

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**MORFOANATOMIA, CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO
E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg.
(MYRTACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alexandre Ribas

Santa Maria, RS, Brasil.

2011

**MORFOANATOMIA, CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Blepharocalyx*
salicifolius (Kunth) O. Berg. (MYRTACEAE)**

Alexandre Ribas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MORFOANATOMIA, CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg.
(MYRTACEAE)**

elaborada por
Alexandre Ribas

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristiani Isabel Banderó Walker, Dr^a. (URI)

Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 23 de dezembro de 2011.

*“Não podemos voltar atrás e fazer um novo começo,
mas podemos recomeçar agora, e fazer um novo final.”*

Chico Xavier

À minha Grande Família

Agradecimentos

Ao Bondoso Criador do Universo, por nos ajudar a transformar derrotas aparentes em vitórias verdadeiras.

Aos meus pais, Flamarion (*in memoriam*) e Nadir, que desde cedo nos mostraram o caminho do bem e ensinaram através dos seus exemplos, como percorrê-lo.

Aos meus filhos, Sebastian, Lara e Guileine que amorosamente me incentivam a persistir sempre.

Aos meus irmãos Gisele, Christian, Gláucio, Christine, Lauren, Stephanie, Taciano, Saulo e Ariadne, pela torcida e apoio, principalmente nos momentos difíceis.

Aos sobrinhos e sobrinhas, cunhados e cunhadas pelo carinho.

Agradeço a minha orientadora, professora Melânia Manfron, que com imensa paciência e disciplina materna, permitiu que eu revolucionasse minha vida com novas oportunidades no campo do conhecimento.

Ao professor Gilberto pelos conselhos constantes, e dicas úteis pra vida toda.

À Vera a nossa mama do laboratório, obrigado pelos cuidados e paciência.

À Rosana, pela ajuda nos experimentos, pelas idéias na revisão e pelo apoio amigo.

Aos colegas do laboratório Vilmar, Cauriane, Camila Zanotto, Aline, Daiane, Raquel, Tiago, Camila Bugnotto, Júnior, Rachel, pelo companheirismo e ajuda durante toda esta jornada.

Ao Prof. Sidnei, ao Regis, à Débora Alves e demais alunos do laboratório.

Aos Profs. Rafael Noal Moresco, Sergio Dalmora e Gisele.

Ao Paulo da secretaria do PPG, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas das farmácias Capilé, em especial à pan 15, Kamila, Elisandra, Ilson, Renato, Elisângela, Cláudio, Júlio, Fernando, Fábio, Eron e Paola, pelo incentivo e compreensão.

Aos colegas da farmácia do Hospital da Brigada Militar de Santa Maria, Maj.Sendko, Patrícia, Dutra, Claudiomir, Márcio, Júnior, Cristiane, Letícia, Marli, Solange, Camila, Ângela, Hoffman, Noemi e Dias pela agradável convivência e pelas trocas de plantões.

À amiga Fabiana, pela grande ajuda na obtenção das amostras de Santa Maria.

Ao Sr. Carlos da Estação Experimental de Santa Maria que com muito empenho e boa vontade, possibilitou o acesso às amostras de Santa Maria para a pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação pela oportunidade de me qualificar.

A todos que colaboraram para que eu conseguisse chegar até o fim, sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

MORFOANATOMIA, CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (MYRTACEAE)

Autor: Alexandre Ribas
Orientadora: Melânia Palermo Manfron
Local e Data de Defesa: Santa Maria, 23 de Dezembro de 2011

A implantação do controle de qualidade nas diferentes etapas de desenvolvimento e produção, desde a coleta até o produto final é de vital importância para garantir a segurança e a qualidade dos produtos vegetais consumidos. A *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. é uma planta nativa no Brasil e popularmente utilizada como digestiva, estabilizante da pressão arterial, antitussígena e nos casos de bronquite, cistite e uretrite. No presente trabalho foi realizada análise morfoanatômica, testes físico-químicos, atividade anti-inflamatória e toxicidade hepática e renal de *B. salicifolius*. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória, foi utilizado o método de indução de formação de tecido granulomatoso em ratos. Além disso, foram determinados os níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina no sangue dos ratos provenientes do teste do granuloma. As folhas desta planta possuem epiderme uni estratificada, sem tricomas e apresentam inúmeras células mucilaginosas e estômatos do tipo anomocítico e anisocítico. O mesofilo é heterogêneo, simétrico, com parênquima paliçádico e idioblastos cristalíniferos com drusas. Os feixes vasculares são do tipo colateral e encontram-se protegidos por uma bainha vascular parenquimática. Estas características morfoanatômicas, quando analisadas em conjunto, contribuem no controle botânico de qualidade das folhas da *B. salicifolius* como insumo farmacêutico. Foram estabelecidos parâmetros de controle de qualidade do extrato das folhas de *B. salicifolius* através de testes farmacopéicos. Os resultados obtidos evidenciam a presença de compostos fenólicos, terpenos e esteroides. Os valores de polifenóis e flavonoides mostraram que 92,67% do extrato bruto é constituído de compostos fenólicos e que destes, cerca de um terço da amostra é constituída por flavonoides. O maior teor de flavonoides foi apresentado na fração acetato (35,49%). O extrato bruto e todas as frações apresentaram atividade antioxidante, sendo que as mais pronunciadas foram extrato bruto (91,34%) e frações acetato (86,33%) na concentração de 100 µg/mL. O poder antioxidante pode ser explicado pela presença de substâncias fenólicas, que são capazes de inibir os radicais livres. O grupo de animais tratados com nimesulida apresentou uma inibição do processo inflamatório de $21,4 \pm 6,5\%$, enquanto o grupo tratado com *B. salicifolius* demonstrou uma inibição do processo inflamatório de $24,7 \pm 4,6\%$, quando comparados ao controle negativo propilenoglicol 20% ($p < 0,05$). O extrato hidroetanólico da *B. Salicifolius*, administrado por via oral, não apresentou toxicidade hepática e renal em ratos quando comparados ao controle negativo.

Palavras-chave: *Blepharocalyx salicifolius*; Myrtaceae; atividade anti-inflamatória; controle botânico.

ABSTRACT

Mastership Dissertation
Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

MORPHOANATOMY, CHEMICAL PHYSICAL CONTROL AND ACTIVITY OF ANTI-INFLAMMATORY *Blepharocalyx Salicifolius* (KUNTH) O. BERG. (MYRTACEAE)

Author: Alexandre Ribas
Adviser: Melania Palermo Manfron
Place and Date of Defense: Santa Maria, Dec. 23th, 2011

The implantation of the quality control in the different stages of development and production, since the collection until the end item is of vital importance to guarantee the security and the consumed vegetal product quality. The *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth). the Berg. it is a native plant in Brazil and popularly used as digestive, stabilizer of the arterial pressure, antitussive and in the cases of bronchitis, cystitis and urethritis. In the present work morphoanatomy analysis was carried through, tests chemical-physical, anti-inflammatory activity and hepatic and renal toxicity of *B. salicifolius*. To evaluation of the anti-inflammatory activity, was used in the method of induction of granulation tissue formation in rats. Moreover, had been determined the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinina in the blood of the rats proceeding from the test of granuloma. The leaves of this plant possess epidermis unistratified, without trichomes and present numerous mucilage cells and stomata of the anomocytic and anisocítico type. The mesophyll is heterogeneous, symmetrical, with palisade parenchyma and idioblasts with cristaliníferos druses. The vascular bundles are of collateral type and are protected by a parenchymatous bundle sheath. These morphoanatomy characteristics, when analyzed in set, they contribute in the botanical control of quality of leaves of the *B. salicifolius* as pharmaceutical ingredient. Parameters were established quality control of the extract of leaves of *B. salicifolius* through pharmacopoeias tests. The results obtained demonstrate the presence of phenolic, terpenes and esteroides compounds. The values of polyphenols and flavonoids had shown that 92.67% of the crude extract are constituted of phenolic compounds and that of these, about one third of the sample are constituted by flavonoides. The highest content of flavonoids was presented in the fraction acetate (35.49%). The crude extract and all the fractions had presented antioxidant activity, being that sharpest they had been crude extract (91.34%) and fractions acetate (86.33%) in the 100 concentration of $\mu\text{g/mL}$. The antioxidant power can be explained by the phenolic substance presence that is capable to inhibit the free radicals. The group of animals treated with nimesulide presented a inhibition of the inflammatory process of $21,4 \pm 6.5\%$, while the group treated with *B. salicifolius* demonstrated a inhibition of the inflammatory process of $24,7 \pm 4.6\%$, when compared with the negative control propilenoglicol 20% ($p < 0,05$). The hydroethanolic extract of the *B. Salicifolius*, administered for a saw verbal, it did not present hepatic and renal toxicity in rats when compared with the negative control.

Keywords: *Blepharocalyx salicifolius*; Myrtaceae; anti-inflammatory activity; botanical control.

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg

FIGURA 1 – *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg..... 19

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

FIGURE 1 (A-C) - A *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf 1A. Adaxial side general aspect; 1B. Abaxial side general aspect; 1C. Detail of the leaf blade highlighting the spots referring to the secretory structures..... 50

FIGURE 2 (A-B) - Paradermal section of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf 2 A. Epidermal section of the adaxial side; 2B. Epidermal section of the abaxial side..... 51

FIGURE 3 - Transverse section of the middle part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 51

FIGURE 4 - Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 52

FIGURE 5 - Transverse section of the middle part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 52

FIGURE 6 - Transverse section of the distal part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 52

FIGURE 7 - Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 53

FIGURE 8 - Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf..... 54

3.2 Manuscrito 2

FIGURA 1 – Potencial antioxidante de *B. salicifolius* por DPPH..... 62

3.3 Manuscrito 3

FIGURA 1 – Atividade anti-inflamatória. Porcentagem de inibição da formação do tecido granulomatoso em ratos Wistar tratados com *B. Salicifolius* e nimesulida após 6 dias de administração por gavagem..... 73

LISTA DE TABELAS

3 MANUSCRITOS

3.2 Manuscrito 2

TABELA 1 -. Análises físico-químicas das folhas de *B. salicifolius*..... 60

TABELA 2 – Análise fitoquímica..... 61

TABELA 3- Determinação do teor de polifenóis e flavonoides nas folhas de *B. salicifolius*..... 62

TABELA 4 - Determinação da concentração eficiente (CE₅₀) por DPPH nas folhas de *B. salicifolius*..... 63

3.3 Manuscrito 3

TABELA 1 – Níveis sanguíneos de AST, ALT e creatinina em ratos Wistar..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AA – ácido araquidônico

AAS – ácido acetil salicílico

AINEs – anti-inflamatórios não-esteróides

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG – Angiosperm Phylogeny Group

AST – Aspartato aminotransferase

CCD – cromatografia em camada delgada

CCS – Centro de Ciências da Saúde

COX – ciclooxigenase

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

COX-3 – ciclooxigenase 3

DP – desvio padrão

EB – extrato bruto hidroalcoólico (70%), extrato etanólico (70%)

FARM. BRAS. – Farmacopéia Brasileira

g – grama

i.p. – intraperitoneal

ILs – interleucinas

Kg – kilograma

LOX – lipooxigenase

LTs – leucotrienos

MeOH – metanol

mg – miligrama

mL – mililitro

NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

NOS – enzima óxido nítrico sintase

iNOS – enzima óxido nítrico sintase indutível

OMS – Organização Mundial da Saúde

p/v – peso/volume

PGs – prostaglandinas

PLA₂ – fosfolipase A₂

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

TPA – 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato

TXs – tromboxanos

u – unidade

u/g – unidade/grama

UV – ultravioleta

v.o. – via oral

v/v – volume/volume

μ g – micrograma

μ g/mL – micrograma/mililitro

μ L – microlitro

μ m – micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Myrtaceae	17
2.1.1 <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth.) O. Berg.....	18
2.2 Controle de qualidade	21
2.3 Compostos fenólicos como antioxidantes	23
2.3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	23
2.4 Interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos	24
2.5 O processo inflamatório	25
2.5.1 Metabólitos do ácido araquidônico.....	27
2.5.2 Óxido Nítrico.....	28
2.5.3 Citocinas.....	28
2.5.4 Aminas Vasoativas.....	28
2.5.5 Fármacos anti-inflamatórios.....	28
2.6 Metabólitos secundários e atividades farmacológicas	31
2.7 Indução <i>in vivo</i> da formação de tecido granulomatoso	33
2.8 Parâmetros bioquímicos para avaliação hepática	34
2.9 Parâmetros bioquímicos para avaliação renal	34
3 MANUSCRITOS	36
3.1 Manuscrito 1 – Morpho-anatomy of leaves of <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth.) O. Berg. (Myrtaceae)	37
3.2 Manuscrito 2 – Caracterização físico-química e atividade antioxidante de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)	55

3.3 Manuscrito 3 – Avaliação da atividade anti-inflamatória e parâmetros bioquímicos de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)	66
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças que acometem a espécie humana remete à antiguidade (CALIXTO, 2001). Há milhares de anos que a humanidade tem buscado nas plantas, a cura para as mais variadas doenças, e por muito tempo, o único arsenal terapêutico disponível era de origem natural. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de plantas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JUNIOR et al., 2006). No início da década de 90, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimava entre 65 e 80% da população de nações em desenvolvimento dependiam exclusivamente de plantas medicinais para os cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Atualmente, mais de 13.000 espécies de plantas são utilizadas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitas das quais servem de modelo para a síntese de um grande número de fármacos. O mercado mundial de fitofármacos e fitoterápicos movimenta na ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano (SIMÕES et al., 2007).

O Brasil é o país com maior biodiversidade vegetal do mundo, possui mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 500.000 (DIAS, 1996). Baseada no conhecimento popular, a etnofarmacologia visa comprovar cientificamente, através de estudos químicos e farmacológicos, os efeitos terapêuticos atribuídos às plantas utilizadas na medicina tradicional (ELISABETSKY; SETZER, 1985). Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos da flora brasileira na segunda metade do século passado concentraram-se em plantas das regiões centro e norte do país, havendo poucos registros de plantas da região sul (MENTZ et al., 1997).

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias, lojas de produtos naturais e feiras livres. Em geral, estas preparações não possuem certificação de qualidade e às vezes prometem benefícios seguros, por se tratarem de fontes naturais. As supostas propriedades farmacológicas na maioria das vezes não possuem validade científica, por não terem comprovação em testes pré-clínicos ou clínicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005).

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 utilizados pelos silvícolas (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005). A

Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg, conhecida popularmente como murta, é uma planta utilizada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul (RS) em casos de tosses, bronquite, como digestivo, para regular a pressão arterial, em cistite e uretrite (MENTZ, 1997).

Para avaliar os usos populares da *B.salicifolius* e colaborar no controle botânico de qualidade de fitomedicamentos, este trabalho teve como objetivos, realizar a análise morfo-anatômica das folhas desta espécie, assim como avaliar o extrato da murta quanto à atividade anti-inflamatória e à toxicidade através de parâmetros bioquímicos, hepático e renal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Myrtaceae

A família Myrtaceae está inserida na ordem Myrtales, e compreende aproximadamente a 5600 espécies distribuídas em 132 gêneros (APG, 2003; SOUZA; LORENZI, 2005; GOVAERTS et al., 2008), sendo a quarta maior família no Brasil. É monofilética, apresentando o maior número de espécies da ordem Myrtales (GIULIETTI et al., 2005; JUDD et al., 2009). Ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, possui como centros de dispersão, as Américas e a Austrália (SCHULTZ, 1985; BARROSO, 1991). O Sudoeste da Ásia foi acrescentado mais recentemente, como um terceiro centro de dispersão para esta família.

A família é dividida em duas subfamílias, de acordo principalmente com a morfologia do fruto, a Leptospermoideae que apresenta frutos secos e folhas alternas ou opostas, com centro de dispersão a Oceania, e a Myrtoideae com frutos carnosos e folhas sempre opostas, distribuída principalmente na América do Sul (LEGRAND; KLEIN, 1978; BARROSO et al., 1991; SOBRAL, 2003).

Myrtaceae constitui uma das famílias de melhor representatividade no Brasil, ocorrendo 23 gêneros e 1000 espécies, frequentemente dominante em ambientes de Mata Atlântica (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

As mirtaceas são plantas lenhosas e arbustivas, com folhas inteiras de disposição alternada ou oposta e às vezes cruzada, sendo que uma característica marcante é a presença de estruturas secretoras, na epiderme foliar, de óleos voláteis que podem ser observadas a olho nu, como pontuações pequenas e translúcidas (METCALFE; CHALK, 1950; JOLY, 2002). É ressaltada sua elevada riqueza específica e importância fitossociológica para as florestas do sul e sudoeste do Brasil, principalmente, nos ambientes ripários (ROMAGNOLO; SOUZA, 2004). Espécies dos gêneros *Eugenia*, *Marlierea*, *Gomidesia* e *Myrcia* são muito comuns nas florestas, Atlântica e de Restinga, os gêneros *Psidium* e *Campomanesia* são importantes nas áreas abertas, especialmente nos cerrados (SOUZA; LORENZI, 2008). O gênero *Melaleuca*, de origem australiana, reúne as espécies denominadas mundialmente de *tea tree*, que apresentam um alto poder germicida, e também são utilizadas como repelentes de insetos.

Espécies de Myrtaceae que possuem importância econômica são cultivadas devido aos frutos comestíveis, com finalidade ornamental, extração de óleos voláteis, ou madeiras e pelas suas propriedades medicinais. Dentre as espécies cultivadas pelos frutos podemos citar *Blepharocalyx salicifolius* (murta), seus frutos são procurados por pássaros dispersores de sementes, *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), *Eugenia bracteata* Vell. (cerejeira), o *Syzygium malaccense* L. (jambo), *Psidium cattleianum* S. (araçá), além da *Plinia cauliflora* L. (jaboticaba) e *Camppomanesia phaea* (O. Berg) Landrum (cambuci), também utilizadas na fabricação de licores. Espécies de *Psidium* são utilizadas popularmente como anti-inflamatórias e analgésicas, como a *Psidium acutangulum* DC (araçá-pera), *Psidium cattleianum* Sabine (araçá-amarela), e no tratamento de disenterias e micoses (*Psidium guajava*). O *Syzygium cumini* (L) Skeels (jambolão) é utilizado como antidiabético. Na culinária são utilizados como condimentos o *Syzygium aromaticum* L. (cravo da Índia) e a *Pimenta officinalis* Lindl. Destacam-se várias espécies produtoras de madeira como a murta e o eucalipto. Como espécies ornamentais, merecem destaque *Myrtus communis* L., utilizadas na confecção de grinaldas e também algumas espécies de *Melaleuca* L., que são utilizadas na arborização urbana (MILES et al., 1990, 1991; BARROS et al., 1991; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; ALMEIDA, 1998; JUDD et al., 2002; VIEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2005). Através do metabolismo secundário, espécies desta família apresentam óleos voláteis do tipo mono e sesquiterpenos, proantocianinas, ácido gálico, ácido elágico, saponinas e raramente compostos cianogênicos, nas células dos tecidos parenquimatosos são encontrados cristais de oxalato de cálcio, de forma solitária ou agrupados (CRONQUIST, 1981).

2.1.1 *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg

O gênero *Blepharocalyx* é sul-americano com aproximadamente 30 espécies, possuindo formas híbridas ou formas ecológicas (LEGRAND; KLEIN, 1978). Já Denardi e Marchiori (2005), seguem o pensamento taxonômico predominante na atualidade, que reconhece apenas três espécies para o gênero e na flora sul-brasileira, apenas a espécie *B. salicifolius* a qual está bem definida.

