

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Byrsonima incarnata* SANDWITH (MALPIGHIACEAE)
BIOMONITORADO POR ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Bolsista: Ray Ney Soares do Nascimento, FAPEAM

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIB-S/0142/2013
RELATÓRIO FINAL

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Byrsonima incarnata* SANDWITH (MALPIGHIACEAE)
BIOMONITORADO POR ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Orientador: Prof^ª MSc Fernanda Guilhon Simplicio

Bolsista: Ray Ney Soares do Nascimento, FAPEAM

MANAUS

2014

RESUMO

Espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) apresentam em sua composição química forte presença de flavonoides e triterpenos, fato que sugere capacidade anti-inflamatória e antidiabética, entretanto, poucas delas foram estudadas com esse enfoque. Diante disso, este projeto avaliou o potencial anti-inflamatório e antidiabético de extratos orgânicos da casca do caule de *Byrsonima incarnata*, espécie arbórea da região amazônica com potencial farmacológico ainda desconhecido. As cascas do caule foram secas em estufa de ar circulante a 45°C, moídas em moinho de facas e em seguida realizou-se a prospecção dos metabólitos presentes por metodologia clássica, onde se detectou a presença de antocianinas e antocianidinas, catequinas, taninos hidrolisáveis, flavonas, terpenos e saponinas. Os extratos brutos para estudo foram obtidos por maceração em ultrassom com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, sequencialmente. A partir dos extratos secos fez-se o teste de inibição da α -glucosidase, α -amilase e lipase, utilizando quercetina, arcabose e Orlistat® como controles positivos, respectivamente. O percentual de inibição para α -glucosidase dos extratos hexano, acetato de etila e metanol foi de $97,30 \pm 0,50$ %, $98,35 \pm 0,07$ % e $98,37 \pm 0,03$ %, respectivamente, o que significativo ($p < 0,05$) em comparação à quercetina. Os testes para inibição de lipase e α -amilase não apresentaram resultados significativos em relação aos controles utilizados. Por apresentar maior percentual de inibição da enzima α -glucosidase, o extrato metanol foi particionado hexano, fornecendo um precipitado que foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN) de H^1 e pressat. Entretanto, as análises realizadas foram insuficientes para a identificação da substância. Os extratos acetato de etila e metanol foram também avaliados quanto a capacidade de inibir a ativação de macrófagos por lipopolissacarídeos, após constatação de ausência de citotoxicidade, e ambos apresentaram maior inibição na concentração de 50 μ g, sendo de $52,28 \pm 10,59$ % e de $47,24 \pm 3,96$ %, respectivamente. Como primeiro estudo científico sobre a espécie, esta pesquisa traz dados inéditos e interessantes sobre o seu potencial farmacológico e sua constituição química, podendo contribuir ainda para as pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos fármacos, medicamentos e fitoterápicos anti-inflamatórios e antidiabéticos.

Palavras-chaves: *Byrsonima incarnata*, inflamação, diabetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.....	10
Figura 02 – Gráfico de inibição para α -glucosidase.....	21
Figura 03 – Gráfico de inibição para lipase.....	21
Figura 04 – Gráfico de inibição para α -amilase.....	22
Figura 05 – Partição metanol:hexano em (A) e precipitado avermelhado em (B).....	23
Figura 06 – Espectro de RMN.....	23
Figura 07 – Gráficos de viabilidade celular.....	24
Figura 08 – Gráficos de atividade antiinflamatória.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	06
2. OBJETIVOS.....	08
2.1. Objetivo geral.....	08
2.2. Objetivos específicos.....	08
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	09
3.1. Byrsonima sp.	09
3.2. Diabetes e enzimas relacionadas.....	10
3.3. Contribuição dos produtos de origem vegetal para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Coleta da matéria-prima vegetal.....	14
4.2. Prospecção fitoquímica.....	14
4.3. Obtenção dos extratos brutos	14
4.4. Partição do extrato metanólico.....	15
4.6. Ressonância Magnética nuclear (RMN)	16
4.7. Inibição da α-glucosidase in vitro.....	16
4.8. Inibição da lipase in vitro.....	16
4.9. Inibição da α-amilase in vitro.....	17
4.10. Cultivo e manutenção da cultura de células de macrófagos.....	17
4.11. Ensaio de viabilização celular em macrófagos.....	18
4.12. Inibição da ativação de macrófagos por LPS.....	28
4.13. Quantificação de Nitrito.....	19
4.14. Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	26
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias representam um problema de saúde pública com altos números de óbito e grande impacto socioeconômico. Atualmente, os principais tipos de fármacos utilizados no tratamento desse tipo de patologia são agentes anti-inflamatórios, que aliviam sintomas e diminuem a inflamação. Entretanto, terapias com esses medicamentos não são totalmente eficazes e provocam muitos efeitos colaterais. A escassez de fármacos seguros e o baixo acesso da população carente aos tratamentos utilizados nesse tipo de patologia estimulam a busca de novas substâncias potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias (GILMAN, 1987).

