



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE MEDICAMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RACHEL OLIVEIRA DE SOUZA MARINHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *BYRSONIMA SERICEA* E SUA
APLICAÇÃO EM DERMOCOSMÉTICA**

Rio de Janeiro

2008

RACHEL OLIVEIRA DE SOUZA MARINHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *BYRSONIMA SERICEA* E SUA
APLICAÇÃO EM DERMOCOSMÉTICA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadores:

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral, UFRJ

Profa. Dra. Tereza Cristina dos Santos, FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2008

Marinho, Rachel Oliveira de Souza

Estudo Fitoquímico da Espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em
dermocosmética - 2008.

xxi, 100 f.: il..

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro,

2008

Orientador: Lúcio Mendes Cabral

1. *Byrsonima sericea*. 2. Friedelina. 3. Lupeol. 4. Betulina. 5. Anti-
malarial. 6. DMAE bitartarato. I. Cabral, Lúcio Mendes (Orient.). II.
Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *BYRSONIMA SERICEA* E SUA APLICAÇÃO EM DERMOCOSMÉTICA.

RACHEL OLIVEIRA DE SOUZA MARINHO

**Comissão Avaliadora da
Dissertação para obtenção do Grau de MESTRE**

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral
Orientador

Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva
NPPN - UFRJ

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Profa. Dra. Lúcia Cruz de Sequeira Aguiar
NPPN - UFRJ

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2008.

Dedico esta dissertação à José, Maria, Nana e Dani.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, José e Maria, por seu amor incondicional, incentivo e apoio. Por me ensinarem a ter persistência e a ser fiel aos princípios ensinados. A Ana Paula por ser tão querida e sempre ter uma palavra de incentivo.

Agradeço ao marido Daniel, pelo amor, carinho, incentivo e por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos meus orientadores, professores Lúcio Mendes Cabral e Tereza Cristina dos Santos, pela disponibilidade, boa vontade, incentivo e amizade.

Agradeço aos professores Carlos Rangel Rodrigues e Maria Bernadete Riemma Pierre, membros da Comissão de Acompanhamento. À professora Gisela Dellamora Ortiz, coordenadora do curso de pós-graduação e a professora Valéria Pereira de Sousa, pelo empenho e boa vontade. À professora Ana Claudia de Macêdo Vieira pela coleta, identificação da matéria prima vegetal, caracterização anatômica, histológica e química da espécie.

Agradeço aos amigos Ilídio, Ana Helena e Gláucia pelo apoio, incentivo e pelas horas divertidas.

Agradeço a Dra. Lair Monteiro Ramos pela compreensão.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presente e que me ajudaram a concluir esta etapa.

*“ É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver”*

Martin Luther King

RESUMO

MARINHO, Rachel Oliveira de Souza. **Estudo Fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

O gênero *Byrsonima* é composto por cerca de 150 espécies, pertence à família Malphigiaceae e está amplamente distribuída na América Central e do Sul. Seus frutos são utilizados com finalidade alimentícias e as espécies possuem indicações terapêuticas tradicionais como anti asmática e para infecções na pele. Dentre as espécies do gênero, existem poucos estudos fitoquímicos relacionados, principalmente relacionado à espécie *Byrsonima sericea*. O estudo anatômico, histológico e fitoquímico desta espécie de uso etnofarmacológico consagrado, assim como avaliação em formulação dermocosmética e em terapia representam uma grande contribuição para a caracterização deste gênero. As substâncias friedelina e lupeol foram identificadas a partir da avaliação fitoquímica da partição hexânica do extrato etanólico. A substância friedelina foi identificada pela primeira vez na espécie. A substância betulina foi isolada a partir da partição em diclorometano. Dentre as partições testadas no teste anti-malarial, a partição em acetato de etila apresentou melhor resultado em relação à taxa de sobrevivência e à parasitemia nos animais infectados. A formulação dermocosmética contendo DMAE Bitartarato, ativo dermatológico de amplo uso na indústria cosmética por ações na promoção da elasticidade e firmeza da pele, e extrato etanólico de *Byrsonima sericea* apresentou resultados compatíveis a estabilidade para o período de 12 meses. Assim, com os resultados obtidos nas investigações fitoquímicas e farmacológicas, evidencia-se o potencial da espécie para atividade anti-malarial.

Palavras-chave: *Byrsonima sericea*, friedelina, lupeol, betulina, anti-malarial

ABSTRACT

MARINHO, Rachel Oliveira de Souza. **Estudo Fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The genus *Byrsonima* is composed for approximately 150 species, belongs to the Malphigiacea family and is widely distributed in Central and South America. Their fruits are used for medicinal purposes, as anti-asthmatics and in skin infections. Among the species that encompass the genus, there are limited phytochemical investigation, especially related to the specie *Byrsonima sericea*. The anatomical, histological and phytochemical studies from these specie with ethnopharmacological use, as with dermocosmetic and in therapy evaluation represents a large contribution for this genus characterization. The phytochemical evaluation from hexanic partition of ethanolic extract afforded substances friedelin and lupeol. The substance friedelin was identified at the first time in this specie. The substance betulin was isolated from dicloromethane partition. Among the partitions tested in anti malarial test, ethyl acetate showed the best results linked to the survival rate of infected animals and parasitemia. The dermocosmetic formulation with DMAE bitartrate, widespreadly used in cosmetic industry promoting elasticity and firmness of the skin, and ethanol extract of *Byrsonima sericea* presented itself stable for use for 12 months. Thus, with the results obtained in phytochemical and pharmacological research shows the potential of the specie to the isolation of new molecules with anti-malarial activity.

Keywords: *Byrsonima sericea*, friedelin, lupeol, betulin, anti-malarial

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 - Substâncias isoladas na espécie <i>Byrsonima crassa</i>	23
Figura 02 - <i>Byrsonima crassifolia</i> – arbusto, flores e frutos.	28
Figura 03 - Substâncias isoladas na espécie <i>Byrsonima crassifolia</i> .	29
Figura 04 - <i>Byrsonima verbascifolia</i> – árvore e flores.	31
Figura 05 - Substâncias isoladas na espécie <i>Byrsonima verbascifolia</i> .	31
Figura 06 - <i>Byrsonima sericea</i> – árvore e botão floral com abelha da espécie <i>Epicharis nigra</i> retirando óleo floral.	33
Figura 07 - Substâncias isoladas na espécie <i>Byrsonima sericea</i> .	33
Figura 08 - Camadas da pele.	35
Figura 09 - Esquema representativo das vias propostas para permeação de drogas no Estrato Córneo.	37
Figura 10 - Substâncias de natureza terpênica utilizadas como promotores de absorção.	42
Figura 11 - Estruturas representativas: DMAE, Colina e Acetilcolina.	44
Figura 12 - Preparo do extrato bruto em etanol e respectivas partições em n-hexano, diclorometano e acetato de etila.	50
Figura 13 - Partição em hexano das folhas de <i>Byrsonima sericea</i> .	55
Figura 14 - Obtenção da substância BS 01.	56
Figura 15 - Obtenção da substância BS 02.	57
Figura 16 - Partição em diclorometano das folhas de <i>Byrsonima sericea</i> .	58
Figura 17 - Obtenção da substância BS 03.	60
Figura 18 - Arbusto ou arboreta representativo da espécie <i>Byrsonima sericea</i> .	64
Figura 19 - Corte transversal da região mediana da folha de <i>Byrsonima sericea</i> .	66
Figura 20 - Mesófilo com parênquima paliádico e esponjoso.	66
Figura 21 - Nervura central da região mediana da folha de <i>Byrsonima sericea</i> .	67
Figura 22 - Tecido parenquimático com presença de substâncias fenólicas.	68
Figura 23 - Tecido parenquimático com presença de substâncias lipofílicas.	68
Figura 24 - Estruturas isoladas e identificadas na partição em hexano de <i>Byrsonima sericea</i> .	69
Figura 25 - Espectro de RMN H^1 da substância Friedelina – $CDCl_3$ 300 MHz.	71
Figura 26 - Espectro RMN C^{13} da substância Friedelina – $CDCl_3$, 300 Mhz.	71
Figura 27 - Espectro de RMN H^1 da substância Lupeol – $CDCl_3$, 500 MHz.	73
Figura 28 - Espectro RMN C^{13} da substância Lupeol – $CDCl_3$, 125 MHz.	73
Figura 29 - Estrutura isolada e identificada na partição em diclorometano de <i>Byrsonima sericea</i> .	74

Figura 30 - Espectro de RMN H ¹ da substância Betulina – CDCl ₃ , 400 MHz.	76
Figura 31 - Espectro RMN C ¹³ da substância Betulina – CDCl ₃ , 125 MHz.	76
Figura 32 - Avaliação farmacológica da partição em Acetato de Etila (BSAc) e em Etanol (BSEt).	78
Figura 33 - Avaliação farmacológica da partição em Diclorometano (BSDM) e em Hexano (BSHX).	79
Figura 34 - Avaliação da parasitemia e sobrevida dos animais infectados com <i>P. berghei</i> 10 ⁸ e tratados com partições em diclorometano (BSDM).	80
Figura 35 - Avaliação da parasitemia e sobrevida dos animais infectados com <i>P. berghei</i> 10 ⁸ e tratados com partições em Acetato de Etila (BSAc).	81
Figura 36 - Avaliação da parasitemia e sobrevida dos animais infectados com <i>P. berghei</i> 10 ⁷ e tratados com partições em Acetato de Etila (BSAc).	81
Figura 37 - Efeito da fração BSAc na parasitemia e na sobrevida dos animais infectados.	82

LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

	Página
Tabela 01 - Sistema eluente utilizado na partição hexânica.	55
Tabela 02 - Sistema eluente utilizado na partição em diclorometano.	58
Tabela 03 - Sistema eluente para fracionamento de BSD FII.	59
Tabela 04 - Formulação dermocosmética proposta.	62
Tabela 05 - Classes químicas presentes nas partições de <i>Byrsonima sericea</i> .	65
Tabela 06 - Dados de RMN H ¹ e C ¹³ para Friedelina.	70
Tabela 07 - Dados de RMN H ¹ e C ¹³ para Lupeol.	72
Tabela 08 - Dados de RMN H ¹ e C ¹³ para Betulina.	75
Tabela 09 - Relação entre volume gasto de solução titulante e período da formulação em estabilidade.	84
Tabela 10 - Correlação entre percentual declarado e encontrado durante estudo de estabilidade.	84
Gráfico 01 - Percentual encontrado na formulação cosmética com extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i> .	85

LISTA DE SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DMAE	Dimetilaminoetanol
EC	Estrato Córneo
IC 90	Concentração capaz de inibir atividade em 90%
HPLC	High performance liquid chromatograph
MeOH	Metanol
CHCl ₃	Clorofórmio
EtOH	Etanol
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HClO ₄	Ácido Perclórico
NP/PEG	Difenilaminoborato/polietileloglicol
DPPH	1,1 difenil 2 picrilhidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido

DMACA	ρ dimetilaminocinamaldeído
C. I.	Color Index
mg	Miligramas
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
PM	Peso Molecular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TF	Flavonóides totais
TP	Fenólicos totais
UV	Ultravioleta
UV-B	Radiação ultravioleta B
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

	Página
1 . Introdução	
1.1 – Distribuição Geográfica do Gênero <i>Byrsonima</i>	17
1.2 – Algumas espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	21
1.2.1 – Espécie <i>Byrsonima crassa</i>	21
1.2.2 – Espécie <i>Byrsonima crassifolia</i>	24
1.2.3 – Espécie <i>Byrsonima verbascifolia</i>	30
1.2.4 – Espécie <i>Byrsonima sericea</i>	32
1.3 – Anatomia e fisiologia da pele	34
1.4 – Vias de absorção da pele	36
1.5 – Uso de promotores de absorção	38
1.6 – Uso de terpenos como promotores de absorção	39
1.7 – 2-Dimetilaminoetanol, Deanol ou DMAE e uso cosmético	42
2 – Objetivos	47
2.1 – Objetivo Principal	47
2.2 – Objetivo Secundário	47
3 – Materiais e Métodos	48
3.1 – Matérias-primas	48
3.2 – Reagentes, solventes e outros	48
3.3 – Equipamentos	49
3.4 – Coleta da matéria-prima vegetal	49
3.5 – Preparo do extrato etanólico inicial e suas partições	50
3.6 – Caracterização química do extrato etanólico bruto e suas respectivas partições	51
3.7 – Caracterização morfológica e anatômica de <i>Byrsonima sericea</i>	52
3.7.1 – Microscopia óptica	52
3.7.2 – Registro fotográfico	53
3.8 – Caracterização cromatográfica dos extratos de <i>Byrsonima sericea</i>	53
3.9 – Estudo da partição em hexano do extrato etanólico das folhas de <i>Byrsonima sericea</i>	54
3.10 – Estudo da partição em diclorometano do extrato etanólico das folhas de <i>Byrsonima sericea</i>	57

3.11 – Avaliação farmacológica das partições obtidas a partir do extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	60
3.12 – Elaboração de formulação cosmética contendo extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	61
3.12.1 – Técnica de doseamento da formulação dermocosmética contendo DMAE e extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	63
3.12.2 – Condições analíticas para doseamento da formulação dermocosmética	63
4 – Resultados	64
4.1 – Caracterização da espécie	64
4.2 – Caracterização química da espécie <i>Byrsonima sericea</i>	65
4.3 – Análise anatômica e histoquímica da espécie <i>Byrsonima sericea</i>	65
4.4 – Identificação das substâncias isoladas na partição em hexano do extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	69
4.5 – Identificação da substância isolada na partição em diclorometano do extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	74
4.6 – Resultado da avaliação farmacológica das partições do extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i>	77
4.7 – Avaliação da formulação dermocosmética desenvolvida	83
5 – Discussão	86
6 – Conclusão	90
7 – Referências Bibliográficas	91

1 – Introdução:

1.1 – Distribuição Geográfica do Gênero *Byrsonima*

A região Central do Brasil é uma das regiões mais ricas em biodiversidade do mundo e também uma das mais inexploradas. Registros recentes da flora local relatam a ocorrência de cerca de 6253 espécies nativas incluídas em 150-160 famílias (MENDONÇA *et al.*, 1998). Dentre estas, a família Malpighiaceae destaca-se. Barroso (1984) cita a existência de 63 gêneros e cerca de 800 espécies; Anderson (1990) aumenta esse número para 66 gêneros compreendendo aproximadamente 1200 espécies. Cerca de 50% destas espécies estão concentradas no Brasil e são encontradas nos mais diversos ambientes ocupando áreas de restinga, cerrado, caatinga e matas pluviais. Estas espécies são constituídas por árvores, arbustos e lianas (MABBERLEY, 1993) e estão distribuídas principalmente nas regiões Norte e Nordeste (AGUIAR, 2005).

A família Malpighiaceae contém exemplares que apresentam diferentes substâncias biologicamente ativas. Por exemplo, o gênero *Banisteriopsis*, de ocorrência principalmente na região Amazônica, apresenta algumas espécies que são empregadas em rituais indígenas devido aos seus efeitos narcóticos e alucinógenos. Após serem estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico, as substâncias responsáveis por esses efeitos foram identificadas como alcalóides carbolínicos (MENDES *et al.*, 1999).

Byrsonima é um dos gêneros de Malpighiaceae de maior destaque entre os taxa brasileiros. É composto por cerca de 150 espécies e encontrado principalmente a partir do México, difundindo-se por toda América do Sul (AGUIAR, 2005). Ocorre em diferentes ambientes como restingas, florestas e cerrados (ARAÚJO & HENRIQUES, 1984; MEIRA

NETO *et al.*, 1989; OLIVEIRA FILHO, 1989; SILVA & OLIVEIRA, 1989; FILGUEIRAS & PEREIRA, 1990; OLIVEIRA FILHO & MACHADO, 1993).

No Brasil, os membros do gênero *Byrsonima* são popularmente conhecidos como “murici”, “murici-cascudo” ou “murici-vermelho” e empregados não apenas na medicina tradicional, mas também como no preparo de alimentos como sucos, geléias e licores, principalmente nas regiões norte e nordeste do país (SANNOMYIA, *et al.* 2005). Dados obtidos no NAPRALERT (Natural Products Alert Database) indicaram que as espécies deste gênero são comumente empregadas pela medicina tradicional como antiasmáticas, antitérmicas e no tratamento de infecções de pele (CACERES, *et al.* 1993). Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos, no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente neste gênero (GOTTLIEB, 1975).

Um levantamento realizado com 32 plantas da região do nordeste brasileiro na região semi-árida denominada caatinga em março de 2003 avaliou a atividade citotóxica, antioxidante e sequestradora de radicais livres. As plantas estudadas eram empregadas pela população local na medicina popular e utilizadas com as seguintes finalidades: laxativa, sedativa, diurética, anti-hipertensiva, digestiva, dermatites, gripes, asma, eczemas, distúrbios menstruais e doenças renais.

A atividade sequestradora de radicais dos extratos das plantas foi determinada através de espectrofotometria utilizando ensaio com 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (DAVID *et al.*, 2007) . A atividade antioxidante dos extratos metanólicos foi avaliada com o teste de branqueamento com β -caroteno em uma suspensão de ácido linolênico; e o teste de letalidade com salmoura de camarão (BST) foi realizado de acordo com SERRANO *et al.* (1996) com poucas modificações. Nos resultados obtidos, observou-se que a maior atividade sequestrante de radicais livres foi observada no extrato de *Byrsonima gardneriana* (0,3 mg/mL) quando

comparada com butil-hidroxianisol (BHA) [IC_{50} ($34,1 \pm 0,6$) $\times 10^{-3}$ mg/mL]. Os extratos testados não exibiram atividade antioxidante e sequestradora de radicais quando comparados aos antioxidantes comerciais. Entretanto, a espécie *B. gardneriana* apresentou maior atividade antioxidante e baixa toxicidade em BST nos ensaios realizados.

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, localizado no município do Rio de Janeiro, norte do estado, é o único em área totalmente de restinga, sendo uma das mais conservadas do país. Essa área representa um ecossistema frágil, com forte ação antrópica, apresentando espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. As plantas de restinga que vivem em ambientes com alta intensidade solar segundo Larson (1988) deveriam apresentar altas taxas de metabólitos especiais, com função antioxidante. Terpenos oxidados, taninos, fenóis, alcalóides, lignanas, cafeína e aminas são exemplos de substâncias do metabolismo especial que estas plantas apresentam (OKADA *et al.*; 1996). Estas substâncias além de serem antioxidantes, também contribuem com diversas funções ecológicas de extrema importância nas relações de competição nos ecossistemas terrestres, como polinização, alelopatia, defesa contra herbívoros e patógenos (GOTTLIEB, 1989; LANGENHEIN, 1994). Dentre doze extratos etanólicos de plantas desta região submetidos ao teste de atividade antioxidante, o extrato de *Byrsonima sericea* foi o que apresentou maior atividade, ou seja, menor valor de CE50. Tal resultado já era esperado, pois as plantas pertencentes à família Malpighiaceae são ricas em substâncias antioxidantes como os taninos (GOTTLIEB & BORIN, 2001).