A *B. salicifolius* (Figura 1) é uma planta nativa no Brasil (Goiás, Minas Gerais e Bahia ao Rio Grande do Sul), Equador, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina. É considerada uma

espécie secundária tardia ou clímax exigente de luz, perenifólia, higrófito, heliófito até esciófito, desenvolvendo-se nos mais variados ambientes ou estágios da vegetação, desde campos abertos até sub-bosques desenvolvidos. É frequente nas matas ciliares e nas submatas dos pinhais situados em solos úmidos (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2006). É uma das mirtáceas mais expressivas nas submatas dos pinhais, que se encontra em estágios mais desenvolvidos, estando associada com espécies como *Sloanea monosperma* (sapopema), *Ocotea porosa* (imbuia) e *Ocotea pulchella* (canela-lajeana). Ocorre naturalmente em litossolos, em solos de aclave suave e de drenagem bastante lenta (LEGRAND; KLEIN, 1978, CARVALHO, 2006).



Figura 1 - *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg
Fonte: Alexandre Ribas, 2011.

Esta planta é conhecida no Brasil por murta, cambui e maria-preta entre outros, é uma árvore que pode medir de 4 a 40 m, o tronco geralmente reto pode chegar a 40 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). A casca é espessa, marrom-escura, marcada por fissuras longitudinais, com espessura de até 20 mm. A copa é globosa ou irregular, com ramificação cimosa e finos ramos pendentes (MARCHIORI; SOBRAL, 1997; LORENZI, 2002; SILVA-JÚNIOR, 2005; CARVALHO, 2006).

A *B. salicifolius* é uma planta ornamental indicada para a arborização de espaços públicos, floresce no final da primavera ao início do verão e frutifica de março a maio. A madeira é empregada em obras internas de construção civil, e para lenha (REITZ, KLEIN; REIS, 1988; MARCHIORI; SOBRAL, 1997; LORENZI, 2002; SILVA-JÚNIOR, 2005; CARVALHO, 2006; MARQUES, 2007).

Parâmetros morfo-anatômicos de um determinado órgão vegetal de importância medicinal, como as folhas podem ser utilizados como um recurso no controle botânico de qualidade dos mesmos como insumos farmacêuticos. Este fato permite a autenticidade do material vegetal, possibilitando a diferenciação inclusive entre espécies botanicamente muito próximas. A identificação botânica das espécies de mirtáceas apresenta uma dificuldade intrínseca, que se deve a grande semelhança morfológica entre as mesmas (SCHULTZ, 1985; DI STASI, 1996; SOUZA; LORENZI, 2005).

A murta é utilizada tradicionalmente como digestiva, estabilizante da pressão arterial, como expectorante, nos casos de tosse e bronquite e em casos de cistite e uretrite (GALVANI; BARRENECHE, 1994; MENTZ, 1997). Em estudos fitoquímicos com extratos das folhas da *B. salicifolius*, foram detectados alguns constituintes: óleo volátil, flavonoides, triterpenos e taninos. O óleo volátil apresentou um rendimento de 0,17 %, constituído basicamente por 1,8-cineol (25,2%), β -cariofileno (22,9 %) e linalol (20,4 %), com atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas e para bactérias Gram-negativas (MATTOS, 1983; LAZZARI & HECKLER, 1996 LIMBERGER, 2001). Foi observada atividade citotóxica para a murta, frente à linhagem SF-268 de células cancerígenas do sistema nervoso (CALDERON et al., 2006). Siqueira et al. (2011) isolaram e testaram cinco compostos contra agentes patogênicos da leishmaniose, paracoccidiodomicose e, adicionalmente, contra linhas de células humanas de câncer.

2.2 Controle de qualidade

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, sendo que pelo menos a metade das espécies vegetais pode apresentar alguma propriedade terapêutica útil à população. As dificuldades no uso de plantas medicinais iniciam-se na identificação da espécie vegetal, o que exige frequentemente, a atuação de um especialista. O cultivo, a coleta e os métodos de secagem das plantas dificilmente são padronizados. A comercialização de espécies medicinais é realizada por farmácias homeopáticas, de manipulação e lojas de produtos naturais adquiridas de distribuidores, “mateiros” ou “raizeiros”, que de forma livre, muitas vezes promovem trocas ou substituições. Grande parte das drogas vegetais brasileiras utilizadas na fitoterapia, não têm descrições morfo-anatômicas, o que torna a diagnose uma tarefa complexa. (MARTINS et al., 1994; VIEIRA, et al., 2000; DE LA CRUZ, 2008). Os processos de adulteração e falsificação de drogas vegetais são procedimentos comuns daqueles que buscam lucro excessivo contribuindo para a má qualidade dos fitoterápicos e prejuízos para a saúde pública (OLIVEIRA et al., 1996.)

O consumo de drogas vegetais é um problema de Saúde Pública, quando do acesso a produtos sem condições adequadas, pois o potencial de contaminação microbiana dos produtos fitoterápicos produzidos é enorme. Há necessidade de controle de qualidade, sejam nas indústrias, farmácias ou empresas distribuidoras, para garantir a eficácia e segurança desses produtos (BUGNO, 2005; GIL, 2007). As etapas do processo de qualidade vão desde a coleta até a análise do produto final, com ensaios de qualidades de matérias-primas vegetais, a análise organoléptica, a autenticidade por meio da identificação botânica, reações químicas de caracterização, a presença de elementos estranhos à droga, determinação do teor de cinzas e teor de umidade (SIMÕES et al., 2007). Um dos problemas relacionados à contaminação dos produtos refere-se às condições inadequadas de armazenamento durante a comercialização, expondo o material vegetal a poeira, calor, umidade, insetos, roedores e microrganismos (AMARAL, et al. 2001).

A qualidade das matérias-primas vegetais não garante, por si, a eficácia, a segurança e a qualidade do produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde, como por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microrganismos e seus produtos metabólicos, produtos de

degradação, entre outros (FARIAS, 2007).

A humanidade na sua busca desenfreada por substâncias que curem, aliviem, embelezem e sirvam como novo nicho comercial retoma em larga escala, o consumo de plantas medicinais. Apesar das conquistas realizadas pela farmacologia moderna, com o desenvolvimento de fármacos que aliviam os males causados por doenças que há séculos afligem a raça humana, como a hanseníase, sífilis, tuberculose e o câncer, assim como para as endemias do mundo moderno, como as cardiopatias, a depressão e a AIDS, a maioria das pessoas não tem acesso aos medicamentos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), apesar dos avanços alcançados nos últimos trinta anos, relacionados às políticas públicas, grande parte da população mundial não tem acesso regular a serviços convencionais de assistência e a medicamentos essenciais (OMS, 2008). Os povos mais pobres utilizam as drogas vegetais como medicamento, por tradição e na ausência de alternativas econômicas viáveis, enquanto que nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelos modismos de consumo de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR, 2008).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantém a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002).

Na Alemanha, país que consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa, a automedicação com plantas é a terapia alternativa mais comum da população, apesar de 70% dos médicos em clínica geral prescreverem as centenas de ervas registradas e uma parte significativa destas ser paga pelo seguro de saúde (BLUMENTAHL, 1998).

Várias plantas medicinais que são utilizadas em rituais religiosos possuem estudos científicos que comprovam suas propriedades farmacológicas e dão sentido às utilizações ritualísticas. A arruda (*Ruta graveolens*) é empregada em banhos rituais de “proteção em casos de amor”. Estudos recentes mostraram que um de seus constituintes, a metilnonilcetona, excita a motilidade uterina, apresentando atividade abortiva. A *Melissa officinalis* (erva-cidreira), utilizada em banhos de descarrego e alívio, devido aos efeitos analgésicos, tranquilizantes, diminuição da insônia e da ansiedade. A *Erythrina verna* (mulungu), utilizado em rituais fúnebres, apresenta efeitos sedativos, podendo causar entorpecimento e bradicardia (CAMARGO, 1998; CORRÊA et al., 1998; FARELLI, 2000, VEIGA-JUNIOR, 2008).

2.3 Compostos fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos de plantas têm sido estudados nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase *in vitro*. Enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; NACZK; SHAHIDI 2004; CHUN et al., 2005).

2.3.1 Avaliação *in vitro* de atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e mais eficaz é a sua atividade antioxidante.

2.4 Interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos

O consumo indiscriminado de plantas medicinais deve-se ao seu fácil acesso, a crença de que drogas vegetais são mais seguras e menos onerosas que fármacos sintéticos. A falta de conhecimento prévio da real atividade terapêutica destas plantas e das possíveis interações com fármacos pode, muitas vezes, interferir no tratamento com medicamentos tradicionais. A forma de utilização de drogas vegetais é importante para garantir a presença do princípio ativo e a não toxicidade (ELDIN; DUNFORD, 2001; ABEBE, 2002; BHATTARAM, 2002; IOANNIDES, 2002).

Drogas vegetais, não devem ser utilizadas por gestantes, lactantes e crianças menores de três anos de idade, quando não existem estudos que mostrem a segurança de uso nessas situações, bem como medicamentos fitoterápicos que não têm estudos para estes pacientes. Para a espécie *Zingiber officinalis* (gengibre) há evidências clínicas que confirmam seu uso na gravidez em casos de cinetose sem dano à saúde (ALI et al., 2007; HICKOK et al., 2007; ALI et al. 2008; ABASCAL et al., 2009). O uso de medicamentos e plantas pode causar alterações farmacológicas e/ou toxicológicas, podendo levar à ampliação ou redução do efeito esperado do fármaco devido ao sinergismo/antagonismo, ou alterações nos processos de absorção e disposição do fármaco no organismo, gerando perfis de concentração plasmáticos alterados (FUGH-BERMAN, 2000). Estudos vêm sendo realizados analisando a potencialização dos efeitos de drogas vegetais. O efeito diurético do *Taraxacum officinale* (dente-de-leão), a atividade antidepressiva do *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João), os efeitos hipnóticos e ansiolíticos da *Passiflora incarnata* (maracujá) (NEWALL et al., 1996; PISCITELLI, 2002; CORDEIRO et al., 2005). Através de estudos pré-clínicos e clínicos, foi constatado que produtos que contêm *Valeriana officinalis* e *Allium sativum* L., interagem com benzodiazepínicos e relaxantes musculares, hipoglicemiantes, anticoagulantes orais e principalmente, antirretrovirais inibidores de protease, como os medicamentos que compõem o coquetel anti-HIV, como o saquinavir e o indinavir (ALEXANDRE et al., 2008).

Como várias outras drogas vegetais podem interferir com a ação terapêutica de diversos medicamentos sintéticos, o paciente deve ser orientado. Temos alguns exemplos de drogas vegetais que não devem ser associadas com medicamentos ou outras drogas vegetais como *Aesculus hippocastanum* (castanha da índia) e a *Curcuma longa* (cúrcuma), não devem ser utilizadas por pacientes que utilizam anticoagulantes (TIFFANY et al., 2002; PATEL et al., 2008); *Anacardium occidentale* (cajuero) pode apresentar interações com anti-inflamatórios anticoagulantes, e corticosteroides (OLAJIDE et al., 2004); *Baccharis trimera*

(carqueja), deve ser evitada com medicamentos para hipertensão e diabetes (OLIVEIRA et al., 2005; ABAD et al., 2007;); *Paullinia cupana* (guaraná), não deve ser associado a outras drogas vegetais com bases xânticas e com anti-hipertensivos (SCOTT et al., 2002); *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* (maracujá) apresenta interações com medicamentos sedativos e depressores do sistema nervoso central (TRES, 2006; VARGAS et al., 2007); *Uncaria tomentosa* (unha de gato), deve ser evitada com imunossupressores (NOWACK, 2008); *Plectranthus barbatus* (boldo), não pode ser associado a metronidazol ou dissulfiram (LEHÁR et al., 2009). *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Curcuma longa* devem ser evitadas por pessoas com úlcera gástrica ou duodenal ou com oclusão das vias biliares (BAGGIO et al., 2002; CHATTOPADHYAY et al., 2004); *Citrus aurantium* (laranja amarga), é contraindicada para pessoas com distúrbios cardíacos (PENZAK, 2001); *Ageratum conyzoides* (mentrasto) não deve ser usado por enfermos com problemas hepáticos (MOURA et al., 2005); *Cynara scolymus* (alcachofra), que não deve ser usada por indivíduos com doenças da vesícula biliar e cujo uso deve ser monitorado em casos de hepatite grave, falência hepática e câncer hepático (ESPINOSA, 2003). *Senna alexandrina* (sene) causa diminuição do tempo do trânsito intestinal e poderá reduzir a absorção de fármacos administrados por via oral; aumento da perda de potássio e poderá potencializar os efeitos de glicosídeos cardiotônicos (digitalis e estrofanço) (OMS, 2002; BRASIL, 2008).

2.5 O processo inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta do organismo frente a um processo infeccioso, a um antígeno ou a uma lesão celular ou tecidual, de caráter benéfico, com o propósito de erradicar o agente agressor e promover a reparação tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório está envolvido em diversas patologias, tais como contusões, tendinites, infecções respiratórias, asma, câncer, aterosclerose, artrite reumatoide, e doenças autoimunes (diabetes mellitus tipo I, doença de Chron, psoríase), obesidade e doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e esclerose múltipla entre outras. É um mecanismo de defesa do organismo, cujo objetivo é a eliminação da causa inicial da lesão celular, provocada por patógenos ou por ação de agentes físicos (COTRAN et al., 2000).

A fase aguda do processo inflamatório se caracteriza por febre, dor e edema, e na fase crônica, ocorre a proliferação celular (SÜLEYMAN et al., 2004).

Os sinais cardinais são sinais clínicos característicos do processo inflamatório, foi Cornelius Celsius, a mais de 2.000 anos atrás, quem inicialmente os descreveu discriminando calor, rubor, edema e dor; o quinto sinal, a perda da função, foi descrito posteriormente, os quais refletem as mudanças vasculares e celulares que ocorrem durante a inflamação (TROWBRIDGE; EMLING, 1997; ROCK; KONO, 2008).

A resposta inflamatória inicial é inespecífica, independente do tipo da agressão e uma resposta imune específica. As reações inatas no interior dos tecidos se dividem em eventos vasculares e em eventos celulares. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por alterações no calibre vascular, que provocam um aumento no fluxo sanguíneo e por alterações na permeabilidade vascular, conduzindo ao extravasamento de exsudato para o interstício, com consequente formação de edema. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com exsudação são provocados por mediadores da inflamação como a histamina, metabólitos do ácido araquidônico, (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas, produzidos a partir do plasma e das células (COTRAN et al., 2000; RANG et al., 2007).

Nos eventos celulares, as células envolvidas são as endoteliais e macrófagos, presentes nos tecidos, ou têm acesso ao local a partir da circulação (ABBAS et al., 2008). Os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio vascular e transmigram para o tecido intersticial em direção ao local da lesão, sob sinalização de agentes quimiotáticos (citocinas e leucotrienos). Em seguida, os leucócitos fagocitam o agente agressor e degradam o tecido necrótico (COTRAN et al., 2000; ABBAS et al., 2008).

O processo inflamatório se caracteriza por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular regulado pela ação de vários mediadores liberados durante uma lesão tecidual. Esses mediadores que comandam o processo inflamatório são derivados de proteínas presentes no plasma ou produzidos e liberados por células endoteliais, leucócitos infiltrados no sítio inflamatório ou por células residentes (MEDZHITOV, 2008).

2.5.1 Metabólitos do ácido araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado com 20 carbonos presente, normalmente, esterificado nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. Os metabólitos do AA também são chamados de mediadores lipídicos, conhecidos genericamente como eicosanoides, compreendendo os prostanoídes, leucotrienos (LTs) e lipoxinas. Devido a estímulos mecânicos, físicos, químicos, ou através de outros mediadores, ocorre a ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que libera o AA dos fosfolipídios, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e o fosfatidilinositol, das membranas celulares (COTRAN et al., 2000). O AA livre é metabolizado pelas enzimas ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), iniciando a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos e pelas lipo-oxigenases, originando a biossíntese de leucotrienos e lipoxinas (COTRAN et al., 2000; BOTTING, 2006; RANG et al., 2007).

Os prostanoídes mais importantes na inflamação são: PGE₂, PGD₂, PGF₂α, PGI₂ e TXA₂. A prostaciclina possui ação vasodilatadora, potencializa os efeitos quimiotáticos e aumenta a permeabilidade de outros mediadores. As prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF₂α, são vasodilatadoras, aumentam o edema. As prostaglandinas também estão envolvidas na patogenia da dor e da febre durante a inflamação (COTRAN et al., 2000; SAUTEBIN, 2000).

A COX-1 é expressa em vários tecidos produzindo PGs em baixos níveis, contribuindo para a manutenção das funções fisiológicas. A COX-2 é conhecida como induzível, sua expressão altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, citocinas, e mitógenos (GERRITSEN, 1996; RAJAKARIAR et al., 2006; HARIZI et al., 2008).

O LTB₄ é o principal leucotrieno envolvido no processo inflamatório, exercendo potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os leucotrienos ativam as células da série branca, promovendo a degranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ (LC₄, LD₄ e LE₄) aumentam a permeabilidade vascular (COTRAN et al., 2000).

2.5.2 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, possui potente ação vasodilatadora, o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Atua também como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra microrganismos. É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Esta é induzida em macrófagos e em outras células durante o processo (COTRAN et al., 2000; SAUTEBIN, 2000).

2.5.3 Citocinas

As citocinas são polipeptídeos produzidos por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e linfócitos ativados, liberados durante as reações imunes e inflamatórias, de forma a regular a ação das células destes sistemas. Destacam-se as citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) e IL-1 (Interleucina-1), liberadas por macrófagos ativados e vários outros tipos celulares. Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio, aumentam a síntese de prostaciclina e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, dentre outras ações. As citocinas secundárias, como as quimiocinas, atraem e ativam as células inflamatórias móveis (COTRAN et al., 2000; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

2.5.4 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) são aminas com ação sobre a vasculatura, e se encontram armazenadas em grânulos citoplasmáticos. A histamina é uma amina vasoativa presente principalmente nos mastócitos, enquanto que a serotonina está presente principalmente nas plaquetas e nas células enterocromafins. Vários fatores induzem a liberação desses mediadores de suas fontes, incluindo trauma, frio, reações imunes, anafilatoxinas, substância P, citocinas (promovem liberação de histamina) e agregação plaquetária após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato, complexos imunes, PAF (promovem liberação de serotonina das plaquetas). A liberação localizada de histamina e sua ação principalmente nos receptores H₁ na microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular, promove também a síntese de prostaciclina

e induz a liberação de óxido nítrico pelo endotélio. O aumento da permeabilidade vascular ocorre por meio da contração das células endoteliais e subsequente formação de abertura das junções celulares endoteliais, resultando no extravasamento plasmático. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina promove vasodilatação dependente de óxido nítrico e aumento da permeabilidade vascular (KUMAR et al., 2005; JUTEL et al., 2009).

2.5.5 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).

A ação anti-inflamatória dos glicocorticoides é devida principalmente, à inibição da transcrição do gene da enzima ciclo-oxigenase-2 e à indução da proteína lipocortina, inibidora da enzima fosfolipase A₂. Também reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (KIM et al., 2004; RANG et al., 2007). São muito utilizados na terapia das doenças auto-imunes e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes.

Os glicocorticoides são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios, alérgicos, hematológicos, na terapia das doenças auto-imunes e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes, são substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias potentes, eficazes e amplamente utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos (PERRETTI; AHLUWALIA, 2000).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), constituem o principal grupo de fármacos utilizados no tratamento da inflamação devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antipirético e analgésico atribuídos à inibição das enzimas COX-1 e COX-2 e, inibição da síntese dos prostanoídes. São medicamentos utilizados para tratar processos inflamatórios como osteoartrite, artrite reumatoide, espondiloartropatias soronegativas (artrite psoriática), síndromes musculoesqueléticas, entorses, distensões, dor lombar e gota (MARNETT, 2009).

O AINE mais antigo é a Aspirina®, ácido acetilsalicílico (AAS), obtida originalmente das cascas do tronco do *Salix alba*, (salgueiro). O AAS é indicado, em baixas doses, na terapia antitrombótica por inibir de forma irreversível pelas plaquetas a síntese de TXA₄ (VIEGAS et al., 2006).

