

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE *LUEHEA SPECIOSA* WILLD.

Maisa Carmen Batista do Nascimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE LUEHEA SPECIOSA WILLD.

Autora: Maisa Carmen Batista do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos; Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Medicamentos Naturais e Sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

NASCIMENTO, MAISA CARMEN BATISTA DO NASCIMENTO INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE LÚEHEA SPECIOSA WILLD. / MAISA CARMEN BATISTA DO NASCIMENTO NASCIMENTO. — 2017 72 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017. Orientação: Prof. Dr. WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA

1. LUEHEA SPECIOSA. 2. FITOQUIMICA. 3. ANTIOXIDANTE. 4. BIOAUTOGRAFIA. 5. CITOTOXIDADE. I. BARBOSA, WAGNER LUIZ RAMOS, *orient.* II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maisa Carmen Batista do Nascimento					
Investigação fitoquímica e atividade biológica das cascas de Luehea speciosa Willd.					
Dissertação de Mestrado aprese de Pós-Graduação em Ciências F de concentração: Fármacos e M de Pesquisa: Desenvolvimento Medicamentos Naturais e Sintéti Ciências da Saúde da Universida como requisito para obtenção do Ciências Farmacêuticas.	Farmacêuticas, área edicamentos; Linha e Avaliação de cos, do Instituto de de Federal do Pará,				
Aprovada em: / /					
Banca Examinadora					
Prof. D.r Wagner Luiz Ramos Barbosa (Orientac Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFF	,				
Prof.a D.ra Cristine Bastos Amarante Instituição: Museu Paraense Emilio Goeldi					

Prof.a D.ra Roseane Maria Ribeiro Costa Instituição: Universidade Federal do Pará

> Belém- PA 2017

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa chega ao fim e, neste momento, o que mais tenho a dizer é o quão grande é minha gratidão por todas as pessoas que, direta e indiretamente, me deram apoio nesta jornada.

Primeiramente, quero agradecer os meus pais, Matias e Carmen, por todas as vezes que acreditaram em mim e por nunca terem saído do meu lado. Aos meus irmãos que sempre incentivaram as minhas escolhas, em especial a Márcia e ao Márcio, que tentaram sempre me ajudar em tudo que precisei, mesmo sem que eu pedisse, até brigando por mim em algumas situações. Vocês são incríveis! Eu amo vocês, minhas inspirações.

Agradeço também aos demais da família que, mesmo que de longe, estavam torcendo para o meu sucesso. Meus primos, Tati e Felipe, que vibraram comigo em todas as vitórias e me ofereceram apoio e carinho quando o mestrado me dava algumas dores de cabeça. Meus tios e tias, das duas famílias, Batista e Nascimento, obrigada pelas orações e pelos abraços de orgulho pela sobrinha de vocês.

Sou grata também a minha cunhada, Adriana, que, ao casar com meu irmão, se tornou mais uma irmã pra mim. Obrigada por todas as palavras de incentivo e por sempre deixar muito claro o quanto acredita em mim. Não sei nem como retribuir tanto amor. Obrigada também pelas duas sobrinhas maravilhosas, que fizeram de mim tia aos 10 anos... E eu não poderia ser mais feliz.

Obrigada professor Wagner, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe desde quando eu ainda estava no início da graduação e nem sabia o que era um bécker. Por ter me mantido no grupo de trabalho, me dando a chance de crescer profissionalmente. Obrigada pela confiança. Sou eternamente grata.

Ao GTWB, pela companhia diária, tornando os dias no laboratório mais leves. Andressa, Carlinha, Ana Paula, Luciana, Bruna e Myrth (o retorno!), obrigada pela amizade, pelo carinho, pela ajuda, pela troca de conhecimento, pelo incentivo, pela vibração pelos resultados positivos e por tantas risadas. Vocês são maravilhosas!

Muito obrigada ao amigo Everton, que esteve comigo desde a divulgação do edital do mestrado, que dividiu material pra estudar, que sempre esteve torcendo pra que duas vagas fossem nossas. E foram! Que ainda venham muitas vitórias pra nós.

Aos amigos e parceiros dos laboratórios vizinhos, com quem pude trocar apoio. Obrigada ao laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas, ao laboratório de Farmacognosia, laboratório de Microbiologia, laboratório P&D Farmacêuticco e Cosmético, laboratório de Bromatologia e ao laboratório de Controle de Qualidade. Sou muito grata pela disponibilidade e suporte que obtive quando precisei. Obrigada pela parceria.

Em especial, gostaria de agradecer alguns atores destes cenários, que fizeram total diferença: ao amigo João Paulo que não se negou, em momento algum, a me ajudar. Obrigada por toda atenção, cuidado e por compartilhar conhecimento comigo. Foste fundamental! Aos queridos Alexandre, Marcus, Thiago, Ana Carla, Kalene, Analu, Juliana, Amandinha, Andreza, Kelly e tantos outros parceiros desses e de outros laboratórios que eu possa ter esquecido de citar, me desculpem e muito obrigada! Todos foram incríveis me ajudando de alguma forma ou apenas me proporcionando ótimos momentos durante os dias de convívio.

Sou muito grata as amizades que conquistei durante a organização do workshop do PPGCF, que mesmo depois de tanto trabalho (com pitadas de estresse), a amizade permaneceu e só se fortaleceu. As miguis Stefania, Milena, Natasha, Erica, Diandra e Helen, em especial Mirian, Fernanda e Rafinha, que contribuíram diretamente neste trabalho, muito obrigada por tudo! Vocês foram uma das maiores conquistas desse mestrado (queria colocar vocês no meu lattes).

Obrigada a prof^a Dr^a Cristine Amarante, que concedeu a parceria com o Nucleo de Pesquisa do Museu Emilio Goeldi, principalmente ao Leandro, que me acompanhou nessa parceria e deu uma das maiores ajudas pra iniciar meu trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, pela grande oportunidade. Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao Prof. Dr. José Luiz Fernandez Vieira pela coordenação e pela parceria na realização

do Workshop do PPGCF. Às queridas secretárias, Brasília e Cliciane, pelo apoio e paciência durante todo o processo.

Aos meus grandes amigos André, Hanna, Nayara, Josy, Wanessa, Reinaldo, Odonei, Karina, Neyzinho, Renatinho, Hugo (in memorian), Jeff, Diego, Marina Pinheiro, Layse, Marília, Marina Barros, Kémmylle, Denise e Steff, toda minha gratidão. O incentivo, a amizade, o amor e o companheirismo de todos vocês são essenciais em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

E por fim, gostaria de agradecer ao Instituto Leonidas e Maria Deane - ILMD-FIOCRUZ-Amazonia, em especial a professora Patrícia Orlandi, pela parceria com nosso trabalho, e a Ivanildes Bastos, por toda disponibilidade, atenção e cuidado em contribuir. Foste a melhor parceira de trabalho a distância. Muito obrigada!

RESUMO

NASCIMENTO, M.C.B. INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE *LUEHEA SPECIOSA* WILLD. Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

As cascas de Luehea speciosa, família Malvaceae, são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de disenteria, reumatismo, tumores, bronquites, feridas de pele, emagrecimento entre outros. Porém, existem poucas informações sobre a espécie na literatura. Dessa forma, faz-se de grande interesse investigar a sua constituição química e suas possíveis atividades biológicas, visto que a comprovação cientifica promove uma alternativa de tratamento de forma segura aos usuários. Neste sentido, o presente estudo buscou a constituição química do extrato bruto seco (EBS) e das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME), da espécie, através de analises por cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas - LC/MS, bem como suas atividades antioxidante, por bioautografia, e citotóxica, in vitro, frente as linhagens de células tumorais, HELA e HEP-2 e VERO. As amostras apresentaram atividade antioxidante, sendo as frações FDM e FAE com perfil mais relevante. O EBS e as frações demonstraram citotoxidade sobre todas as linhas em estudo, porém a fração FDM apresentou maior atividade citotóxica contra células tumorais. Nas análises por LC/MS, foram detectados compostos fenólicos, com características sugestivas da presença do ácido chicórico, através do m/z = 148, além do espectro de UV semelhante. Esses resultados demonstram que a espécie em estudo possui atividade antioxidante e sugerem que a amostra exerce citotoxidade contra células tumorais, apresentando-se promissora para futuros estudos.

Palavra-chave: Luehea speciosa, antioxidante, bioautografia, citotoxidade

ABSTRACT

NASCIMENTO, M.C.B. PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *LUEHEA SPECIOSA* WILLD. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2017.

The barks of Luehea speciosa, family Malvaceae, are used in traditional medicine to treat dysentery, rheumatism, tumors, bronchitis, skin wounds, weight loss and others diseases. However, studies give little information about the species in the literature. Thus, it is of great interest to investigate its chemical constitution and biological activities, since the scientific proof of its activity can promote, in the future, a therapeutic alternative. The present study analyzed the chemical constitution of the dry crude extract (EBS) and hexane (FHX), dichloromethane (FDM), ethyl acetate (AED) and methanolic (FME) fractions of the species by high-performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric - LC/MS, as well as its antioxidant activities by bioautography and cytotoxic assays, in vitro, against HELA, HEP-2 and VERO tumor cell lines. The samples showed antioxidant activity, being the fractions FDM and AED results more relevant. The EBS and fractions demonstrated cytotoxicity on all cell lines, however the FDM fraction had greater cytotoxic activity against tumor cells. In the LC/MS analyzes, were detected phenolic compounds and suggestive characteristics of chicoric acid presence through m/z = 148, as in the UV spectrum. These results demonstrate that this species has antioxidant activity and suggest its cytotoxicity against tumor cells, being a promising species for future studies.

Key words: Luehea speciosa Willd, antioxidant, bioautography, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da família Malvaceae (TROPICOS, 2017) 20
Figura 2: Distribuição geográfica do gênero Luehea (TROPICOS, 2017) 21
Figura 3: Metabólitos secundários obtidos de Luehea divaricata: (1) Ácido 3b-phidroxibenzoiltormêntico; (2) ácido maslínico; (3) vitexina; (4) glicopiranosilsitosterol; e (5) (-)-epicatequina (TANAKA et al, 2005)
Figura 4: Representação da reação geral entre o radical livre DPPH e um antioxidante (OLIVEIRA, 2015)
Figura 5: Molécula antioxidante doa elétron ao radical, neutralizando sua atividade nociva
Figura 6: Exsicata de Luehea speciosa, depositado no Herbário da EMBRAPA
Figura 7: Fluxograma dos processos de obtenção do extrato bruto seco e das frações
Figura 8: Determinação granulométrica: % do pó que ficou retido no tamis x % do pó que passou pela malha
Figura 9: Resultado das análises por infravermelho do extrato bruto (EB) e das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME)
Figura 10: Porcentagem de inibição do DPPH nas concentrações 2000; 1000; 500; 250 e 125 μg/ml das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME) de Luehea speciosa
Figura 11: Cromatoplaca contendo extrato bruto e as frações de L. speciosa após aplicação do reagente DPPH
Figura 12: Percentual de morte celular das linhagens de células tumorais, HELA (A), HEP-2 (B) e VERO (C) quando expostas as frações hexanica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanolica (FME), de Luehea speciosa Willd.
Figura 13: Cromatograma da fração metanólica (FME) de Luehea speciosa obtida no primeiro fracionamento
Figura 14: Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 3.71 min
Figura 15:Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 12.09 min

Figura 16: Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 12.89 min
Figura 17: Cromatogramas das frações de Luehea speciosa: fração hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME), respectivamente
Figura 18: Espectro de massa da fração Acetato de Etila (FAE) no Rt = 11.51min.
Figura 19: Espetros de UV da fração acetato de etila (FAE) no Rt 11.51 min (A) e do ácido chicórico (LEE e SCANGEL, 2008) (B)
Figura 20: Espetro de massa da fração diclorometano (DCM) no Rt 8.94 min. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento do material vegetal, droga e extrato
Tabela 2: Determinação do teor de cinzas totais e de umidade do pó de Luehea speciosa
Tabela 3: Resultados da abordagem fitoquímica no extrato bruto de L. speciosa45
Tabela 4: Rendimento das frações Hexânica (FHX), Diclorometano (FDM), Acetato de Etila (FAE) e Metanólica (FME) do extrato de L. speciosa

SUMÁRIO

1.	Introd	ução	. 11
2.	Refere	encial teórico	. 14
	2.1	. Fitoterapia	.14
		2.1.1. Histórico do uso de plantas medicinais	.14
		2.1.2. Flora medicinal no Brasil	.15
		2.1.3. Regulamentação da fitoterapia no Brasil	. 16
	2.2	. Luehea speciosa Willd	. 19
		2.2.1. Classificação Botânica	. 19
		2.2.2. Família Malvaceae	. 19
		2.2.3. Gênero Luehea	. 20
		2.2.3.1. Luehea divaricata Mart	. 22
		2.2.3.2. Luehea paniculata Mart	. 23
		2.2.3.3. Luehea speciosa Willd	. 24
	2.3	. Constituintes Químicos	26
	2.4	. Atividade antioxidante	28
	2.5	. Câncer	.30
3.	Obieti	VOS	. 32
		Objetivo geral	
		Objetivos específicos	
4.	Mater	iais e métodos	. 33
		Materiais	
		4.1.1. Matéria prima vegetal	
		4.1.2. Solventes e reagentes	
		4.1.3. Equipamentos	. 34
	4.2.	Métodos	. 35
		4.2.1. Processamento da amostra	. 35
		4.2.2. Análises farmacognósticas da droga vegetal	. 35
		4.2.2.1. Determinação granulométrica	. 35