Algumas plantas tiveram seu uso popular comprovado a partir dos resultados obtidos ao relacionar a patologia indicada pela população e o fato de possuir forte demanda de radicais livres como agente etiológico. Como exemplos, podem ser citados a aroeira, a embaúba e o jambo branco que apresentaram alta atividade antioxidante e são indicadas para o tratamento de gripe e febre, patologias conhecidamente relacionadas com altas taxas de radicais livres (BOSCOLO *et al.*, 2007).

No nordeste brasileiro, ocorrem diversas espécies do gênero *Byrsonima* e apesar do grande número de espécies vegetais, pouco é conhecido acerca da constituição química da família.

Relatos na literatura reportam a presença de triterpenos em *Byrsonima verbascifolia* e *Byrsonima microphylla* e, flavonóides e esteróides em *Byrsonima variabilis* (DAVID *et al*, 2003). Da espécie *Byrsonima sericea* já foram isolados e identificados os triterpenos lupeol e ácido betulínico (SOUZA *et al*, 1970).

Investigações fitoquímicas a partir de *Byrsonima crassifolia*, *B. microphylla* e *B. verbascifolia* revelaram a ocorrência de sulfonoglicolípídios, esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proantocianidinas (SANNOMYIA *et al.*; 2005).

Aguiar *et al.* (2005), a partir do extrato clorofórmico de *Byrsonima microphylla* A. Juss, isolaram duas naftoquinonas, que pela primeira vez foram relatadas em Malpighiaceae, além de flavanol e triterpenos (Δ -lupenona, β -amirina, betulina e lupeol).

Reis *et al.* (2007) evidenciaram a composição química do óleo floral de *Byrsonima intermedia*. Este óleo floral é rico em ácidos graxos livres e o principal constituinte identificado foi o ácido birsônico.

1.2 – Algumas espécies do Gênero *Byrsonima*

1.2.1 - Espécie *Byrsonima crassa*

A espécie *Byrsonima crassa* Niedenzu (IR) é uma espécie nativa da formação de Cerrado. É popularmente conhecida como murici-cascudo ou murici-vermelho e seus frutos são utilizados como alimento. Dentre as propriedades atribuídas à casca e às folhas desta espécie, podemos citar ações anti emética, diurética, febrífuga, tratamento de úlcera, gastrite e diarreia.

Investigações fitoquímicas preliminares por Cromatografia em Camada Delgada utilizando padrões autênticos conduziram à detecção de flavonóides com atividade antioxidante nos extratos polares das folhas desta espécie. Por a atividade antioxidante estar relacionada com a ação antiulcerativa dos extratos de plantas, ensaios biológicos com compostos puros poderiam contribuir para melhor entendimento do processo de cura. Apesar do fato da maioria das preparações herbais brasileiras serem constituídas de extratos brutos, sem nenhuma etapa de purificação antes do uso, o isolamento e a elucidação estrutural dos constituintes principais é essencial para promover melhor conhecimento acerca da bioatividade alegada a planta (SANNOMYIA *et al.*, 2004). Sendo assim, Sannomyia *et al.* (2005) avaliaram os extratos de CHCl₃, MeOH e 80% MeOH (hidrometanólico) em relação a atividade antiulcerogênica em úlceras gástricas induzidas por HCl/EtOH. Ratos albinos Swiss foram alimentados 24 h antes de receberem uma dose oral dos extratos a serem testados (CHCl₃, MeOH e 80% MeOH, nas dosagens 250, 500 e 1000 mg/kg) e do medicamento utilizado como controle (lansoprazol 30 mg/kg). Após cinquenta minutos, os animais foram tratados com 0,2 mL de uma solução 0,3 M HCl/60% EtOH (solução HCl/etanol) para indução das ulcerações gástricas. Logo após, os animais foram sacrificados e a extensão das

lesões quantificada. A administração desta solução ácida no grupo controle, produziu lesões extensas na mucosa com áreas com necrose características e lesões petequiais. A presença da solução de HCl na lesão apenas acelera o processo de ulcerogênese gástrico. A administração prévia do extrato CHCl₃ e lansoprazol inibiram a formação de úlceras em 67, 59, 57 e 69%, respectivamente. O extrato de MeOH (500 e 1000 mg/kg) inibiu a formação de úlceras em 93 e 99% respectivamente, enquanto o tratamento com extrato 80% MeOH (250, 500 e 1000 mg/kg peso corporal) inibiu a formação de úlceras em 74, 78 e 92%, e também reduziu as lesões hemorrágicas, caracterizando um efeito do tipo dose-resposta.

Os resultados demonstraram que os extratos polares apresentaram melhor atividade antiulcerativa do que o extrato apolar. Vários mecanismos podem relacionar-se com o efeito observado, incluindo o aumento do nível de hexosamina gástrica e a força da barreira gástrica, fisicamente ou por bloqueio da H⁺, K⁺ ATPase. Estudos relatam que a geração de oxigênio derivado dos radicais livres e da peroxidação lipídica é um dos mecanismos mais importantes envolvidos na patogênese da úlcera gástrica. Os antioxidantes são reconhecidamente sabidos em inibirem a peroxidação lipídica e sequestrar radicais livres. Análises cromatográficas dos extratos testados por Cromatografia em Camada Delgada com solução de DPPH (1,1 difenil 2 picril-hidrazil) revelaram a presença de manchas amareladas, indicativas de atividade antioxidante presentes no extratos MeOH e 80% MeOH. Placas reveladas com reagente NP/PEG (difenilaminoborato/polietilenoglicol) produziram manchas laranjas e amarelas características de flavonóides e placas reveladas com anisalaldeído/ácido sulfúrico também produziram manchas avermelhadas, sugerindo a presença de derivados de catequina. A investigação fitoquímica realizada no extrato MeOH conduziu ao isolamento do biflavonóide amentoflavona, quercetin-3-O-β-D-galactopiranosídeo, quercetin-3-O-α-L-arabinopiranosídeo, (-) epicatequina e (+) catequina.

Flavonóides e catequinas são metabólitos secundários presentes nas plantas e têm merecida atenção pelo largo espectro de suas atividades biológicas. Vários estudos relatam as propriedades antiulcerogênicas dos flavonóides (GRACIOSO *et al.*, 2002). Galati *et al.*, (2003) também relatam correlação entre atividade antiulcerogênica e antioxidante dos flavonóides. A presença de (-)epicatequina e (+) catequina nos extratos metanólicos pode contribuir para a gastroproteção observada em *Byrsonima crassa*, pois estão relacionados com inibição da peroxidação lipídica, além de possuírem potente atividade antioxidante (IWAI *et al.*, 2001). Relatos nas literaturas citam que amentoflavona apresenta ambas atividades antioxidante e antiúlcero-gênica (GOEL *et al.*, 1988; CHOLBI *et al.*, 1991).

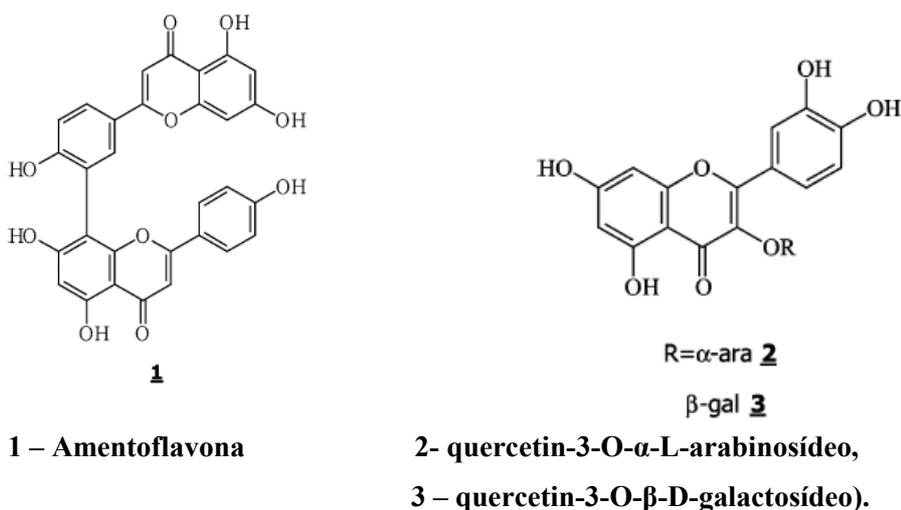


Figura 1 – Substâncias isoladas da espécie *Byrsonima crassa*.

1.2..2 – Espécie *Byrsonima crassifolia*

A espécie *Byrsonima crassifolia* está amplamente distribuída em várias regiões do México, América Central e do Sul e é popularmente conhecida como “nanche”. Tem sido utilizada com fins terapêuticos desde os tempos pré-hispânicos por vários grupos étnicos. As folhas e raízes são utilizadas para desordens gastrointestinais, infecções da pele e como antiofídicas e antitussígenas. As frutas são comestíveis e comumente vendidas em mercados locais. O extrato obtido a partir de folhas e raízes demonstrou exercer efeitos espasmogênicos em ratos, assim como atividades antifúngicas e antidermatofíticas.

Martinez-Vásquez *et al.*, (1999) testaram a atividade antibacteriana dos extratos obtidos por percolação das raízes e do caule com hexano, acetato de etila e metanol. As cepas bacterianas testadas foram: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus*. Os extratos também foram avaliados quanto à presença de flavonóides, taninos, esteróides e/ou terpenos, alcalóides, glicosídeos e saponinas. Os resultados indicaram que os extratos de acetato de etila, obtidos a partir do caule e das raízes, foram os mais efetivos contra as espécies microbianas testadas, apresentando atividade dose dependente.