Porém, os AINEs não seletivos podem apresentar diversos efeitos colaterais, dentre

os quais o mais importante é a tendência a produzir ulceração gástrica e duodenal. Este efeito colateral pode ser explicado pela inibição da COX-1 no estômago resultando no bloqueio da biossíntese de importantes prostaglandinas (PGE_2 e PGI_2), que exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica. Pode ocorrer alteração na função renal quando usados por muito tempo em pessoas com predisposição, além de outros efeitos colaterais como asma induzida por AINEs, alteração no tempo de coagulação, hipersensibilidade (BOTTING, 2006; VIEGAS et al., 2006; RANG et al., 2007).

A descoberta de outra isoforma da COX (a COX-2) altamente expressa em locais inflamatórios e a noção de que os eicosanóides produzidos durante o processo inflamatório resultavam da expressão aumentada da COX-2, juntamente com a necessidade de se desenvolver medicamentos anti-inflamatórios com menos efeitos adversos gastrointestinais, foram introduzidos no mercado os inibidores seletivos para COX-2. Os inibidores seletivos de COX-2 também denominados coxibes foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese de PG pela enzima COX-2 em locais de inflamação sem, contudo, afetar a ação da isoenzima COX-1 constitutivamente ativa, encontrada no trato gastrointestinal, nos rins e plaquetas. Atualmente sabe-se que a COX-2 também é expressa constitutivamente e exerce papéis fisiológicos através da síntese de PGI_2 . Embora os fármacos que inibem seletivamente a COX-2, demonstrem uma melhor segurança gastrintestinal, alguns membros dessa classe foram retirados do mercado devido a um risco aumentado de eventos cardiovasculares. Assim como os AINEs tradicionais, os coxibes também exercem efeitos tóxicos renais e não são recomendados para pacientes com insuficiência renal grave. Além disso, em doses altas também são capazes de causar dano gastrointestinal (BRICKS & SILVA, 2005). Alguns medicamentos representantes dessa classe são Celecoxibe, Parecoxibe, Rofecoxibe, Etoricoxibe e Lumiracoxibe (KATZUNG, 2004; GOODMAN et al., 2006; RAINSFORD, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aumentou o controle sobre a venda dos AINEs seletivos para COX-2, estando estes na lista de substâncias sob controle especial (Lista C1 da Portaria 344/98) - Resolução RDC nº. 79, de 04 de novembro de 2008. Os quais só podem ser vendidos com a retenção da receita médica pelo estabelecimento farmacêutico (BRASIL, 2008).

Outros fármacos também mostram ser mais seletivos para COX-2 do que para COX-1, como por exemplo, nimesulida e etodolaco.

A nimesulida é um AINE da classe das sulfonilidas, considerado um fármaco inibidor mais seletivo para COX-2 do que para COX-1. É utilizada em inflamações do trato

respiratório, da cavidade oral, em tendinite, sinovite e artrite reumatoide e como um inibidor seletivo de COX, pode causar distúrbios gastrointestinais, intoxicação hepática e renal (TRAVERSA et al., 2003; WHITTLE, 2003).

2.6 Metabólitos secundários e atividades farmacológicas

A diversidade química das plantas faz com que sejam fonte de escolha para o isolamento de metabólitos farmacologicamente relevantes e que sirvam como protótipos para a síntese de novos fármacos (BASSO et al., 2005).

Newman e Cragg (2007) revisaram drogas aprovadas para o tratamento de inúmeras condições patológicas desde janeiro de 1981 até junho de 2006. Estes constataram que do total de 1.184 drogas, 30% são de origem totalmente sintética, 23% de compostos derivados de produtos naturais, 5% são compostos de ocorrência natural, 14% são oriundas de fontes biológicas, 4% vacinas, 4% são drogas sintetizadas a partir de compostos naturais e 20% são moléculas que mimetizam a estrutura química de compostos de ocorrência natural ou modeladas com base em inibidores naturais do alvo de interesse.

O fitoterápico Acheflan[®] é um medicamento indicado no tratamento local de processos inflamatórios. É encontrado nas formas farmacêuticas aerosol e creme, contendo 5,0 mg do óleo essencial de *Cordia verbenácea* (erva baleeira), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno alfa-humuleno. O Daflon[®] é um medicamento composto por diosmina e hesperidina que apresenta ação venotônica e vasoprotetora.

Várias substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Destacam-se os alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanas, taninos e terpenos de raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT et al., 2001; BASSO et al. 2005; VIEGAS et al., 2006).

Os taninos são polifenóis, de acordo com as suas estruturas são classificados em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis dividem-se em galhotaninos e elagitaninos. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias orgânicas como na diarreia, hemorragias, hipertensão arterial, problemas estomacais e renais, e em processos inflamatórios (SIMÕES et al., 2007). Os elagitaninos e proantocianidinas encontrados nas cascas de *Anacardium occidentale*, atuam

como anti-inflamatórios, bloqueando a hialuronidase ativada e/ou a degranulação de mastócitos em ratos (SCHOLZ, 1994).

As saponinas apresentam atividade anti-inflamatória, hemolítica, antimicrobiana e antiviral. Plantas que contém saponinas como *Aesculum hippocastanum* L. (castanheira da índia) e *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz) possuem atividade anti-inflamatória, que são conhecidas a bastante tempo (SCHENKEL et al., 2007).

A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização (TAHARA, 2007).

Os flavonoides são polifenóis que possuem atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória. A ação anti-inflamatória destes, se dá através da modulação das células envolvidas com a inflamação (inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, e a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (HAVSTEEN, 2002; MIDDLETON et al., 2002; KIM et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2008; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

Dentre os 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 são derivados ou baseados em polifenóis de origem natural (YOON E BAEK, 2005).

Aos flavonoides apigenina, luteolina, miricetina e genisteína é atribuída a capacidade de diminuir a produção de NO e a expressão da enzima iNOS. A morina e a miricetina inibem a enzima lipo-oxigenase e outros como crisina, apigenina, luteolina, morina, rutina e galangina inibem ciclo-oxigenase (SANTANGELO et al., 2007; CAZAROLLI et al., 2008). Os flavonóis quercetina e kaempferol, que são encontrados em praticamente todo reino vegetal, apresentam significativa ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída à inibição das enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂) lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS (KIM et al., 2004; O'LEARY et al., 2004; YOON E BAEK, 2005; SANTANGELO et al., 2007).

Os flavonoides genisteína, quercetina, luteolina, apigenina e rutina são capazes de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1). A miricetina e as flavanonas hesperetina e naringenina inibem a enzima fosfolipase A₂ (KIM et al., 2004; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; CAZAROLLI et al., 2008).

Nepetina e jaceosidina, flavonas de *Eupatorium arnottianum* Griseb. (Asteraceae), apresentaram atividade de redução de edema induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-

acetato (TPA). A nepetina reduziu em 46,9% a e jaceosidina em 23,2% na dose usada. Estes flavonóides inibiram em 91 e 77% respectivamente, a indução de fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), fator de transcrição que regula a resposta imune frente a um processo inflamatório (CLAVIN et al., 2007).

Os flavonoides isoquercitrina e quercetina apresentaram atividade anti-inflamatória em modelo de asma induzida em camundongos, reduzindo o recrutamento de eosinófilos e a formação de leucotrienos indutores de broncoconstrição (CAZAROLLI et al., 2008).

Novos estudos relacionando a estrutura-atividade de flavonoides na busca de novos medicamentos anti-inflamatórios e que sirvam para identificar os grupos funcionais responsáveis pela ação farmacológica, possibilitam a compreensão da interação do flavonoide com o receptor, permitindo o aperfeiçoamento da molécula original para uma melhor atividade (THEOHARIDES et al., 2001; LÄTTIG et al., 2007).

2.7 Indução *in vivo* da formação de tecido granulomatoso

A inflamação granulomatosa é um tipo de reação inflamatória crônica que se caracteriza pelo acúmulo de células epitelioides e macrófagos ativados. Os granulomas podem ser de dois tipos: imunes e de corpo estranho. Macroscopicamente o granuloma assemelha-se a grãos (nódulos pálidos), e microscopicamente são coleções organizadas de macrófagos ativados, com transformação em células epitelioides, e circundados por colar de linfócitos, ou ocasionalmente plasmócitos. As células epitelioides podem coalescer, dando origem à células gigantes multinucleadas (ROBBINS et al., 2001).

A formação do granuloma experimentalmente desenvolvido, através do implante subcutâneo de *pellets* de algodão em ratos é um método utilizado para avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios, o qual possui uma reprodutibilidade confiável devido à capacidade de interferência do cilindro implantado com os componentes proliferativos do processo inflamatório (BAILEY et al., 1982). O granuloma formado no local do implante do *pellet* de algodão se caracteriza pela formação de uma cápsula fibrosa, vascularizada contendo fibroblastos e com infiltração de células polimorfonucleares. Quanto menor for a cápsula fibrosa, maior será a atividade anti-inflamatória da substância testada (LE BARS et al., 2001).

2.8 Parâmetros bioquímicos para avaliação hepática

São necessários estudos biológicos para avaliar a toxicidade das plantas medicinais para permitir que sejam utilizadas de forma segura. As transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando a AST no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e a ALT no fígado, rim e coração. A ALT está presente no citosol e a AST na mitocôndria dos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999). As lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas enzimas para a circulação. No dano celular leve, a forma predominante no soro é citoplasmática, em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT, diferença essa que auxilia no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas (MOTTA, 2003).

2.9 Parâmetros bioquímicos para avaliação renal

Um dos efeitos da insuficiência renal é a alta concentração de nitrogênio não proteico no sangue, como a ureia e a creatinina, devido à incapacidade do organismo de excretar os produtos metabólicos finais das proteínas. A concentração desses nitrogênios não proteicos, em particular a ureia, pode aumentar até 10 vezes o valor normal durante a 1^a a 2^a semanas de insuficiência renal. Porém, a ureia não é tão específica como a creatinina, e isoladamente, não é determinante para a avaliação da função renal (GUYTON; HALL, 2002).

A creatinina é sintetizada no fígado, rim e pâncreas e transportada para as células musculares, onde é fosforilada a creatina-fosfato, que atua como reservatório de energia. A creatina-fosfato e a creatina, em condições fisiológicas, perdem o ácido fosfórico ou água, para formar seu anidrido, a creatinina. A creatinina difunde do músculo para o plasma de onde é removida quase inteiramente e em velocidade constante por filtração glomerular. A quantidade excretada diariamente é proporcional à massa muscular e não é afetada pela dieta, idade, sexo ou exercício. A sua produção não é influenciada pelo metabolismo proteico ou outros fatores externos. A concentração de creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal. Os teores de creatinina sérica são mais sensíveis e específicos do que a medida de concentração plasmática da ureia, no estudo da velocidade de filtração glomerular reduzida (RAVEL, 1997; MOTTA, 2003).

A depuração da creatinina tem uma vantagem sobre a da ureia, em virtude da taxa de produção de creatinina ser mais constante do que a ureia. Como o valor sérico faz parte da fórmula de depuração, a ocorrência de menor flutuação no nível sérico permite colheitas de urina a intervalos maiores, também fornecendo resultados mais reproduzíveis. Verificando-se uma menor alteração da excreção de creatinina do que de ureia (RAVEL, 1997).

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 Manuscrito 1

“Morpho-anatomy of leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. (Myrtaceae)”. Submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.

3.2 Manuscrito 2

“Caracterização físico-química e atividade antioxidante das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)”. A ser submetido.

3.3 Manuscrito 3

“Avaliação da atividade anti-inflamatória e parâmetros bioquímicos de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)”. A ser submetido.

3.1 Manuscrito 1

Morpho-anatomy of leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. (Myrtaceae).

Alexandre RIBAS¹, Gilberto D. ZANETTI², Melânia P. MANFRON¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé, Av. Aluizio da Silva Gomes, 50, Granja dos Cavaleiros, Macaé, RJ, CEP: 27930-560, Brasil.

RESUMO: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. é uma planta nativa no Brasil, Equador, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina. Esta planta é popularmente utilizada como digestivo, estabilizante da pressão arterial, antitussígena e nos casos de bronquite, cistite e uretrite. Neste trabalho foram determinados parâmetros morfo-anatômicos das folhas, por análise macro e microscópicas, com o objetivo de auxiliar a autenticidade das mesmas como insumo farmacêutico. As folhas desta planta exibem filotaxia oposta cruzada, são simples, inteiras, aromáticas e apresentam consistência cartácea com venação peninérvia, caracterizando o tipo broquidódromo. A epiderme é uniestratificada e apresenta inúmeras células mucilaginosas e estômatos do tipo anomocítico e anisocítico. Nas duas faces da epiderme foliar não foram observados tricomas. O mesofilo é heterogêneo e simétrico, com parênquima paliçádico disposto subjacente às duas faces epidérmicas e idioblastos cristalíniferos com drusas. Os feixes vasculares são do tipo colateral e encontram-se protegidos por uma bainha vascular parenquimática. Estas características morfoanatômicas, quando analisadas em conjunto, contribuem no controle botânico de qualidade das folhas de *B. salicifolius* como insumo farmacêutico.

Palavras-chave: *Blepharocalyx salicifolius*, farmacobotânica, morfoanatomia, Myrtaceae, murta.

ABSTRACT: The *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. is a plant native from Brazil, Equator, Bolivia, Paraguay, Uruguay e Argentina. This plant is commonly used as a digestive, blood pressure stabilizer, antitussive and for cases of bronchitis, cystitis and urethritis. In this work, the leaves morpho-anatomical parameters were determinate by macro and microscopic analysis, aiming to help in their authenticity as pharmaceutical material. The plant leaves have opposite cross phyllotaxy, they are simple, entire, aromatic and present chartaceous consistence with pinnate venation, thus charactering the brochidodromous type. The epidermis is uniseriate and shows many mucilage cells and, anomocytic and anisocytic type stomata. It was no observed trichomes in any of the epidermis sides. The mesophyll is heterogeneous and symmetric, with palisade parenchyma disposed subjacent to the two epidermic sides and, crystalliferous ideoblasts with druses. The vascular bundles are of collateral type and are protected by a parenchymatous vascular sheath. These morpho-anatomical characteristics when analyzed together contribute in the quality botanical control of *B. salicifolius* leaves as pharmaceutical material.

Keywords: *Blepharocalyx salicifolius*, pharmacobotany, morphoanatomy, Myrtaceae, murta.

INTRODUCTION

The Myrtaceae family comprises about 4000 species divided in 130 genres (Souza and Lorenzi, 2005; APG, 2003). This family, although occurring in all tropical and subtropical regions, has two dispersion centers, one in the Americas and the other in Australia (Barroso, 1991; Schultz, 1985). The mirtaceas are woody and shrub plants with whole leaves in alternate, opposite and sometimes cross disposition, one of its striking features is the presence of volatile oil secretory structures that may be observed with naked eye as small and translucent points in the leaf epidermis (Joly, 2002; Barroso et al., 1984; Metcalfe & Chalk, 1950).

Blepharocalyx salicifolius (Kunth.) O. Berg. is a native plant from Brazil (from the State of Goiás, Minas Gerais and Bahia to Rio Grande do Sul), Ecuador, Bolivia, Paraguay, Uruguay and Argentina (Lorenzi, 2002). This plant is a tree that can reach 40 m high, selective, hygrophilous and heliophilous and even shade tolerant. It occurs in mountain regions with moist and compacted soil, being at some locations the predominant species in forest formation (Lorenzi, 2002; Reitz, Klein and Reis, 1988). The *B. salicifolius* blooms in late spring to early summer and fruits from March to May (Marques, 2007; Reitz, Klein and Reis, 1988). It is an ornamental plant indicated to forest public spaces (Marchiori & Sobral, 1997), and its fruits are well accepted by birds. In the traditional medicine is used as digestive and as a blood pressure stabilizer (Mentz, 1997; Galvani & Barreneche, 1994). It is also indicated as pectoral (in cases of coughs and bronchitis) and, in cases of cystitis and urethritis.

In the *B. salicifolius* leaves it was detected the presence of volatile oil, flavonoids triterpenes and tannins (Lazzari & Heckler, 1996). The volatile oil showed an efficiency of 0,17 % and, it was basically constituted by 1,8-cineol (25,2%), β -caryophyllene (22,9 %) and linalool (20,4 %), (Mattos, 1983). This volatile oil demonstrated an antibacterial activity for both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Limberger, 2001) and, a cytotoxic activity against the SF-268 line of cancer cells of the nervous system (Calderon et al., 2006).

Morpho-anatomical parameters of a given plant organ with medicinal importance like the *B. salicifolius* leaves, may be used as a resource in its botanical control of quality as pharmaceutical raw material. This allows the authenticity of the plant material, making it possible to differ it even between species that are close botanically (Souza, 2005; Di Stasi, 1996). We have to highlight that the botanical identification of Myrtaceae species has an intrinsic difficulty due to the great morphological similarity between them (Schultz, 1985).

This work presents subsidies for the authenticity of *B. salicifolius* leaves, contributing in the formation of morpho-anatomical standards that may be used by the pharmaceutical industry.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining plant material

Blepharocalyx salicifolius (Kunth.) O. Berg. leaves were collected in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. A sample of the vegetal material was identified and stored at the Department of Biology Herbarium according to voucher specimen (exsiccate SMDB 11 822).

Morpho-anatomical analysis

The morphological analysis was performed using a binocular stereomicroscope and, taking Lorenzi (2007), Gattuso & Gatuso (1999) and Oliveira & Akisue (1989) as a basis for the description.

In the anatomical analysis we used paradermal and transverse sections of leaves from the fourth stem node. The paradermal sections were made with fresh material and in freehand in semi-permanent slide, using glycerol as the inclusion mean and methylene blue at 0,05% as the dye (Gattuso & Gatuso, 1999). For the transverse section analysis, the medium-apical part of the leaves was sectioned (2 x 2mm), fixed directly in glutaraldehyde at 2% in phosphate buffered saline 0,013M, pH 7,2, and stored at 4°C for 48 h. The material was dehydrated in ascending ethylic series from 30 to 96° GL, for 1h in each alcohol and, included in hydroxyethyl methacrylate blocks (Ruetze, 1986; Gerrits & Smid 1983). Sections of 4 µm were made using a rotating microtome and, which were brought to histological bath, taken to the slide and stained with toluidine blue at 0,05 % (Ruetze, 1986).

The presence of mucilage was detected using china ink at 0,25% and methylene blue at 0,15% (Costa, 1982). The chemical composition of the crystals was observed using acetic acid at 6% or hydrochloric acid at 7 % (Costa, 1982).

All sections were analyses based on Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2003), Dickison (2000), Fahn (1990) and Cutter (1987).

The material was registered in microphotographs using a microscope with digital camera and, the slides were stored in the slides heap of the Industrial Pharmacy Department from the Federal University of Santa Maria.

RESULTS

Determining the macroscopic characteristics

The *B. salicifolius* (Fig. 1) leaves show cross opposite phyllotaxy. These leaves are simple, entire, aromatic and, reach the average of 1,5 to 7 cm length and are 0,4 to 2 cm wide. The leaf blade is elliptical, discolor, adaxially shiny and displays translucent spots. These leaves show a chartaceous consistence and have pinnate venation characterizing the brochidromous type with the last marginal incomplete and, the midrib grooved in the adaxial side. The leaf blade base is cuneate, the apex is acuminate and mucronate and the margin is entire. These leaves are short-petiolate, the petiole is flattened and measures from 0,3 to 0,6 cm in length and 0,5 mm in thickness. In transverse section the petiole is biconvex.

FIGURE 1

Determining the microscopic characteristics

In front view, the adaxial side of the leaf epidermis of the *B. salicifolius* (Fig.2A) shows epidermal cells with sinuous cell wall but, we did not observe any stomata. In the abaxial side, the epidermis shows cells with straight cell wall and many stomata of the anomocytic and anisocytic types (Fig.2B). In both sides of the leaf epidermis of this plant, it was not observed any glandular or tector trichomes.