		4.2.2.2. Determinação do de cinzas totais	35
		4.2.2.3. Determinação do teor de umidade	36
		4.2.3. Obtenção da tintura de <i>Luehea speciosa</i>	36
		4.2.4. Obtenção do Extrato Bruto Seco (EBS)	
		4.2.5. Abordagem Fitoquímica	
		4.2.6. Fracionamento do EBS	
		4.2.7. Análises por infravermelho	39
		4.2.8. Avaliação da atividade antioxidante	39
		4.2.8.1. Método do sequestro de radicais por DPPH	39
		4.2.8.2. Bioautografia	40
		4.2.9. Avaliação da citotoxidade in vitro	40
		4.2.10.Análises cromatográficas	41
		4.2.10.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficie	ência
		acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS)	41
5.	Resul	tados e discussão	42
	5.1.	Análises Farmacognósticas	42
		5.1.1. Determinação granulométrica	42
		5.1.2. Determinação de cinzas totais	43
		5.1.3. Determinação do teor de umidade	44
	5.2.	Abordagem fitoquímica	44
	5.3.	Fracionamento do EBS	46
	5.4.	Análises por infravermelho	47
	5.5.	Avaliação da atividade antioxidante	49
		5.5.1. Método do sequestro de radicais por DPPH	49
		5.5.2. Bioautografia	51
	5.6.	Avaliação da citotoxidade in vitro	53
	5.7.	Análises cromatográficas	56
		5.7.1. Análise por LC/MS	56
6.	Concl	usões	63
7.	Refer	ências bibliográficas	64

1. INTRODUÇÃO

A relação do homem com o ambiente faz com que diferentes culturas se construam absorvendo uma variedade de conhecimentos e costumes do meio em que vivem. Com o passar do tempo, estes conhecimentos se incorporam aos costumes padrões de cada grupo populacional e se difundem por gerações (PINTO e MADURO, 2003). Dessa forma, buscando soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, o homem fez uso de plantas na tentativa de descobrir a cura ou o alívio de doenças, adquirindo assim importantes conhecimentos sobre medicina popular (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Neste contexto, surge a Etnofarmácia, uma ciência interdisciplinar que estuda recursos farmacêuticos, levando em conta determinantes culturais que caracterizam o uso desses recursos em um determinado grupo humano. Recorre à etnobotânica para a identificação, classificação e categorização cognitiva do material natural do qual o remédio é produzido; inclui a prática farmacêutica, na preparação das formas farmacêuticas; recorre à etnofarmacologia, que trata dos efeitos desta preparação e à etnomedicina, sobre aspectos propedêuticos implícitos nesses usos (HEINRICH, 2001), e aplica fundamentos e técnicas da ciência farmacêutica na elaboração e análise dos remédios artesanais e fitoterápicos deles derivados.

Como estratégia na investigação de plantas medicinais, o levantamento etnofarmacêutico, metodologia que consiste na prospecção de plantas utilizadas como recurso terapêutico por populações locais, combina informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal com estudos químicos e farmacológicos, o que permite conhecer a preparação do remédio e a relação do usuário com ele, objetivando, através da pesquisa farmacêutica, o uso seguro e eficaz desses recursos (BARBOSA, 1997); e, de forma mais abrangente, formular hipóteses sobre a atividade farmacológica e o composto responsável pela ação terapêutica relatada (ELISABETSKY, 2003).

Atualmente, sabe-se bastante sobre os metabólitos presentes nas plantas e que entre eles, existe uma gama de substâncias farmacologicamente importantes, dessa forma, o conhecimento sobre tais metabólitos assume grande relevância, pois permite a preparação de extratos padronizados em

relação a esta substância ativa (EMA, 2010) e o aproveitamento deles em formulações fitoterápicas, contribui, também, para a descoberta de novos fármacos a partir de plantas medicinais (SIMÕES et al, 2010), tendo como consequência a ampliação das alternativas de tratamento para a população.

Na Conferência Internacional sobre Medicina Tradicional para os países do Sudeste da Ásia, em 2013, a diretora geral da Organização Mundial de Saúde (OMS), Dr. Margaret Chan, disse que medicamentos tradicionais de qualidade, segurança e eficácia comprovada ajudam a garantir o acesso aos cuidados à saúde. Para milhões de pessoas, o uso desses medicamentos, tratamentos e práticas tradicionais representam a principal fonte de cuidados à saúde, e às vezes a única. A acessibilidade da maioria dos medicamentos tradicionais é relevante devido o crescente aumento dos custos de cuidados à saúde e o aumento incessante de doenças crônicas não transmissíveis, o que desperta o interesse do mercado mundial (OMS 2013).

Segundo pesquisadores da Embrapa, o crescimento do mercado de fitoterápicos é estimado em 10 a 20% ao ano e as principais razões desse grande crescimento nas últimas décadas foram: a valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e, consequentemente, o consumo de produtos naturais; os evidentes efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos nas plantas; a comprovação científica da eficácia de fitoterápicos; e o preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder aquisitivo. Além disso, o desenvolvimento de um medicamento sintético custa em torno de US\$ 500 milhões, caindo para US\$ 50 milhões no caso de um fitoterápico, que pode chegar ao mercado num tempo dez vezes menor. A estimativa do mercado mundial para medicamentos é de US\$ 300 bilhões/ano, sendo US\$ 20 bilhões derivados de substâncias ativas de plantas medicinais. Já a estimativa do mercado nacional de medicamentos é de aproximadamente US\$ 8 bilhões/ano, com os derivados de plantas medicinais correspondendo a US\$ 1,5 bilhão desse total.

Porém, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes, essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles originalmente

alegados. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (VEIGA JUNIOR, 2005).

Neste contexto, entre inúmeras espécies vegetais encontradas no território nacional e que possui interesse medicinal, este trabalho visa explorar os conhecimentos sobre a espécie *Luehea speciosa* Willd, uma árvore popularmente conhecida como açoita cavalo. Dentre suas indicações de uso medicinal, tem sido relatada, em poucas fontes na literatura, a sua utilização em diferentes preparações para o tratamento de disenteria, leucorreia, reumatismo, gonorreia, tumores, bronquites, feridas de pele, emagrecimento entre outros (LORENZI, 2000; BIGHETTI et al., 2004; TANAKA et al., 2005).

Não há dados científicos que comprovem as propriedades medicinais indicadas pela população no uso de *L. speciosa*, porém as pesquisas realizadas com espécies do mesmo gênero, como a *L. divaricata* onde se relata, por exemplo, estudos etnobotânico no Brasil, atividade antimicrobiana e potencial mutagênico (de Souza, 2004; Bieski et al., 2012; Felicio et al., 2011), podem servir como comparação.

Desta forma, no presente estudo, as cascas de *Luehea speciosa*, adquiridas no mercado de ervas do Mercado Ver-o-Peso, em Belém-Pará, foram analisadas para obter o perfil fitoquímico e investigar suas possíveis atividades biológicas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Fitoterapia

Histórico do uso de plantas medicinais

Desde que começaram a aparecer enfermidades, os homens, como é lógico, trataram de combatê-las como melhor sabiam. A natureza foi, sem dúvida, o primeiro médico, a primeira farmácia, o primeiro hospital a quem o homem recorreu (MADRINI, 2009). A exploração de plantas de uso medicinal através da extração direta data de mais de 60.000 anos, na China; em 3.000 a.C, já existiam farmacopeias descrevendo as ervas e suas indicações de uso (REZENDE, 2002).

Em 1978, na Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através da Declaração de Alma-Ata, reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento faz uso de práticas tradicionais em seus cuidados básicos de saúde. Destes, 85% faz uso de plantas medicinais ou de preparações feitas a partir delas. A partir de então, os sistemas de saúde passaram a aplicar práticas integrativas, com as primeiras recomendações para a implantação das medicinas tradicionais e práticas complementares, difundindo-se em todo o mundo.

No Brasil, esse movimento ganhou força a partir da Oitava Conferência Nacional de Saúde (1986), cujo relatório final serviu como subsídio para os deputados constituintes elaborarem o artigo 196 da Constituição Federal de 1988 - "Da Saúde", seguida da criação do Sistema Único de Saúde, em 1990, onde profissionais usuários, pesquisadores e gestores começaram a lutar pela utilização da fitoterapia como alternativa de tratamento.

Em 2002, com a publicação da primeira estratégia da OMS sobre medicina tradicional, que estabeleceu metas para serem alcançadas entre os anos de 2002 e 2005, com objetivos como a implantação de políticas públicas sobre medicina tradicional, e o uso de forma segura, eficaz e racional deste recurso no mundo. Sendo atualizado em 2013, na Conferência Internacional sobre Medicina Tradicional para os países do Sudeste da Ásia, onde a OMS traçou novas

estratégias para serem alcançadas até 2024, de forma a manter os progressos alcançados desde o primeiro documento.

Nesse contexto, o uso da medicina tradicional se expandiu cada vez mais no Brasil, mesmo com o lobby das indústrias farmacêuticas no cuidado aos pacientes. Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) cresceu cerca de 161%.

Desde 2012, o Ministério da Saúde (MS) investiu mais de R\$ 30 milhões em 78 projetos com plantas medicinais e fitoterápicos no âmbito do SUS. Além dos investimentos em pesquisa, também promoveu cursos de Fitoterapia para Médicos, capacitando 300 profissionais de todas as regiões do País, ampliando o conhecimento sobre o tema e permitindo o acesso da população brasileira aos fitoterápicos com eficácia, segurança e qualidade.

Em 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), adotou a Resolução n°26 de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, estabelecendo os requisitos mínimos para o registro dos mesmos, exigindo a presença de informações de uso, contraindicações, efeitos adversos e outros, para que o usuário utilize o medicamento de forma segura e eficaz.

Dessa forma, o Brasil se aproxima de países europeus, como Itália, Portugal e Inglaterra, por exemplo, onde o uso da medicina tradicional é uma prática não apenas regulamentada como também permitida dentro dos hospitais.

2.1.1. Flora medicinal no Brasil

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total entre 350.000 e 550.000, considerando que mais da metade dessas espécies está disposta nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SIMOES, 2010). Importante salientar, porém, que apesar da diversidade vegetal, cerca de 8% das espécies vegetais, apenas, foram objetos de estudos científicos (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Atualmente, sabe-se que a ideia de que não existe substância química nas plantas, bem como efeitos adversos, é errônea. Mesmo assim, grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não foi estudada de forma a permitir a elaboração de monografias completas e modernas (QUEIROGA et al., 2006). O uso indiscriminado de espécies vegetais na medicina tradicional fez surgir a necessidade de regulamentações acerca do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, tornando-se indispensável associar o conhecimento etnofarmacêutico ao científico. Atendendo a esta necessidade, o Brasil, então, começou a introduzir e regulamentar o uso de plantas medicinais como terapia, antes mesmo da criação do Sistema Único de Saúde (SUS).

2.1.2. Regulamentação da fitoterapia no Brasil

Em 1988, foi baixada a Resolução nº 04/88 da CIPLAN, que disciplinou o uso da Fitoterapia nos serviços de saúde (BRASIL, 1988). Com o SUS implantado, profissionais dos serviços de saúde, usuários, pesquisadores e gestores passaram a defender a fitoterapia como alternativa de tratamento (BRASIL, 2006). Em 2006, o Ministério da Saúde, através da portaria 971 (BRASIL, 2006), juntamente com outros ministérios, propôs a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) visando à inclusão da Fitoterapia e de outras terapêuticas integrativas e complementares na Atenção Básica pelo SUS.

Com o objetivo de consolidar a fitoterapia na rotina do SUS, instituiu-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que normatiza o acesso da população a plantas medicinais e fitoterápicos, a produção e a oferta destes; tratando da inclusão social e regional, do desenvolvimento industrial e tecnológico, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado às comunidades e povos tradicionais. (BRASIL, 2006).

Posteriormente, para que fosse concretizada a PNPMF, foi lançado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estabelece ações para parceiros de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país. O programa visa

ampliar as opções terapêuticas e melhorar a atenção à saúde dos usuários do SUS, além de promover o desenvolvimento de tecnologias, assim como fortalecer as cadeias produtivas, para o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde. (BRASIL, 2009).

Em 2005, a Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF/SCTIE/MS) construiu em parceria com outros ministérios e, com a colaboração de consultores e pesquisadores, uma lista com espécies vegetais considerando as já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, o conhecimento tradicional e popular e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis. Este documento subsidiou, em 2008, a construção da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que traz uma lista de plantas medicinais com potencial de avançar nas cadeias produtivas para gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009).

Técnicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Saúde (MS), profissionais de serviços e pesquisadores da área de plantas medicinais e fitoterápicos, vinculados à área da saúde, representando as diversas regiões brasileiras, fizeram uma pré-seleção das espécies vegetais, por região geográfica que referenciavam seu uso, por indicações de uso e de acordo com as categorias do Código Internacional de Doenças (CID- 10). A partir desta pré-seleção foram excluídas espécies exóticas e as que constam da lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, do Ministério do Meio Ambiente, IN nº 6/2008 (BRASIL, 2009).

O MS espera que os pesquisadores e o setor produtivo interajam para estudar as espécies e que os resultados alcançados gerem produtos de interesse para o SUS, pois só assim serão garantidos à população plantas medicinais e fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia, como também a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Após estudos destas plantas, caso alguma apresente toxicidade, esta poderá ser contraindicada e excluída da relação (BRASIL, 2009).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxidade *in vitro* é o primeiro

teste para avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial, para que, depois de comprovada a sua não toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto possa ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO et al, 2003) e futuros ensaios clínicos. Sendo, então, uma etapa de extrema relevância.

Na produção de fitomedicamentos o ponto de partida pode ser um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. Através do levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde aspectos morfológicos associados a identificação de grupos botânicos podem indicar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica) (TOLEDO et al, 2003).