O extrato metanólico das raízes apresentou atividade contra *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhi*, enquanto o extrato metanólico do caule e o extrato hexânico do caule foram ineficazes. A análise preliminar fitoquímica revelou a presença de glicosídeos, saponinas e flavonóides em ambos os extratos de acetato de etila. Taninos foram detectados nos extratos metanólico e de acetato de etila obtidos a partir do caule de *Byrsonima crassifolia*. A atividade anti dermatofítica dos extratos aquosos das folhas e a atividade antimicótica dos extratos obtidos a partir de folhas e cascas de *B. crassifolia* já haviam sido relatadas por

Caceres *et al* (1991, 1993). A atividade do extrato de acetato de etila contra bactérias Gram positivas e Gram negativas poderia ser indicativa da presença de um largo espectro de compostos antibióticos ou simplesmente de toxinas metabólicas. A heterogeneidade da composição fitoquímica assinalada com triterpenos, esteróides, ésteres aromáticos, aminoácidos e glicolipídios já havia sido relatada por Amarquaye *et al.*, (1994), Bejar *et al.*, (1995) e Rastrelli *et al.*, (1997). Apesar da presença de flavonóides, saponinas e glicosídeos no extrato de acetato de etila obtido a partir das raízes, apenas os flavonóides e glicosídeos poderiam contribuir para a atividade antibacteriana do extrato. (HARBONE & BAXTER, 1995).

Berger *et al.* (1999), avaliaram a atividade de cinco plantas, selecionadas por pesquisadores da Universidade de São Carlos, Guatemala, utilizadas popularmente para doenças bacterianas e protozoárias, dentre as quais *Byrsonima crassifolia*. O extrato etanólico foi particionado em butanol e água. A partir das soluções estoques dos extratos brutos, foram preparadas soluções com concentrações variáveis de 100, 10 e 1 mg/kg de peso corporal dos animais submetidos ao teste. A administração dos extratos ocorreu após 24 h de inoculação com *Trypanossoma cruzi*, e de forma contínua a cada 48 h por 3 semanas. Nos dias 7, 14, e 21, os ratos foram sangrados e a parasitemia foi avaliada microscopicamente em cada animal. O número de formas tripomastigotas encontrados nos animais foi comparado com o encontrado nos animais considerados controle positivo (tratados com nifurtimox e benznidazole) e controle negativo (tratados com solução de DMSO). As drogas utilizadas como controle positivo são drogas de primeira escolha neste país, porém apresentam vários efeitos colaterais, tais como anorexia, distúrbios gastrointestinais e neuropatias; causando muitas vezes abandono do tratamento pelos pacientes. Assim, plantas utilizadas popularmente contra doenças protozoárias poderiam ser uma alternativa eficaz a terapia contra a Doença de Chagas.

Quatro extratos de *B. crassifolia* inibiram tripomastigotos com 90% da concentração inibitória de 420,9, 442,3, 580,1 e 376,3 µg/mL para as infusões das cascas e folhas, e para os extratos de hexano e etanol das folhas respectivamente. Nenhum extrato avaliado foi ativo contra a forma epimastigota, ou apresentou toxicidade. O extrato etanólico foi o mais ativo contra a forma tripomastigota e três frações suprimiram o crescimento deste estágio com IC₉₀ de 98,7, 89,3 e 94,3 mg/mL. Estes valores são equivalentes a uma inibição 14 e 10 vezes menor do que com as drogas utilizadas como controle positivo – nifurtimox e benznidazole. Análises por CCD e HPLC destas frações revelaram a presença de sapogeninas triterpênicas, ácido 2- α - e 2- β - hidroxioleanólico, ácido lupeanólico, ácido 2- α -hidroxilupeanólico, catequina, epicatequina e quercetin 3-O- β -D-galactosídeo. As frações continham ainda flavonóides (quercetin 3-O- β -D-galactosídeo, quercetin 3-O- β -D-glucosídeo, isorhamnetin 3-O- β -D-rutinosídeo e isorhamnetin 3-O- β -D-galactosídeo) em diferentes concentrações. Como as frações ativas apresentaram-se como misturas complexas de vários componentes, testes com estas substâncias isoladas seriam de grande valia para avaliar a atividade tripanocida.

O interesse em substâncias polifenólicas antioxidantes, devido à ação seqüestradora de radicais livres e a relação entre radicais livres com diversas doenças como doença cardíaca coronariana, câncer, regulação gênica e doenças neurodegenerativas, estimulou Silva *et al.* (2007) a estudarem o potencial antioxidante de 15 espécies nativas da região Amazônica. Estas plantas já são utilizadas pela população indígena e local a muitos anos para tratamento de várias doenças como diabetes e doença coronariana. O estudo deste material pode levar a descoberta de novas fontes antioxidantes e serve de incentivo à preservação destas espécies e ao desenvolvimento sustentável da região. Dentre estas plantas, a espécie *Byrsonima crassifolia* foi avaliada quanto ao potencial antioxidante. As partes das plantas utilizadas no estudo foram escolhidas de acordo com o uso tradicional na medicina popular, utilizaram-se as folhas, cascas e frutos da espécie *B. crassifolia*.

As substâncias fitoquímicas com propriedades antioxidantes são originárias das vias do chiquimato e do acetato-malonato e compartilham um esqueleto carbônico básico: uma unidade fenilpropanóide (C₆-C₃). O maior grupo de compostos fenólicos inclui os fenóis simples (C₆-C₂), os ácidos fenólicos (C₆-C₂), ácidos hidroxicinâmicos (C₆-C₃), estilbenos (C₆-C₂-C₆), flavonóides (C₆-C₃-C₆), biflavonóides (C₆-C₃-C₆)₂ e proantocianidinas. Os flavonóides representam as moléculas antioxidantes mais eficientes e cerca de 6400 estruturas já foram definidas. Estão sub-divididos em várias famílias tais como flavonóis, flavan-3-óis, flavanonas, antocianinas, chalconas, etc. A determinação de derivados fenólicos totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu; e a determinação de flavonóides totais (TF) usou o cromógeno *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA). Os extratos foram submetidos à espectrofotometria na região de 200 nm a 800 nm e exibiram banda de absorção entre 200 e 325 nm, a qual é característica de absorção por compostos polifenólicos. Entretanto, nenhuma amostra apresentou banda de absorção entre 465 e 560 nm, típica de antocianinas. A espécie *B. crassifolia* apresentou os maiores resultados na estimativa dos conteúdos totais fenólicos (TP) e de flavonóides (TF) dentre as espécies analisadas. Vale ressaltar que para estes valores totais, foram consideradas substâncias químicas equivalentes (ácido gálico e catequina, respectivamente). O extrato obtido a partir da folhas de *B. crassifolia* apresentou maior valor de TP. Tal resultado correlaciona-se com o fato dos polifenóis serem encontrados em maior concentração nas folhas com a biossíntese acelerada pela exposição a luz solar, além de servir como mecanismo protetor contra as radiações UV-B. Na amostra de cascas de *B. crassifolia*, foi encontrado o segundo maior valor de TP e TF, devido a presença de derivados flavanol (taninos condensados), os quais possuem a função de defesa através da função antimicrobiana e pronunciado gosto amargo.

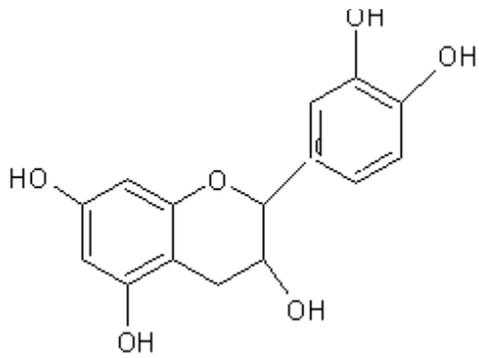
Estudos fitoquímicos anteriormente feitos na espécie *B. crassifolia* realizados por Geiss (1995) revelaram a presença de trímeros e dímeros de proantocianidinas, monômeros e

ácido gálico, nas cascas desta espécie. Rastrelli *et al.*, (1997) isolaram a partir do extrato metanólico, 14 compostos, dentre os quais compostos glicolipídios foram isolados pela primeira vez na espécie.

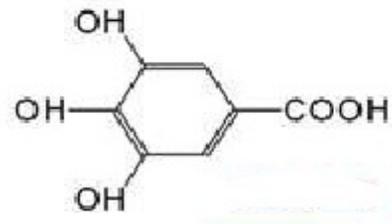


Figura 2 – *Byrsonima crassifolia* – arbusto, flores e frutos

Fonte: www.cybertruffle.org.uk



Catequina



Ácido Gálico

Figura 3 – Substâncias isoladas na espécie *Byrsonima crassifolia*

1.2.3 – Espécie *Byrsonima verbascifolia*

Na espécie *Byrsonima verbascifolia*, a partir do extrato hexânico foram isolados β -amirina, sitosterol, friedelina, ácido 3-O-acetiloleanólico, β -amirenona, 3-O-acetillupeol e glocidona em 1975 por Gottlieb *et al.*

Lopez *et al.* (2001) pesquisaram a atividade antimicrobiana e antiviral de trinta plantas tradicionalmente utilizadas na medicina popular na Colômbia, dentre as quais a espécie *B. verbascifolia*. Testou-se o extrato metanólico, elaborado a partir das plantas secas. As cepas viróticas testadas foram: Herpes simplex tipo 1 (HSV) e Poliovírus tipo 1; as cepas bacterianas dividiam-se em Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimerium* e *Mycobacterium phlei*. A atividade anti fúngica foi testada com a cepa de *Candida albicans*.