In the transverse section, the middle portion of the leaf blade is flat in the adaxial side and slightly convex in the abaxial side (Fig.3). The epidermis is uniseriate and presents a thick and fissured cuticle, with a greater accumulation of material in the central region of the periclinal walls of the epidermal cells. In the adaxial side of the epithelial cells, both in the central and lateral regions, they generally present the periclinal wall larger than the anticlinal wall (75 to 175 μ m wide x 75 to 100 μ m height). In the abaxial side, the epidermal cells show characteristics of shape and size in diameter. The stomata are of the mesocytic type (Fig.4 and 5). In both epidermal sides we can find a great amount of mucilage cells, in-between the

epidermal cells. In the distal region, the epidermal cells assume a round shape with 75 to 125 μm in diameter (Fig.5).

The mesophyll is heterogeneous and symmetric with palisade parenchyma disposed along both epidermal sides (Fig.4). The upper palisade comprises greater cells size than the lower palisade, 25 to 50 μm wide x 275 to 525 μm height and 25 to 50 μm wide x 125 to 300 μm height, respectively (Fig.7). On the other hand, the lower palisade has intercellular spaces of greater size. The spongy parenchyma is constituted by 7 to 10 cell layers that show shapes from ovoid to circular and also, square to rectangular (Fig. 3,4 and 7). Some cells located near to the upper palisade are collectors (Fig. 4 and 8). The cells located at the central region of this parenchyma are greater than the ones near to the palisade parenchyma 75 to 400 μm wide x 100 to 225 μm height and 175 μm wide x 150 μm height, respectively. The intercellular spaces are of chamber type but, invariably, many cells in this parenchyma are juxtaposed, forming small cell groups. In the upper palisade parenchyma and in the two bottom layers of the spongy parenchyma, there is the occurrence of sparse idioblasts with 175 μm in diameter and, each crystal idioblast bears only one crystal of calcium oxalate in druse form (Fig.8). Either in the lateral region or in the distal region of the transverse section of the mesophyll, there is the presence of round shape glandular structures that reach 500 to 1000 μm in diameter and, have a practically homogeneous and in light-green color internal content (Fig.6 e 7).

The vascular bundles are of collateral type and are protected by a parenchymatous bundle sheath. There is the occurrence of many sclerenchyma cells along the vascular bundle, marking the presence of pericycle in the vascular bundle of greater size (Fig.3,4,7 and 8), Both xylem and phloem have the occurrence of vascular parenchyma.

FIGURE 2 to 8

DISCUSSION

The results obtained from the macroscopic analysis of the *B. salicifolius* leaves demonstrated that they follow the patterns of the morphological characters described for the Myrtaceae family, highlighting the pinnate venation and the presence of small translucent spots throughout the leaf blade (Gonçalves & Lorenzi, 2007; Joly, 2002; Barroso, 1991; Schultz, 1985;). For the considered species, according to Kawasaki (2000) and Landrum (1986), the leaves size and shape are very variable in relation to the geographical distribution of the specimens. However, among the *B. salicifolius* morphological characteristics, the same authors say that they have simple leaves with entire margin and gleaming surface. Cronquist (1981) mentions that the Myrtaceae leaves present continuous intra-marginal vein what was confirmed for the considered species. In this work, it was found that the leaves are smooth, hairless and gleaming. A remarkable characteristic in the quality control of *B. salicifolius* leaves, besides the fact that they not show hairiness, the leaf blade is discolor and the venation is brochidodromous what make it different from other medicinal species like *Psidium guajava* (Myrtaceae). Other Myrtaceae species like *Psidium australe* and *Campomanesia pubescens* have an acrodromous-brochidodromous venation what differentiates it from the brochidodromous type of the *B. salicifolius* (Cardoso & Sajo, 2004). On the other hand, the same author emphasizes that, although the marginal ultimate venation, which is incomplete in the *B. salicifolius*, make striking differences even between very close species such as the *Psidium australe*, *Campomanesia guazumifolia* and *Campomanesia pubescens* that present the marginal ultimate venation in form of arcs, while the *Psidium firmum*, *Calycolpus legrandii* and *Acca sellowiana* have fimbrial marginal ultimate venation.

The *B. salicifolius* have a flattened petiole and, in transverse section, it is biconvex differing from the one in *Eugenia uniflora* that is concave-convex (Farmacopéia Brasileira [Brazilian Pharmacopoeia] V ed., 2010).

As in the morphological analysis, the anatomic analysis of the *B. salicifolius* leaves demonstrated the presence of Myrtaceae general characteristics as well as some very unique characteristics that are important to guide the authentication of the considered species. Among the anatomic characteristics, according to Metcalfe & Chalk (1950) and Solereder (1908), it is noteworthy the presence of secretory cavities, the remarkable abundance of calcium oxalate in the form of crystals and the anomocytic stomata. All these characteristics were found in the botanic material analyzed.

The epidermis provides anatomic markers that are useful in the authenticity of plant based drugs. In front view, the adaxial side of the leaf epidermis of the *B. salicifolius* shows epidermal cells with sinuous cell wall while in the abaxial side, the epidermis shows cells with straight cell wall, a characteristic that makes it possible to differentiate it from species like *Eugenia uniflora* and *Eucaliptus globulus*, that have epidermal cells of polygonal type in both epidermal sides (Farmacopéia Brasileira IV ed., 1996; Farmacopéia Brasileira V ed., 2010). The *B. salicifolius* epidermis is uniseriate; a characteristic similar to the *Eugenia uniflora*, however, this characteristic may be used as differential to other Myrtaceae species like *Psidium guajava* which have a pluriseriate epidermis.

In relation to the presence of mucilage cells in the both epidermal sides of the *B. salicifolius* we have to highlight that it is a characteristic that differentiates it from species like *Eucaliptus globulus*, *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora* and *Syzygium cumini* (Farmacopéia Brasileira IV ed., 1996, 2002; Farmacopéia Brasileira V ed., 2010).

The stomata in *B. salicifolius* are anomocytic and anisocytic, which are characteristic types of Myrtaceae (Metcalf & Chalk, 1950), though they differ from those in species like *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora* and *Syzygium cumini* that present anomocytic stomata (Farmacopéia Brasileira IV ed., 2002; Farmacopéia Brasileira V ed., 2010). Together with the stomata types observed in paradermal section, the prominence of the stomata in relation to the epidermal cells may help in the authenticity of vegetal species. In this way, the stomata in medicinal species like in *P. guajava* are in its majority projected in relation to the epidermal cells, what is different from the *B. salicifolius* where they are disposed at the same layer of the epidermal cells (Farmacopéia Brasileira IV ed., 2002).

In both sides of the *B. salicifolius* leaf epidermis, it was not observed the presence of any type of trichome what will differ it from several Myrtaceae species like *Psidium guajava*, which has simple tector trichomes disposed mostly in the abaxial side (Farmacopéia Brasileira IV ed., 2002). The presence or absence of trichomes may be useful in the quality control of plant based drugs because even when the drug is in powder form, this anatomic characteristic is important because, in general the trichomes remain intact even in powdered drugs. On the other side, the presence or absence of trichomes in plant based drugs analysis is a microscopic characteristic that stands out in relation to others.

The mesophyll in *B. salicifolius* is heterogeneous and symmetric, a characteristic that differentiates it from other Myrtaceae medicinal species like *Eugenia uniflora*. The palisade parenchyma in the *B. salicifolius* is isofacial (have the same type of surface on both sides), with bigger cells in the palisade subjacent to the adaxial epidermal side, differently from

Psidium guajava, *Eugenia uniflora*, *Syzygium cumini* that have bifacial mesophyll. In the spongy parenchyma, the inter-cell spaces in *B. salicifolius* are characteristically from the chamber type while in other Myrtaceae species like *Psidium guajava* these spaces are of meatus type but, however, in the *Eugenia uniflora*, the spaces are conspicuous and, in *Syzygium cumini*, they are abundant (Farmacopéia Brasileira IV ed. 2002; Farmacopéia Brasileira V ed. 2010). The collecting cells are striking structures in the spongy mesophyll of *B. salicifolius*. These structures are not emphasized in the Myrtaceae literature.

One striking characteristic in the Myrtaceae mesophyll is the occurrence of sub-epidermal secretory cavities, a real striking characteristic for the considered species. These secretory structures in Myrtaceae, according to authors like Barroso et al., 1984; Cronquist, 1981 and Metcalfe & Chalk, 1950, have their content formed by volatile oils that are specific for each species. Fahn (1979) says that the secretory cavities can secrete only terpenes or terpenes with carbohydrates and other substances. Siani et al. (1997) analyzed the volatile oil from 12 different Myrtaceae species and revealed the striking presence of terpenoids.

Many functions are assigned to justify the presence of calcium oxalate crystals in vegetal, the most common are the plant defense against herbivorous, calcium metabolic regulation and the detoxification of oxalic acid or heavy metals (Nakata, 2002). A taxonomic value is assigned to the presence of crystals in vegetal organs and, its shape, chemical constitution and location are relevant in the taxonomy and authenticity of plant based drugs (Walker et al., 2008). Thus, the presence of druse in the leaf blade of *Syzygium cumini* is a relevant characteristic in the authenticity of this plant leaves as pharmaceutical material (Alberton et al., 2001).

The vascular bundles in *B. salicifolius*, are of collateral type what make it possible to differentiate them from, for example, *P. guajava*, that have vascular bundles type bi-collateral in open arc and, from other Myrtaceae species like *E. globulus* and *E. uniflora* that have the vascular system type bi-collateral closed (Farmacopéia Brasileira V ed., 2010). In the *B. salicifolius*, the vascular bundles are surrounded by a sheath of parenchymatous cells while in the *P. guajava* this rarely occurs.

CONCLUSIONS

The morpho-anatomical characteristics of *B. salicifolius* are compatible with the ones described for Myrtaceae and for the considered species. Among the macroscopic characteristics we highlight the hairless discolor leaf blade, with chartaceous consistence and pinnate venation of brochidodromous type. Microscopically we highlight the uniseriate epidermis with several mucilage cells, anomocytic and anisocytic stomata as well as the absence of trichomes. The mesophyll is heterogeneous and symmetric, the vascular bundles are collateral closed and surrounded by a parenchymatous sheath. There is the presence of calcium oxalate crystals in form of druse and rounded secretory structures. All those characteristics are consistent morpho-anatomical markers that when analyzed together, contribute in the botanic control of the leaves quality for use in the pharmaceutical industry.

REFERENCES

- Alberton, JR, Ribeiro A, Sacramento LVS, Franco SL, Lima, MAP 2001. Caracterização farmacognóstica do jambolão *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 11 (1): 37-50.
- Apezatto-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM 2003. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa.
- Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CF, Costa CG, Peixoto AL, Lima HC 1984. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. V 2. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa.
- Barroso GM 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa.
- Calderon AI, Vazquez Y, Solis PN, Caballero GC, Zacchino S, Gimenez A, Pinzon R, Caceres A, Tamayo G, Correa M, Gupta MP 2006. Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. *Pharm Biol* 44 (2): 130-40.
- Cardoso CMV, Sajo MG 2004. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia L.*(Myrtaceae) da bacia hidrográfica do rio Tibagi, PR. *Rev Bras Bot* 27: 47-54.
- Costa AF 1982. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2 ed., vol.3.
- Cronquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Ed. Columbia University.
- Cutter EG 1987. *Anatomia vegetal*. Órgãos Experimentos e interpretações. São Paulo: Ed. Rocca
- Dickson WC 2000. *Integrative Plant Anatomy*. San Diego: Harcourt Academic Press.
- Di Stasi LC 1996. *Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP.
- Eschrich W 1995. *Funktionelle Pflanzenanatomie*. Berlin: Springer-Verlag.
- Fahn A 1990. *Plant anatomy*. 4ª ed. Oxford: Pergamon Press.
- Fahn A 1979. *Secretory tissues in plants*. London, Academic Press.
- Farmacopéia Brasileira 1996. 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte 2. fasc. 1
- Farmacopéia Brasileira 2002. 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte 2. fasc. 4
- Farmacopéia Brasileira 2010. V ed. Brasília: Ed. Fiocruz, Livro 2
- Galvani FR, Barreneche ML 1994. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). *Revista da FZVA*. Uruguaiana 1(1): 1-14

- Gattuso MA, Gattuso SJ 1999. *Manual de procedimentos para analisis de drogas en polvo*. Argentina. Ed. Universidade Nacional de Rosário.
- Gerrits PO, Smid LA 1983. A new, less toxic polimerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial section. *Journal of Microscopy* 132: 81-85.
- Gonçalves E, Lorenzi H 2007. *Morfologia vegetal - Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. São Paulo: Nova Odessa. Instituto Plantarum, 416 p.
- Joly AB 2002. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Ed. Nacional.
- Kawasaki ML 2000. *Flora fanerogômica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga*. (São Paulo, Brasil). 88 - Myrtaceae. *Hoehnea* 27: 165-186.
- Landrum LR 1986. Monography 45: *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica* 4: 72-115.
- Lazzari A, Heckler E 1996. Murta – *Blepharocalyx salicifolius* (Berg.): estudo fitoquímico. In: Congresso Nacional de Botânica, 47. Nova Friburgo. Resumos: Sociedade Botânica do Brasil.
- Limberger RP, Aboy AL, Bassani VL, Moreno PRH, Ritter MR, Henriques AT 2001. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). *J Essent Oil Res* 13: 225-228.
- Lorenzi H 2002. *Árvores Brasileiras - Manual de identificação e cultivo das plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2a ed. São Paulo: Nova Odessa.
- Marchiori JNC, Sobral M 1997. *Dendrologia das angiospermas: Myrtales*. Santa Maria: Ed. UFSM.
- Marques TP 2007. *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*. Curitiba, 244 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Paraná.
- Mattos JLR 1983. *Frutíferas nativas do Brasil*. São Paulo: Nobel, 92 p.
- Mentz LA, Lutzemberger LC, Schenkel EP 1997. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D Ávila (1910). *Caderno de Farmácia* 13 (1): 25-48.
- Metcalfé CR, Chalk L 1950. *Anatomy of The Dicotyledons*. London: Oxford University press, Amen Hause.
- Nakata, PA 2002. *Trends in plant Science* 7 (7): 324 p.
- Oliveira F, Akisue G 1989. *Fundamentos de farmacobotânica*. São Paulo: Atheneu.
- Reitz R, Klein MR, Reis A 1988. *Projeto Madeira do Rio Grande do Sul- Governo do Estado do Rio Grande do Sul*.

- Ruetze M, Schimit U 1986. Glycol-methacrylat (GMA) als einbettungssystem für histologische untersuchungen von koniferen-Nadeln. *Eur J Forest Pathol* 16: 321-324.
- Schultz A 1985. Introdução à botânica sistemática. Porto Alegre: UFRGS.
- Siani AC, Branquinho LF 1997. Extração e análise química de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae. *V Reunião de Iniciação Científica da Fundação Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Solereeder H 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany*. Oxford: Clarendon Press.
- Souza VC, Lorenzi H 2005. Botânica sistemática-guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum.
- Walker CIB, Zanetti GD, Ceron CS, Manfron MP. 2008. Morfo-anatomia e histoquímica das folhas de *Luehea divaricata* Martius (Malvaceae). *Latin American Journal of Pharmacy* 27: 203-210.

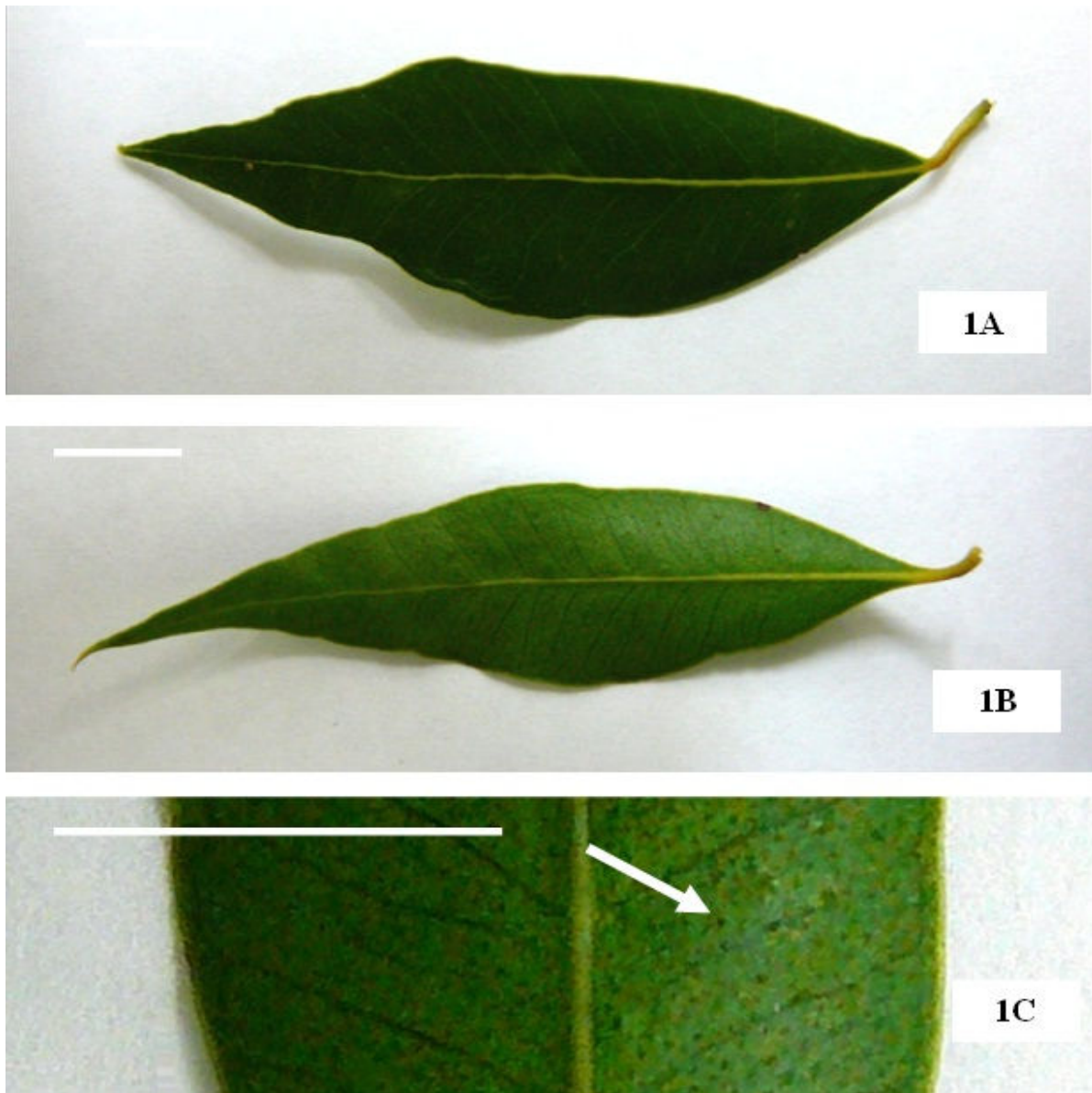


FIGURE 1 (A-C). *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf 1A. Adaxial side general aspect; 1B. abaxial side general aspect; 1C. Detail of the leaf blade highlighting the spots referring to the secretory structures. Bar: 1 cm.