Está cada vez mais claro o papel crucial da inflamação da fisiopatologia de diversas doenças, com os mais diferentes graus de impacto socioeconômico. Várias evidências apontam o envolvimento da inflamação, via substâncias secretadas por macrófagos ativadas, em doenças como o diabetes Mellitus dos tipos 1 e 2, uma das grandes preocupações em saúde pública a nível global (ESPINOZA-JIMÉNEZ et al., 2010). Na obesidade, condição cada vez mais comum na sociedade atual, dada a adoção de estilo de vida sedentário e maus hábitos alimentares (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011), está demonstrada a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, o que pode levar a hipertensão, aterosclerose, dislipidemia e do próprio diabetes Mellitus, os quais caracterizam a síndrome metabólica (EMANUELA et al., 2012).

Sendo assim, o desenvolvimento de medicamentos que possam atuar como anti-inflamatórios e que tenham a capacidade de inibir alguma enzima envolvida na degradação de carboidratos, poderão contribuir para oferecimento alternativas terapêuticas contra o Diabetes e assim contribuindo para a melhoria da qualidade de vida e eficiência do tratamento em pacientes que fazem uso desse tipo de medicamento. Nesse contexto, produtos naturais apresentam vantagens, de origem vegetal podem fornecer insumos e moléculas diversas que atuam por diferentes mecanismos para tratamento e controle de várias patologias. A Amazônia como a região com a flora mais rica do mundo, apresenta inúmeras possibilidades para atingir esses objetivos (SIMÕES et al., 2004).

Desse modo, este estudo investigou a capacidade de extratos orgânicos da espécie *Byrsonima incarnata* Sandwith inibirem enzimas relacionadas à fisiopatologia do diabetes e também sua capacidade de suprimir uma resposta inflamatória, por meio da inibição da

formação e/ou liberação de óxido nítrico pro macrófagos ativados, um importante mediador de respostas inflamatórias, esperando-se contribuir para o conhecimento do potencial farmacológico dessa planta amazônica e com os estudos voltados aos desenvolvimentos e novos fármacos e medicamentos anti-inflamatórios e antidiabéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar técnicas de fracionamento fitoquímico para a obtenção de frações contendo substâncias com capacidade anti-inflamatória e antidiabéticas e ou isolamento das mesmas, a partir de extratos orgânicos da casca do caule de *Byrsonima incarnata*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de inibição da ativação de macrófagos de diferentes extratos orgânicos e frações da casca do caule de *Byrsonima incarnata*;
- Avaliar a capacidade de inibição da ativação de macrófagos de diferentes extratos orgânicos e frações da casca do caule de *Byrsonima incarnata*;
- Obter substâncias ou frações semipurificadas com ação anti-inflamatória em quantidade viável para posteriores estudos in vivo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.2 *Byrsonima* sp.

Malpighiaceae é uma família de árvores, arbustos, subarbustos e lianas com aproximadamente 71 gêneros e 1250 espécies, que se distribuem em florestas tropicais, subtropicais e savanas do Velho e Novo Mundo, onde estão localizadas 85% das espécies (GABLE, 2007). O gênero mais extensivamente estudado tem sido o *Byrsonima*, com 150 espécies de distribuição marcadamente neotropical. O Brasil concentra cerca de 50% dessas plantas, que são encontradas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Central, podendo também ser encontradas na região Sudeste do país, em áreas de cerrado. São conhecidas popularmente como “muricis”, sendo diferenciadas pela cor de suas flores e frutos, ou pelo local de ocorrência. Desse modo, recebem nomes como murici da várzea, murici da mata, murici-amarelo, entre outros (TEXEIRA, 2000).

Folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são usadas popularmente em disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como antidiarréicos (Amarquaye et al., 1994). Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos, no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais frequente no gênero (FELÍCIO et al., 1995).

As espécies do gênero *Byrsonima* têm sido predominantemente investigadas quanto a sua ação contra micro-organismos, entre diversas espécies de bactérias, enterobactérias, micobactérias, protozoários e fungos implicados na etiologia de doenças gastrointestinais e de pele, com resultados positivos na maioria dos estudos. Outras atividades biológicas como espasmogênica/antiespasmogênica, imunoestimuladora, anti-inflamatória tópica, anti-hemorrágica, antiglicemiante, anti-hiperlipidêmica, antiulcerogênica, antidiarreica e antioxidante também foram investigadas em diferentes espécies. De forma geral, os resultados apresentados corroboram para a validação dos usos etnofarmacológicos (GUILHON-SIMPLICIO, 2009).

Byrsonima incanata é uma arvoreta com cerca de 5-6 metros de altura possuindo o tronco retilíneo com casca bem avermelhada encontrada especialmente na terra firme Amazônica. Entretanto, não há dados científicos registrados sobre os efeitos farmacológicos e a química de extratos das cascas e até mesmo folhas de *Byrsonima Incanata*. A espécie

também não possui registro de uso medicinal, ou outro popular conhecido, apesar da difundida aplicação medicinal e alimentícia de várias espécies do seu gênero em diferentes regiões do país.



(A)

(B)

(C)

Figura 01 – *Byrsonima incarnata*. (A) Espécime no local de coleta; (B) Detalhe das flores; (C) Detalhes do caule (ARQUIVO PESSOAL)

3.3 Diabetes e enzimas relacionadas

Diabetes é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação de insulina ou em ambas e alterações no metabolismo e carboidratos, lipídios e proteínas, resultando em um aumento do nível de glicose no sangue (SOUZA, 2011). Em relação ao impacto econômico, estimativas sugerem que aproximadamente 9% dos custos com hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS) sejam atribuídos ao diabetes (REIS, 2008).