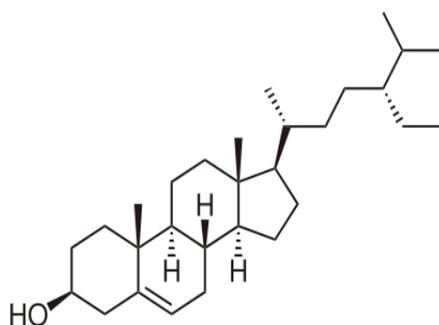
As amostras foram testadas em duplicata com ensaio de difusão de disco. Os papéis foram impregnados com 20 μ L de uma solução preparada com 100 mg de cada extrato dissolvidos em 1 mL de metanol. Vinte e quatro extratos apresentaram atividade contra HSV, porém nenhum foi ativo contra o Poliovírus.

O extrato de *Byrsonima verbascifolia* apresentou particularmente atividade contra HSV, com a menor Concentração Mínima Inibitória (MIC) dentre os extratos testados. Os valores observados foram 2,5 μ L/mL para o extrato elaborado a partir da folhas e 6,5 μ L/mL para o extrato de cascas e raízes. Os extratos das folhas, das cascas e das raízes apresentaram atividade contra as seguintes cepas bacterianas: *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Dentre as espécies avaliadas apenas duas apresentaram atividade anti fúngica promissora (*Piper lanceaefolium* e *Juglans neotropica*)

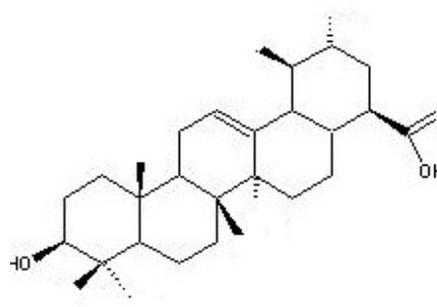


Figura 4 – *Byrsonima verbascifolia* – árvore e flores

Fonte: <http://portaldes.cict/fiocruz.br>



Sitosterol



β amirina

Figura 5 – Substâncias isoladas na espécie *Byrsonima verbascifolia*

1.2.4 – Espécie *Byrsonima sericea*

Em um estudo etnofarmacológico realizado na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil, com objetivo de inventariar as espécies vegetais usadas na faixa terrestre e associar as tradições locais; 68 espécies foram catalogadas e estão compreendidas em 61 gêneros e 42 famílias. Dentre os vários relatos, os pescadores citam que a restinga é rica em saborosos e nutritivos frutos, dentre os quais destacam-se representantes de várias famílias, incluindo o murici (*Byrsonima sericea* – Malpighiaceae). O murici também é citado como parte da cultura e tradição do local e é utilizado pelos pescadores locais para tingir redes de pesca, evitando assim o ataque excessivo dos peixes à rede. (FONSECA-KRUEL & PEIXOTO, 2004).

A espécie *Byrsonima sericea* D.C. é a mais representativa do gênero nas áreas de restingas do estado do Rio de Janeiro (ARAÚJO & HENRIQUES, 1984). Apresenta-se como uma árvore encontrada frequentemente na zona da mata, em florestas úmidas, ocorrendo na região litorânea e nos estados do Espírito Santo e Pernambuco (TEIXEIRA & MACHADO, 2000). Assim como as outras espécies do gênero, é vulgarmente conhecida como murici, murici penima ou murici-da-praia (PIO CORRÊA, 1974).

A dissertação de Silva (1990) trata de aspectos da floração, frutificação e polinização desta espécie. Os indivíduos apresentam cerca de 3 a 20 m de altura, flores pentâmeras e pétalas amarelas. A floração inicia-se em meados de outubro, estendendo-se até o final de janeiro. A frutificação tem início no final de dezembro, estendendo-se até o final de abril. Os primeiros botões de *B. sericea* aparecem no início da estação seca ou logo após o término da estação chuvosa. (TEIXEIRA & MACHADO, 2000).

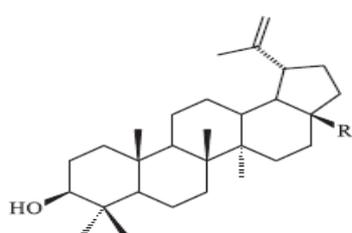
Desta espécie, em especial existem pouco relatos de estudos anatômicos e histoquímicos, e referem-se a floração e frutificação. As poucas investigações fitoquímicas

descritas na literatura descrevem o isolamento do triterpeno β -amirina das cascas de *B. sericea*, assim como lupeol e ácido betulínico (BÉJAR & MALONE, 1993). Entretanto, a atividade anitparasitária de outras espécies do gênero e a possibilidade de que estas espécies apresentem flavonóides e terpenóides dentre seus prováveis metabólitos especiais, desperta a possibilidade de que esta seja estudada em termos fitoquímicos e anátomo-morfológico, buscando caracterização de forma mais efetiva desta espécie de ampla aplicação etnofarmacológica e apontar seu potencial uso em terapia.



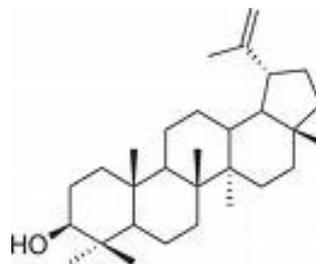
Figura 6 – *Byrsonima sericea* – árvore e botão floral com abelha da espécie *Epicharis nigra* retirando óleo floral

Fonte: http://www.faperj.br/boletin_intern.pht?objid=3574
www.qualibio.ufba.br/txt067.html



1 R = COOH

Ácido betulínico



Lupeol

Figura 7 – Substâncias isoladas da espécie *Byrsonima sericea*

1.3 – Anatomia e fisiologia da pele:

A maior limitação à liberação de drogas por via transdérmica é representada pela própria pele. A pele é a camada mais externa do organismo humano, e separa o meio interno do meio externo agindo como uma barreira de duas vias, ou seja, prevenindo o ingresso de moléculas externas e o egresso de substâncias endógenas.

A principal barreira à penetração é representada pelo Estrato Córneo (EC) e por sua estrutura compacta. Além disso, essa função de barreira também é assistida por atividade metabólica, apesar de apresentar menor capacidade de biotransformação do que o intestino e o fígado.

A pele é essencialmente composta por duas camadas: a epiderme, camada mais externa, não vascularizada e a derme, camada interna, composta por capilares, nervos, glândulas sebáceas e folículos pilosos sustentados por tecido conectivo.

A epiderme pode ainda ser dividida em várias camadas anatômicas cada qual representando um estágio diferente de diferenciação. A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo (EC) é formado por várias camadas de células mortas embebidas em uma matriz lipídica. Em peso seco, o EC é basicamente protéico (75-80%) com uma grande parte composta de α -queratina e uma pequena porção de β -queratina amorfa. Juntos, estes componentes tornam os corneócitos densos e quase impermeáveis aos solutos. Cerca de 10-15% da fração protéica é solúvel em água. O restante do EC consiste em uma mistura lipídica complexa (5-15%) e material não identificado (5-10%).

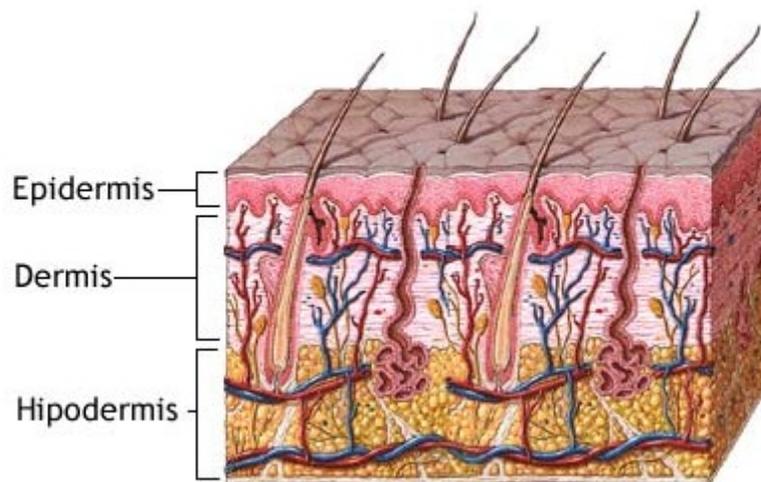


Figura 8 – Camadas da pele

Fonte: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/images/ency/fullsize/8912.jpg>

A permeabilidade do EC à água é cerca de 1000 vezes menor do que as outras membranas biológicas, o que pode ser atribuído a sua composição lipídica única e ao conteúdo do EC, especialmente ao arranjo estrutural da matriz intercelular lipídica e o envelope lipídico que circunda os corneócitos. O papel desta composição lipídica nas propriedades de barreira, pode ser demonstrado pela remoção dos lipídios por solvente. O resultado é a perda aumentada de água via transepidermal e permeabilidade aumentada da pele. Tais fatos podem ser comprovados ao comparar a função de barreira da pele doente com anormalidades na composição lipídica do EC e na recuperação dessa função barreira quando ocorre aplicação tópica de lipídios que fazem parte da composição do EC.

A composição lipídica do EC é única, especialmente atribuída aos fosfolipídios. É composta principalmente por ceramidas (41%), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%) e ácidos graxos (9%) com uma pequena fração de sulfato de colesterol (2%). A composição e a proporção lipídica pode variar conforme a localização corporal. Um grupo estruturalmente

heterogêneo de sete ceramidas representam o principal conteúdo protéico presente no EC. O alto conteúdo de ceramidas com cadeias alifáticas saturadas, longas e rígidas, parecem ser ideiais para a formação das membranas impermeáveis altamente ordenadas, as quais promovem resistência as variações de temperatura, exposição a raios UV e oxidação do ar.

Os lipídios extracelulares entre os corneócitos estão arranjados em múltiplas estruturas lamelares formando uma fase lipídica contínua que ocupa cerca de 20% do volume total do EC. Este arranjo é possível devido a presença das ceramidas que fornecem a polaridade necessária para tal rearranjo e realizam ligações de hidrogênio extensivas. Também foi sugerido que substâncias anfifáticas presentes na fração lipídica do EC, tais como sulfato de colesterol, sejam responsáveis pela manutenção da forma lamelar (SUHONEN, *et al.* 1999).