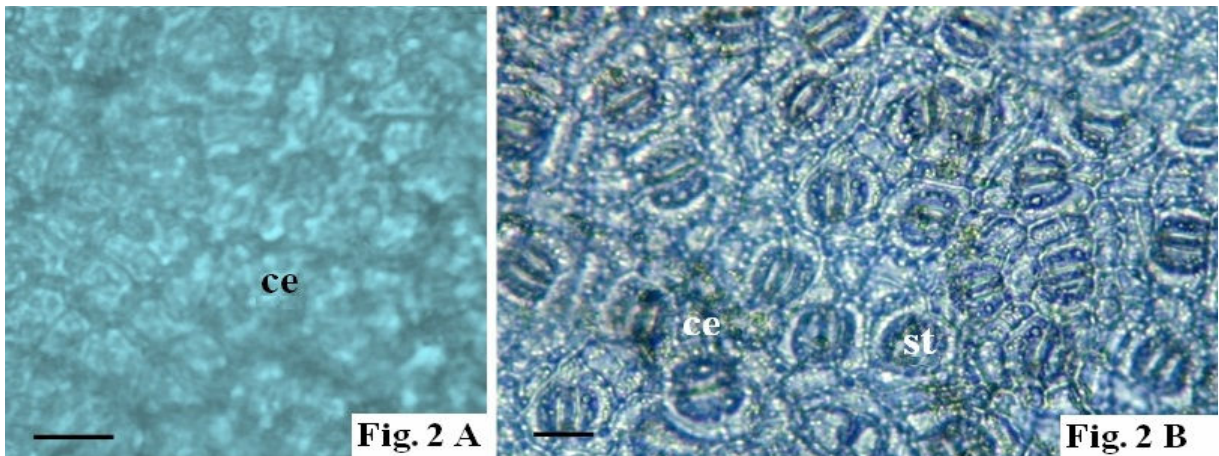


FIGURE 2 (A-B). Paradermal section of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf **2A.** Epidermal section of the adaxial side; **2B.** Epidermal section of the abaxial side. Abbreviations: ce: epidermal cells; st: stomata. Bar:100 μ m.

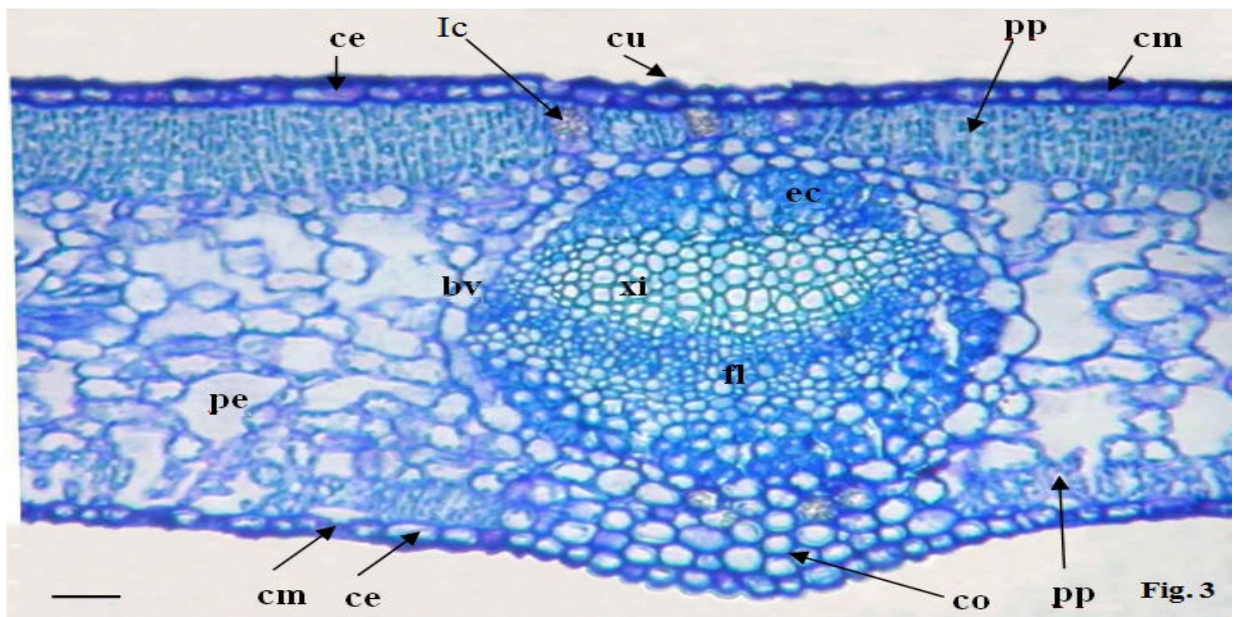


FIGURE 3. Transverse section of the middle part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf. Abbreviations: ce: epidermal cell; cu: cuticle; cm: mucilage cell; st: stomata; Ic: Idioblast with calcium oxalate crystal in the form of druse; pp: palisade parenchyma; pe: spongy parenchyma; co: collenchyma; bv: vascular sheath; ec: sclerenchyma; xi: xylem; fl: phloem. Bar: 100 μ m.

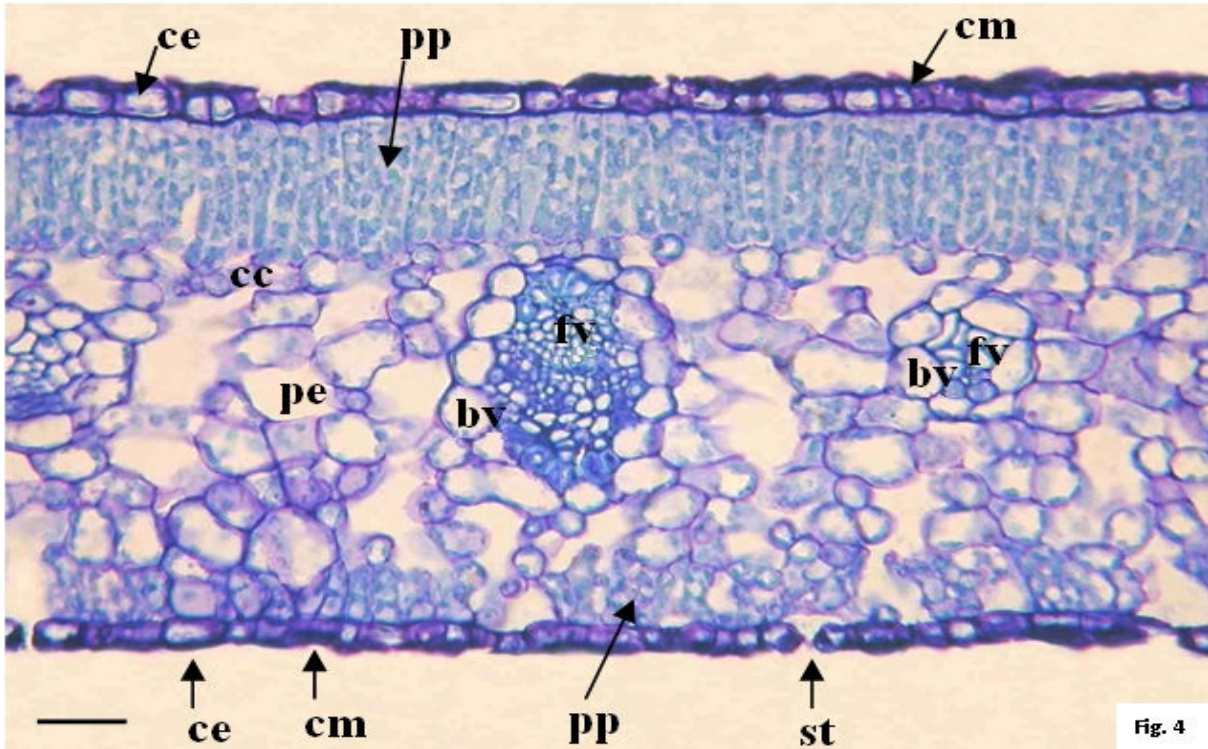


FIGURE 4. Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf
Abbreviations: ce: epidermal cells; cm: mucilage cell; st: stomata; pp: palisade parenchyma; pe: spongy parenchyma; bv: vascular sheath; fv: vascular bundle; cc: collecting cells. Bar: 100 μ m.

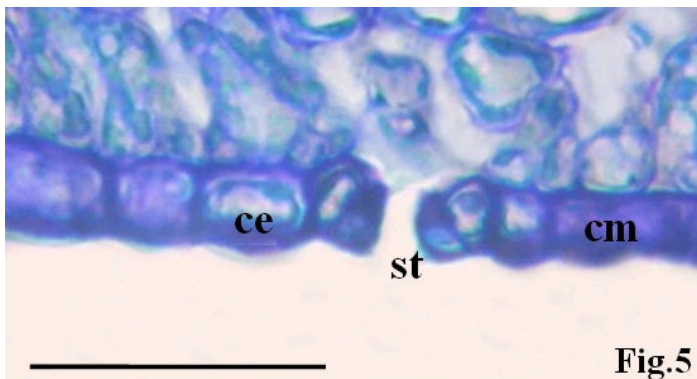


Fig.5

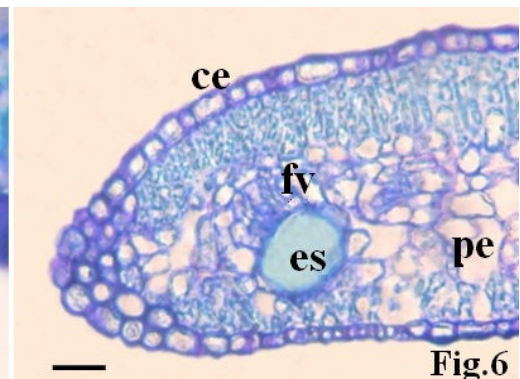


Fig.6

FIGURE 5 Transverse section of the middle part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf
Abbreviations: ce: epidermal cell from the abaxial side; cm: mucilage cell; st: stomata. Bar: 100 μ m.

FIGURE 6. Transverse section of the distal part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf
Abbreviations: ce: epidermal cell from the adaxial side; pe: spongy parenchyma; es: secretory structure; fv: vascular bundle. Bar: 100 μ m.

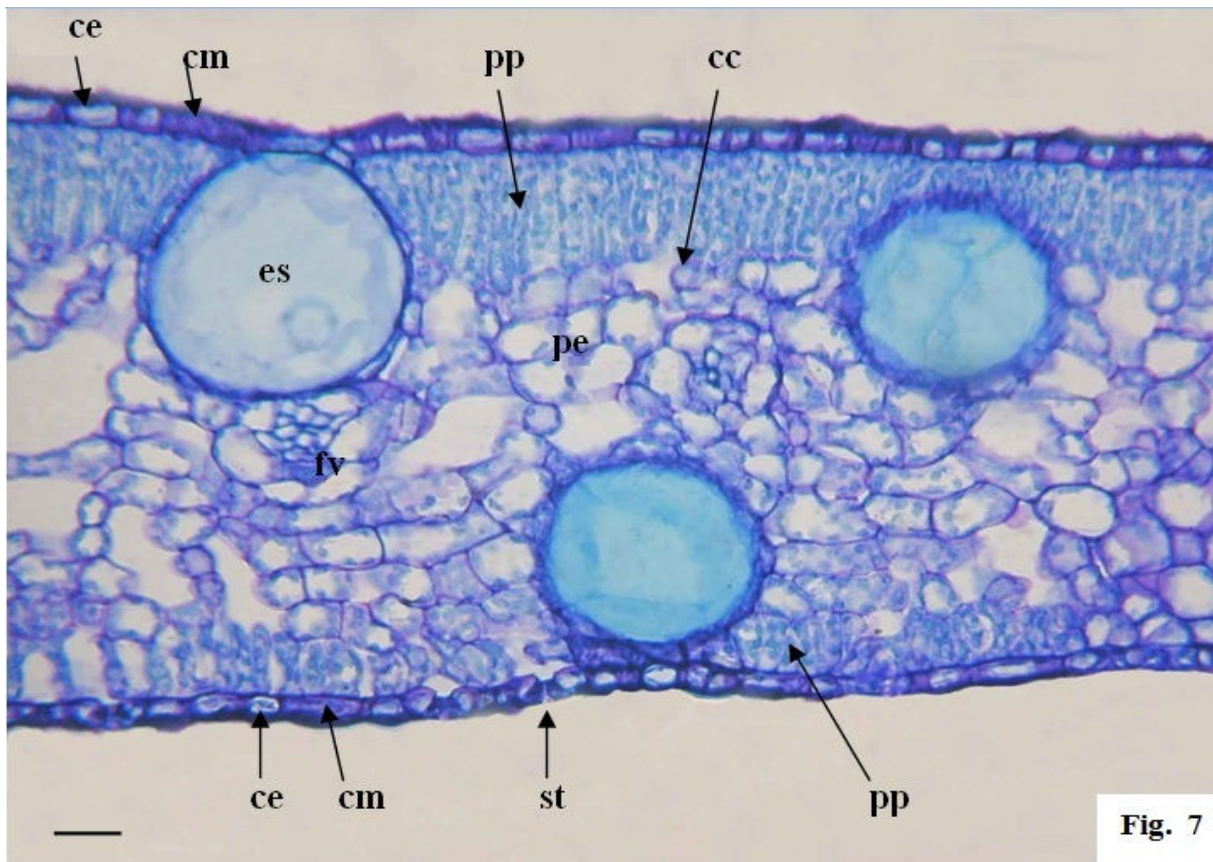


Fig. 7

FIGURE 7. Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf
 Abbreviations: ce: epidermal cell; cm: mucilage cell; st: stomata; pp: palisade parenchyma; pe: spongy parenchyma; cc: collecting cell; es: secretory structure; fv: vascular bundle protected by a vascular sheath. Bar: 100 μ m.

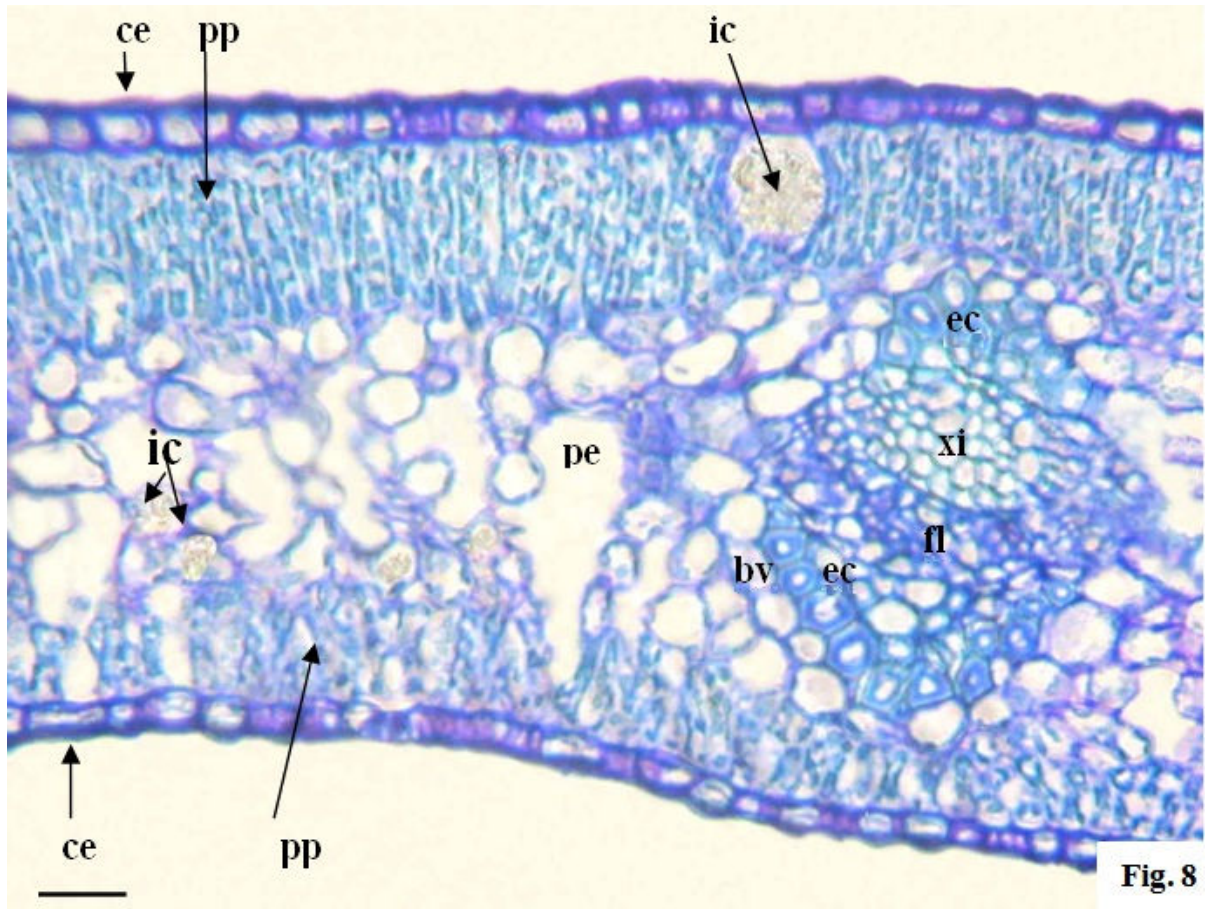


Fig. 8

FIGURE 8. Transverse section of the lateral part of a *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. leaf
 Abbreviations: ce: epidermal cell with thick cuticle; Ic: idioblast with calcium oxalate crystal in the form of druse; pp: Palisade parenchyma; pe: spongy parenchyma; bv: vascular sheath; ec: sclerenchyma; xi: xylem; fl: phloem. Bar: 100 μ m.

3.2 Manuscrito 2

Caracterização físico-química e atividade antioxidante das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)

Alexandre Ribas¹, Rosana Casoti¹, Carla Speroni Ceron¹, Tiago Maki¹, Aline Marin¹, Daiana Flores Dala Lana¹, Melânia P. Manfron¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica. Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil.

RESUMO: É imprescindível o controle da qualidade da matéria-prima vegetal para obtenção de um fitoterápico de qualidade. *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. popularmente conhecida como murta, é utilizada na medicina tradicional como digestivo, expectorante e também para casos de cistite e uretrite. Este estudo tem como objetivo, estabelecer parâmetros de controle de qualidade do extrato das folhas de *B. salicifolius* (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae) através de testes farmacopeicos e determinação da capacidade antioxidante frente a 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os resultados obtidos evidenciam a presença de compostos fenólicos, terpenos e esteróides. Os valores determinados de polifenóis e flavonoides mostraram que 92,67% do extrato bruto é constituído por compostos fenólicos e que destes, cerca de um terço da amostra é constituída por flavonoides. O maior teor de flavonoides foi apresentado na fração acetato (35,49%). O extrato bruto na concentração de 100 µg/mL e todas as frações apresentaram atividade antioxidante, sendo que as mais pronunciadas foram o extrato bruto (91,34%), frações acetato (86,33%) e hexânica (78,62%). O poder antioxidante pode ser explicado pela presença de substâncias fenólicas, que são capazes de inibir os radicais livres. Os parâmetros físico-químicos estabelecidos são úteis no controle de qualidade de *B. salicifolius*. Há variação dos constituintes físico-químicos, a qual pode ser atribuída à coleta em regiões diferentes. O teor de polifenóis juntamente com os flavonoides pode justificar o potencial antioxidante do extrato bruto e suas frações justificando o uso das folhas de *B. salicifolius* na medicina tradicional.

Palavras-chave: *Blepharocalyx salicifolius*, controle de qualidade, atividade antioxidante, plantas medicinais.

SUMMARY: The quality control is essential to quality of vegetable raw material to obtain a phytotherapeutic quality. *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. popularly known as murta, is used in traditional medicine as a digestive, expectorant and also for cases of cystitis and urethritis. This study aims to establish quality control parameters of leaves from *B. salicifolius* by pharmacopoeial testing and determination of antioxidant capacity against DPPH in crude extract and fractions. The results show the presence of phenolic compounds, terpenes and steroids. The determined values of polyphenols and flavonoids showed that 92.67% of the crude extracts is composed of phenolic compounds and these, about one third of the sample consists of flavonoids. The higher content of flavonoids was presented at acetate fraction (35.49%). The crude extract at a concentration of 100g/ml and all fractions showed antioxidant activity and the crude extract were more pronounced (91.34%), acetate fraction (86.33%) and hexane (78.62%). The antioxidant power can be explained by the presence of phenolic substances, which are capable of inhibiting free radicals. The physico-chemical parameters established are useful in quality control of *B. salicifolius*. Occurs variation in the physical-chemical constituents, which can be attributed to the samples in different regions. The polyphenol content along with the flavonoids may account for the antioxidant potential of crude extract and its fractions, justifying the use of the leaves of *B. salicifolius* in traditional medicine.

Keywords: *Blepharocalyx salicifolius*, quality control, antioxidant activity, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

O aumento no uso de fitoterápicos pela população mundial tem se traduzido em preocupação com a qualidade de tais produtos, devido aos problemas comumente encontrados referentes à autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais que contribuem para um fitoterápico de má qualidade (CARVALHO et. al., 2008; SILVEIRA et. al.; 2008).