Desta forma, a publicação do RENISUS representa um norte na pesquisa para obtenção de fitomedicamentos, pois ainda existem inúmeras espécies da flora brasileira não investigadas e que são utilizadas pela população, como no caso da *Luehea speciosa*, que é comercializada e indicada pelos usuários por propriedades ainda não confirmadas, o que torna relevante o presente estudo.

2.2. Luehea speciosa Willd.

2.2.1. Classificação botânica

• Classe: Equisetopsida

Subclasse: Magnoliidae

• Superordem: Rosanae

Ordem: Malvales

Família: Malvaceae

• Gênero: Luehea

• Espécie: Luehea speciosa

2.2.2. Família Malvaceae

A família Tiliaceae foi incorporada à família Malvaceae, juntamente com as famílias Bombacaceae, Sterculiaceae, em 1998, a partir de estudos moleculares, dados morfológicos, anatômicos e biogeográficos analisados pela Angiosperm Phylogeny Group (APG). A partir da nova circunstância, a família Malvacea foi expandida, e reúne nove subfamílias: Bombacoideae, Brownlowioideae, Byttnerioideae, Dombeyoideae, Grewioideae, Helicterioideae, Malvoideae, Sterculioideae e Tilioideae (GRINGS, 2013); e é representada, agora, por aproximadamente 250 gêneros e 4200 espécies distribuídas em regiões temperadas (Figura 1), entre ervas, arbustos, lianas e pequenas e grandes árvores.

Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil, 69 gêneros e 754 espécies ocorrem no Brasil (BOVINI et al. 2013), sendo 30 gêneros distribuídos em 393 táxons da subfamília Malvoideae (BOVINI, 2010). A família está distribuída nas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo predominantemente pantropical, com uma estimativa de que 65% dos gêneros de Malvaceae estejam concentrados nas Américas (FRYXELL, 997) e tendo a América do Sul como o centro de riqueza específica (BARROSO et al. 2004).

A família possui grande potencial ornamental e alimentício, como os gêneros Firmiana, Abroma, Brachychiton e Guazuma que são utilizadas na arborização de ruas, parques e jardins; enquanto que representantes dos gêneros Eriotheca, Pseudobombax e Spirotheca são utilizados no reflorestamento de áreas degradadas e dos gêneros como Gossypium, Urena e Luehea servem como fonte de madeira e de fibras na indústria têxtil, cordoaria e na aniagem (LORENZI 2002).

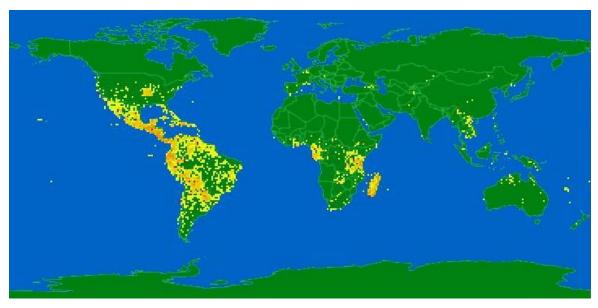


Figura 1: Distribuição geográfica da família Malvaceae (TROPICOS, 2017)

2.2.3. Gênero Luehea

O gênero *Luehea* é essencialmente tropical (Figura 2), existindo no sul do México, incluindo as Índias Ocidentais ao Uruguai e à Argentina. Atualmente, existem cerca de 25 espécies, das quais 12 ocorrem no Brasil, sendo a maior concentração no Sudeste e no Centro-Oeste (CUNHA, 1985 apud CALIXTO JUNIOR et al, 2016). Está presente no cerrado brasileiro e treze espécies estão registradas em herbários brasileiros: *Luehea altheaeflora Spruce ex Benth., Luehea fiebrigii Burret, Luehea candicans* Mart., *Luehea candida* (Moc. & Sess'e ex DC) Mart., *Luehea Crispa* Krapov., *Luehea cymulosa* Abeto de Benth., *Luehea divaricata* Martius e Zuccarini, *Luehea grandiflora* Mart. & Zucc., *Luehea*

paniculata Mart. & Zucc., Luehea ochrophylla Mart., Luehea rosea Ducke e Luehea speciosa Willd (CALIXTO JUNIOR, 2016).

Suas folhas são usadas popularmente no tratamento da disenteria, leucorreia, reumatismo, gonorreia e tumores; A infusão das flores é utilizada contra a bronquite e a raiz é depurativa (TANAKA et al, 2005). Braga (1976) apontou a adstringência das cascas de *L. speciosa* e também registrou a ocorrência da espécie *L. candicans* E *L. paniculata* apresentando o mesmo uso (CALIXTO-JÚNIOR, 2016). A atividade antifúngica de *L. divaricata* foi avaliada por Zacchino e colaboradores (1998), obtendo como resultado a ação moderada do extrato diclorometânico na inibição do crescimento de hifas de fungos dermatófitos.

Cascas de espécie do gênero *Luehea*, são comercializadas pelo nome popular "açoita-cavalo". Muitas espécies deste gênero são parecidas entre si, recebendo o mesmo nome vulgar e tendo aplicações idênticas, destacando-se a *Luehea divaricata*, *L. paniculata*. e *L. speciosa*.



Figura 2: Distribuição geográfica do gênero Luehea (TROPICOS, 2017)

2.2.3.1. Luehea divaricata Mart.

A Luehea divaricata é encontrada naturalmente nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EMBRAPA, 2008).

De acordo com Bortoluzzi e colaboradores (2002), a espécie é uma árvore caducifólia, que possui até 30m de altura e 80 a 100 cm de diâmetro; com o tronco geralmente tortuoso e nodoso e base alargada. Na floresta, forma troncos quase retos e bastante altos, com casca parda-acinzentada, fibrosa, com gosto adstringente um pouco amargo; ramificação irregular, grossa e tortuosa.

Possui folhas simples com três nervuras longitudinais típicas, descolores, com lâmina foliar medindo de 4,5 a 15 cm de comprimento e 2 a 6,5 cm de largura; pecíolo ferruginoso, com até 1 cm de comprimento. Apresenta inflorescências em cimeiras dicotômicas, terminais e axilares, divergentes e multifloras, com flores hermafroditas, pétalas vistosas nas cores róseas, roxas ou raramente brancas, chegando a medir 2,5 cm de comprimento.

Seu fruto é uma cápsula lobada de valvas lenhosas de coloração castanha, com densa pilosidade ferrugínea cobrindo inteiramente o tegumento e o pedicelo do fruto, com 2 a 3 cm de comprimento, abrindo-se em cinco fendas. Apresenta deiscência loculicida na sua extremidade, apresentando cinco a quinze sementes por fruto. Essas sementes são pequenas, providas de alas agudas, de coloração dourado-brilhante, com núcleo seminal pequeno na extremidade da asa, e coloração marrom claro (EMBRAPA, 2008).

A *L. divaricata* é uma espécie pioneira em várias formações florestais. Vegeta preferencialmente em locais de bastante luz e em solos bastante úmidos. É característica das florestas aluviais, onde pode ser bastante frequente ou mesmo abundante. Nas matas altas e densas é pouco frequente, até mesmo rara, sobretudo em terrenos de inclinação suave e solos profundos. Mas em solos rochosos e íngremes, no alto das encostas, possui elevada frequência, demonstrando que possui dois ambientes ecológicos distintos para o seu desenvolvimento na floresta primária. É igualmente comum nas matas semi-

devastadas, nas capoeiras e capoeirões. Portanto, é considerada uma das árvores mais importantes para o reflorestamento de áreas degradadas, junto com mais 55 espécies, como a Cabreúva, cedro, coronilha, ipê-roxo, maria-preta, murta, peroba, salseiro, tiambaúva, entre outras (LORENZI, 1992).

Sua madeira, por ser moderadamente pesada, de boa aparência, com resistência mecânica variando entre média e baixa, é indicada para confecções de estrutura de móveis. Na construção civil, é recomendada para ripas, molduras, cordões, guarnições e rodapés. Boa para trabalhar, a madeira desta espécie tem sido aplicada na fabricação de coronhas de armas, formas de sapatos e de outras peças torneadas, sendo também usada para cadeiras, carrocerias, lanças para cavalaria, caixas de piano, cangas e esculturas (LORENZI, 1992).

A análise fitoquímica das suas folhas detectou principalmente flavonoides, saponinas e taninos de catequina, taninos condensados (BORTOLUZZI et al, 2002) e em menor grau, alcaloides, antocianinas, carotenoides e polissacarídeos, além de taninos, óleo essencial, resina e mucilagem (LORENZI, 1988 apud CALIXTO-JUNIOR, 2016).

2.2.3.2. Luehea paniculata Mart.

A Luehea paniculata é encontrada na Bolívia, Paraguai e Peru. No Brasil, ocorre do Pará até São Paulo e Mato grosso do Sul, nos cerradões e mata latifoliada semidecídua da bacia do Paraná (LORENZI, 2008).

Árvore que alcança altura de 6 a 12 metros, a espécie é dotada de copa alongada e rala, com ramos novos ferrugíneo-tomentosos. Tronco ereto e cilíndrico, com casca fibrosa, de superfície áspera e descamante em pequenas placas retangulares, de 40 a 60 centímetros de diâmetro. Suas folhas são simples, alternas, coriáceas, discolores, de bordos irregularmente dentados, glabras e ásperas na face superior e brancacentas e ferrugíneo-tomentosas na inferior, de 6 a 11 centímetros de comprimento por 4,5 a 7,5 centímetros de largura, sobre pecíolo de 6 a 10 milímetros de comprimento.

Possui inflorescências em panículas abertas e tomentosas, terminais e nas axilas da extremidade de ramos, com 8 a 14 centímetros de comprimento, sendo suas flores brancas com estames amarelos. Fruto cápsula lenhosa deiscente, contendo várias sementes aladas.

Sua madeira é moderadamente pesada e dura, de textura média e mais ou menos uniforme. Bastante flexível e resistente, apresenta boa durabilidade natural. Assim, é indicada para a confecção de móveis vergados e peças curvadas como selas e hélice de avião. A casca fornece fibra para a confecção de cordas rústicas. A árvore possui qualidades ornamentais que recomendam arborização em geral, sendo também recomendada para reflorestamentos heterogêneos destinados a recuperação da vegetação de áreas degradadas.

Nos extratos etanólicos das folhas e cascas foram detectados taninos e flavonoides da espécie e ainda rutina (BOVINI, 2010). Alves e colaboradores (2013) relataram o isolamento de triterpenos de ácido maslínico (RAI, 2003) a partir da fração clorofórmica e ácido oleanólico (CHOI, 2006) e lupenona (KIM e LEE, 2005) a partir da fração de acetato de etila, bem como avaliou a atividade antiproliferativa do extrato etanólico bruto e fração de acetato de etila das folhas de *L. paniculata* coletadas no Cerrado, Brasil Central (CALIXTO-JUNIOR, 2016).

O efeito antioxidante do extrato etanólico de raízes da espécie foi avaliado pelo método de eliminação do radical livre DPPH e demonstrou um potencial antioxidante quase semelhante ao valor associado ao flavonoide quercetina. Os extratos das folhas e cascas também demostraram bons resultados, no mesmo teste, com valores de IC50 0,32 e 0,24 mg /ml, respectivamente (CALIXTO JÚNIOR, 2016).

2.2.3.3. Luehea speciosa

A *Luehea speciosa* é uma árvore que mede de 6 a 30 m de altura, possui tronco com 30 a 120 cm de diâmetro, com casca externa pardo-acinzentada, de até 25 mm de espessura, com numerosos e pequenos sulcos longitudinais e, casca interna rosada até avermelhada, com textura fibrosa. Suas folhas são simples, alternas, dísticas, de membranáceas a cartácea, oblongas, com

estípulas, pecioladas (até 1 cm), com margens irregularmente serreadas e base arredondada a subcordada, discolores, verde-escuras, ásperas ao tato na face adaxial e com pilosidade branco-tomentosa na face abaxial, medem de 5 a 15 cm de comprimento por 2 a 6 cm de largura. As flores são brancas, hermafroditas, polistêmones e reunidas em inflorescências cimosas axilares ou em panículas terminais; podendo as flores chegar até 2,5cm de comprimento. O fruto é uma cápsula de até 3 cm, coberta de pilosidade de cor castanha, deiscente por cinco fendas na extremidade (MARQUES, 2007).

Segundo Calixto (2016), a semelhança entre espécimes de *Luehea* speciosa e *L. grandiflora*, induzia a considerar a nomenclatura como sinonímia. Porém, análises mais minuciosas, mostraram uma ligeira diferença na presença de fibras nos troncos, onde *L. speciosa* é mais fibrosa que *L. grandiflora*, dessa forma as espécies foram separadas e reabilitadas como diferentes.

Existem na literatura científica poucas informações sobre a espécie L. speciosa, tornando, assim, relevante a investigação de seus constituintes químicos e propriedades biológicas. Dos trabalhos disponíveis, o de Oliveira (2013) relata uma triagem fitoquímica e a avaliação da capacidade de liberação de histamina em processos alérgicos, onde o extrato de *L. speciosa* não interferiu na liberação espontânea de histamina, assim como não inibiu a liberação de histamina induzida por ionóforos. Porém quando a liberação foi estimulada pelo composto 48/80, foi detectada uma inibição significativa a partir da concentração de 10µg/mL. Port's (2013), em ensaios de triagem com 2,2– difenil–1–picril–hidrazila (DPPH), demonstrou o potencial antioxidante da espécie, sendo, portanto, o único dado científico sobre sua atividade farmacológica até o momento. Por esta razão, o presente trabalho torna-se de grande relevância em fornecer dados fitoquímicos e propriedades biológicas sobre a espécie.