1.4 – Vias de absorção da pele

A absorção de drogas através da pele ocorre pela via passiva. A permeação transdérmica pode envolver a passagem de moléculas através da epiderme intacta ou através de uma via derivada distribuída universalmente pelos folículos pilosos e glândulas écrinas. Estes apêndices, entretanto ocupam apenas cerca de 0,1% da superfície total da pele humana. Desta forma, a idéia da difusão passiva via transepidermal associada com a permeação de drogas pela pele, é largamente difundida (SUHONEN, *et al.* 1999).

A absorção percutânea via transepidérmica envolve a difusão através do EC e das camadas celulares viáveis da epiderme, e finalmente através das camadas superiores da epiderme para a microcirculação. O passo determinante na taxa de absorção percutânea da maioria das drogas é sua permeação através do EC vencendo sua resistência natural. Apenas

para drogas muito lipofílicas, a natureza essencialmente aquosa da epiderme viável pode resultar em uma barreira significativa.

O EC geralmente é caracterizado como uma estrutura semelhante a uma parede de tijolos com os corneócitos (células protéicas) assemelhados aos tijolos e a matriz intracelular como o cimento. A fase protéica é descontínua enquanto a fase lipídica é contínua. Através do EC, teoricamente, existem duas vias potenciais, a transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica) e a intercelular (via os domínios lipídicos entre os corneócitos).

Estudos experimentais indicam que a permeação da maioria dos compostos através do EC é fortemente dependente do tamanho molecular e da sua lipofilicidade. Entretanto, os compostos muito hidrofílicos penetram tanto pelas regiões hidrofílicas dos corneócitos (presumivelmente pela água associada a queratina) quanto pela matriz lipídica.

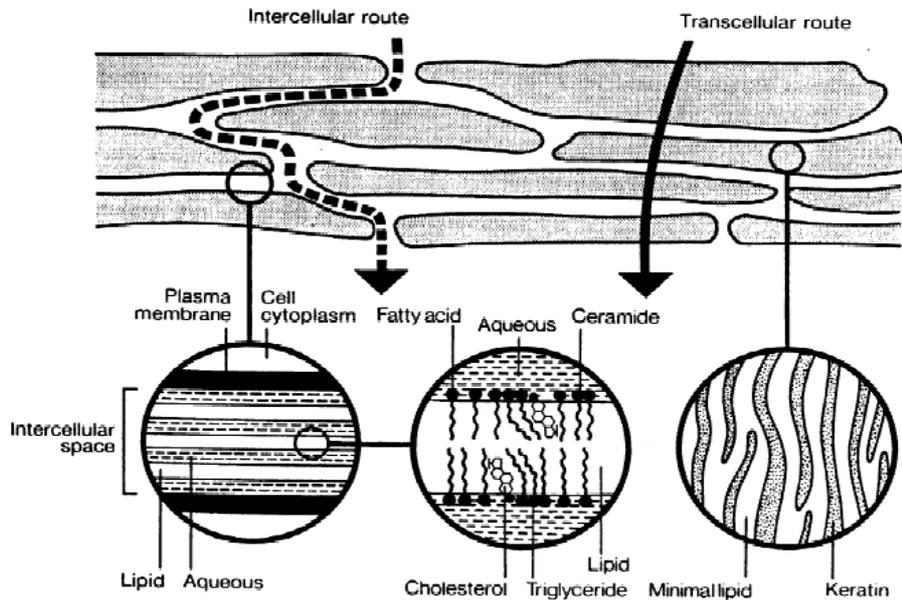


Figura 9 – Esquema representativo das vias propostas para permeação de drogas no Estrato Córneo (SUHONEN *et al.*, 1999).

1.5 – Uso de promotores de absorção

A chave para promover a permeação de drogas através da pele é alterar as propriedades da principal via associada com a penetração de drogas através do EC, a via lipídica intercelular e a via polar. Entretanto, devido a estrutura do EC e a continuidade da barreira lipídica, as interações lipídica intercelulares com EC possuem importância crucial na efetividade da ação do promotor de penetração (SUHONEN, 1999).

Apesar de várias substâncias químicas terem sido avaliadas como promotores de absorção em pele humana ou animal, nenhuma ainda tornou-se ideal. Dentre as propriedades mais desejáveis para os promotores de absorção, podemos citar: atoxicidade, não irritantes ou alergênicos; devem atuar de forma rápida, ter ação e duração de efeito predizível e reproduzível; não devem ter atividade farmacológica, ou seja não ligar-se em receptores; devem ter ação unidirecional, ou seja, permitir a entrada do agente terapêutico no corpo e prevenir a perda de material endógeno; quando removido da pele, as propriedades de barreira devem retornar rapidamente e de forma completa; devem ser compatíveis com excipientes e fármacos e ser cosmeticamente aceitáveis (WILLIAMS & BARRY, 2004).

Asbill & Michniak (2000) citam como os promotores podem agir para promover melhor absorção dos fármacos: aumentar a difusibilidade do fármaco na pele; causar fluidificação lipídica do EC, ocasionando decréscimo na função de barreira (ação reversível); aumentar e otimizar a ação termodinâmica do fármaco no veículo e na pele; servir como um reservatório do fármaco na pele e alterar o coeficiente de partição do mesmo, aumentando sua liberação a partir da formulação para as camadas mais internas da pele.

Dentre as várias substâncias ou classes de substâncias utilizadas como promotoras de absorção podemos citar: a água; sulfóxidos e substâncias químicas similares, como por exemplo, DMSO, solvente aprótico utilizado em várias áreas das ciências farmacêuticas como um “solvente universal”; azona, primeira molécula desenvolvida especificamente como essa finalidade; pirrolidonas, que agem preferencialmente em substâncias hidrofílicas; ácidos graxos; alcóois, alcóois graxos e glicóis; surfactantes; fosfolipídios; solventes em altas concentrações; óleos essenciais e terpenos.

1.6 – Uso de terpenos como promotores de absorção:

Os terpenos formam uma diversificada família de substâncias naturais, com funções diferenciadas nos vegetais. Ocorrem naturalmente em plantas e são compostos por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, porém não apresentam aromaticidade. São classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas formadoras. Os monoterpenos atuam na atração de polinizadores; os diterpenos dão origem aos hormônios de crescimento vegetal e os sesquiterpenos em geral apresentam função protetora contra fungos e bactérias. Os triterpenos e seus derivados, apresentam uma gama de funções variadas tais como proteção contra herbívoros, função antimutagênica e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento de raízes (HARBONE & BAXTER, 1995).

Os terpenos são promotores clinicamente aceitáveis devido a baixa toxicidade sistêmica, a alta atividade promotora e baixa irritação cutânea em baixas concentrações (1-5%). O terpeno com aplicação farmacêutica mais popularmente conhecido é o mentol. Este é considerado uma substância segura ao uso segundo o FDA (GRAS – Generally Regarded As Safe) e é utilizado em preparações inalatórias tradicionais, além de

possuir leve efeito antipruriginoso quando incorporado em preparações emolientes. Os terpenos aumentam os parâmetros de permeação percutânea para um grande número de substâncias, incluindo compostos lipofílicos e hidrofílicos. O efeito dos terpenos nas propriedades de barreira podem ser atribuídas a sua habilidade de afetar o empacotamento intercelular dos lipídios do EC. Entretanto, a alteração lipídica é considerada totalmente reversível e causa muito pouca irritação cutânea. Compostos naturais e do tipo GRAS tais como terpenos são considerados moléculas promissoras em aplicações farmacêuticas como promotores de absorção, devido a baixa toxicidade e habilidade em aumentar permeabilidade de moléculas tanto hidrofílicas quanto lipofílicas (ASBILL & MICHNIAK, 2000).

Os óleos essenciais do eucalipto, quenopodium e *ylang ylang* são promotores efetivos para a substância 5-fluorouracil atravessar a pele humana *in vivo* (WILLIAMS & BARRY, 1989). O óleo mais potente do eucalipto aumentou a permeabilidade do coeficiente do fármaco em 34 vezes. O principal elemento terpênico do óleo de eucalipto é 1,8-cineol. Uma série de 17 terpenos foi avaliada em um modelo de fármaco hidrofílico (5-fluoruracil) na pele humana *in vitro* (WILLIAMS & BARRY, 1991). Algumas observações relacionando estrutura atividade dos terpenos analisados podem ser citadas: terpenos hidrocarbonetos são menos potentes para o fármaco estudado do que terpenos contendo a função álcool ou cetona, e a maior atividade promotora foi observado por terpenos óxidos. Dentro da subclasse óxido, a potência dos éteres cíclicos foi maior do que epóxidos. O pré-tratamento das membranas epidérmicas humanas com 1,8-cineol promoveu um acréscimo próximo a 100 vezes no coeficiente de permeabilidade do fármaco modelo.