O diabetes tipo I é uma doença metabólica crônica caracterizada por uma deficiência de insulina, a qual é determinada pela destruição das células produtoras de insulina do pâncreas. Este processo, mediado pelo sistema imunológico, ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia o qual é característico da patologia. Invariavelmente há necessidade de reposição insulínica exógena (YAMAGISHI, 2004).

Já o diabetes tipo II é também chamado de diabetes não insulínica ou diabetes do adulto e corresponde a 90% dos casos de diabetes, neste tipo de diabetes encontra-se a presença de insulina, porém sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como

resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia (GOTTLIEB, 2009). Por ser pouco sintomático o diabetes na maioria das vezes permanece por muitos anos sem diagnóstico e sem tratamento o que favorece a ocorrência de suas complicações no coração e no cérebro (SOUSA, 2006).

Alterações fisiológicas provocadas pela hiperglicemia levam à diminuição da capacidade que o organismo tem de responder com inflamação, aumentando a susceptibilidade às infecções. Há disfunções nos leucócitos, com anormalidades na aderência, quimiotaxia, fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, quando comparados aos pacientes controles não diabéticos (BANDEIRA et al, 2003).

As α -glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos ou oligossacarídeos liberando unidades de glicose, estão localizadas na membrana da borda em escova de células intestinais e são enzimas essenciais para a digestão dos carboidratos. Após a hidrólise do amido pela α -amilase, a maltose e as unidades menores de oligossacarídeos são clivadas pela ação da α -glucosidase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo. A α -glucosidase cliva as unidades terminais de glicose da amilose ou amilopectina, tendo preferência por malto-oligossacarídeos menores, liberando glicose com uma configuração α (SOUZA, 2011).

Os inibidores competitivos da alfa-glicosidase, como a acarbose, o miglitol e a voglibose agem como antagonistas enzimáticos da amilase e sucrase e diminuem a absorção intestinal da glicose. Estas medicações não interferem na secreção de insulina, e diminuem a glicemia de jejum e a hiperglicemia pós-prandial que decorre da diminuição da primeira fase de secreção insulínica e não tanto da resistência à insulina, sendo usados para pacientes com diabetes do tipo I, evitando com que os mesmo apresentem sintomas mais graves da doença como infecções severas entre outros distúrbios (KATZUNG, 2006).

As lípases são as principais enzimas lipolíticas sintetizadas e secretadas pelo pâncreas (CURIEL, 2011), classificadas como hidrolases, atuam sobre a ligação éster presente triacilgliceróis, liberando glicerol na forma de β -monoacilglicerol e ácidos graxos de cadeia longa saturada e poli-insaturada como produto lipolítico, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (JAEGER, 2001).

A inibição dessa enzima provoca uma menor absorção de gordura no nível intestinal, o que leva a uma perda de peso gradual, o que no caso dos pacientes diabético que possuem obesidade, faz com que diminua a resistência à insulina, diminuindo assim a suscetibilidade de pacientes acometidos pelo diabetes de desenvolverem infecções (CHAN JM).

As α -amilases são enzimas hidrolíticas que quebram o amido em maltose. No corpo humano, as α -Amilases são originadas a partir de vários órgãos: a amilase pancreática é produzida pelo pâncreas e liberada no trato intestinal, a amilase salivar é sintetizada nas glândulas salivares e secretada na saliva. A amilase presente no sangue é eliminada através do rim e excretada na urina (ALVAREZ-MACARIE, 2002).

Os inibidores dessa enzima reagem com a α -amilase e bloqueiam sua ação sobre as moléculas de amido. Isto impede a transformação das cadeias de carboidrato em glicose, impossibilitando a absorção intestinal deste componente altamente calórico o que leva a uma perda de peso gradual, em pacientes diabético que possuem obesidade, faz com que diminua a resistência à insulina, controlando o diabetes evitando o agravamento da doença caracterizado principalmente pelo aparecimento de infecções (HALPEM e MANCINI, 2000).

3.4 Contribuição dos produtos de origem vegetal para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticoides e pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (Balunas e Kinghorn, 2005).

Os efeitos terapêuticos e colaterais dos AINES resultam principalmente da inibição da enzima COX, reduzindo assim, a síntese das PG e diminuindo a intensidade do processo inflamatório. De acordo com as funções fisiológicas das isoformas da COX, postulou-se que AINES inibidores específicos da COX-2 impediriam o processo inflamatório sem causar os efeitos colaterais gástricos resultantes da inibição da COX-1. Em geral, os AINES inibem de forma variável as duas isoformas da COX em suas dosagens terapêuticas. Eles também antagonizam os receptores de PG, reduzem a permeabilidade capilar, diminuindo o edema e vermelhidão, e inibem a liberação de PGE1 o que leva a redução do estado febril (RANG&DALE, 2001).

Os glicocorticóides interagem com receptores intracelulares; os complexos esteróides-receptor resultantes formam dímeros (pares) que em seguida, interagem com o DNA, com isso, modificam a transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas, como a lipocortina-1 que é importante na retroalimentação e como anti-inflamatório, pois inibe a fosfolipase A2 que é a responsável pela degradação dos fosfolipídeos da membrana celular com formação de ácido arquidônico que é o substrato das ciclo-oxigenases na formação dos eicosanóides: quimiotaxinas, lipoxinas, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos. Além disso, inibe a síntese de outras substâncias tais como a COX-2, fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1, interleucina-4, as citocinas e óxido nítrico (KATZUNG, 2006).