2.3. Constituintes químicos

O metabolismo vegetal está condicionado a processos fotossintéticos e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. Dos processos que ocorrem no metabolismo primário são obtidos os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos (OLIVEIRA, 2003).

As substâncias ativas, na sua maioria, são produto do metabolismo secundário dos vegetais. Em cada espécie vegetal há diferentes substâncias resultantes do metabolismo secundário, as quais fornecem à planta uma característica, uma impressão digital química pertinente ("fingerprint"). O padrão de substâncias ativas varia de acordo com a origem, a época da colheita e condições de conservação e, em geral, representam 0,5 a 5% do peso total da droga. Por esta razão, são necessários métodos analíticos padronizados para garantia de reprodutibilidade da constituição química, das ações farmacológicas e da eficácia do vegetal. (WAGNER e WIESENAUE, 2003).

A espécie *Luehea speciosa* tem sido pouco estudada quanto à sua composição química, apenas o trabalho de Oliveira (2013) reporta a presença, no extrato obtido pela infusão das folhas, de açúcares redutores, proteínas, aminoácidos, taninos, catequinas, carotenoides, esteroides, triterpenoides e saponinas. E no estudo realizado por Port's e colaboradores (2013) que identificou, através de teste específico, a presença de compostos fenólicos e de uma significante quantidade de flavonoides.

Mas, as espécies do mesmo gênero podem nos inferir parâmetros de comparação, como a *Luehea divaricata*, em que a análise fitoquímica das suas folhas detectou principalmente flavonoides, saponinas e catequinas, taninos condensados (BORTOLUZZI et al, 2002), e em menor grau, presença de alcaloides, antocianinas, carotenoides e polissacarídeos, além de óleo essencial, resina e mucilagem (LORENZI, 1988); e Alice e colaboradores (1995) que, através da abordagem fitoquímica de extratos etanólicos das folhas e caules, detectaram flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos/esteroides, isolando o triterpeno ácido 3 β -p-hidroxibenzoiltormêntico (ácido 3 β -p-hidroxibenzoil-2 α ,19 α -di-hidroxiurs-12-en-28-óico). Em 2003, Tanaka e colaboradores investigaram, na mesma espécie, uma mistura de triterpenos cujo constituinte majoritário é o ácido 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-óico (ácido maslínico), um

derivado 2,3 diidroxilado de β-amirina; relatados posteriormente, em 2005, por Tanaka e colaboradores, que também isolaram, do extrato das folhas, vitexina e glicopiranosilsitosterol, e da fração acetato de etila das cascas, a (-)-epicatequina, um flavonoide pertencente à classe dos flavan-3-ol (Figura 3).

Figura 3: Metabólitos secundários obtidos de Luehea divaricata: (1) Ácido 3b-phidroxibenzoiltormêntico; (2) ácido maslínico; (3) vitexina; (4) glicopiranosilsitosterol; e (5) (-)-epicatequina (TANAKA et al, 2005).

A vitexina foi isolada a partir de três espécies diferentes de Luehea e pode estar relacionada a ação anti-inflamatória, considerada a principal indicação de uso popular para o gênero. Logo, a vitexina é citada como um possível marcador taxonômico do gênero, mas para provar esta hipótese mais dados experimentais são necessários a partir da investigação de outras espécies (CALIXTO-JUNIOR et al, 2016).

Sáens e Nassar (1968) identificaram pequena quantidade de alcaloides na espécie *Luehea candida*. E na *Luehea paniculata*, os extratos etanólicos das folhas e cascas apresentaram taninos e flavonoides, identificando a existência de rutina (BOVINI, 2010); e Alves e colaboradores (2013) relataram o isolamento de triterpenos de ácido maslínico (RAI, 2003) a partir da fração clorofórmica e ácido oleanólico (CHOI, 2006) e lupenona a partir da fração de acetato de etila (KIM e LEE, 2005).

2.4. Atividade antioxidante

O sistema celular obtém a energia necessária para suas atividades essenciais através do processo metabólico da oxidação. O metabolismo do oxigênio molecular nas células promove, secundariamente, o aparecimento de intermediários resultantes da sua redução parcial denominadas por espécies reativas de oxigénio (EROS) (TEPE et al., 2005). O desequilíbrio entre a produção de EROS e os mecanismos de desintoxicação destas espécies no organismo humano, com um consequente aumento da concentração de radicais livres nas células, acarreta o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2006). Dessa forma, o controle entrópico dos processos biológicos em nível celular requer um ambiente redutor que precisa ser mantido com o auxílio de estruturas enzimáticas antioxidantes, que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, como, por exemplo, o sequestro de radicais livres (NEVES et al, 2009).

O método mais comum é o do sequestro de radicais por DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), uma substancia capaz de reagir como doador de hidrogênio. Na presença de compostos antioxidantes, o mesmo recebe a carga livre sendo então reduzido (Figura 4). A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema, que é proporcional à concentração de antioxidante. O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, mas, quando é reduzido, passa a ter coloração amarela. Reação que é facilmente detectada por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível. (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; BONDET et al., 1997).

O DPPH é um cromóforo bastante estável e ao ser reduzido por um agente antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e, como consequência, perde sua absortividade (FABRI, 2008). Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a ligação dupla dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases de DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular, protegendo as células dos efeitos prejudiciais causados pelas espécies reativas (GÜNTZEL, 2008).

$$NO_2$$
 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2 NO_2

Figura 4: Representação da reação geral entre o radical livre DPPH e um antioxidante (OLIVEIRA, 2015).

Radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados (Figura 5), capazes de existir independentemente durante um curto período, sendo altamente reativos e instáveis. Em condições fisiológicas, os radicais livres formam-se em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares e atuam como moléculas sinalizadoras na regulação do crescimento celular, da adesão, diferenciação e apoptose das células (SALVADOR e HENRIQUES, 2004; DROGE, 2002; THANNICKAL; FANBURG, 2000). Porém, em condições patológicas, essa produção pode aumentar de maneira crônica ou prolongada tornando-se a causa fundamental para a progressão de doenças como arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer, câncer, desordens neurológicas e envelhecimento, entre outras patologias (OKTAY et al., 2003; SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

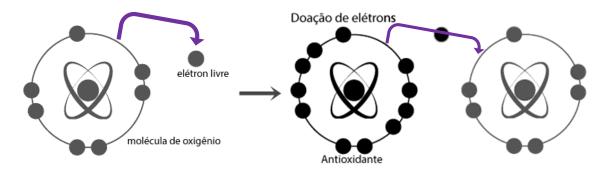


Figura 5: Molécula antioxidante doa elétron ao radical, neutralizando sua atividade nociva.

Dessa forma, a ação de substancias com propriedade antioxidante, encontradas na dieta ou mesmo sintéticas, é um dos mecanismos de defesa contra a ação maléfica dos radicais livres. Pois estas substâncias que, mesmo em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação deste substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra os efeitos dos radicais livres (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

2.5. Neoplasias

O câncer é um grupo de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos. Diferente das células normais do organismo, as células cancerosas desenvolvem-se de maneira rápida e agressiva, acarretando, assim, transtornos funcionais (BRASIL, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para o ano de 2012 foram esperados 14 milhões de novos casos no mundo, em 2020, serão 22 milhões, estimando 13 milhões de óbitos por ano (OMS, 2014).

O avanço significativo no tratamento do câncer, ocorrido nos últimos 50 anos, é inegável, onde cerca de 70 novos medicamentos foram introduzidos na terapêutica. Porém, ainda existe a necessidade de se desenvolver fármacos mais seletivos, pois células malignas e normais do corpo possuem relativa semelhança, o que ocasiona destruição de ambas pelos fármacos. E como consequência desta baixa seletividade, as inúmeras reações adversas e tóxicas do tratamento (OLIVEIRA e ALVES, 2002; BRANDÃO et al. 2010 e FERREIRA et al. 2014).

A quimioterapia aplicada no tratamento do câncer tem, como um dos seus maiores obstáculos, o desenvolvimento, por parte das células tumorais, de resistência aos fármacos, que acomete cerca de 90% dos casos de câncer metastático. Esta resistência a múltiplas drogas pode estar relacionada a uma série de fatores que não são plenamente compreendidos, como o transporte da droga através da membrana plasmática, a alteração nas enzimas-alvo, a alteração no metabolismo da droga, o aumento na reparação do DNA e a incapacidade para sofrer apoptose. (DIETEL, 1991; MORROW e COWAN, 1990; HAMMOND et al. 1989 e HANNUN, 1997 apud HUBER et al 2010). Além disso, o custo elevado é outra causa do insucesso do tratamento. De acordo com os Centros para Controle e Prevenção de Doenças, cerca de 20% dos pacientes com câncer, que tem menos de 65 anos, atrasa ou recusa o tratamento, consequência dos fármacos utilizados no tratamento, a frequência de administração dos medicamentos na quimioterapia, a duração do tratamento e as despesas hospitalares. (COMICB, 2015).

Quanto antes o câncer for detectado, maior a possibilidade de cura, entretanto, os tratamentos disponíveis, quimioterapia, radioterapia e a própria cirurgia, são muitas vezes dolorosos e traumáticos aos pacientes. Diante disso, faz-se necessária a busca por alternativas de tratamento, como a utilização de plantas medicinais, visto que fármacos, hoje disponíveis no mercado, foram isolados de plantas da medicina popular, dentre eles, os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina de Catharantus roseus G.Don, ativos contra o câncer de mama, de pele e linfoma, e o paclitaxel de Taxus brevifolia Nutt (CRAGG e NEWMAN, 2005), administrado no combate ao câncer avançado de mama, de ovário e pulmão (ROWINSKY et al, 1992).

Apesar das comprovações cientificas, ainda existem espécies vegetais que são citadas pela população e que ainda não foram estudadas, como é o caso da *Luehea speciosa*. Pesquisas realizadas com uma espécie do mesmo gênero, *Luehea divaricata*, demonstrou efeito antiproliferativo frente a linhagens de células tumorais (TANAKA et al., 2005), fornecendo, assim, indícios sobre as propriedades de *L. speciosa*. Porém, como não há estudos que validem a eficácia antitumoral de ambas espécies, o presente trabalho faz-se relevante para a investigação de tais propriedades.

OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir conhecimento sobre *Luehea speciosa Willd*, sua composição química e principais atividades biológicas, para qualificar a utilização desta espécie na fitoterapia popular e contribuir para a validação da alegação de uso e para a padronização da forma de emprego da espécie enquanto recurso fitoterápico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização físico-química da droga obtida das cascas de *L. speciosa*;
- Descrição do perfil cromatográfico de extratos e frações obtidos da espécie em foco;
- Detectar e caracterizar uma ou mais substâncias potencialmente marcadoras(s) para fins de quantificação da forma de uso.
 - Avaliação do potencial antioxidante do material em estudo;
- Avaliação da atividade citotóxica de L. especiosa frente a linhagens de células tumorais;
- Contribuir para a validação da alegação de uso e para a padronização da forma de emprego da espécie enquanto recurso fitoterápico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Matéria Prima Vegetal

Foram adquiridos 2 kg de cascas da espécie *Luehea speciosa*, no mercado do Ver-o-Peso, Belém, PA. Uma exsicata do material foi preparada e caracterizada por Manoel Cordeiro, por comparação com a exsicata número IAN 195572, depositada no herbário da Embrapa (Figura 3).



Figura 6: Exsicata de Luehea speciosa, depositado no Herbário da EMBRAPA.

4.1.2. Solventes e Reagentes

Acetona; acetato de etila; clorofórmio; éter de petróleo; éter etílico; tolueno; hexano, etanol 70%; metanol; H₂O osmotizada e ultrapura; acetonitrila grau HPLC. Ácido acético glacial; ácido clorídrico; ácido fórmico; ácido sulfúrico p.a; ácido trifluoroacético; anidrido acético; formaldeído a 4%; H₂O₂ 30 volumes; Na₂CO₃; NH₄OH; o-dinitrobenzeno; solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina; FeCl₃; ninhidrina; vanilina; 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); raspas de magnésio. Reativo de Bouchardat; reativo de Dragendorff; reativo de Fehling (A e B); reativo de Kedde; reativo de Mayer; reativo de Pascová; Lugol.

4.1.3. Equipamentos

Balança analítica – Shimadzu® AUY220; Balança semianalítica – Gehaka® – BK 600; Espectrofotômetro UV - Shimadzu® UV-1800; Espectrofotômetro IV - Shimadzu® FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) IRPrestige-21; Estufa de circulação de ar microprocessada – Quimis® Q314M222; Purificador de água – Direct Q – Millipore; LC/MS – G6460C – Triple Quad, Agilent Technologies®; Sistema de Osmose Reversa – Quimis® - Q842 210; Ultrafreezer - Telstar® Igloo – Green Line - Vip insulation 445L.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Processamento da Amostra

As cascas foram adequadamente processadas no laboratório de Fitoquímica, faculdade de Farmácia - UFPA. Inicialmente, foram lavadas com água corrente para a retirada de sujidades, depois dispostas em bancada sobre papel absorvente a temperatura ambiente para evaporação da água. Após esta etapa o material foi seco em estufa de ar circulante a 40 °C com monitoramento diário de uma alíquota da amostra, até peso constante. A secagem total do material vegetal ocorreu em oito dias. Em seguida foi triturado em moinho de facas, obtendo-se então a droga vegetal.