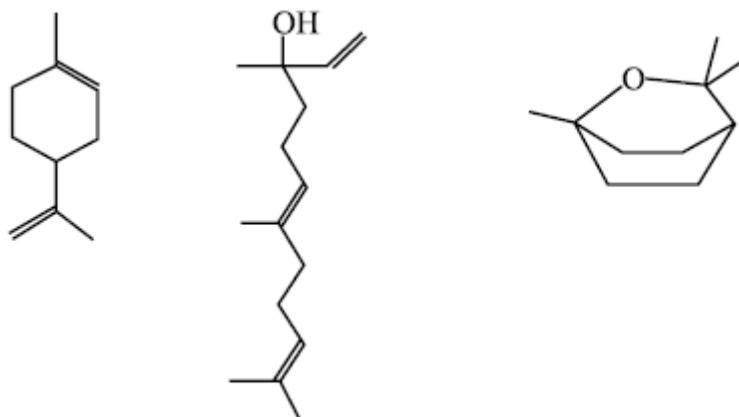
Os mesmos terpenos foram empregados em um protocolo idêntico, porém com fármaco lipofílico – estradiol (WILLIAMNS & BARRY, 1991). O resultado demonstrou que apesar dos terpenos com função álcool ou cetona para o fármaco 5-fluorouracil apresentarem atividade promotora moderada (aumento de 10-40 vezes o coeficiente de permeabilidade),

estes mesmos agentes não aceleraram a atividade de absorção no modelo lipofílico e inclusive, pareceram retardar sua permeação. Os éteres cíclicos, tão potentes para 5-fluoruracil, promoveram apenas uma promoção moderada da permeação do estradiol, e em contraste com o fármaco hidrofílico, os terpenos hidrocarbonetos (tais como d-limoneno) foram mais efetivos para o fármaco esteróide.

Moléculas maiores de terpenos – sesquiterpenos, também foram avaliados quanto a sua capacidade em promover permeação. O nerolidol aumentou a permeabilidade de 5-fluoruracil cerca de 20 vezes através da pele humana *in vitro*. Assim como para promotores lipofílicos com cadeias maiores, os efeitos destes agentes são estendidos por períodos mais prolongados – mais de 5 dias, em contraste com os monoterpênicos que são facilmente removidos por lavagem do EC (WILLIANS & BARRY, 2004).

Os terpenos e sesquiterpenos sugerem-se como promotores de permeação promissores. Por exemplo, l-mentol tem sido utilizado para facilitar *in vitro* a permeação de morfina e imipramina em pele de rato (MORIMOTO *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 2002). Ainda existe pouco controle acerca do uso tópico da maioria dos terpenos e o uso excessivo pode oferecer dano potencial além da atividade farmacológica que alguns possuem. Aparentemente, os terpenos menores tendem a ser promotores de absorção mais ativos do que os sesquiterpenos. A presença de hidrocarbonetos e grupamento não polar, tais como limoneno promove melhor promoção para permeantes lipofílicos do que para terpenos “polares”. Inversamente, o grupo polar contido em terpenos (tais como l-mentol, 1,8- cineol) promove melhor promoção dos permeantes hidrofílicos. Vários terpenos permeam bem a pele humana e grandes quantidades de terpenos (acima de 1,5 µg/cm²) foram encontrados na epiderme após a aplicação de uma matriz do tipo *patch*. Os terpenos em experimentos de permeação, onde o lag time para permeação geralmente foi reduzido, indicam o aumento na difusibilidade da droga através da membrana.

Estudos de difração de Raio X indicam que d-limoneno e 1,8-cienol rompem a bicamada lipídica do EC, enquanto o sesquiterpeno nerolidol reforça a bicamada, possivelmente por reorientação ao longo dos lipídios do EC (WILLIAMS & BARRY, 2004).



d-Limoneno

Nerolidol

1,8-Cineol

Figura 10 – Substâncias de natureza terpênica utilizadas como promotoras de absorção

1.7 – 2-Dimetilaminoetanol (Deanol ou DMAE) e uso cosmético

A pele humana está sujeita a eventos extrínsecos e intrínsecos variáveis. Assim, uma molécula que exercesse um efeito tensor deveria modificar a força tênsil cutânea e/ou alterar a percepção sensorial dos pacientes. O aumento da firmeza da pele pode ser resultado da modulação da contração dos músculos lisos dérmicos ou pelo aumento da contratilidade e adesão de outras células dérmicas e epidérmicas.

A acetilcolina é um exemplo de neurotransmissor com ocorrência extra-neuronal reconhecida em uma ampla variedade de células. O sistema colinérgico não neuronal está envolvido em funções básicas como diferenciação de queratinócitos, formação de barreira epidérmica, circulação sanguínea, angiogênese e reações imunes (KURZEN, 2004).

Nguyen *et al.* (2003) investigaram o mecanismo da adesão celular de queratinócitos mediada por acetilcolina não neuronal produzida nos próprios queratinócitos. Os resultados demonstraram que estes receptores regulam a adesão dos seus desmossomos.

Danysz *et al.* (1967) relataram aumento da tensão muscular com uso de DMAE por via oral em doses de 20 mg/dia com leve estimulação mental, aumento gradual do tônus muscular e possível aumento da frequência da convulsão em indivíduos susceptíveis. Devido a estes relatos e as observações clínicas do aumento da tensão muscular nos indivíduos tratados começou-se a investigar o uso cosmético do DMAE no aumento do tônus facial e suas propriedades anti-envelhecimento da pele.

Desta forma, acetilcolina, seu precursor colina e 2-dimetilaminoetanol (deanol, DMAE – sintético análogo dos anteriormente citados) representam bons candidatos para tal efeito. Assim, receptores colinérgicos modulam uma grande variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e viabilidade. Queratinócitos, melanócitos, células endoteliais e fibroblastos possuem receptores e/ou enzimas colinérgicas das classes muscarínicas e/ou nicotínicas. Estas células podem formar uma rede local de transdução de sinais com a acetilcolina e mediar a comunicação entre tipos diferentes de células. (UHODA *et al.* 2002)

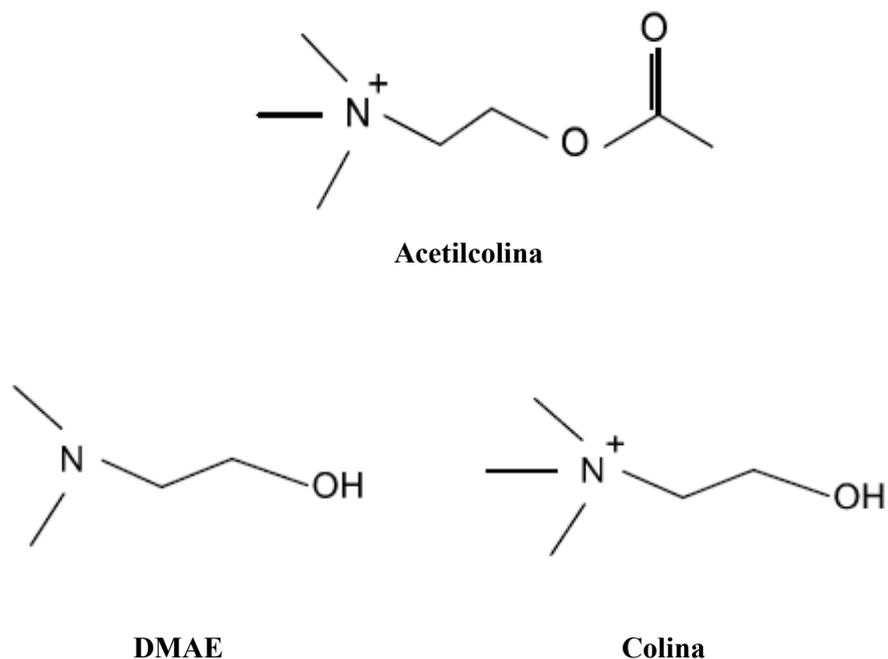


Figura 11 - Estruturas representativas: DMAE, Colina e Acetilcolina

O interesse cosmético pelo DMAE, segundo a literatura, iniciou-se por volta de 1996, quando Nicholas Perricone, dermatologista americano patenteou e divulgou um cosmético antiidade, promotor do aumento do tônus cutâneo, contendo DMAE (3 a 5%), éster de vitamina C (ascorbil palmitato) e outras vitaminas e minerais (DECCACHE, 2006).

O DMAE (dimetilaminoetanol) é classificado como aminoálcool com peso molecular (PM) 89,1 e fórmula molecular $C_4H_{11}NO$. É uma molécula pequena, de baixo ponto de ebulição $134\text{ }^{\circ}C$ e que se apresenta na forma de base livre, como um líquido incolor com forte odor característico de aminas e pH por volta de 11 (DECCACHE, 2006).

O uso de DMAE é largamente difundido em formulações cosméticas, com a promessa de promover um ‘lifting’ instantâneo na pele, proporcionando firmeza e melhora na textura com redução das de expressão. O DMAE também confere uma certa proteção contra os radicais livres, exercendo ações antiinflamatória e antioxidante. O mecanismo de ação do DMAE em dermatologia ainda não está totalmente elucidado, especula-se que uma possível

interferência com neurotransmissores colinérgicos (talvez, de forma análoga ao efeito anti-rugas da toxina botulínica) associado a um suave efeito antiinflamatório seja responsável pela sua ação (MORISSETTE *et al.*, 2007). A via da acetilcolina é possível ao nível da junção neuromuscular e/ou ainda, por aumento da contratilidade de células não epidérmicas e dérmicas.

Em um estudo realizado em 2002 (UHODA *et al.*) com trinta voluntárias com idades entre 36 a 49 anos, comparou o uso de uma formulação contendo 3% DMAE e outra formulação sem DMAE. Poucas voluntárias foram inconclusivas em comparar os efeitos da formulação com DMAE e da formulação placebo. As medidas realizadas sobre a força tensional intrínseca da pele não podem ser atribuídas as alterações de propriedades visco-elásticas relacionadas com a hidratação do estrato córneo. As medições de hidratação e conteúdo lipídico foram similares para ambas formulações. Entretanto, DMAE proporcionou a repartição da água em membranas celulares e nas macromoléculas da matriz dérmica. O aumento da retenção de água na superfície do tecido conectivo poderia aumentar a firmeza tissular resultando em rigidez da superfície da pele.