A busca por novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente, ou então serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos. Substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se terpenos, taninos, alcalóides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonóides (SIMOES, 2006). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2005).

Um exemplo recente é o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Produto oriundo de pesquisa 100% nacional é encontrado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno α -humuleno (BULA ACHEFLAN – MEDICINANET)

Um outro exemplo é o Daflon 500 mg®, medicamento composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina. Apresenta ação venotônica e vasoprotetora (BULA DAFLON – MEDICINANET).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da matéria-prima vegetal

Casca do caule da espécie *Brysonima Incarnata* foi coletado na Reserva Florestal Adolfo Ducke, em Manaus, Amazonas. A espécie foi taxonomicamente identificada por botânicos do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e o depósito da exsicata está sendo providenciado na Universidade Federal de Goiás, onde há uma parceria para a realização de um estudo botânico da espécie. Após a coleta, as cascas foram levadas à estufa com circulação de ar em temperatura de 40-60 °C, por 3 dias. Em seguida as cascas foram limpas, retirando-se uma camada externa que continha impurezas. Devido à espessura e comprimento das cascas dificultarem a moagem direta, elas foram e então pulverizadas em moinhos de facas e o pó com rendimento de 1,744 kg foi conservado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até a extração.

4.2. Prospecção fitoquímica

Para a realização da prospecção fitoquímica, utilizou-se 20 g do pó da casca do caule de *B. incarnata* do qual foi preparada uma solução extrativa hidroetanólica e uma solução extrativa aquosa. A partir da solução hidroetanólica realizou-se a prospecção para alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, cumarinas, antraquinonas, esteróis e triterpenos. A partir da solução aquosa realizou-se prospecção de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogénicos, flavonoides, gomas, taninos, mucilagens, aminogrupos, ácidos voláteis e ácidos fixos. As metodologias utilizadas para a detecção dos metabólitos foram realizadas segundo as metodologias de Matos (1997) e Costa (2001).

4.3. Obtenção dos Extratos Brutos

No processo de extração, aproximadamente 832,6457g o pó foi dividido em 2 erlenmeyers de 2,0 litros cada. A maceração exaustiva foi realizada com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, em ciclos de 15 minutos de agitação em ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique®), que é um aparelho que utiliza a energia de ondas sonoras que são

transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano e estas ondas criam uma vibração que causa uma variação na pressão no líquido gerando a cavitação e permitir o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida devido à turbulência e aos micromovimentos simultâneos (DA LUZ, 1998) para otimização do tempo de maceração.

Os extratos orgânicos foram filtrados utilizando, papel de filtro e um funil de vidro para separação dos componentes sólido-líquido. O líquido separado do sólido foi identificado como extrato do macerado, esse processo foi repetido 6 vezes utilizando hexano e acetato de etila e 8 vezes utilizando metanol. Ao todo, foram utilizados 3,0 litros de cada solvente.

Após o processo de filtração os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) na temperatura de 45° C, pressão de 500 mmHg e na rotação de 180 rpm, para eliminar o excesso de solvente e o volume residual do solvente após esse processo os extratos foram evaporados em capela de exaustão, em temperatura ambiente. Os extratos assim obtidos tiveram rendimento de 6,9234g, 3,6346 g e 7,9232g, respectivamente. Os extratos secos foram guardados em recipientes de massa conhecida, em temperatura de mais ou menos 8 ± 2 °C na geladeira até sua utilização.

4.4. Partição do extrato metanólico

O extrato metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com hexano, onde 100,2316 g de extrato seco foi solubilizado em 1 litro de uma mistura de metanol e água destilada na proporção 1:1, e em seguida foi transferido para um balão de separação, e foi extraído quatro vezes com o volume de 500 mL de hexano. A fase residual foi denominada hidrometanólica. Os solventes foram eliminados em evaporação rotativa (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) na temperatura de 45° C, pressão de 15 500 mmHg e na rotação de 180 rpm.

4.6. Ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN de ^1H e Presat da amostra foi obtido a partir de 50 μL da amostra dissolvidos em 500 μL de CDCl_3 e em seguida analisado utilizando-se um espectrômetro de RMN de 11,7T.

4.7. Inibição da α -glucosidase in vitro

O método do teste de inibição da alfa-glucosidase baseia-se no princípio da interação entre a enzima e o reagente de cor (p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo), a qual resultará num cromógeno medido espectrofotometricamente (CARLOS et al, 2009).

O teste enzimático de inibição α -glucosidase in vitro foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 10 μL da enzima α - glucosidase obtida de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) a qual foi pré-incubada com 20 μL das amostras em diferentes concentrações durante 5 minutos a 25°C. Adicionou-se 40 μL de solução p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG) (1mM) em tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,8). A microplaca foi colocada em incubadora rotativa incubada a 37°C durante 30 minutos em. Após a incubação, adicionou-se 100 μL de solução 10% de bicarbonato de sódio e a absorbância foi lida a 405nm em um leitor de Elisa de multiplaca. Para o teste em branco foi utilizado somente o pNPG, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do pNPG. Utilizou-se a quercetina como controle positivo do teste (ANDRADE-CETTO, BECERRA-JIMÉNEZ e CÁRDENAS-VÁZQUES, 2008). A inibição da α -glucosidase foi calculada por meio da fórmula: $100 - (\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra} / \text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}) * 100$. E a concentração inibitória a 50 % (CI50) foi calculada através de um método gráfico, utilizando o software Origin®.