4.2.2. Análises farmacognósticas da droga vegetal

4.2.2.1. Determinação da Granulometria

A determinação da distribuição granulométrica da droga vegetal foi realizada com base na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed (2010). Foram colocados 5 g da droga vegetal no topo de uma coluna de tamises, dispostos em ordem decrescente de tamanho da malha, respectivamente, 10 (2 mm), 14 (1,40 μm), 25 (710 μm), 45 (355 μm), 60 (250 μm), 120 (125 μm), além do frasco coletor. O tamisador foi acionado automaticamente por 20 minutos e a percentagem de pó retido em cada tamis classificou a droga quanto a sua granulometria. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.2.2. Determinação de Cinzas Totais

A quantificação do resíduo não volátil da droga vegetal foi realizada pela determinação do teor de cinzas totais, de acordo com o que preconiza a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010). Para o teste, 3 cadinhos foram calcinados em mufla, resfriados, pesados e a eles adicionado 1g da droga vegetal em estudo. Em seguida, as amostras foram incineradas, em mufla, a 450 °C, por 2

horas. Após esse período os recipientes foram levados a um dessecador para esfriar sob pressão reduzida e, em seguida, pesados. A operação foi repetida até o peso tornar-se constante.

4.2.2.3. Determinação do teor de Umidade

Após pré-aquecimento do equipamento, 3g da droga vegetal de *L. speciosa* foram distribuídos uniformemente no coletor de alumínio do aparelho. Em seguida, foi selecionada a programação de secagem; 105°C em 1 minuto. O resultado foi mostrado no display do aparelho sendo assim, registrado o valor de umidade em percentual (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.3. Obtenção da Tintura de Luehea speciosa

O método escolhido para a obtenção da tintura foi a maceração, descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), tendo como líquido extrator o álcool etílico a 70%. A droga vegetal foi colocada em contato com o líquido extrator na proporção de 1:10 (p/v). A mistura permaneceu em maceração sob agitação diária com bastão de vidro, por sete dias. Após este período, a mistura foi filtrada obtendo-se a tintura de *Luehea speciosa*. Ao resíduo do material filtrado foi adicionado álcool etílico a 70% numa quantidade que ficasse totalmente submerso, para uma nova maceração por mais 5 dias. O material foi novamente filtrado, obtendo-se maior volume de tintura.

4.2.4. Obtenção do Extrato Bruto Seco (EBS)

A tintura obtida foi concentrada utilizando um evaporador rotativo a baixa pressão, até a total evaporação do etanol. Posteriormente, o material foi congelado a temperatura – 40 °C para que fosse retirada a água restante por liofilização, obtendo-se dessa forma, o Extrato Bruto Seco (EBS).

4.2.5. Abordagem Fitoquímica

Nesta etapa, foram realizados testes químicos de triagem para a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato bruto seco, que são baseados em reações características para saponinas, açúcares redutores, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, fenóis e taninos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados benzoquinonas, naftoquinonas, fenantraquinonas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, esteroides, triterpenoides e azulenos (BARBOSA, 2001).

4.2.6. Fracionamento do Extrato Bruto Seco

O fracionamento foi realizado por tratamento de 14g do EBS com solventes de polaridade crescente, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente. Os solventes foram adicionados ao extrato em alíquotas de 50mL e levados ao ultrassom para acelerar a dissolução das substâncias presentes no extrato. O processo foi repetido cerca de 4 vezes para cada solvente, e após a evaporação dos mesmos se obtiveram as frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME). Processo ilustrado na Figura 4.

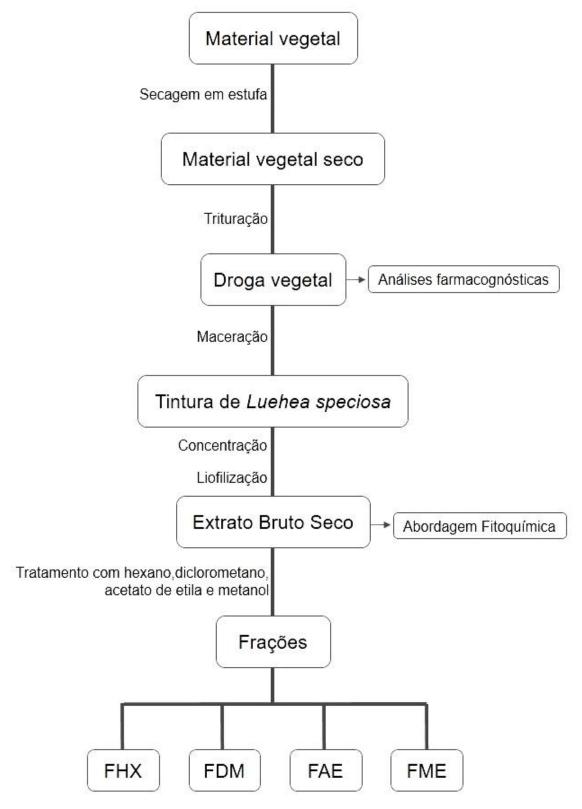


Figura 7: Fluxograma dos processos de obtenção do extrato bruto seco e das frações.

4.2.7. Análises por infravermelho

Alíquotas de Extrato Bruto e suas frações foram analisadas pela técnica ATR (Total Reflection and internal reflection) na forma de comprimidos em mistura com KBr. As leituras foram realizadas na faixa de 400 cm-1 a 4000 cm-1 e 600 a 4000 cm-1 em ATR e analisadas por espectroscopia no Infravermelho usando um espectrofotômetro de infravermelho, modelo FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), Shimadzu® IRPrestige-21. Os dados foram gerenciados pelo programa SciDavis versão 0.2.4, software free, licenciado pela GNU-General Public License. Com Número de Scans igual a 32, Resolução 4.0 e em modo de transmitância.

4.2.8. Avaliação da atividade antioxidante

4.2.8.1. Método do sequestro de radicais por DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico do DPPH (2,2–difenil–1–picrilhidrazila), seguiu a metodologia de Kulisic e colaboradores (2004) modificada.

No ensaio foram preparadas soluções de 2000; 1000; 500; 250 e 125 μg/ml das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME) obtidas de EBS. Foram adicionados 3,9 ml da solução metanólica de DPPH a 0,1 ml das amostras, posteriormente encubadas por 30 minutos, para fazer as leituras das absorbâncias a 515 nm.

Uma solução com 5,7 mg de DPPH em 240 ml de metanol, foi usada como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata e a média das absorbâncias, de cada amostra, foi calculada.

A porcentagem de inibição do radical DPPH, pelas amostras, foi calculada de acordo com a fórmula:

% Inibição = ((
$$Ac_{(0)}$$
 - $A_{A(T)}$) / $Ac_{(0)}$) x 100

Onde:

- Ac(o) é a absorbância do controle negativo no t = 0 min;
- AA(T) é a absorbância da amostra no t = 60 min.

4.2.8.2. Bioautografia

A atividade antioxidante de EBS e frações foi avaliada em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com gel de sílica, utilizando 2,2'-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) como revelador. Foram preparadas amostras do extrato e das frações na proporção de 10 mg/ml em metanol. As soluções foram aplicadas sobre cromatoplaca juntamente com rutina, substância de referência, na mesma proporção.

Como fase móvel, foi utilizado o eluente clorofórmio-acetona-ácido fórmico (75:16,5:8,5), de acordo com Wagner e Bladt (2001). Após evaporação dos solventes, a placa foi nebulizada com a solução de DPPH. Após 30 min, ao abrigo da luz, foi realizada a leitura do cromatograma, onde halos brancos ou amarelados sobre o fundo violeta, são considerados positivos. O ensaio detectou a atividade de substâncias presentes nas amostras, capazes de prevenir a oxidação do DPPH (Cavin et al., 1998).

4.2.9. Avaliação da citotoxidade in vitro

A citotoxidade foi avaliada pelo método de alamar blue, segundo Nakayama e colaboradores (1997). Neste estudo, foram utilizadas as linhagens de carcinoma de laringe humana (HEP-2), câncer cervical (HELA) e linhagem de células normais de rim de macaco verde africano (VERO). As células HEP-2 e

HELA, foram cultivadas em meio DMEM e a célula VERO no meio RPMI, ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e armazenadas em incubadora a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Foram aplicadas 1 x 10⁴ células em cada um dos 96 poços da placa. Após 24 horas de incubação e aderência das células, estas foram tratadas com as frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME) de *Luehea speciosa*, dissolvidas em DMSO puro e estéril, e testadas na concentração de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 150 mg/mL, conforme é sugerido nas considerações de concentração máxima em testes de genotoxicidade celular de mamíferos, publicado em 2010 por Parry e colaboradores.

Após o período de tratamento foram adicionados 10 μL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) nos 96 poços. Posteriormente ao tempo padronizado de metabolização da resazurina, que compreendeu o período de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência a 530nm. A viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula abaixo:

% viabilidade =
$$\frac{\text{Ft x 100}}{\Delta \text{Fb}}$$

Onde Ft corresponde a fluorescência da célula + meio + substância + resazurina; e ΔFb corresponde a fluorescência da célula + meio + resazurina.

4.2.10. Análises Cromatográficas

4.2.10.1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS)

Amostras de EBS e suas frações foram dissolvidas em MeOH grau HPLC, na concentração de 10mg/MI, para as análises realizadas em um sistema LC/MS Triple Quad 1260, modelo 6460 da Agilent Technologies, gerenciado por Agilent MassHunter Qualitative Analisys Software Version B.07.00.

A coluna utilizada foi uma Zorbax C18 com tamanho de partícula $5\mu m$, $4,6 \times 150$ mm, numa temperatura de forno de 30 °C \pm 1. A eluição foi realizada com

um fluxo de 0,4 ml/min. O sistema eluente foi composto por água pura com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B), com perfil de eluição A:B - 75:25 em t= 4min; 60:40 em t=7min; 50:50 em t= 10 min; 10:90 em t= 16 min e 10:90 em t= 26min. O volume de injeção foi de 8µl. O registro de cromatogramas se deu nos seguintes comprimentos de onda: 254 nm, 280 nm, 315 nm, 330 nm e 350 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a seleção do material vegetal, foram obtidos 2 kg de cascas de *L. speciosa*, que depois de secas e pulverizadas renderam 1,696 g de pó. Após o processo extrativo, concentração e liofilização, se chegou a um rendimento, em massa, de 85,87 g de extrato bruto, correspondente a 5,06 %.

Tabela 1: Rendimento do material vegetal, droga e extrato.

Material	Massa
Material vegetal	2000 g
Droga vegetal (Cascas secas e trituradas)	1696 g
Extrato hidroetanólico concentrado EBS	85,87 g

5.1. Análises farmacognósticas

5.1.1. Determinação da Granulometria

Com a análise da granulometria foi possível classificar o pó das folhas de *L. speciosa* como moderadamente grosso, cujas partículas passaram pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 um, como demonstrado na (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

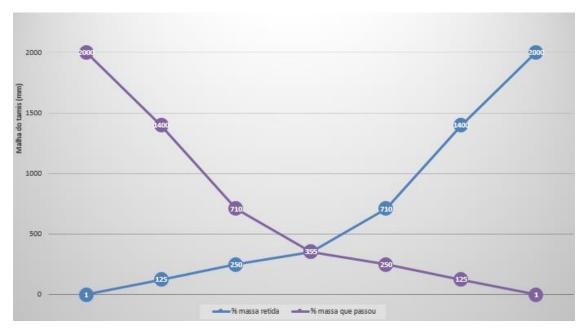


Figura 8: Determinação granulométrica: % do pó que ficou retido no tamis x % do pó que passou pela malha.

A determinação da granulometria da droga vegetal avalia um parâmetro que permite aumentar a eficiência da extração, já que, partículas muito finas se compactam e assim, reduzem a penetração do líquido extrator e ainda, bloqueiam os poros dos filtros e com isso, dificultam a filtração. Por outro lado, partículas de alta granulometria não apresentam superfície de contato suficiente, o que interfere também na eficiência do processo (BARBOSA e COSTA, 2009).

Dessa forma, o pó das cascas de *L. speciosa*, moderadamente grosso, traz vantagens a solubilidade da droga, facilitando na extração, pois apresenta uma boa superfície de contato e com menor compactação de partículas, por não se apresentar muito fino.

5.1.2. Determinação do teor de Cinzas Totais

O teste realizado, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (5. ed. – 2010), apresentou como resultado 11% de teor de cinzas totais para a espécie em estudo, estando, dessa forma, dentro dos limites preconizados, no máximo 14% de teor de substâncias não voláteis no processo de incineração. Demonstrando um conteúdo apropriado de material orgânico, calcinável.

5.1.3. Determinação do Teor de Umidade

A droga vegetal de *L. speciosa* apresentou 8,85% de teor de umidade. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (5ª ed. – 2010), este valor se encontra dentro dos limites estabelecidos para plantas medicinais, que é de 8% a 14%, o que indica que o material teve armazenamento e secagem adequados, além de servir como parâmetro de qualidade, já que o excesso de água pode contribuir para ação enzimática, possibilitar o crescimento de fungos e bactérias e assim, acarretar a degradação de substâncias (SIMÕES, 2010).

De dois estudos anteriores encontrados na pesquisa bibliográfica realizada, aquele realizado por Oliveira (2013), sobre folhas de *L. speciosa*, registra um teor de 7,3% de umidade para o vegetal.

O teor de umidade é o valor resultante do aquecimento da amostra de forma que a água e substâncias voláteis sejam removidas resultando num resíduo seco (IAL, 2008). Esse teste indica a capacidade de conservação e armazenamento que o material vegetal passa a apresentar após a secagem, pois desta maneira se pode evitar o desenvolvimento de microrganismos.

Tabela 2: Determinação do teor de cinzas totais e de umidade do pó de Luehea speciosa.

