclusivamente derivados de droga vegetal.
Formas promastigotas	forma infectante do parasita da <i>leishmania</i> quando este esta na corrente sistêmica.
Gânglios	formados basicamente por células imunológicas que procuram defender a área na qual se localizam da ação deletéria de certos agentes externos.
Hepato/ esplenomegalia	inchaço do Baço e Fígado.
Helmintos	são parasitas causadores de doenças infecciosas.
Hipertensão portal	hipertensão na veia porta e filiais que é frequentemente definida como gradiente de pressão portal igual ou superior a 12 mm Hg.
IC ₅₀	medida da eficácia de uma substância na inibição de uma função biológica ou bioquímica específica.
Lise celular	rompimento da membrana celular.
Miracídios	larva ciliada do <i>Schistosoma mansoni</i> (aparece após contato solar em ovos presentes em aguas contaminadas).
Moléculas “self”	antígenos próprios (produzidos pelo próprio organismo).
Morbidade	conjunto de casos de uma determinada doença ou a soma de agravos a saúde, que atingem um grupo de indivíduos em um dado intervalo de tempo e lugar específico.
Propriedades sudoríferas	provoca suor.
<i>Schistosoma mansoni</i>	parasita do gênero dos platelmintos tremátodes, responsável pela esquistossomose, uma parasitose grave que causa milhares de mortes por ano.
Síndrome de Katayama	Conjunto de sintomas que evidencia por febre, erupção cutânea semelhante a uma urticária, tosse, dor abdominal e inflamação do fígado e baço.
Sintomas agudos	sintomas que caracterizam o inicio de uma enfermidade.
Sintomas crônicos	sintomas que caracterizam a pertinência de efeitos deletérios no organismo causado por qualquer fator externo ou interno que altere as funções orgânicas.

Tripomastigotas	forma parasitaria da Doença de Chagas que tem a capacidade de invasão de células.
Vetor	ser vivo capaz de transmitir um agente infectante.