Os consumidores utilizam os fitoterápicos como uma alternativa terapêutica eficaz e com a mesma qualidade dos medicamentos sintéticos, tornando-se imprescindível o controle da matéria-prima vegetal para a obtenção destes medicamentos (VILEGAS; CARDOSO, 2007; SIMÕES et. al., 2007).

A *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. conhecida como murta é uma planta nativa no Brasil, Equador, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina (LORENZI, 2002). Esta espécie floresce no final da primavera ao início do verão e frutifica de março a maio, atingindo até 40 m de altura e chega a ser espécie predominante nas formações florestais em algumas regiões (REITZ, KLEIN; REIS, 1988).

Esta planta é tradicionalmente utilizada como digestivo, expectorante, e também para casos de cistite e uretrite. Os óleos voláteis extraídos desta espécie apresentam atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e atividade citotóxica frente à linha SF-268 de células cancerígenas do sistema nervoso (LIMBERGER, 2001; CALDERON et. al., 2006).

Chalconas, quercetrina e guaijaverina isolados das folhas de *B. salicifolius* apresentaram atividade leishmanicida, antitumoral e antimicrobiana (SIQUEIRA et. al. 2011). Neste trabalho foram determinados parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade e determinação da capacidade antioxidante no extrato bruto das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. foram coletadas em setembro de 2009, nas cidades de Dilermando de Aguiar (amostra 1), São Pedro do Sul (amostra 2) e Santa Maria (amostra 3), Rio Grande do Sul, Brasil. Estas foram identificadas pelo biólogo Gilberto Dolejal Zanetti, e depositada conforme exsicata SMDB 11822 no Herbário do Departamento de Biologia, CCNE, UFSM.

As análises físico-químicas realizadas na droga, tais como, determinação do pH; matéria estranha; características organolépticas; teor de água, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, cinzas sulfatadas, índice de espuma, índice de amargor, índice de intumescência seguiram a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1996) e WHO (1998). Estas análises foram realizadas com as três (3) coletas.

Com o extrato das folhas de murta, amostra 3, preparado por maceração a frio em solução hidroalcoólica 70 %, concentrado em evaporador rotatório e liofilizado, sendo após, ressuspenso em água e fracionado em funil de separação segundo FALKENBERG et al. (2007), através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, iniciando com hexano, passando por diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, obtendo-se respectivamente as frações hexânica (FH), diclorometano (FD), clorofórmica (FC), acetato de etila (FA) e *n*-butanólica (FB). Foi realizada a avaliação fitoquímica preliminar conforme a metodologia proposta por Moreira (1979) e Costa (1982), e as determinações de polifenóis, flavonoides e atividade antioxidante.

Determinação do teor de óleos voláteis

A determinação do teor de óleos voláteis foi realizada com 25 g de material fresco por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY; AKISUE, 1969). O óleo volátil extraído foi pesado para determinação do rendimento.

Determinação do teor de polifenóis

O doseamento de polifenóis foi realizado através do método de Folin-Ciocalteu modificado conforme Chandra e Meija (2004). Na solução de 0,5 mg/mL do extrato de *B. salicifolius*, foi adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, após 5 min., foi acrescentado 2 mL de carbonato de sódio a 20%. A absorção da amostra foi medida em 730 nm em

espectrofotômetro Shimadzu UV 1021. As análises foram realizadas em triplicata. A curva padrão do ácido gálico foi realizada nas concentrações de 3, 6, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml. O teor de fenois foi determinado por interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração do padrão e expressos como gramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de amostra analisada.

Determinação do teor de flavonoides

A dosagem de flavonoides foi feita de acordo com Rio (1996) modificado, onde a concentração da amostra analisada foi de 400 µg /mL solubilizada em MeOH 70% e acrescidas de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%. A curva padrão da rutina foi obtida nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 800µg/ml. As análises foram realizadas em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/visível (425 nm). O teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorvância da amostra com a curva de calibração do padrão e expressos como gramas de equivalente de rutina por 100 gramas de amostra analisada.

Determinação do potencial antioxidante por DPPH

A determinação do potencial antioxidante foi realizada pelo método radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) conforme Choi et al. (2002). Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico. A solução estoque foi preparada na concentração de 1mg/mL e a partir desta, diluições seriadas foram realizadas nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 µg/mL. Fez-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 518 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição do radical livre DPPH foi determinada com a fórmula: % inibição = $[100 - (\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do Branco})/\text{Absorvância do controle}] \times 100$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras das folhas frescas de *Blepharocalyx salicifolius* apresentaram um forte odor aromático característico, com coloração verde escuro e sabor adstringente. O pH foi caracterizado por pH ácido em solução hidroalcolica 70%. A presença de mucilagens e saponinas foram determinadas pelo índice de intumescência e de espuma, respectivamente (tabela 1).

Os padrões de pureza da *B. salicifolius* encontrados apresentaram cinzas totais (7,01-9,61%), cinzas insolúveis em ácido clorídrico (0,21-0,35%), cinzas sulfatadas (5,90-6,43%) e teor de água (6,26-6,70%). Esses resultados estão em conformidade com a Farmacopéia Brasileira 4^a (2003), que descreve que o teor de umidade tem que ser no máximo de 14%, cinzas insolúveis em HCl no máximo de 2% e cinzas totais no máximo de 12%.

TABELA 1 - Análises físico-químicas das folhas de *B. salicifolius*

Parâmetros de qualidade	Amostra 1 X± DP	Amostra 2 X± DP	Amostra 3 X± DP
Matéria estranha (%)	0,14±0,02	0,08±0,01	0,15±0,01
Teor de água (%)	6,26±0,21	6,70±0,58	6,30±0,36
Cinzas totais (%)	7,01±0,82	9,61±1,15	7,72±0,79
Cinzas insol. HCl (%)	0,30±0,04	0,21±0,01	0,35±0,01
Cinzas sulfatadas (%)	6,01±0,06	6,43±0,08	5,90±0,51
Índice de amargor (u/g)	301,67±1,80	240,00±1,40	298,35±1,30
Índice de intumescência	3,0±0,2	4,2±0,4	3,5±0,5
pH	4,8±0,2	5,0±0,3	4,5±0,2
Teor de óleos voláteis (%)	0,16±0,02	0,18±0,1	0,15±0,09

A determinação do teor de cinzas totais é importante uma vez que indica a presença de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar contaminando a droga vegetal (FARM. BRAS., 2000). As cinzas totais incluem cinzas fisiológicas e de materiais estranhos, cinzas não-fisiológicas, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (FARM. BRAS. 1988).

A água residual encontrada na droga sugere, quando excede o limite preconizado, em perda do material vegetal por contaminação microbiana ou degradação dos seus constituintes químicos. O índice de amargor de cada amostra de 240,0; 295,35 e 306,7 us/g permite

concluir, que a planta apresenta substâncias amargas. Plantas medicinais com forte sabor amargo são empregadas principalmente como digestivas, pois estimulam a produção de suco gástrico (MORS et. al., 2000).

As folhas de *B. salicifolius* apresentaram rendimento de óleo volátil de 0,15-0,18 % (tabela 1), que vem a corroborar com o estudo realizado por Mattos (1983), o qual encontrou o teor de 0,17%, e identificou os constituintes do óleo volátil de *B. salicifolius* como 1,8-cineol (25,2%), beta-cariofileno (22,9 %) e linalol (20,4 %).

Após análises estatísticas ($p < 0,01$) com o software Assistat, foi possível afirmar que, a amostra 2 (São Pedro do Sul) é significativamente diferente das amostras 1 (Dilermando) e amostra 3 (Santa Maria).

A triagem fitoquímica (tabela 2) do pó das folhas de *B. salicifolius* evidenciou a presença de esteroides, triterpenos e compostos fenólicos principalmente flavonoides, saponinas e taninos. O que está de acordo com o uso tradicional, pois plantas ricas em taninos são usadas no tratamento de diarreia, reumatismo, feridas, problemas estomacais, renais e processos inflamatórios em geral (SIMÕES et al., 2007).

TABELA 2 - Análise fitoquímica.

Metabólitos secundários	Amostra 1.	Amostra 2.	Amostra 3.
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-
Compostos fenólicos	+	+	+
Alcaloides	-	-	-
Heterosídeos cardiotônicos	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Taninos	+	+	+
Esteroides/terpenos	+	+	+

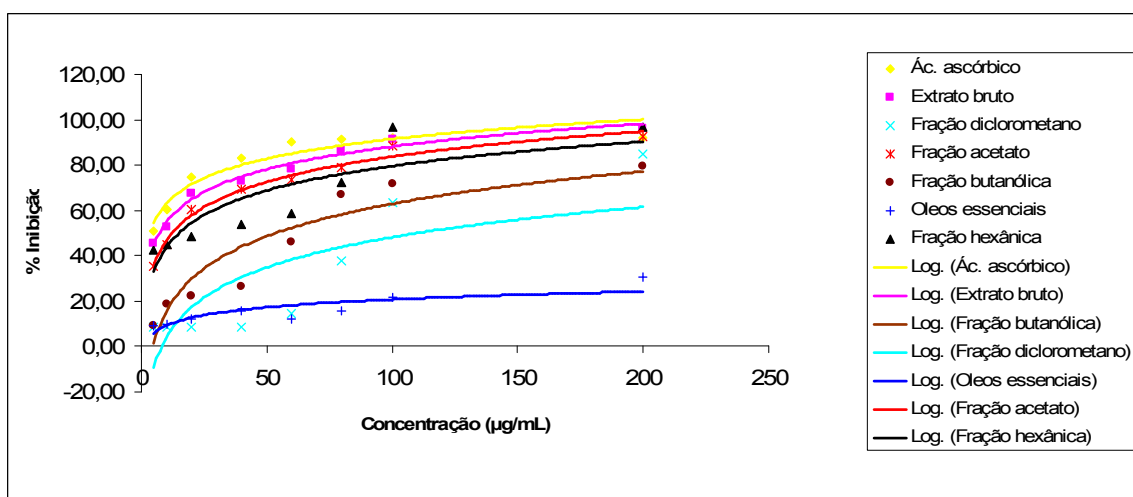
(-) ausência de reação; (+) presença de reação.

Os teores de polifenóis e flavonoides (tabela 3) demonstram que o maior teor de flavonoides foi apresentado na fração acetato (35,49%). Compostos flavonoídicos representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural; classe de compostos amplamente distribuída no reino vegetal (HARBONE; WILLIAMS, 2000). Estas substâncias atuam na inibição da enzima lipoxigenase, que converte o ácido araquidônico em leucotrienos, mediadores de asma, alergias e inflamação (ISHIKAWA et al., 2006).

TABELA 3- Determinação do teor de polifenóis e flavonoides nas folhas de *B. salicifolius*

	Polifenóis (g)/100g amostra	Flavonóides (g)/100g amostra
	$\bar{X} \pm PD$	$\bar{X} \pm PD$
EB 0,04%	92,67±1,37	24,94±0,51
FAc 0,04%	82,82± 4,86	35,49±0,74
FBut 0,04%	70,84±10,38	10,42±0,12

A atividade antioxidante pode ser explicada pela presença de substâncias fenólicas, que são capazes de inibir os radicais livres (RUBERTO et al., 2007). O extrato de *B. salicifolius* e as frações acetato e butanólica na concentração de 100 µg/mL estão de acordo com esta afirmação, pois os mesmos na determinação do potencial antioxidante apresentaram valores de (91,34%); (86,33%) e (78,62%) respectivamente (figura 1).

FIGURA 1 – Potencial antioxidante de *B. salicifolius* por DPPH

A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante.

TABELA 4 - Determinação da concentração eficiente (CE₅₀) por DPPH nas folhas de *B. salicifolius*

Amostras	CE₅₀% (µg/mL)
Ác.ascórbico	3,525
Extrato bruto	7,15
Fração acetato	14,91
Fração butanólica	49,95
Fração diclorometano	99,38
Fração hexânica	14,22
Óleos essenciais	> 1000

O valor CE₅₀ = 7,15 µg/mL do extrato bruto demonstrou que os constituintes químicos em sinergismo possuem maior atividade antioxidante do que as suas frações, não deixando de enfatizar que a fração acetato (CE₅₀ = 14,91 µg/mL) também apresentou expressivo potencial antioxidante (tabela 4), quando comparado com o padrão ácido ascórbico. Em um estudo com a espécie *Terminalia brasiliensis* Camb. (fração hexânica) apresentou CE₅₀ (44,53 e 27,59 µg/mL) nas suas folhas e cascas, respectivamente (SOUSA, 2007). Já o ácido gálico e a rutina apresentaram uma CE₅₀ (24,27 e 27,80 µg/mL), mostrando menor potencial antioxidante que *B.salicifolius*.

CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos estabelecidos são úteis no controle de qualidade de *B. salicifolius*. Há variação dos constituintes físico-químicos, a qual pode ser atribuída à coleta em regiões diferentes. O teor de polifenóis juntamente com os flavonoides pode justificar o potencial antioxidante do extrato bruto e suas frações justificando o uso das folhas de *B. salicifolius* na medicina tradicional.

REFERÊNCIAS

CALDERON, A.I.; VAZQUEZ, Y; SOLIS, P.N.; CABALLERO, G.C.; ZACCHINO, S; GIMENEZ, A.; PINZON, R.; CACERES, A.; TAMAYO, G.; CORREA, M.; GUPTA, M.P. Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. **Pharmacology Biological**, 44 (2): 130-40. 2006.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.18, p. 314-319, 2008.

CHANDRA,S ; MEIJA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of na Aqueous extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C.W. et a. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, p1161-1168, 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2ª edição, Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, v. III, 1032 p, 1982.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988). 4 ed., Fascículo 1 (1996), Fasc. 2 (2000), Fasc. 3 (2002), Fasc. 4 (2003), Fasc. 5 (2004), Fasc. 6 (2005). São Paulo: Atheneu Editora.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 52, p. 481-504, 2000.

ISHIKAWA, T.Y, GOTO, M. & YAMAKI, K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. **Phytomedicine** 13:310-317. 2006

LIMBERGER, R.P.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L.; MORENO, P.R.H.; RITTER, M.R.; HENRIQUES, A.T. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). **J Essent Oil Res** 13: 225-228. 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - Manual de identificação e cultivo das plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.

MATTOS, J. L. R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 92 p. 1983.

MOREIRA, E.AT., Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. *Companulaceae*. **Tribuna Farmacêutica**, V.47, n° 1, p. 13-39, 1979.

MORS WB, RIZZINI CT, PEREIRA NA. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000.

REITZ, R.; KLEIN, M.R.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul - Governo do Estado do Rio Grande do Sul**, 1988.

RIO, R. G. W. Métodos de controle químico de amostras de própolis. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

RUBERTO, G. et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extrato from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v.100, n.1, p.203-210, 2007.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.18, p 618-626, 2008.

SIQUEIRA, E. P. et al. Bioatividade dos compostos isolados de *Blepharocalyx salicifolius*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.21, n.4 p 645-651. 2011.

SIMÕES, C.M.O.; et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto-Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1104 p. 2007.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C.A.L. **Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais**. In; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 1. ed. Itajaí: Univali, 2007.

WASICKY, R.; AKISUE, G. Um novo aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade Farmácia Bioquímica USP** 7: 399 – 405. 1969.

3.3 Manuscrito 3

**Avaliação da atividade anti-inflamatória e parâmetros bioquímicos de
Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae)**

Alexandre Ribas¹, Rosana Casoti¹, Rafael Noal Moresco¹, Sergio Dalmora¹, Melânia Palermo Manfron¹.

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil.*

RESUMO: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. (Myrtaceae) conhecida popularmente como murta, é utilizada na medicina tradicional como digestivo, estabilizante da pressão arterial e nos casos de cistite e uretrites. O objetivo deste estudo foi a determinação da atividade anti-inflamatória e toxicidade hepática e renal a partir do extrato bruto hidroalcoólico a 70% das folhas de *B. salicifolius*. As análises hepatotóxicas e nefrotóxicas foram realizadas através das medidas dos níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina respectivamente. Para a avaliação do efeito anti-inflamatório utilizou-se o método da indução de formação do tecido granulomatoso pela implantação de pellets de algodão. O tratamento foi realizado por 6 dias consecutivos, por via oral, onde foram administrados 1,5 mL do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *B. salicifolius*, por gavagem, fracionado em 3 administrações diárias. O controle positivo utilizado foi nimesulida (5mg/kg/dia) e como controle negativo foi administrado propilenoglicol 20% (v/v). Após o período de tratamento, o grupo de animais controle tratados com nimesulida apresentou uma inibição do processo inflamatório de $21,42 \pm 6,52\%$, enquanto o grupo tratado com *B. salicifolius* mostrou uma inibição do processo inflamatório de $24,7 \pm 4,6\%$, quando comparados ao controle negativo de propilenoglicol 20% ($p < 0,05$). Os níveis séricos de AST, ALT e creatinina em todos os grupos de animais, não mostraram elevação significativa quando comparados ao controle negativo. A Atividade anti-inflamatória exibida pela *B. salicifolius* poderia ser associada à sua composição que contém polifenóis em abundância.

PALAVRAS-CHAVE: *Blepharocalyx salicifolius*, granuloma, AST, ALT, creatinina.

SUMMARY: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth). the Berg. (Myrtaceae) known popularly as murta, it is used in the traditional medicine as digestive, stabilizing of the arterial pressure and in the cases of cystitis and urethritis. The objective of this study was the determination of the anti-inflammatory activity and hepatic and renal toxicity from the hidroalcoólico rude extract 70% of leves of *B.salicifolius*. Hepatotoxic and nephrotoxic analyzes were performed by measuring the serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinina respectively. For the evaluation of the anti-inflammatory effect was used the method of the induction of formation of granulomatous for the implantation of cotton pellets. The treatment was carried for 6 days consecutive, by way oral, where they were administered 1,5 mL of crude extract from the leaves of *B. salicifolius*, by gavage, in three fractionated admnistrações daily. The used positive control was nimesulida (5mg/kg/dia) and as negative control was managed propilenoglicol 20% (v/v). After the period of treatment, the group of animal has controlled treat with nimesulida presented a inhibition of the inflammatory process of $21,42 \pm 6.52\%$, while the group dealt with *B. salicifolius* showed a inhibition of the inflammatory process of $24,7 \pm 4.6\%$, when compared with the negative control of propilenoglicol 20% ($p < 0,05$). The séricos levels of AST, ALT and creatinina in all the groups of animals, had not shown significant rise when comparative to the negative control. The anti-inflammatory Activity shown by the *B. salicifolius* could be associated with its composition that contains polifenóis in abundance.

KEYWORDS: *Blepharocalyx salicifolius*, granuloma, AST, ALT, creatinine.

INTRODUÇÃO

A busca pela cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas medicinais, foi uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JUNIOR et al., 2006). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.

Atualmente, mais de 13.000 espécies de plantas são utilizadas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitas das quais servem de modelo para a síntese de um grande número de fármacos. Dentre vários medicamentos obtidos de plantas medicinais está o Acheflan®, medicamento fitoterápico indicado no tratamento local de processos inflamatórios, constituído de óleos essenciais de *Cordia verbenacea* (erva-baleira) pertencente à família Borraginaceae.

O processo inflamatório é uma resposta do organismo frente a um processo infeccioso, a um antígeno ou lesão celular ou tecidual, de caráter benéfico, com o propósito de erradicar o agente agressor e promover a reparação tecidual. Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os agentes mais utilizados na terapêutica. Constituem o principal grupo de fármacos utilizados mundialmente no tratamento da inflamação, devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antipirético e analgésico atribuídos à inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) e conseguinte, inibição da síntese dos prostanóides (MARNETT, 2009). O AINE mais antigo é a Aspirina® (ácido acetilsalicílico), um derivado do ácido salicílico. Este, por sua vez, é um derivado da salicina, obtida originalmente das cascas do tronco de *Salix alba* (salgueiro) Salicaceae (VIEGAS et al., 2006).