TESTE	L. speciosa
Teor de Cinzas Totais	11%
Teor de Umidade	8,85%

5.2. Abordagem Fitoquímica

Nos testes de triagem fitoquímica realizados, foram encontradas no extrato hidroetanólico concentrado das folhas de *L. speciosa* as seguintes classes: ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos cardíacos, catequinas, sesquiterpenolactonas e purinas (tabela 3).

Tabela 3: Resultados da abordagem fitoquímica no extrato bruto de L. speciosa.

CLASSES DE METABÓLITOS	L. speciosa
Saponinas	-
Ácidos orgânicos	+
Esteroides e triterpenos	-
Azulenos	-
Glicosídeos cardíacos	+
Flavonoides	+
Derivados de Benzoquinonas,	-
Naftoquinonas e Fenantraquinonas.	
Sesquiterpenolactonas	+
Purinas	+
Dragendorff	-
Alcaloides { Bouchardat	+
Mayer	-
Açúcares redutores	+
Polissacarídeos	-
Fenóis e taninos	+
Proteínas e Aminoácidos	-
Catequinas	+

Em seu trabalho, Oliveira (2013) que analisou o extrato das folhas de *L. speciosa*, detectou a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, catequinas, resultados que corroboram os testes aqui apresentados. Além de ter observado a presença de saponinas, polissacarídeos, esteroides, triterpenoides e carotenoides, ausentes nas análises reportadas neste trabalho. Fato que pode estar relacionado às diferentes partes da planta que foram utilizadas nos estudos e/ou diferentes origens das espécies, modo de coleta e sazonalidade, que expõe as plantas a mudanças periódicas, principalmente através de fatores como água, luz e temperatura, onde elas têm que se ajustar fisiologicamente à estas condições (MAGALHÃES et al, 2005).

5.3. Fracionamento do EBS

A massa de cada fração foi de, respectivamente: FHX: 0,25 g; FDM: 0,07g; FAE: 0,18g e FME: 12,93g (tabela 4), sendo esta última a de maior rendimento, podendo ser explicado pelo fato do EBS ter sido obtido através de extração com álcool, dessa forma, a amostra passou a concentrar substâncias de mais alta polaridade, e consequentemente tendo mais afinidade por solventes mais polares.

Tabela 4: Rendimento das frações Hexânica (FHX), Diclorometano (FDM), Acetato de Etila (FAE) e Metanólica (FME) do extrato de L. speciosa.

Frações	Massa (g)	%
FHX	0,25	1,78
FDM	0,07	0,5
FAE	0,18	1,28
FME	12,93	98,35

O fracionamento do extrato e a realização dos testes com frações obtidas possibilitam, geralmente, resultados mais claros e confiáveis (SIMÕES, 2010). É graças à seletividade dos solventes que se podem extrair preferencialmente as substâncias desejadas, em maior concentração. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair, determina o solvente a ser usado. (SIMÕES, 2010).

5.4. Análises por infravermelho

Os espectros de infravermelho obtidos de extratos brutos e frações, de origem vegetal, fornecem uma impressão digital das amostras, na qual estão registrados todos os grupos funcionais presentes nas substâncias presentes nessas amostras e que possuem grupos funcionais em comum.

Os resultados, obtidos pelas análises por infravermelho, estão ilustrados na Figura 9, onde é possível observar a banda **1612** cm⁻¹, no EBS, que indica a forte presença da banda de absorção da ligação dupla entre Carbono e Oxigênio (C=O), que absorve em torno da região 1600 cm⁻¹, que sugere também a presença de anéis aromáticos, já que eles são absorvidos na faixa de 1600-1500 cm⁻¹ e a banda de absorção é bem evidente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Na fração FME, há uma banda bastante semelhante, porém com menor intensidade, mas inferindo também a presença dos grupos funcionais.

Segundo Pavia (1996), ligações duplas entre carbono e oxigênio (–C=O), características do grupo funcional carboxila dos ácidos carboxílicos, apresentam bandas na faixa de 1720-1670 cm⁻¹. Diante do exposto, as bandas **1709** cm⁻¹, da fração FDM, e **1714** cm⁻¹, da fração FHX, estão compreendidas no intervalo, sugerindo a presença do grupo funcional.

As deformações axiais das ligações entre carbono e oxigênio (–C–O), em álcoois e fenóis, produzem uma banda forte no intervalo de 1261-1016 cm⁻¹ (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; PAVIA, 1996), e no extrato bruto de *L. speciosa*, a banda mais evidente é em **1074** cm⁻¹, que está compreendida neste intervalo. Podendo ser interpretada como uma absorção de deformação axial de álcoois secundários (–C–C–O), que apresenta absorção em 1073 cm⁻¹ (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000; PAVIA, 1996).

A absorção correspondente a deformação axial entre Carbono e Hidrogênio (–C–H) de alcanos ocorre na região de 3000 a 2840 cm⁻¹. A posição das vibrações de deformação axial de C–H está entre as menos variam no espectro. Dessa forma, é possível apontar a presença desta deformação axial de C–H na amostra, pela absorção **2929** cm⁻¹ que aparece na fração FDM e que a fração FHX possui banda semelhante (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

As bandas mais importantes e que dão mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos são as encontradas entre 900 cm⁻¹ e 675 cm⁻¹, intervalo que compreende a fraca absorção **788** cm⁻¹ observada no espectro do EBS. Essas bandas intensas provêm da deformação angular fora do plano das ligações C–H do anel benzênico (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Dessa forma, pode-se sugerir a presença das substancias citadas, de acordo com a literatura.

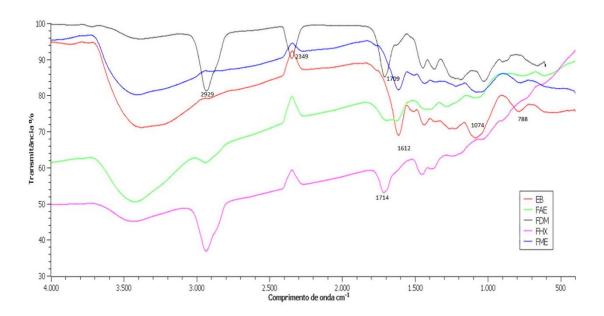


Figura 9: Resultado das análises por infravermelho do extrato bruto (EB) e das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME).

5.5. Avaliação da atividade antioxidante

5.5.1. Método do sequestro de radicais por DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante pelo radical DPPH, realizada neste trabalho, foi possível observar a redução de radicais DPPH através da redução da absorbância induzida pela presença de antioxidantes nas frações obtidas da espécie em estudo, onde todas apresentaram atividade sequestrante de radical livre, quando comparados ao composto padrão utilizado como controle positivo, quercetina. Após cálculo do percentual de inibição (%inibição), observou-se que as frações FDM, FAE e FME apesentaram %inibição relevante, com valores aproximados aos apresentados pelo padrão quercetina. Enquanto a fração FHX obteve %inibição mais baixo, porém significativo (Figura 10).

A atividade antioxidante de *L. speciosa* pode ser atribuída a substâncias fenólicas, caracterizadas nas análises por HPLC reportadas neste trabalho, corroborada por Port's (2013), que detectou compostos fenólicos e flavonoides nas folhas da espécie e também, a sua atividade antioxidante. E em 2013, Oliveira caracterizou taninos e catequinas na espécie, através da prospecção fitoquímica. Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, no mínimo, um anel benzênico diretamente ligado a, pelo menos uma hidroxila livre ou a outra função oxigenada, como éter, éster ou heterosídeo (CAPECKA et al 2005, WOJDYLO et al, 2007). São produtos do metabolismo secundário, estando presentes em todos os tecidos vegetais. As substâncias de natureza fenólica, mais abundantes nas plantas, pertencem às classes dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (NEVES et al, 2009).

Dessa forma, os resultados demonstram que o extrato hidroetanólico da espécie pode ser utilizada como fonte de antioxidantes naturais.

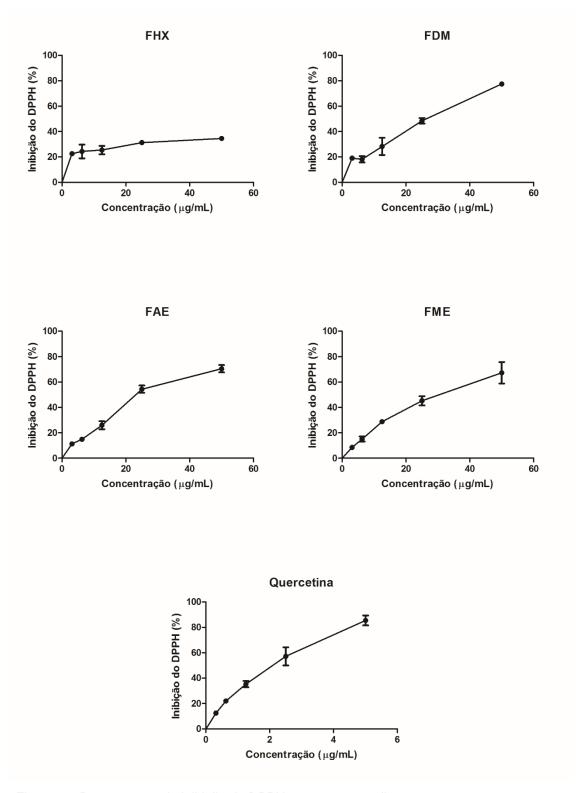


Figura 10: Porcentagem de inibição do DPPH nas concentrações 2000; 1000; 500; 250 e 125 μg/ml das frações hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME) de Luehea speciosa.

5.5.2. Bioautografia

Na avaliação da atividade antioxidante por bioautografia, desenvolvida neste trabalho, foi possível observar, sob luz visível, no cromatograma, zonas correspondentes a substâncias separadas que reagiram com o DPPH, o que revelou o efeito antioxidante delas e permitiu separar as frações responsáveis por esse efeito. Na base do cromatograma, onde as amostras e o padrão, rutina, foram aplicados, é possível observar a reação com o DPPH, alterando a coloração, o que significa que as amostras apresentam mais substâncias antioxidantes que não eluiram e, portanto, não puderam ser analisadas neste ensaio.

Nas frações FDM e FAE, as bandas visíveis, que reagiram com o DPPH, apresentaram Rf = 0.17, que também apareceu no EB, e Rf = 0.34, 0.45, 0.57 e 0.65, que foi mais reativo na fração FDM, porém não há evidencias cientificas, utilizando o mesmo sistema eluente, que possam servir de comparação. Porém, o sistema escolhido, segundo Wagner e Bladt, é utilizado na identificação de flavonoides, incluindo catequinas, metabólitos já identificados em plantas do mesmo gênero, como nas análises realizadas no extrato das cascas de *L. divaricata*, onde Siqueira (2006) identificou como principais componentes flavonoides, taninos, antocianinas e triterpenos; e Tanaka (2005) que caracterizou o polifenol epicatequina na mesma espécie. Além da prospecção fitoquímica realizada no presente trabalho, que sugere a presença de flavonoides na amostra. Somando-se a informação na literatura, que comprova a atividade antioxidante dos flavonoides (LÓPEZ CARRERAS et al, 2012).

Apesar de não representar as condições semelhantes aos processos que ocorrem in vivo, o método colorimétrico para avaliar a atividade antioxidante contra o radical DDPH representa um método simples para detectar a presença de substâncias com tais propriedades em extratos vegetais (SOARES e FABRI, 2011). A associação com cromatografia em camada delgada (CCD) oferece várias vantagens, como resultados rápidos, uma redução nas etapas de preparação de amostras demoradas e o acesso direto a compostos alvo separados na placa de CCD (POOLE, 2015).

Dessa forma, foi obtido o perfil cromatográfico por CCD com a finalidade de se conhecer a composição qualitativa de substancias antioxidantes da espécie *L. speciosa*. Análises direcionadas à identificação e quantificação dos constituintes antioxidantes são necessários para elucidar a composição química das frações ativas.

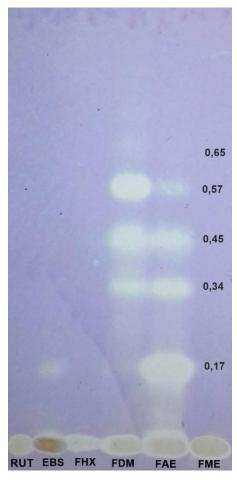


Figura 11: Cromatoplaca contendo extrato bruto e as frações de *L. speciosa* após aplicação do reagente DPPH.

Analisando os resultados da ação antioxidante da espécie em estudo, é possível sugerir que a propriedade apresentada possa estar ligada a atividade citotóxica e ao seu uso popular contra o câncer, já que se for mantida a saúde das células, previne-se diversas doenças, inibindo a proliferação de células nocivas, dentre as quais, as células tumorais.

5.6. Avaliação da citotoxidade in vitro

Este trabalho segue a premissa de que, de acordo com o conhecimento popular, a espécie em estudo, *L. especiosa*, é utilizada no tratamento contra o câncer. Dessa forma, buscou-se obter dados que demonstrassem o seu possível potencial antitumoral, através da avaliação da atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares, pois quando objetivo é obter a atividade antitumoral de uma amostra, o ideal, é avaliar em um painel de diferentes linhagens tumorais e normais (SPIELMANN et al. 1999; CRUZ et al. 2004), pois as diferentes linhagens podem apresentar perfis distintos de sensibilidade (MIRANDA, 1992).

Muitas vezes, o fracionamento do extrato etanólico obtido de plantas contribui para o aumento da atividade biológica, porém a citotoxidade para células normais do organismo pode aumentar (GALUCIO, 2014; VANDRESSEN et al, 2017.). Mediante o exposto, avaliou-se a citotoxidade das frações FHX, FDM, FAE e FME sobre linhagens de células tumorais, HELA, HEP 2 e VERO.