4.8. Inibição da lipase in vitro

O teste enzimático de inibição lipase in vitro foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 250 μL da enzima lipase pancreática (Sigma L3126) que foi incubada com 30 μL das amostras em diferentes concentrações durante 5 minutos a 37°C. Adicionou-se 20

μL de solução p-nitrofenil (pNP) em acetonitrila e etanol. Em seguida fez-se a primeira leitura (branco) da absorbância em leitor Elisa de microplaca. A reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos em incubadora rotativa. Após a incubação, a absorbância foi lida pela segunda vez a 405nm em um leitor de Elisa de microplaca.

Utilizou-se oliositate como controle positivo do teste. A inibição da lipase foi calculada por meio da fórmula: $100 - (\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra} / \text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}) * 100$. E a concentração inibitória a 50 % (CI50) se relevante seria calculada através de um método gráfico, utilizando o software Origin®.

4.9. Inibição da α -amilase in vitro

O teste enzimático de inibição α -amilase in vitro foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 100 μL da enzima α -amilase que foi incubada com 30 μL das amostras em diferentes concentrações durante 5 minutos a 37°C . Adicionou-se 170 μL de Amilase CNPG LIQUIFORM diluída na proporção de 1:10 no tampão tris 75 mM (pH 8,5). Em seguida fez-se a primeira leitura (branco) da absorbância em leitor Elisa de microplaca. A reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos em incubadora rotativa. Após a incubação, a absorbância foi lida a 405nm em um leitor de Elisa de microplaca.

Utilizou-se acarboxi como controle positivo do teste. A inibição da α -amilas foi calculada por meio da fórmula: $100 - (\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra} / \text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}) * 100$.

4.10. Cultivo e manutenção da cultura de células de macrófagos

Nesta análise foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774. Essa linhagem teve as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 U/mL de penicilina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Invitrogen) a 37°C em estufa a 5% de CO_2 . O LPS foi preparado como uma solução-estoque de 1 mg/mL em água esterilizada e armazenado a -20°C .

4.11. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue segundo NAKAYAMA et al. (1997). Neste ensaio foram utilizados macrófagos da linhagem J774. Os macrófagos foram cultivados na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os extratos e a alfa e beta-amirina, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$, obtidas por meio de diluição seriada. As células foram tratadas em triplicata para o período de tratamento de 24 horas. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) e controle negativo somente meio de cultura. Após o período de tratamento de 24 horas foi adicionado 10 μL de azul de tripano 0,4%. Após o tempo de metabolização da resazurina, que é de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência em um leitor de Elisa de multiplaca. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e Fb= (fluorescência da célula + meio + resazurina). A viabilidade foi calculada por meio da fórmula: % viabilidade = $(Ft \times 100) / Fb$.

4.12. Inibição da ativação de macrófagos por LPS

Os macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados na densidade 1×10^6 células/mL em placas de 96 poços seguindo-se adesão por 24 h a 37°C , em atmosfera com 5% de CO_2 . Após aderência, o meio foi retirado e adicionado meio de cultivo RPMI suplementado com 1% de SFB com volume de 100 μL /poço. As células foram estimuladas pela adição de lipopolissacarídeo - LPS (concentração final 1 $\mu\text{g/mL}$) e tratadas juntamente com os extratos e a alfa e beta-amirina nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata. Para o experimento controle as células foram cultivadas apenas com meio de cultivo. Em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas a 37°C , 5% de CO_2 , e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de NO.

4.13. Quantificação de nitrito

A produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, mais estáveis, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982). Para a determinação da produção de NO, 100 μ L do sobrenadante celular foi submetido a reação com igual volume do reagente de Griess. Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em H₃PO₄ (5%) e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H₃PO₄ (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram adicionados na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. Após o período de incubação de 10 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO₃ (15 μ M até 1000 μ M).

4.14. Análise estatística

Para análises estatísticas, foi utilizando o software GraphPad Prism® 6.0. Os resultados forma comparados por ANOVA, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia empregada, a prospecção fitoquímica das soluções extrativas da casca do caule *B. incarnata* analisadas sugeriram as presenças de antocianinas e antocianidinas, catequinas, taninos hidrolisáveis, flavonas, terpenos e saponinas. A sugestão da presença de flavonoides indica possíveis atividades biológicas, como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, dentre outras, o que lhe confere significativa importância farmacológica (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

O processo de extração por maceração acoplado ao ultrassom utilizando os solventes de polaridade crescente, hexano, acetato de etila e metanol obteve os seguintes rendimentos contidos na tabela 1.

Solventes	Massa do pó das cascas de <i>Byrsonima incarnata</i> (g)	Massa do extrato seco (g)	Rendimento (%)
Hexano	800,00g	6,9234	0,86
Acetato de Etila	800,00g	3,6346	0,45
Metanol	800,00g	7,9232	0,99

Tabela 1 – Rendimento dos extratos obtidos da casca do caule de *B. incarnata*.