A formação do granuloma experimentalmente desenvolvido foi através do implante subcutâneo de *pellets* de algodão em ratos, que é um método utilizado para avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios, o qual possui uma reprodutibilidade confiável devido à capacidade de interferência do cilindro implantado com os componentes proliferativos do processo inflamatório (BAILEY et al., 1982). O granuloma formado no local do implante dos *pellets* de algodão se caracteriza pela formação de uma cápsula fibrosa, vascularizada contendo fibroblastos e com infiltração de células polimorfonucleares. Quanto menor for a

cápsula fibrosa, maior será a atividade anti-inflamatória da substância testada (LE BARS et al., 2001). A indução tecido granulomatoso é um método amplamente utilizado para a avaliação de substâncias anti-inflamatórias (SWINGLE; SHIDEMAN, 1972).

A concentração sérica de enzimas específicas permite a avaliação da toxicidade hepática e renal. As aminotransferases são indicadores confiáveis de alteração funcional ou estrutural das células do fígado e aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase (AST /ALT) são úteis no diagnóstico de doenças do fígado (BITTENCOURT; SILVA, 1985; ANDRIOLO; BORGES, 1989). A determinação da creatinina sérica é um teste utilizado para avaliar a função renal (GUYTON; HALL, 2002).

A *Blepharocalyx salicifolius* é uma espécie pertencente a família Myrtaceae ocorrendo no Brasil (Goiás, Minas Gerais e da Bahia ao Rio Grande do Sul), Equador, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina (LORENZI, 2002). É conhecida popularmente como murta sendo utilizada na medicina tradicional como digestivo, estabilizante da pressão arterial e nos casos de cistite e uretrites (GALVANI; BARRENECHE, 1994; MENTZ, 1997). Nas folhas de *B. salicifolius* foi detectado a presença de flavonoides, triterpenos e taninos e óleos essenciais, no qual foram isolados e identificados seus constituintes químicos como o 1,8-cineol (25,2%), β -cariofileno (22,9 %) e linalol (20,4 %) (MATTOS, 1983; LAZZARI; HECKLER, 1996).

O óleo essencial de *B. salicifolius* apresentou atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas (LIMBERGER, 2001). Também foi observada atividade citotóxica frente à linhagem SF-268 de células cancerígenas do sistema nervoso (CALDERON et al., 2006). Cinco compostos foram isolados e ensaiados, mostrando atividade contra células tumorais, *Leishmania amazonensis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (SIQUEIRA et al. 2011).

Este estudo teve como objetivo determinar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto (EB) hidroalcoólico a 70% das folhas de *B. salicifolius*, testando o modelo de indução *in vivo* da formação de tecido granulomatoso, e avaliar a toxicidade hepática e renal através de soro de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

A *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg foi coletada em setembro de 2009, no município de Santa Maria no Estado do Rio Grande do Sul. A exsicata deste material foi identificada pelo biólogo Gilberto Dolejal Zanetti, e depositada no Herbário do Departamento de Biologia, conforme exsicata SMDB 11822. As folhas frescas foram colhidas e submetidas à secagem em estufa com ar circulante, à temperatura de 40°C e logo depois, moídas em moinho de facas e maceradas em solução de etanol 70%. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo e posteriormente liofilizado.

Animais

Para o ensaio, foram empregados ratos machos Wistar, pesando entre 180-200g foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três grupos com lote de 6 animais em cada gaiola, mantidos em temperatura (23 ± 2 °C) e umidade (55 ± 10 %) mantidos no Biotério do DFI/CCS/UFSM, onde receberam água e alimento *ad libitum*, com fotoperíodo de 24 horas/luz.

Grupo 1: controle positivo-nimesulida, Nisulid® (5mg/Kg/dia);

Grupo 2: Tratamento-EB *B.salicifolius* (300 mg/kg/dia);

Grupo 3: controle negativo- Propilenoglicol/água (20%).

Modelo *in vivo* de indução da formação de tecido granulomatoso

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato bruto (EB) hidroalcoólico das folhas de *B.salicifolius*, utilizou-se o método da indução de formação do tecido granulomatoso pela implantação de *pellets* de algodão, descrito por Meier (1950), modificado por Niemegeers (1975) e adaptado por Germano (1993).

Em condições assépticas e sob anestesia, foi efetuada uma incisão longitudinal dorsal em cada animal e implantado um *pellets* de algodão hidrófilo branco de 40 mg previamente esterilizado e imerso em solução de ampicilina a 30%. Duas horas após o implante dos *pellets* de algodão e durante sete dias consecutivos, os animais receberam 1,5 mL do extrato bruto

por gavagem, fracionado em três administrações diárias. No sétimo dia, os animais foram sacrificados, os granulomas removidos e submetidos à secagem em estufa a 60°C, por 24 horas.

O peso do granuloma foi considerado após dessecação pela diferença entre os pesos final e inicial. O percentual de Inibição (I%) do processo inflamatório foi obtido através da fórmula:

$I\% = 100 - (B \times 100/A)$, onde (A) é o peso médio do granuloma do veículo (propilenoglicol 20%); (B) é o peso médio do granuloma do tratamento com EB de *B. salicifolius*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações do Comitê Internacional de cuidados no uso de animais e de acordo com os regulamentos nacionais para a experimentação animal.

Testes bioquímicos

As dosagens bioquímicas foram realizadas em todos os ratos do teste de granuloma. No final do tratamento, 3 mL de sangue foram coletadas através de punção cardíaca dos grupos de teste, controle positivo e controle negativo. Estas amostras foram centrifugadas a 2800 rpm por 15 minutos para separar o soro. Os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina foram mensurados no sistema automatizado Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

Polifenóis totais

O doseamento de polifenóis foi realizado através do método de Folin-Ciocalteu modificado (CHANDRA; MEIJA, 2004). Para o ensaio foi preparado uma solução de 0,5 mg/mL do extrato bruto de *B. salicifolius*, no qual foi adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, após 5 min., foi acrescentado 2 mL de carbonato de sódio a 20%. Mediu-se a absorção da amostra a 730 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV 1021. As análises foram realizadas em triplicata. A curva padrão do ácido gálico foi realizada nas concentrações de 3, 6, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. O teor de polifenóis foi determinado por interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração do padrão e expressos em g de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de EB.

Flavonoides totais

A dosagem de flavonoides foi feita de acordo com Rio (1996) modificado, onde a concentração da amostra analisada foi de 400 µg /mL solubilizada em metanol (MeOH) 70% e acrescidas de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%. Foi utilizada rutina como padrão, no qual a curva do padrão foi obtida nas concentrações de 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 e 800 µg/ml. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/visível (425 nm). O teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorvância da amostra com a curva de calibração do padrão e expressos em g de equivalente de rutina por 100 gramas de EB. A análise foi realizada em triplicata.

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio padrão (DP), e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste t de Student, considerado-se níveis de significância $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O modelo de granuloma em ratos tem sido usado para avaliar a reação inflamatória crônica. Este modelo avalia a fase transudativa, exsudativa e proliferativa da inflamação crônica. Substâncias anti-inflamatórias, tais como AINEs (nimesulida) interferem no processo de formação do granuloma, suprimindo a infiltração inicial de neutrófilos no granuloma (BAILEY, 1982).

Após a administração por via oral (gavagem) de *B. salicifolius*, nimesulida e propilenoglicol 20%, os *pellets* de algodão foram retirados, secos e pesados. O resultado mostrou uma significativa inibição do processo inflamatório nos animais do grupo tratado com extrato da *B. salicifolius*. Os animais do grupo controle tratado com nimesulida tiveram um processo de inibição da inflamação $21,4 \pm 6,5\%$, enquanto o grupo tratado com *B. salicifolius* mostrou uma inibição de $24,7 \pm 4,6\%$, quando comparado ao grupo controle negativo propilenoglicol 20% ($p < 0,05$). Os resultados obtidos do extrato da *B. salicifolius* e nimesulida são similares, demonstrando que a atividade anti-inflamatória do extrato vegetal é

significativa o que vem a justificar seu uso popular.

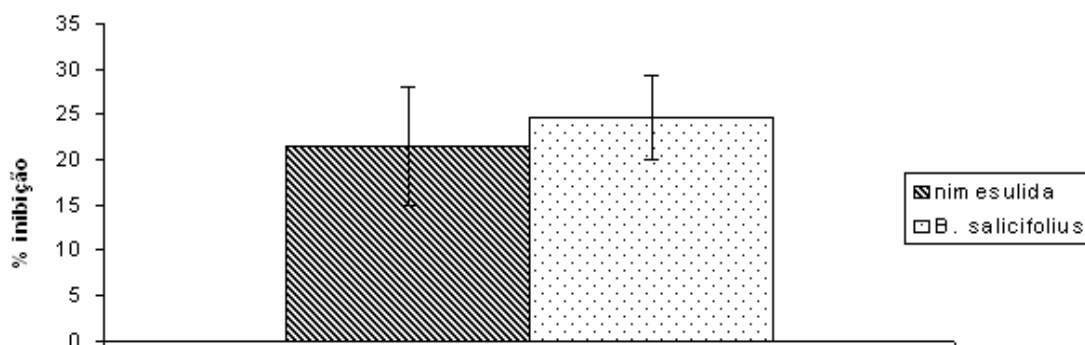


FIGURA 1 – Atividade anti-inflamatória do extrato bruto da *B. Salicifolius* (300 mg/kg/dia) e da nimesulida (5mg/Kg/dia), na inibição da formação do tecido granulomatoso em ratos Wistar .

Os resultados da atividade anti-inflamatória apresentada pelo extrato hidroalcoólico de *B. salicifolius*, pode estar associada a sua composição, que contém substâncias fenólicas como majoritárias. As quantidades de polifenóis totais e flavonoides foram determinadas pelo método espectroscópico para o extrato bruto da *B. salicifolius*, onde foram obtidas 92,67g e 24,94g de equivalente de ácido gálico e rutina por 100 g de extrato bruto, respectivamente. A ação anti-inflamatória dos flavonoides se dá através da modulação das células envolvidas com a inflamação (inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KIM et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2008; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

O extrato obtido por maceração das flores de *Arnica montana* 1%, administrados por via oral, mostraram redução do processo inflamatório muito próximo do ocorrido com a betametasona pelo método de edema de pata de rato. *A. montana* contém constituintes ativos como isoquercetina, quercetina e outros flavonóides.

O extrato de *Conocliniopsis prasiifolia* mostrou atividade anti-inflamatória *in vitro* significativa em concentrações de 25 e 50 μ g/mL pelo método de inibição de degranulação de neutrófilos em ratos, onde se atribuiu a atividade a presença de flavonoides (MACEDO, 2004). Além da comprovação das atividades farmacológicas é essencial o estudo biológico de avaliação toxicológica. A avaliação de ensaios de toxicidade renal e hepática são fundamentais para assegurar o uso farmacológico seguro de um fitoterápico.

O tratamento realizado com extrato hidroetanólico da *B. salicifolius* não induziu a modificações no perfil bioquímico de AST e ALT (tabela 1), sugerindo que não houve danos no fígado ou lesão tecidual nos animais testados com as respectivas doses de *B. salicifolius*. Além disso, os resultados mostraram que não houve comprometimento da função renal nas doses testadas, porque nenhum aumento significativo dos níveis de creatinina foi observado.

TABELA 1 – Valores das dosagens bioquímicas realizadas após o término do ensaio do granuloma em ratos Wistar.

	<i>B. salicifolius</i>	Nimesulida	Propilene glicol 20%
	$\bar{X} \pm PD$	$\bar{X} \pm PD$	$\bar{X} \pm PD$
AST (U/L)	134,00±16,55	130,17±14,26	149,33±49,38
ALT (U/L)	60,00±14,18	55,50±8,76	53,00±14,59
Creatinina (mg/dL)	0,17±0,04	0,19±0,09	0,22±0,06

Estas enzimas estão amplamente distribuídas nas [células](#), especialmente no [fígado](#) e no [miocárdio](#), além de estar presente nos rins e músculo esquelético, em baixa taxa sanguínea em humanos. Esta taxa se eleva consideravelmente em caso de lesões celulares. O aumento do teor de AST pode indicar [infarto](#) do miocárdio e o de ALT, lesão hepática. A AST e ALT são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. A necrose em si não é necessária, e há baixa correlação entre o grau de lesão hepatocelular e o nível das aminotransferases. Por isso, a elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado diagnóstico e não prognóstico nas hepatopatias agudas (MOTTA, 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados pelo extrato hidroalcoólico das folhas da *Blepharocalyx salicifolius* mostraram que o extrato foi capaz de inibir significativamente a formação de tecido granulomatoso no modelo *in vivo* sem causar danos ao fígado ou aos rins, nas doses testadas. Esta atividade anti-inflamatória pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides nas suas folhas, as quais são substâncias com propriedades anti-inflamatórias.

REFERÊNCIAS

ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya Senegalensis* on some biochemical parameters of Rat Kidney. **Journal of Ethnopharmacology** 88: 69-72. 2003.

ANDRIOLO, A.; BORGES, D. R. Enzimologia Clínica em doenças do fígado. **Revista Brasileira de Patologia Clínica.**; 25: 95-8. 1989.

BAILEY, P. J. Biochemical Study of the cotton pellets granuloma In Rats. **Biochemical Pharmacology** 31: 1213-8. 1982.

BITTENCOURT, P. L. E SILVA, L.C. **Fígado e Drogas**. In: Fígado e Drogas: Compêndio de Hepatologia. 2 ed. São Paulo; p.264-85. 1985.

CALDERON, A. I.; VAZQUEZ, Y.; SOLIS, P.N.; CABALLERO, G. C.; ZACCHINO, S.; GIMENEZ, A; PINZON, R.; CACERES, A.; TAMAYO, G.; CORREA, M.; GUPTA, M. P. **Screening of Latin American plants for cytotoxic activity**. Pharm Biol. 44 (2): 130-40. 2006.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 8, 1429. 2008.

CHANDRA,S; MEIJA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of na Aqueous extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.52, p. 3583-3589, 2004.

GALVANI, F. R; BARRENECHE, M. L. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Revista da FZVA**. Uruguaiana 1(1): 1-14. 1994.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, M.; Miguel, O.; Germano, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v.7, n.27, p.6-11. 1993.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan. 2002.

HAVSTEEN, B. H. **Pharmacology Ther** 96, 67, 2002.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. **J. Pharmacology Science**, 96, 229, 2004.

LAZZARI, A.; HECKLER, E. Murta – *Blepharocalyx salicifolius* (Berg.): estudo fitoquímico. In: **Congresso Nacional de Botânica**, 47. Nova Friburgo. Resumos: Sociedade Botânica do Brasil. 1996.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacology**, V. 53, p 597-652, 2001.

LIMBERGER, R. P.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L., MORENO, P.R.H.; RITTER, M.R.; HENRIQUES, A.T. **Essential oils from four Mikania species (Asteraceae)**. J Essent Oil Res 13:225-228. 2001.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; de MEDINA, F. S. **Biochemical Pharmacology** 76, 495, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil - 2ª edição**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 384 p. 2002.

MACEDO, S.B; FERREIRA,L.R; PERAZZO,F.F; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflamamory activity of *Arnica montana* 6 cH: preclinical study in animals. **Homeopathy**. v.93, p. 84-87, 2004.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-90, 2009.

MATTOS, J. L. R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 92 p. 1983.

MEIER, R.; SCHULER, W.; DESAULLES, P. Usnic Acid: Tumor inhibitor isolated from lichens. **Experimentia** 6: 469-471. 1950.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia** 13 (1): 25-48. 1997.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. **Pharmacol Rev** 52, 673, 2000.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o laboratório, Princípios e Interpretações**. Ed. Educ, 4^a ed. 2003.

NIEMEGEREERS, C. J. E.; AWOUTERS, F.; LENAERTS, F. M.; JANSSEY, A. J. The activity of suprofen on nystatin-induced paw oedema In Rats. **Arzneimittel-Forschung** 23, 1516-1519.1975.

RIO, R. G. W. Métodos de controle químico de amostras de própolis. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIQUEIRA, E. P. et al. Bioatividade dos compostos isolados de *Blepharocalyx salicifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** vol.21, n.4 p 645-651. 2011.

SWINGLE, K. F. & SHIDEMAN. F. E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 226-234. 1972.

VIEGAS-JUNIOR C; DA SILVA BOLZANI, V; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

4 DISCUSSÃO GERAL

A análise macroscópica das folhas de *B. salicifolius* revelou que a mesma segue o padrão dos caracteres morfológicos descritos para a família Myrtaceae, destacando-se a venação do tipo peninérvia e a presença de pequenas pontuações translúcidas por toda a lâmina foliar (SCHULTZ, 1985; BARROSO, 1991; JOLY, 2002; GONÇALVES; LORENZI, 2007). A nervura intramarginal contínua, descrita para as folhas de Myrtaceae foi confirmado para as folhas de Murta (CRONQUIST, 1981).

Características marcantes no controle de qualidade das folhas de *B. salicifolius* é a lâmina foliar discolor, não apresentar pilosidade, e a venação ser broquidódroma, predominante em Mirtaceas, o que a diferencia de *Psidium guajava*, *Psidium australe* e *Campomanesia pubescens* as quais apresentam venação do tipo acródromo-broquidódromo. Estas apresentam a nervação última marginal em arcos, enquanto que *Psidium firmum*, *Calycolpus legrandii* e *Acca sellowiana* a nervação última marginal é fimbrial, o que em *B. salicifolius* é incompleta, que diferenciam espécies muito próximas (CARDOSO; SAJO, 2004).

O pecíolo em *B. salicifolius* é achatado e, em secção transversal, é biconvexo diferindo de *Eugenia uniflora* que é côncavo-convexo (FARM. BRAS. 5^a ed., 2010).

A ocorrência de cavidades secretoras, a abundância de oxalato de cálcio na forma de cristais e estômatos anomocíticos, conforme Metcalfe e Chalk (1950) e Solereder (1908), são características comuns para a família.

As folhas de *B. salicifolius* na face adaxial apresentam células epidérmicas de parede celular sinuosa, e na face abaxial as células são de parede reta, o que permite diferenciá-la de espécies como *Eugenia uniflora* e *Eucaliptus globulus*, que possuem células epidérmicas do tipo poligonal nas duas faces epidérmicas (FARM. BRAS. 5^a ed., 2010). A epiderme de *B. salicifolius* uniestratificada, é semelhante à de *Eugenia uniflora*, contudo, serve como diferencial para outras espécies de Myrtaceae em que a epiderme é pluriestratificada. A cutícula espessa e plicada, com um maior acúmulo de material na região central das paredes periclinais das células epidérmicas, que a diferencia de *Eugenia uniflora*, que possui cutícula fina. Células mucilaginosas nas duas faces epidérmicas de *B. salicifolius* a diferencia de espécies como *Eucaliptus globulus*, *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* (FARM. BRAS. 5^a ed., 2010). Os estômatos do tipo anomocíticos e anisocíticos,

característicos em Myrtaceae (Metcalf e Chalk, 1950), diferem de *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* que apresentam apenas estômatos anomocíticos. Estômatos projetados em relação às células epidérmicas (*P. guajava*), Farm. Bras. 5^a ed., (2010), em *B.salicifolius* estão dispostos no mesmo nível das células epidérmicas.

Ausência de tricomas diferencia a murta de inúmeras espécies como *Psidium guajava* que possui tricomas tectores simples dispostos em maior quantidade na face abaxial (FARM. BRAS. 5^a ed., 2010). Característica anatômica importante, pois os tricomas geralmente permanecem íntegros mesmo em drogas pulverizadas.

O mesofilo em *B.salicifolius* é heterogêneo e simétrico, o parênquima paliádico é isofacial, com células de maior tamanho na paliçada subjacente à epiderme da face adaxial, diferente de *Psidium guajava*, *Eugenia uniflora*, *Syzygium cumini*, que apresentam mesofilo bifacial. No parênquima esponjoso, os espaços intercelulares em *B. salicifolius* são do tipo câmara, enquanto que em *Psidium guajava* são do tipo meato (FARM. BRAS. 5^a ed. 2010).