Na figura 11, que ilustra o percentual de morte celular das três linhagens de células tumorais quando expostas as frações, é possível observar que todas as amostras apresentaram alguma atividade contra os três tipos celulares. Porém a fração FDM demonstrou o percentual de morte celular mais relevante, nas três concentrações (50, 100 e 150 mg/ml), com uma moderada diferença, para mais, de percentual, com o aumento da concentração, onde as concentrações de 100 e 150 mg apresentaram valores mais aproximados entre si. Dessa forma, é possível inferir que a fração FDM possui uma expressiva atividade citotóxica, apresentando valores nas três concentrações de forma semelhante nas três linhagens de células, onde pode-se sugerir que a atividade citotóxica não é seletiva, e também, dose dependente, devido o percentual aumentar com o aumento da concentração. Sendo, portanto, uma amostra com resultados promissores para futuros estudos que possam confirmar a sua ação terapêutica contra o câncer

A fração FHX apresentou percentuais de morte celular semelhantes frente as linhagens HELA e HEP-2, demonstrando menor percentual nas concentrações 50 e 100 mg/ml. Porém, quando aumentada a concentração, para 150 mg/ml, a fração demonstrou relevante aumento percentual. Quando em

contato com as células VERO, que simulam o comportamento de células normais, a fração demonstrou maior percentual de morte celeular e consequentemente, demonstrando a necessidade de uma maior concentração de amostra para que haja o efeito citotóxico. Dessa forma, é possível sugerir que sua propriedade é dose dependente, apresentando citotoxidade quase irrelevante nas menores concentrações, de 50 e 100mg/ml, nas três linhagens de células.

A fração FAE apresentou baixo percentual de morte celular nas três linhagens de células, sendo mais evidente nas células HELA e HEP-2, inferindo, a amostra, pequena atividade citotóxica contra células tumorais, porém irrelevante para que se possa confirmar tal propriedade a amostra. Quando avaliada contra células VERO, a fração FAE demonstra um maior percentual de morte celular, quando comparado as demais linhagens, apresentando a característica de dose dependência mais evidente.

A fração FME promoveu morte celular em todas as linhas linhagens de células tumorais em estudo, sendo mais evidente nas células HEP-2 e VERO. Onde, nas concentrações de 100mg/ml, houve um aumento significativo do percentual, caindo moderadamente quando a concentração aumenta para 150mg/ml, logo, nas duas maiores concentrações, a fração apresentou um moderado percentual de morte celular, sugerindo dependência da dose. Dessa forma, é possível concluir que a fração FME apresenta uma considerável atividade citotóxica contra células tumorais, sendo relevante nas duas maiores concentrações.

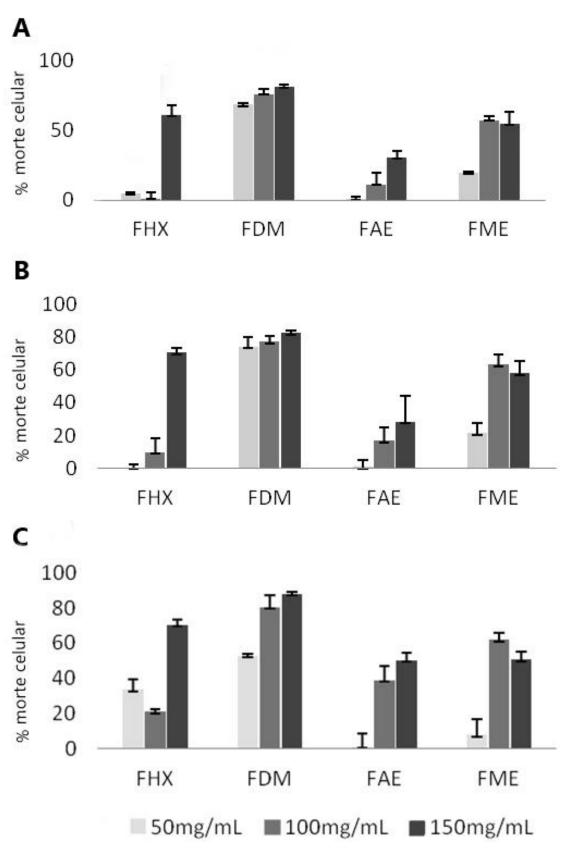


Figura 12: Percentual de morte celular das linhagens de células tumorais, HELA (A), HEP-2 (B) e VERO (C) quando expostas as frações hexanica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanolica (FME), de Luehea speciosa Willd.

De modo geral, as células HELA, HEP-2 e VERO foram mais sensíveis aos efeitos deletérios da fração FDM, sendo esta a fração mais promissora quanto a atividade citotóxica sobre células tumorais, podendo-se então, sugerir que a espécie possui propriedade contra células tumorais, porém não é possível ainda descrever o mecanismo pelo qual exerce tal atividade e nem há, de fato, maior seletividade da toxicidade para células HELA e HEP-2, pois não foi investigado no presente estudo. Porém, a citotoxidade demonstrada frente as células VERO, infere uma propriedade negativa, já que a célular em estudo simula células normais do organismo.

Em 2011, Felicio e colaboradores avaliaram a atividade mutagênica de *Luehea divaricata*, que por ser do mesmo gênero, pode apresentar características semelhantes à espécie em estudo. O trabalho de Felício mostra que a espécie não apresenta potencial mutagênico, sugerindo então, que *L. divaricata* pode ser uma opção terapêutica antitumoral, aumentando, portanto, a probabilidade de que *L. speciosa* também apresente a mesma propriedade.

Os fármacos utilizados na quimioterapia do câncer são pouco seletivos, geralmente, pois apresentam toxidade para as células tumorais e para células normais. Após uma sessão de quimioterapia, o paciente apresenta alterações hematológicas, mais tardiamente observam-se efeitos tóxicos renais, hepáticos, cardíacos, sistema nervoso entre outros (FERREIRA et al. 2014). Por isso, há dificuldade na adesão do tratamento do câncer em decorrência dos efeitos adversos, que podem ser atribuídos à toxidade dos medicamentos (GUERRA, 2005), levando à repulsa do paciente ao tratamento. Nesse sentido, é importante a busca por substâncias que atuem seletivamente em células tumorais.

5.7. Análises cromatográficas

5.7.1. Análises por LC/MS

Em uma primeira etapa do trabalho, foi realizado um fracionamento apenas com dois solventes, diclorometano e metanol. Nas análises por LC/MS, os cromatogramas demonstraram substâncias pouco separadas e concentradas na fração de maior polaridade, FME (Figura 13).

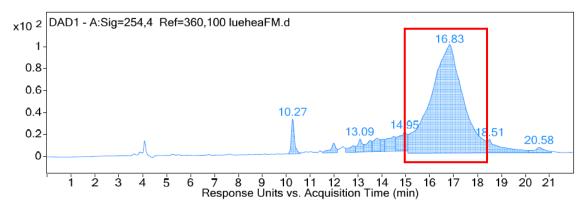


Figura 13: Cromatograma da fração metanólica (FME) de Luehea speciosa obtida no primeiro fracionamento.

Porém, alguns espectros de massa apresentaram picos bem evidentes nos Rts 3.71 min, onde se destaca o m/z 376.9, sugestivo de derivado de ácido cafeico, descrito e identificado no estudo de Bystrom e colaboradores, em 2011 (Figura14).

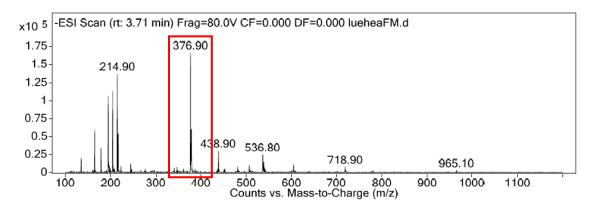


Figura 14: Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 3.71 min.

O Rt 12.09 min. (Figura 15), que demonstrou uma substância com m/z 576.9, também identificada por Bystrom e colaboradores (2011), sugerindo presença de um dímero do flavan-3-ol procianidina na amostra (Figura 12).

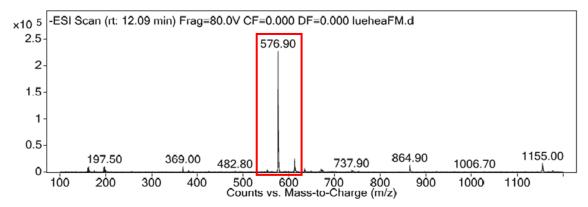


Figura 15:Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 12.09 min

Enquanto que no Rt 12.89 min, o pico de m/z 288.9 (Figura 16) é característico de epicatequina (BYSTROM, 2008), o que é corroborado por Tanaka e colaboradores (2005), que isolaram, da fração acetato de etila das cascas de *L. divaricata*, o flavonoide epicatequina, um flavan-3-ol, indicando que a presença desse flavonoide pode ser uma característica do gênero.

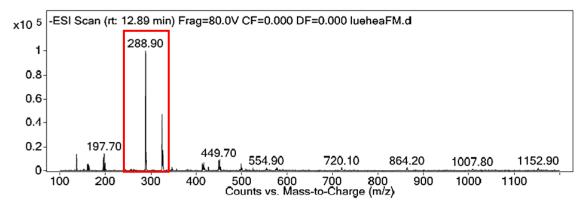


Figura 16: Espectro de massa da fração metanólica (FME) de L. speciosa obtida no primeiro fracionamento no Rt 12.89 min

A partir dos resultados obtidos nas análises no LC/MS no primeiro fracionamento, foi realizado um novo fracionamento, descrito no item 4.2.6., onde foram obtidas as frações FHX, FDM, FAE e FME, na tentativa de se separar melhor as amostras. Nas análises, realizadas no modo de ionização negativo,

conforme descrito no item 4.2.9.1., é possível observar que a maioria dos constituintes foi detectada no final da análise (Figura 17). Entretanto, os espectros obtidos não foram claros o suficiente para a caracterização de outras substâncias. Assim, se faz necessário o melhoramento do método, para que estas substancias sejam melhor separadas e identificadas.

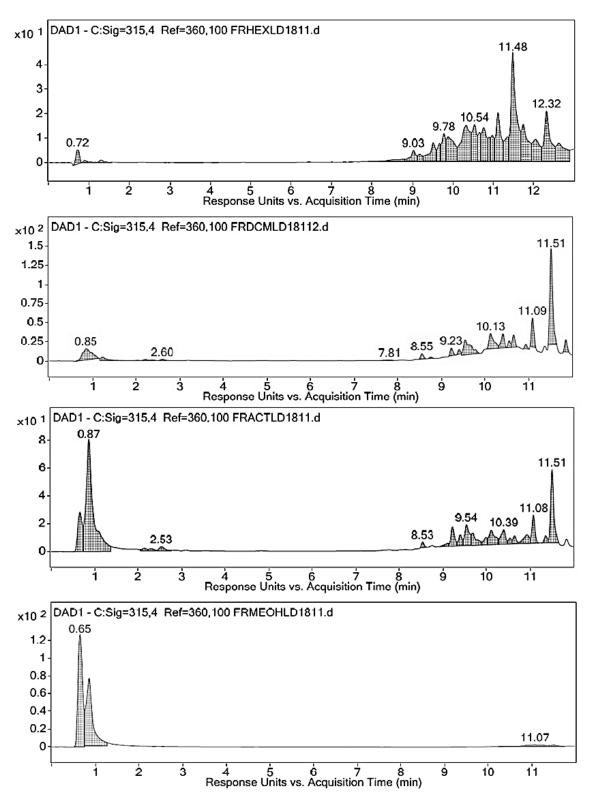


Figura 17: Cromatogramas das frações de Luehea speciosa: fração hexânica (FHX), diclorometano (FDM), acetato de etila (FAE) e metanólica (FME), respectivamente.

O pico mais informativo, com Rt = 11.51 min, registrado na fração FAE (Figura 18), apresenta valor de massa (m/z) 134,8 e é sugestivo de derivado do ácido cinâmico, que possui m/z = 148 (DASS, 2007) mas que no processo de ionização, pode ter perdido uma metila (CH₃).

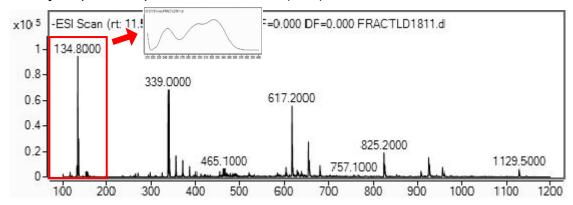


Figura 18: Espectro de massa da fração Acetato de Etila (FAE) no Rt = 11.51min.

O espectro de UV referente a este pico, apresenta semelhança com o do ácido chicórico, um derivado do ácido cafeico, que foi identificado nas folhas de *Ocimum basilicum* no estudo de Lee e Scagel (2008). Sendo, dessa forma, sugestivo que a amostra apresente cromóforo semelhante ao ácido, porém com diferentes substituintes (Figura 19).

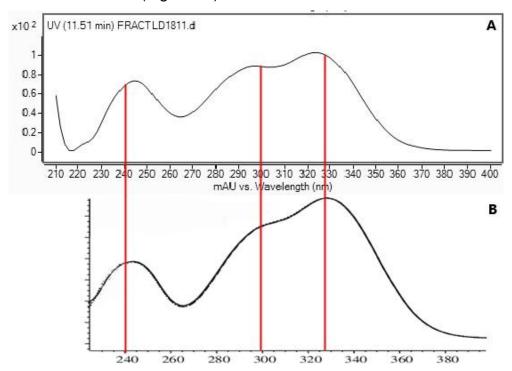


Figura 19: Espetros de UV da fração acetato de etila (FAE) no Rt 11.51 min (A) e do ácido chicórico (LEE e SCANGEL, 2008) (B)

Na análise de outros picos, houve a relevância do pico de Rt 8,94 da fração DCM, onde o espectro apresenta m/z 503 (Figura 20), podendo-se observar pouca fragmentação dos picos na energia utilizada (135 v), o que indica que a substância possui uma estrutura estável. Porém, não foram encontrados dados na literatura que possam servir de parâmetro comparativo para esta massa, logo ainda não é possível concluir de que substância se trata, sendo preconizado o isolamento e análise por outros métodos.