Todos os extratos foram testados quanto à capacidade de inibição da enzima α -glucosidase, com inibição de $97,30 \pm 0,5$ % para o extrato hexano, $98,35 \pm 0,7$ % para o extrato acetato de etila e $98,37 \pm 0,3$ % para o extrato metanólico, o que se mostrou significativo ($p < 0,05$) em comparação com o controle positivo a quercetina, um flavonóide que já se tem conhecida a capacidade de inibição de várias enzimas (Quercetina 500mg - ABC Phamu), que apresentou inibição de $68,72 \pm 4,5$ %.

A inibição da α -glucosidase pode ser relacionada segundo a literatura, a presença de compostos fenólicos em extratos de plantas. Na prospecção fitoquímica notou-se que vários destes compostos estão presentes na espécie em estudo, os quais são facilmente extraíveis por metanol, o que pode explicar o fato do extrato metanólico ter sido mais ativo no teste. Devido à característica estrutural comum a todos os compostos fenólicos, que é a presença

de um anel aromático hidroxilado, eles são capazes de interagir com as proteínas causando complexação (PEREIRA et al., 2010).

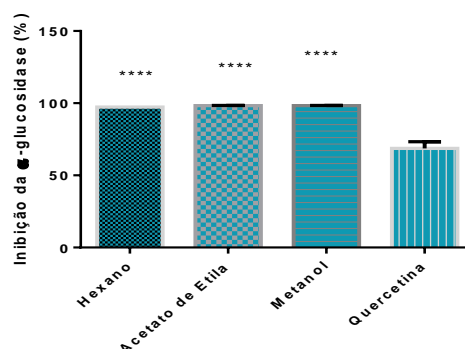


Figura 02 – Gráfico de inibição para α-glucosidase.

No teste para inibição de lipase, todos os extratos apresentaram inibição, $47,75 \pm 5,21$ % para o extrato hexano, $26,86 \pm 6,85$ % para o extrato acetato de etila e $32,49 \pm 2,30$ % para o extrato metanólico. Contudo, esse percentual de inibição não foi significativo comparado ao Orlistat® com $93,24 \pm 1,14$ %, um derivado hidrogenado da lipstatina sintetizado quimicamente e que age por inibição parcial da atividade das lipases gástrica, pancreática e carboxil-ester no trato gastrointestinal, reduzindo a hidrólise dos triglicérides ingeridos e impedindo a absorção de aproximadamente 30% da gordura dietária ingerida (CHAN JM).

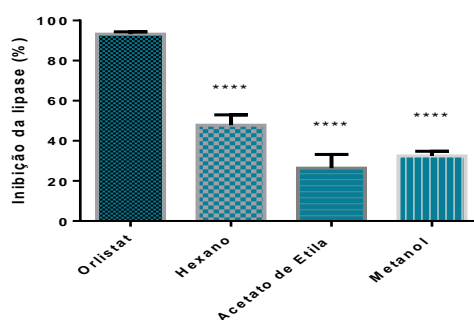


Figura 03 – Gráfico de inibição para lipase.

No teste para inibição de alfa-amilase, nem todos os extratos apresentaram inibição. O extrato hexano apresentou percentual de inibição de $3,08\% \pm 1,21$, o extrato acetato de etila $32,26 \pm 5,69$ e o extrato metanólico não foi capaz de inibir a enzima. A Arcabose (fármaco

hipoglicemiante, controle positivo) apresentou inibição de $50,13\% \pm 0,21$. Por meio dos dados observou-se que o extrato acetato de etila possuiu uma inibição mais expressiva comparados aos demais extratos, provavelmente devido a sua seletividade, pois esse solvente costuma extrair triterpenos, derivados fenólicos e isofenólicos (COSTA, 2001).

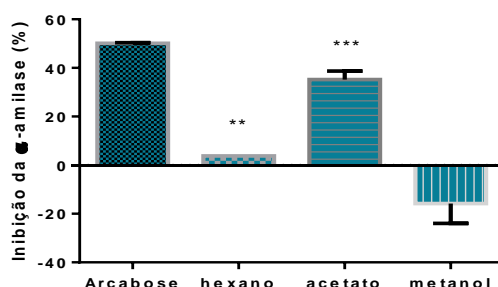


Figura 04 – Gráfico de inibição para α-amilase.

Como o extrato metanólico tem maior polaridade, espera-se que tenha uma gama maior de substâncias que a literatura já aponta como mais interessantes, compostos fenólicos por exemplo. Por esse motivo, o mesmo foi dissolvido em uma mistura hexano-metanol 1:1 e particionado com hexano, para tornar a mistura menos complexa e facilitar um possível isolamento, ficando na parte hexânica os compostos menos polares e na parte hidrometanólica os mais polares. Durante o procedimento de concentração da partição hexano, observou-se o aparecimento de precipitado de cor avermelhada, que foi separado por centrifugação, para poder ser analisado mais detalhadamente. O rendimento desse precipitado foi de 2,1687, que foi então enviado ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) para ser analisado por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), para identificar possíveis substâncias relacionadas às atividades apresentadas pelo extrato metanólico. O rendimento da fração hexano foi de 0,9865.



(A)

(B)

Figura 05 – Partição metanol:hexano em (A) e precipitado avermelhado em (B) .