Os feixes vasculares de *B.salicifolius*, são do tipo colateral, envolvidos por uma bainha de células parenquimáticas, o que a diferencia de *P. guajava*, que possui feixes vasculares do tipo bicolateral em arco aberto, outras espécies de Myrtaceae como *E.globulus* e *E.uniflora* o sistema vascular é do tipo bicolateral fechado (FARM. BRAS. 5^a ed., 2010).

O cultivo, o clima, o solo, a área geográfica, a irrigação, os procedimentos para a coleta, a época do ano, o período do dia, e o órgão vegetal, são fatores que asseguram a qualidade de drogas vegetais como também o monitoramento da presença de contaminantes (OMS, 2003).

A caracterização fitoquímica das folhas da *B.salicifolius* evidenciou a presença de esteroides, triterpenos e compostos fenólicos principalmente flavonoides, saponinas e taninos. O óleo volátil teve um rendimento de 0,15-0,18 %, o que é corroborado por Mattos (1983), o qual encontrou o teor de 0,17%, e identificou os constituintes do óleo volátil de *B. salicifolius* como 1,8-cineol (25,2%), beta-cariofileno (22,9 %) e linalol (20,4 %).

As determinações de cinzas totais (7,01-9,72)%, cinzas insolúveis em ácido clorídrico (0,21-0,35)%, cinzas sulfatadas (5,90-6,43)% e teor de umidade (6,26-6,70)% estão de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4^a ed. (2003), que discrimina no máximo, para cinzas totais de 12%, cinzas insolúveis em HCl de 2% e teor de umidade de 14%.

As cinzas totais são derivadas de tecido vegetal, de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga, portanto importante para o controle de qualidade, pois a presença de impurezas inorgânicas não voláteis indica contaminantes da droga vegetal,

(FARM. BRAS. 4^a ed., 1988, 2000). O teor de água indica as condições de armazenamento, que excedendo o limite preconizado pode indicar contaminação microbiana ou degradação dos seus constituintes químicos.

O extrato bruto da *B.salicifolius*, quando administrado por via oral, produziu uma significativa inibição do processo inflamatório no modelo de granuloma em ratos, em $24,7 \pm 4,6\%$, quando comparado ao controle negativo (propilenoglicol), demonstrando significativa atividade anti-inflamatória.

Os resultados da atividade anti-inflamatória da *B.salicifolius* podem estar associados às substâncias fenólicas devido ao teor de polifenóis, em torno de 90% e o de flavonoides de 24%. *Conocliniopsis prasiifolia* também apresentou atividade anti-inflamatória significativa pelo método de inibição de degranulação de neutrófilos em ratos, a qual foi atribuída aos flavonoides presentes nessa espécie (MACEDO, 2004).

O extrato bruto e todas as frações apresentaram atividade antioxidante na concentração de 100 µg/mL, sendo que no extrato bruto (91,34%) e nas frações acetato (86,33%) e hexânica (78,62%) esta atividade foi maior. Esta atividade antioxidante pode ser explicada pela presença de substâncias fenólicas, as quais são capazes de inibir os radicais livres.

O extrato da *B.salicifolius* não alterou os níveis séricos de AST e ALT, sugerindo que não houve danos ao fígado. Também não houve comprometimento da função renal nas doses testadas, já que os níveis de creatinina não foram alterados significativamente.

Os resultados obtidos corroboram com a necessidade de estudos mais aprofundados quanto à toxicidade, ao mecanismo de ação, isolamento de substâncias responsáveis pelas atividades biológicas da *B.salicifolius*, visando uma aplicação farmacêutica.

5 CONCLUSÕES

- ✓ As características morfo-anatômicas da *B.salicifolius* são compatíveis com as descritas para Myrtaceae.
- ✓ A lâmina foliar é discolor, com consistência cartácea e venação peninériva do tipo broquidódromo.
- ✓ A epiderme é uniestratificada com inúmeras células mucilagenosas, estômatos do tipo anomocíticos e anisocíticos, com ausência de tricomas.
- ✓ O mesofilo é heterogêneo e simétrico, o feixe vascular é colateral fechado e rodeado por uma bainha parenquimática.
- ✓ Há a presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de drusa e estruturas secretoras arredondadas, características consistentes que em conjunto, contribuem no controle botânico das folhas.
- ✓ Os teores de polifenóis e flavonoides no extrato bruto hidroalcoólico da *B. salicifolius* podem justificar o seu uso como anti-inflamatório.
- ✓ O poder antioxidante da *B.salicifolius* pode estar relacionado à presença de substâncias polifenólicas, que combatem os radicais livres.
- ✓ O extrato da *B.salicifolius* inibiu significativamente a formação de tecido granulomatoso em ratos.
- ✓ O extrato da *B.salicifolius* não apresentou alteração nas dosagens séricas da AST e ALT e creatinina.
- ✓ O extrato da *B.salicifolius* não apresentou toxicidade hepática e renal em ratos nas doses testadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. Baccharis (Compositae): a review update. **Arkivoc**, 7:76-96. 2007.

ABASCAL, K.; YARNELL, E. Clinical uses of *Zingiber officinale* (Ginger). **Alternative Complement Therapy**, 15:231-7. 2009.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Trad. Farias, A. S.): **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.

ABEBE, W. **Jouranl Clinical Pharmacology Therapy**, 27:391-401. 2002.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram** 28: 13-19. 1993.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 117-126. 2008.

ALI, A.; GILANI, A.H. Medicinal value of Ginger with focus on its use in nausea and vomiting of pregnancy. **Intern Journal Food Properties**, 10:269-78. 2007.

ALI, B. H.; BLUNDEN G.; TANIRA M.O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food Chemical Toxicology**, 46:409-20. 2008.

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In Cerrado: ambiente e flora. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, 1998, 556 p.

AMARAL, F. M. M.; ROSA, L. M. V.; COUTINHO, D. F.; GONÇALVES, L. H.; RIBEIRO, M. N. Qualidade Microbiológica das cascas do caule de *Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb. Comercializadas Em São Luís/Maranhão. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 65-70, Jul.-Dez./2001.

APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and

families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436, 2003.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; NHADUCUE, P. F.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L.(Compositae) on gastrointestinal tract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12(Suppl 1):31-3. 2002.

BAILEY, P. J.; STURM, A.; LOPES-RAMOS, A. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexametasona and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**, V. 31, p. 1213-1218, 1982.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - A Review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 443 p. 1991.

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M. & H. DERENDORF, H. **Phytomedicine**, 9: 1-33. 2002.

BLUMENTAHL, M. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Austin: American Botanical Council. 1998.

BOTTING, R. M. **Journal Thermal Biological**, 21, 208, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RESOLUÇÃO RDC Nº 79, De 04/11/ 2008: Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº. 344, de 12 de maio de 1998. Disponível em: www.anvisa.gov.br

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº. 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. Acesso em 15 set 2011. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC nº 14, de 31/03/2010: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: www.anvisa.gov.br

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. **Pediatrics** (São Paulo),27, 181, 2005. [\[Link\]](#)

BUGNO, A.; BUZZO, A. A.; et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.41 n. 4, Oct./Dec. 2005.

CALDERON, A. I.; VAZQUEZ, Y.; SOLIS, P.N.; CABALLERO, G. C.; ZACCHINO, S.; GIMENEZ, A; PINZON, R.; CACERES, A.; TAMAYO, G.; CORREA, M.; GUPTA, M. P. **Screening of Latin American plants for cytotoxic activity**. *Pharm Biol.* 44 (2): 130-40. 2006.

CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. 1. ed. Chapecó: Argos – Ed Universitária, 77p. Capítulo 2: Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. 2001.

CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas Medicinais e de Rituais Afrobrasileiros II**, São Paulo: Ícone editora. 1998.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia L.*(Myrtaceae) da bacia hidrográfica do rio Tibagi, PR. **Revista Brasileira de Botânica**, 27: 47-54. 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas,. v.2, 627 p. 2006.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 8, 1429. 2008.

CHATTOPADHYAY, I.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R. K. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Curr Sci.** 87:44-53, 2004.

CHUN, S. S.; VATEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K.; **Process Biochemical**, 40, 809. 2005.

CLAVIN, M.; GORZALCZANY, S.; MACHO, A.; MUÑOZ, E.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C.; MARTINO, V. **Journal Ethnopharmacol**, 112, 585, 2007.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*.

Revista Brasileira de Farmacognosia, 15: 272-278. 2005.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. **Plantas Mediciniais do cultivo à terapêutica**. Petrópolis: Ed. Vozes. 1998.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.); *Robbins – Patologia Estrutural e Funcional*, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

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

DE LA CRUZ, M. G. **Plantas medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros**. Cuiabá: Carlini Caniato, p.32, 2008.

DENARDI, L.; MARCHIORI, J.N.C. Anatomia ecológica da madeira de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n.2, p. 119-127, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP. 1996.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**, Barueri: Editora Manole. 2001.

ELISABETSKY, E.; SETZER, R. **Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia**. In: Parker, E.P. (Ed.) *The Amazon Caboclo: historical and contemporary perspectives* 243-278. 1985.

ESPINOSA, E. E. **Uso farmacéutico de las hojas de alcachofa**. *Offarm*. 22:138-40. 2003.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, cap. 10, p. 229-245, 2007.

FARELLI, M. H. **Plantas que curam e cortam feitiços**. 6ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Pallas. 2000.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: 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*. 6. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.263-288. 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988). 4 ed., Fascículo 1 (1996), Fasc. 2 (2000), Fasc. 3 (2002), Fasc. 4 (2003), Fasc. 5 (2004), Fasc. 6 (2005). São Paulo: Atheneu Editora.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5^a ed. Brasília: Ed. Fiocruz, Livro 2. 2010.

FUGH-BERMAN, A. **Lancet** 355: 134-8. 2000.

GALVANI, F. R; BARRENECHE, M. L. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiiana (RS). **Revista da FZVA**. Uruguaiiana 1(1): 1-14. 1994.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. **Cardiovascular Research**, v. 32, n. 4, p. 720-32, 1996.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidades de medicamentos**. São Paulo: Pharmabooks, p. 289-290. 2007.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n. 3, p. 632-639, 2005.

GONÇALVES, E.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal** - Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. São Paulo: Nova Odessa. Instituto Plantarum, 416 p. 2007.

GOODMAN, L. S. *et al.* **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11th. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GOVAERTS, R., M. et al. **World checklist of Myrtaceae**. Local: Royal Botanic Gardens, Kew, 2008. 455 p. Disponível em: <http://www.kew.org/wcsp/>. Acesso em 29/08/2011.

GREEN, G. B.; HARRIS, I. S.; LIN, G. A.; MOYLAN, K. C. **The Washington Manual of Medicine Therapeutics**, 31^a edição, Lippincott Williams e Wilkins, St. Louis, U.S.A. 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 10^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.

HARIZI, H. et al. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in molecular medicine**, v. 14, n. 10, p. 461-9, 2008.

HASLAM, E.; **Journal of natural products**, 59, 205. 1996.

HAVSTEEN, B. H. **Pharmacology Therapy**, 96, 67, 2002.

HICKOK, J. T.; ROSCOE, J. A.; MORROW, G. R.; RYAN, J. L. A phase II/III randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of ginger (*Zingiber officinale*) for nausea caused by chemotherapy for cancer: a currently accruing URCC CCOP Cancer Control Study. *Support Cancer Ther.* 4:247-50. 2007.

IOANNIDES, C. **Xenobiotica** 32: 451-78. 2002

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12^a Ed. São Paulo: Ed. Nacional. 2002.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer associates, Massachusetts, 2002.

JUDD, W. S., et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 612 p. 2009.

JUTEL, M. et al. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009.

KATZUNG, B. G. **Basic & clinical pharmacology**. 9th. ed. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, 2004.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. **Journal Pharmacology Science**, 96, 229, 2004.

KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LI M A-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, v. 2. 627 p. 2006.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae)*. New York: New York Botanical Garden, 1986, p.116-160. (Flora Neotropica Monograph, n. 45).

LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, (49):508-36, 1997.

LÄTTIG, J.; BÖHL, M.; FISCHER, P.; TISCHER, S.; TIETBÖHL, C.; MENSCHIKOWSKI, M.; GUTZEIT, H. O.; METZ, M.; PISABARRO, M. T. **Journal Comput. Aided Mol. Des.** 21, 473, 2007.

LAZZARI, A.; HECKLER, E. Murta – *Blepharocalyx salicifolius* (Berg.): estudo fitoquímico. In: Congresso Nacional de Botânica, 47. Nova Friburgo. Resumos: Sociedade Botânica do Brasil. 1996.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception . **Pharmacology**, V. 53, p 597-652, 2001.

LEHÁR, J.; KRUEGER, A. S.; AVERY, W.; HEILBUT, A. M.; JOHANSEN, L. M.; PRICE, E. R. et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. **Natural Biotechnology**, 27:659-66. 2009.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – Myrcia. In: REITZ, P. R. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1969. p. 218-330.

_____. Mirtáceas – Myrciaria, Pseudocaryophyllus, Blepharocalyx, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: REITZ, P. R. Flora Ilustrada Catarinense. 1978. p. 733-876.

LIMBERGER, R. P.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L., MORENO, P.R.H.; RITTER, M.R.; HENRIQUES, A.T. **Essential oils from four Mikania species (Asteraceae)**. *J Essent Oil Res* 13:225-228. 2001.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; de MEDINA, F. S. **Biochemical Pharmacology**, 76, 495, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil - 2ª edição**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 384 p. 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3): 429-38. 2002.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das Angiospermas: Myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265 - 90, 2009.

MARQUES, T.P. 2007. **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**. Curitiba, 244 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Paraná. 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D. C.; Dias J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 220 p. 1994.

MATTOS, J. L. R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 92 p. 1983.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, 13 (1): 25-48. 1997.

METCALFE, C. R., CHALK, L. **Anatomy of The Dicotyledons**. London: Oxford University press, Amen Hause.1950.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. **Pharmacol. Rev.** 52, 673, 2000.

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. 1999. **Laboratório para o clínico**. 8ª ed. São Paulo: Editora Arheneu, p.60, 1999.

MILES, D. H.; ROSA DEL MEDEIROS, J. M.; CHITTAGONG, V.; SWITHENBANK, C.; LINDERT, Z.; WEEKS, J.A.; ATWOOD, J.L. & HEDIN, P.A. 3-Formyl-2,4,6-Trihydroxy-

5"-methyl-dihydrochalcone, A prospective New Agrochemical from *Psidium acutangulum*. **Journal Natural Products**, 6 (53): 1548-1551, 1990.

MILES, D. H.; ROSA DEL MEDEIROS, J. M.; CHITTAGONG, V.; HEDIN, P.A.; SWITHEBANK, C. & LINDERT, Z. 3-Formyl-2,4,6-Trihydroxy-5"-methyl-dihydrochalcone from *Psidium acutangulum*. **Phytochemical**, (30): 1131-1132, 1991.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o laboratório Princípios e Interpretações**. Ed. Educ, 4^a edição, 2003.

MOURA, A. C.; SILVA, E. L.; FRAGA, M. C.; WANDERLEY, A. G.; AFIAPOUR, P.; MAIA, M. B. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. **Phytomedicine**, 12:138-42. 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; **Journal of Chromatography**, A, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal Medicines: A guide for health-care professionals**. London: The Pharmaceutical Press. 1996.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. **American Journal of Clinical Nutrition**, 74, 418, 2001.

NOWACK, R. Review article: cytochrome P450 enzyme, and transport protein mediated herb-drug interactions in renal transplant patients: grapefruit juice, St John's Wort—and beyond! **Nephrology (Carlton)**.13:337-47. 2008.

OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M.A.; ADEDAPO, A. D.; MAKINDE, J. M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. **Journal Ethnopharmacology**, 95:139-42. 2004.

O'LEARY, K. A.; DE PASCUAL-TEREASA, S.; NEEDS, P. W.; BAO, Y. P.; O'BRIEN, N. M.; WILLIAMSON, G. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen**. 551, 245, 2004.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

OLIVEIRA, A. C.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A.; BRANÃO, M. G.; COELHO M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal Ethnopharmacology**, 102:465-9. 2005.

OMS. **Informe sobre la salud en el mundo 2008**: La atención primaria de salud, más necesaria que nunca. Geneva: Organização Mundial da Saúde; 2008.

PATEL, J.A.; GOHIL, K. J. Warfarin-herb interactions: a review and study based on assessment of clinical case reports in literature. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, 7:85-99. 2008.

PENZAK, S. R.; JANN, M. W.; COLD, J. A.; HON, Y. Y.; DESAI, H. D.; GURLEY, B. J. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *J Clin Pharmacol.* 41:1059-63. 2001.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. **Microcirculation**, v. 7, n. 3, p. 147-61, 2000.

PISCITELLI, S. C. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. **Clin Infect Dis** 34: 234-238. 2002.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Sub-cellular biochemistry**, v. 42, p. 3-27, 2007.

RAJAKARIAR, R. *et al.* COX-2 in inflammation and resolution. **Molecular interventions**, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Trad. Do Nascimento, A. P.); **Farmacologia**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 18(3): 613-627. 2004.

SANNTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. **Ann Ist Super Sanità**, 43, 394, 2007.

SAUTEBIN, L. **Fitoterapia**. 71, S 48, 2000.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L.; Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2007.

SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. Porto Alegre: UFRGS, 1985.

SCOTT, G. N.; ELMER, G. W. Update on natural product — drug interactions. **Am J Health Syst Pharm**. 59:339- 47. 2002.

SCHOLZ, E. Planziliche Gerbestoffe: Pharmakologie und Toxikologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 134, n. 34, p. 3167-3179, 1994.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIANI, A. C, BRANQUINHO, L. F. Extração e análise química de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae. V **Reunião de Iniciação Científica da Fundação Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, (27): 86-92, 2005.

SILVA JÚNIOR, M. C. **100 árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília, DF: Rede de sementes do Cerrado, 278 p. 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2007.

SIQUEIRA, E. P. et al. Bioatividade dos compostos isolados de *Blepharocalyx salicifolius*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.21, n.4 p. 645-651, 2011.

SOARES, S. E.; **Revista de Nutrição**, 15, 71. 2002.

SOBRAL, M. **A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 215 p. 2003.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica sistemática** - guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum. 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação de famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado no APGII. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 703 p 2008.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.; ÖSTASAN, N.; SÜLEYMAN, B. Antiinflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. **Polish Journal of Pharmacology**, V. 56, p. 775-780, 2004.

TAHARA, S. **Bioscience, Biotechnology, Biochemical**, v.71, p. 1387, 2007.

THEOHARIDES, T. C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LY TINAS, M. **Journal Immunopathology Pharmacology**, v.14, p.119, 2001.

TIFFANY, N.; BOON, H.; ULBRICHT, C.; BASCH, E.; BENT, S.; BARRETTE, E. P. et al. Horsechestnut: a multidisciplinary clinical review. **Journal Herbal Pharmacotherapy**, v. 2, p. 71-85, 2002.

TRAVERSA, G.; BIANCHI, C.; DA CAS, R.; ABRAHA, I.; MENNITI-IPPOLITO, F.; VENEGONI, M. Cohort study of hepatocity associated whit nimesulida and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **British Medicin Journal**, v. 327, p. 901-909, 2004.

TRES, J. C. Interaction between medicines and medicinal plants. *An Sist Sanit Navar*. 6;29:233-52, 2006.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflammation : a review of the process**. 5th. ed. Chicago: Quintessence Pub. Co., 1997.

VANE, L. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, v. 38, p. 97-120, 1998.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112-9, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 26-31, 2005.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, A. C. M.; SOARES, A. P. C.; LAINETTI, R. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 81, p. 11-3, 2000.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, p. 536-539, 2004.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, p. 585, 2005.

WHITTLE, B. J. R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental and Pharmacology**, v. 17, p. 301-313, 2003.

WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization. 1998; 1999; 2002.