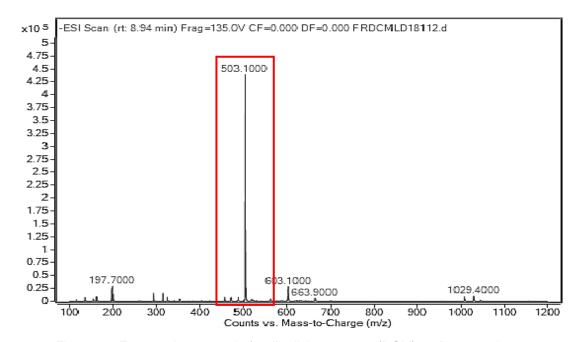


Figura 20: Espetro de massa da fração diclorometano (DCM) no Rt 8.94 min.

Conclusões

- A espécie *Luehea speciosa* apresenta atividade antioxidante, sendo detectada pelo método do sequestro do radical livre DPPH e pelo método bioautográfico, revelado pelo mesmo reagente, onde as frações FDM e FAE apresentaram os melhores resultados.
- Todas as amostras apresentaram alguma citotoxidade contra as linhagens de células em estudo, porém a fração FAE apresentou melhor perfil, sendo mais tóxica contra células HELA e HEP-2, de forma dose dependente. Enquanto que, ao se expor as células VERO, a citotoxidade diminuiu, demonstrando, dessa forma, uma possível seletividade para células tumorais. Podendo-se concluir que a espécie é promissora como agente contra células tumorais, porém há a necessidade de mais estudos que evidenciem e comprovem tal propriedade.
- Os cromatogramas por LC/MS apontaram a presença de flavonoides e derivados, como o ácido cafeico e epicatequinas, já elucidadas em trabalhos anteriores com espécie do mesmo gênero, sugerindo que a presença desse flavonoide pode ser uma característica do gênero.
- O m/z 134,8, foi comparativo a duas substancias, podendo ser um derivado do ácido cinâmico, ou um derivado do ácido cafeico, o ácido chicórico, que apresenta espectro de UV semelhante ao da amostra. Porém, estes dados não foram suficientes para a identificação e comprovação das substancias elucidadas, podendo-se apenas sugerir a presença das mesmas.
- As cascas de Luehea speciosa Willd. são utilizadas na medicina popular, porém sem comprovação das suas atividades biológicas e análise de seus constituintes químicos. Dessa forma, o presente estudo contribui para posteriores análises visando identificar as substâncias aqui reportadas, fornecendo dados que promovam a segurança do usuário.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acesso em 10 de julho de 2017.

ALICE, C. B. et al. Plantas medicinais de uso popular. Atlas Farmacognóstico.

ALVES, I.M., DANTAS, I.C., MELO, J.I.M., FELISMINO, D.C.. A família *Malvaceae* sensu lato em uma área do agreste paraibano, nordeste do brasil. Revista de Biologia e Farmácia. Vol. 6, no 1, 2011.

ALVES, V.G., VANDRESEN, F. e ROSA, E.A.. Triterpenos e Atividade Antiproliferativa de Luehea paniculata (Tiliaceae), I Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, 2013.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5. Ed. Brasília, 2010.

ATCC, cell lines. Organização mundial de recursos e padrões de materiais biológicos.

Disponível em:

http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Revista Cientifica da UFPA. Belém-PA. Vol.4. 2004.

BARBOSA, W. L. R.(Org.) **Etnofarmácia:** fitoterapia popular e ciência farmacêutica. Belém – PA: NUMA/UFPA, 2009.

BARBOSA, W. L. R.(Org.) Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica. Belém – PA: NUMA/UFPA, 2009

BARBOSA, W. L. R; FIQUENI, S. F.. Abordagem etnofarmacêutica de Portulaca pilosa, In: Encontro Internacional de Ciências Farmacêuticas, 1, 1997. Recife. Anais..., Recife: UFPE.1997.

BARBOSA. W. L. R; COSTA. R. S. C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de Cynara scolymus L.(Asteraceae). Revista Brasileira de Farmácia 90(3): 169-174, 2009.

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

BIGHETTI, E.J.B., ANTONIO, M.A., POSSENTI, A., CARVALHO, J.E., FOGLIO, M.A., SIQUEIRA, M.G.. Efeitos da administração aguda e subcrônica da Luehea divaricata Martus et Zuccarini. Lecta, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2004.

BORTOLUZZI, R. C.; WALKER, C. I. B.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D. Análise Química Qualitativa e Morfo-histológica de Luehea divaricata Mart. XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Anais, Cuiabá/MG, 2002.

BOVINI, M. G. Malvaceae na reserva rio das pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguesia, vol. 61, pp. 289–301, 2010.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.P.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Revista Química Nova. v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC N- 14, De 31 de Março de 2010, DOU Nº 63, 5 de abril de 2010, Dispõe Sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. 2010.

BRASIL, ministério da saúde, Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS (2009). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/. Acesso em 18 de setembro de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Brasília. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em htp://Portal Saúde.gov.br. Acessado em 18 de setembro de 2016.

BYSTROM, L.M., LEWIS, B., BROWN, D.L., RODRIGUEZ, E., OBENDORFD, R.L.. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in Melicoccus bijugatus Jacq. 'Montgomery' fruits. Food Chem. 111. P. 1017–1024, 2008.

CALIXTO-JUNIOR, J.T., MORAIS, S.M., COLARES, A.V., COUTINHO, H.D.M.. The Genus Luehea (Malvaceae-Tiliaceae): Review about Chemical and Pharmacological Aspects. Journal of Pharmaceutics, 2016.

CHOI, H. J., EUN, J. S. and KIM, B. G.. Vitexin, an HIF-1α has anti-metastatic potential in PC12 cells. Molecular Cell Biology, vol. 22, pp. 291–299, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: UNICAMP, 2006.

COMICB 2015. O custo médio para o tratamento da quimioterapia. Disponível em http://www.comicb.com/o-custo-medio-para-tratamento-do-cancer-quimioterapia/ Acesso em 18 de janeiro de 2017.

CRAGG, G. M. e NEWMAN, D. J., Plants as a source of anti-cancer agents, Journal of Ethnopharmacology, 72–79, 2005.

CRUZ, A. S; BARBOSA, M.L; ANDREOLI PINTO, T.A. *In vitro* tests used as an alternative to Draize *in vivo* tests. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v 63, n1, p 1-9, 2004.

CUNHA, M. C. S. Revisão das espécies do gênero Luehea Willd. (Tiliaceae), ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Curso de Pósgraduação em Botânica, UFRJ, 1981. Dissertação de Mestrado.

DASS, C.. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, 2007.

DIETEL, M. What's new in cytostatic drug resistance and pathology. Pathology – Research and Practice – Journal, v. 187, p. 892-905. 1991.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. Ciência e Cultura, vol. 55, nº 3, p. 35-36, 2003.

EMBRAPA. Circular técnica – 147. Extraído de: CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa Florestas, v.1. 2003. Colombo, PR. 2008.

FABRI, R.L.. Estudo Fitoquímico de Mitracarpus frigidus (Willd ex Reem Schult.) K. Schum. biomonitorado pela atividade antimicrobiana e avaliação das atividades citotóxica, antioxidante e leshmanicida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Juiz de fora, 2008. Dissertação de Mestrado.

FELICIO, L.P., RIBEIRO, V., CARVALHO, S., SILVA, E.M., MIRANDA, C.T., VIEIRA I.L.B.F., PASSOS, D.C.S., FERREIRA, A.K.S., VALE, C.R., LIMA, D.C.S., NUNES, W.B.. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant Luehea divaricata (Malvaceae) in somatic cells of Drosophila melanogaster: SMART/wing. Genetics and Molecular Research, vol. 10, p. 16-24, 2011.

FERREIRA, A, L; ROCHA, C.P; VIEIRA, L.M; SANT'ANA DUSSE, L.M; D.R.G.J; CARVALHO, M. G. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. Revista Brasileira de Farmácia, v. 94, p. 94-101. 2014.

HAMMOND J.R., JOHNSTONE, R.M. e GROS, P. Enhanced Efflux of Vinblastine from Chinese Hamster Ovary Cells Transfected with a Full-Length Complementary DNA Clone for the mdr1 Gene. Cancer Research, 49. p. 3867-3871. Jul 1989.

HANNUN, Y.A. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. The Journal of the American Society of Hematology, v.89, p. 1845-1853, Mar. 1997.

HEINRICH M. Ethnopharmazie und Ethnobotanik. Eine Einführung. Stuttgart Germany.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001.

HUBER, P.C.; MARUIAMA, C.H; ALMEIDA W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. Química Nova, v.33, n.10, p. 2148-2154. 2010.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed., 1º ed. Digital, v.1, São Paulo-SP, 2008.

KIM, J. H., LEE, B. C.. The isolation and antioxidative effects of vitexin from Acer palmatum. Archives of Pharmacal Research, vol. 28, no. 2, pp. 195–202, 2005.

LEE, J. e SCAGEL, C.F.. Chicoric acid found in basil (Ocimum basilicum L.) leaves. Food Chemistry, no. 115, p. 650–656, 2009.

LOPEZ CARRERAS, N., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A.. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes. Nutr. clín. diet. hosp. Vol. 32, p. 81-91, 2012.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum: Nova Odessa, 1988.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol. 2, 5^a edição. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.

MAGALHÃES, M.A.F.; CORTINES, E.; MELO, A.L.; e VALCARCEL, R. Influência da sazonalidade nos processos de regeneração espontânea na serra Madureira-Mendanha, RJ. In: VI Simpósio Nacional sobre Áreas Degradadas, e II Congresso Latino Americano de Recuperação de Áreas. Resumo expandido. 2005.

MARQUES, T. P. Subsídios à Recuperação de Formações Florestais Ripárias da Floresta Ombrófila Mista do Estado do Paraná, a Partir do Uso Espécies Fontes de Produtos Florestais Não-madeiráveis. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

Ministério da Saúde. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Brasília, 2006. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em 10 de setembro de 2016.

MIRANDA, A.C.C. 58 f. Avaliação da sensibilidade das linhagens celulares ST, PK₁₅ e SK₆ ao parvovírus suíno. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Medicina veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

MORROW, C. S.; COWAN, K. H. Glutathione S- transferase and drug resistance Cancer Cells, v.2, p.15-22. 1990. Breast Cancer Research, v 10, p 210 – 224, 2008.

NAKAYAMA, G.R., CATON, M. C., NOVA, M.P., PARANDOOSH, Z.. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. Journal of Immunological Methods. 204, p. 205–208, 1997.

OLIVEIRA, D.M.C.. Triagem de cinco espécies de plantas medicinais usadas na Amazônia através da análise de secreção de histamina. Programa de pósgraduação em Neurociências e Biologia Celular. 2013. Tese de doutorado.

OLIVEIRA, R. B de; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. Química Nova, v 25, p 976-984, fev, 2002.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional (2014-2023). 2013.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Informe sobre la situación mundial, 2014. PARRY, J.M., PARRY, E., PHRAKONKHAM, P., CORVI, R.. Analysis of published data for top concentration considerations in mammalian cell genotoxicity testing. Mutagenesis, vol. 25, no. 6, pp. 531–538, 2010.

PEREIRA, R. J; CARDOSO, M. G.. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. Journal of Biotechnology and Biodiversity. Vol. 3, N.4 pp.146-152, 2012.

PINTO, A. A. C; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. Acta Amazonica, vol. 33, nº 2, p.281-290, 2003.

POOLE, C.F.. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Elsevier, 2015.
RAI, M. K.. Plant-Derived Antimycotics, Haworth Press, London, UK, 2003.
ROGERO, LUGÃO, A.B., IKEDAB, T.I., CRUZ, A.S.. Teste *in vitro* de Citotoxidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. Materials Research, vol. 6, no. 3, p. 317-320, 2003.

ROWINSKY, E. K., ONETTO, N, CANETTA, R. M., e ARBUCK, S. G., Semin. Onc., 19, 646, 1992.

SALVADOR, M. e HENRIQUES, J.A.P. Radicais livres e a resposta ao estresse oxidativo. Ed. ULBRA, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. 1 reimp. Porto Alegre. Editora da UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2010.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. Alternatives to Laboratory Animals, v. 27, p. 957-966, 1999.

TANAKA, J. C. A. et al. A new Tormentic Acid derivative from Luehea divaricata. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 14, No. 3, p. 475-478, 2003.

OLIVEIRA, R.B, GODOY, S.A.P. e COSTA, F.B. Conhecimento e Prevenção de Acidentes. Editora Holos, 2003.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de Luehea divaricata Martius (Tiliaceae). Química Nova, vol. 28, n. 5, 834-837, 2005.

TROPICOS®. Disponível em: http://www.tropicos.org>. Acesso em: 28 de junho de 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Revista Brasileira de Farmacognosia no 18, p. 308-313, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas. 2^a edição. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. p.126-147, 2001.

WALKER, C. I. B.; BORTOLUZZI, R. C.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D. Toxicidade Aguda e Controle Botânico de Qualidade da Luehea divaricata Mart. XVII Jornada Acadêmica Integrada, Anais, Santa Maria - UFSM, 2002.