No espectro de RMN do precipitado observaram-se possíveis hidrogênios alifáticos acíclicos com deslocamento químico de 0,6 – 1,289 ppm, podendo ser hidrogênios alifáticos beta dissustituídos, e pequena possibilidade de alquinos com deslocamento químico em 2,0 ppm, possíveis alifáticos alfa-monossustituídos com deslocamento químico em 3,316; 3,304; 3,307; 3,310; 3,313 ppm (Figura 6). No entanto, para refinar a elucidação estrutural, seriam necessárias outras análises espectroscópicas e cromatográficas, incluindo a medição do ponto de fusão das amostras que aparentemente possuem substâncias puras, pois o espectro sugere que a amostra apresenta substância de estrutura complexa ou ainda a mesma encontra-se em forma de mistura (SILVERSTEIN,2006).

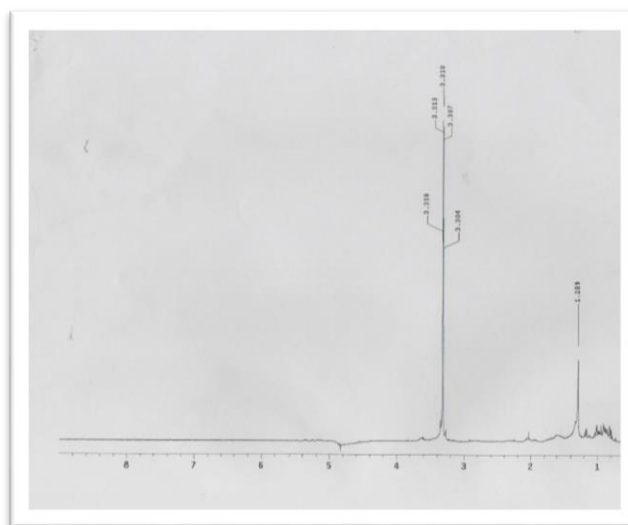


Figura 06 – espectro de RMN

No teste para avaliar a viabilidade de macrófagos frente às amostras, não foi observada citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, tornando possível a execução do teste de inibição da ativação de macrófagos por LPS.

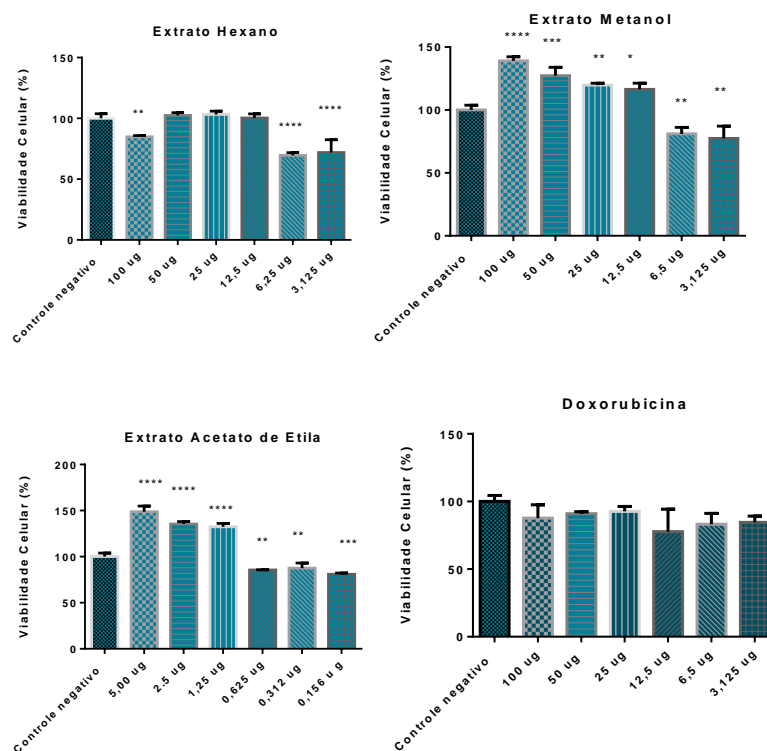


Figura 07 – Gráficos de viabilidade celular.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Atualmente, foi determinado que o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS) (RANG&DALE,2001). O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse

oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (KATZUNG, 2006).

De tal forma, foi feita a quantificação de nitrito para observar diminuição da produção de óxido nítrico por macrófagos, já que o nitrito é um produto da degradação do óxido nítrico no corpo humano. Foram aplicadas diferentes concentrações dos extratos e acetato de etila de *B. incarnata*. Este último apresentou maior inibição da produção de óxido nítrico na concentração de 50ug, $52,28 \pm 10,59$ %, enquanto que o extrato metanólico apresentou inibição de $47,24 \pm 3,96$ %. Essa melhor resposta anti-inflamatória do extrato acetato de etila pode ser explicada por suas características químicas já citadas neste relatório.

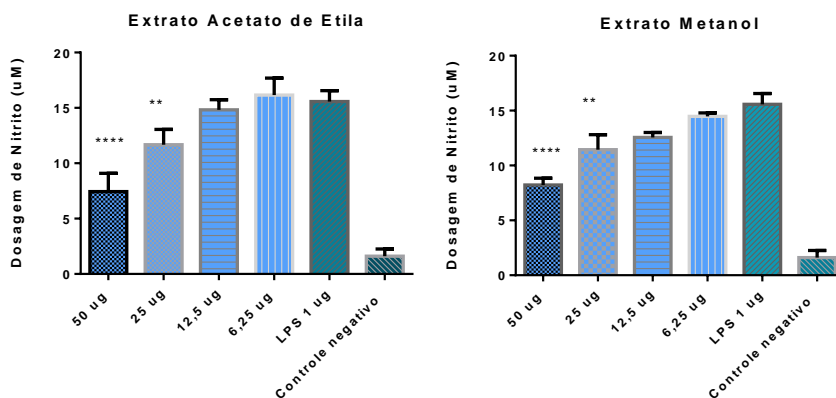


Figura 08 – Gráficos de atividade anti-inflamatória.

6. CONCLUSÃO

Por este trabalho foi possível demonstrar que a espécie *Byrsonima incarnata* pode ser considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas por apresentar excelente inibição da enzima α -glucosidase e também alguma capacidade de inibir a lipase pancreática e a α -amilase, e um bom resultado no teste de inibição da ativação de macrófagos, indício de atividade anti-inflamatória.

A partir dos estudos fitoquímicos, pode-se observar que esta espécie apresenta terpenos e flavonoides, o que é compatível com outras espécies do mesmo gênero, sendo esses os possíveis responsáveis pelo seu potencial anti-inflamatório e antidiabético. É válido destacar que este é o primeiro estudo com abordagem químico-farmacológica da espécie, que pode contribuir com os estudos para novos fármaco, fitoterápicos e/ou medicamento contra o Diabetes Mellitus e inflamações. Espera-se que este estudo possa incentivar outras pesquisas farmacológicas e fitoquímicas acerca desta espécie.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2013	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2014	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Coleta, identificação e preparação do material botânico	R	R										
3	Obtenção dos extratos orgânicos brutos			R	R								
4	Realização de testes de atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> para direcionamento do estudo fitoquímico							R	R	R	R		
5	Fracionamento dos extratos orgânicos por técnicas cromatográficas							R	R	R	R		
6	Identificação de substâncias							R	R	R	R		
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final											R	R
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso de Iniciação Científica												R

R – Atividades realizadas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-MACARIE, E.; Augier-Magro, V.; Guzzo, J.; Baratti, J.; *Biotechnol. Lett.* 1999, 21, 313
- BANDEIRA, F. et al. *Endocrinologia e diabetes*. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- BULA ACHEFLAN – <http://www.medicinanet.com.br/bula/246/acheflan.htm>
- BULA DAFLON – <http://www.medicinanet.com.br/bula/432/daflon.htm>
- CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. *Farmacologia Moderna*. 6 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005;
- CONSTANZO, L. S. *Fisiologia*. 2 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- CARDOSO, C. R. P.. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- CARLOS, E. C. L. et al.. Atividade inibitória dos extratos vegetais de *Cecropia purpurascens* sobre as enzimas α -glucosidase e a α -amilase. In: Reunião Anual da SBPC, Manaus. Anais de resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC. 2009.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia: Farmacognosia experimental*. 3. ed., v. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- CURIEL, A. A.. Caracterização do efeito inibitório de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* na atividade de lipase pancreática. 2011. 77f. Dissertação (Mestre em Ciência da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista.
- CHAN JM, Stampfer MJ, Ribb EB, Willett WC, Colditz GA. Obesity fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. **DIABETES CARE** 2000;17:961-9.
- EMANUELA F. et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J Nutr Metabol* 2012: 1-6, 2012.
- ESPINOZA-JIMÉNEZ A, PEÓN AN, TERRAZAS LI. Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. *Mediat Inflamm* 2012: 1-10, 2012.

FELDMAN M, MCMAHON AT. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? *Ann Intern Med.* 2000;132(2):134-43.

FELICIO JD, Gonçalves E, Braggio MM, Costantino L, Albasini A, Lins AP 1995. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Med* 61: 217-220.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12: 3117-32, 2011.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. *Farmacologia Clínica*. 3 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GILMAN, A. G. *As Bases farmacológicas da Terapêutica*. 10 edição. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005.

GOLAN, D. E. et al. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009;

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Status antioxidante, Diabetes Mellitus II e Aterosclerose. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 2, n. 1, p. 99-106, 2009.

GUILHON-SIMPLICIO, F., PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1032–41, 2011.

HALPEM, A.; MANCINI, M. C.. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 7, n. 2, 2000.

JAEGER, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53, 315.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia: Básica & Clínica*. 9 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006;

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

PEREIRA, L. L. S. et al.. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 4, 2010.

PEREIRA, L. L. S. et al.. Investigação da ação do extrato de lúpulo sobre as enzimas alfa amilase, alfa glicosidase, lipase e tripsina. In: XVIII Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2009, Lavras. XVIII Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2009.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 4 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001;

REIS, J. S. et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabólica*, v. 52, n.7, p. 1096-1105, 2008.

SILVERSTEIN, Robert M. (Robert Milton), 1916 – Identificação espectroscópica de compostos orgânicos; tradução Ricardo Bicca de Alencastro. – Rio de Janeiro LTC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, p.598, 2004.

SOUSA, G.. Uso de adoçantes e alimentos dietéticos por pessoas diabéticas. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Geral e Especializada) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, P. M.. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

YAMAGISHI, S. I. et al. Hyperglycemia potentiates collagen induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. Diabetes, v.6 n. 50, p. 1491-1494, 2001.

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