Uma formulação contendo DMAE 3% e extratos de duas plantas - *Rosmarinus officinalis* e *Centella asiatica* - foi avaliada quanto a promoção de elasticidade e firmeza da pele em um estudo randomizado, placebo-controlado e duplo cego (SOMMERFELD, 2007). Das 28 mulheres que participaram do estudo, três não concluíram o período de tratamento de 4 semanas, por desenvolverem dermatite de contato irritativa. As medições do aparelho que determina a firmeza da pele após 4 semanas de tratamento apresentaram diferença significativa entre as leituras da parte da face tratada com a formulação e a parte tratada com a formulação placebo. Com a formulação contendo DMAE e extratos de plantas houve uma redução de mais de 20% das medidas de distensão da pele, demonstrando que a formulação aumentou a firmeza da pele significativamente. Os efeitos adversos ao tratamento foram limitados, algumas mulheres relataram reações irritantes que desapareceram em alguns dias.

Nenhum outro efeito adverso foi relatado. Os componentes desta formulação sabidamente inibem o processo inflamatório destrutivo da pele, reduzem o dano causado por radicais livres, aumentam a elasticidade e firmeza com possível envolvimento do tônus muscular facial, e melhoram a cicatrização de feridas. O extrato de *Centella asiatica* com os terpenóides asiaticosídeo e madecosídeo que desempenham a função regulatória da atividade dos fibroblastos, poderia ser a explicação para seu uso em para feridas, queimaduras e eczemas. A planta *Rosmarinus officinalis* contém o antioxidante ácido rosmarínico, enquanto que o óleo essencial contém os triterpenos cineol e borneol aumentam o fluxo sanguíneo local. As ações combinadas destes componentes podem representar efeito benéfico à pele danificada.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Principal

- ✓ Estudo anatômico, histológico e fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea*, de uso etnofarmacológico consagrado, assim como a avaliação de sua aplicação cosmética e em terapia.

2.2 – Objetivos Específicos

- ✓ Partição e identificação dos constituintes químicos do extrato etanólico bruto das folhas de *Byrsonima sericea*;
- ✓ Avaliação farmacológica das partições obtidas a partir do extrato etanólico inicial;
- ✓ Desenvolvimento de formulação com extrato etanólico de *Byrsonima sericea* para uso cosmético;
- ✓ Avaliação da estabilidade da formulação dermocosmética obtida.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Matérias-primas:

- ✓ 2-dimetilaminoetanol (DMAE) bitartarato – Henrifarma
- ✓ Cera Auto Emulsificante (Lanette) - Farmos
- ✓ Vaselina líquida - Farmos
- ✓ Monoestearato de Glicerol - Galena
- ✓ Glicerina - Vetec
- ✓ Metilparabeno - Galena
- ✓ Propilparabeno - Galena
- ✓ Lanolina Anidra - Farmos
- ✓ Propilenoglicol – Vetec

3.2 – Reagentes, Solventes e Outros

- ✓ Ácido Acético Glacial P.A. - Vetec
- ✓ Ácido Perclórico 70% P.A. - Vetec
- ✓ Ácido Sulfúrico – Vetec
- ✓ Acetato de Etila – Vetec
- ✓ Anidrido Acético P.A. - Vetec
- ✓ Diclorometano - Vetec
- ✓ Etanol P.A. - Vetec
- ✓ Etanol 96°GL - Vetec
- ✓ Hexano – Vetec
- ✓ Sílica gel Mesh 60 – Merck Darmstad

- ✓ Cromatoplasmas com indicador de fluorescência 254 nm – Merck Darmstad

3.3 – Equipamentos

- ✓ Câmara Climática – Nova Ética
- ✓ Titulador Automático - Mettler DL 25
- ✓ Rota Evaporador – Fisaton
- ✓ Placa de aquecimento – Corning
- ✓ Balança analítica
- ✓ Colunas cromatográficas de vidro
- ✓ Lâmpada UV - Bioespectro
- ✓ Vidrarias em geral

3.4 – Coleta da matéria-prima vegetal

As folhas de *B. sericea* foram coletadas nas restingas de Maricá, Itaipuaçu, Recreio dos Bandeirantes e Grumari, no estado do Rio de Janeiro. Exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob os números 28574 e 28575, após sua identificação. A coleta e identificação foi realizado pela Prof^a Ana Cláudia Macêdo Vieira.

3.5 - Preparo do Extrato Etanólico inicial e suas partições

Cerca de 1,5 kg de folhas de *Byrsonima sericea* foram submetidas à secagem em estufa com ar circulante. Após esta etapa, o material obtido, cerca de 700 g, foi triturado em liquidificador e submetido à percolação com etanol 96° GL por cinco dias até esgotamento total do mesmo. Posteriormente, o extrato etanólico obtido foi concentrado sob pressão reduzida para remoção do solvente obtendo-se o extrato concentrado.

O extrato concentrado foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila).

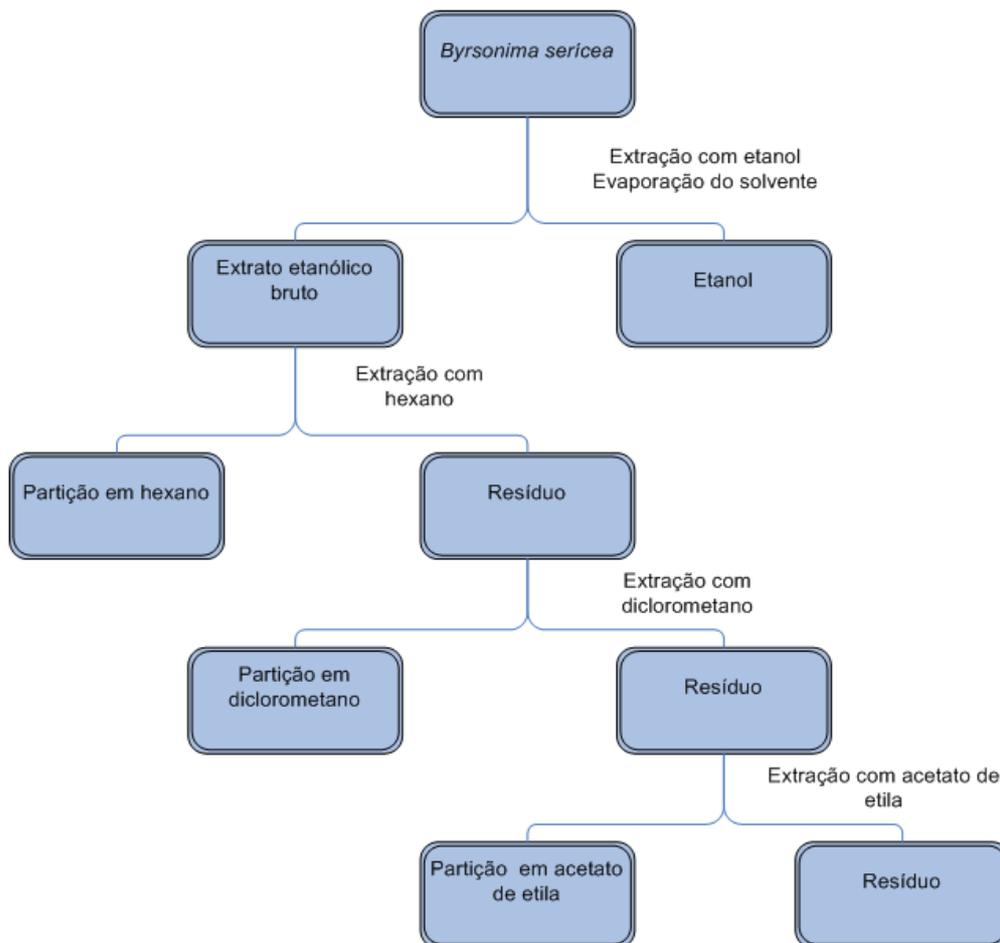


Figura 12 – Preparo do extrato bruto em etanol e respectivas partições em n-hexano, diclorometano e acetato de etila

Após evaporação dos solventes, obteve-se partições com os seguintes pesos: partição hexânica – 24,34g, partição em diclorometano – 11,74 g e partição em acetato de etila – 27,69g.

3.6 - Caracterização química do extrato etanólico bruto e suas respectivas partições

O extrato etanólico bruto e cada partição foi quimicamente analisada de forma a identificar as possíveis classes químicas presentes nas mesmas. A metodologia para avaliação segundo Mattos *et al.* (1988) determinou a presença de flavonóides, esteróides, oses/osides, alcalóides e antraquinonas.

3.7 – Caracterização morfológica e anatômica da espécie *Byrsonima sericea*

3.7.1 – Microscopia óptica

A análise morfológica das folhas foi realizada com material recém-coletado e/ou fixado em etanol 70% (JENSEN, 1962). A terminologia empregada nas descrições foi proposta por Radford *et al.* (1974).

Estudos anatômicos e histoquímicos foram desenvolvidos com a utilização de material recém-coletado e/ou fixado. Foram empregados como fixadores etanol 70%, formalina tamponada neutra (LILLIE 1948 *in* CLARK, 1981) ou glutaraldeído a 2,5% com tampão de fosfato de sódio (ZHANG & O'NEIL, 1993), dependendo do objetivo da análise e corados com azul de astra (C. I. não indicado) e safranina (C. I. 50240) (BUKATSCH, 1972). Após a desidratação etanólica das seções histológicas, a montagem das lâminas foi feita com resina sintética (Entellan). Para os estudos histoquímicos, as amostras foram seccionadas à mão, por intermédio de uma lâmina cortante ou com auxílio de micrótomo do tipo Ranvier. As seções foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- A detecção de amido foi feita com o reagente de Lugol (JENSEN, 1962) em material recém-coletado. O controle foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ling-Lee *et al.* (1977).

- A detecção de lipídios foi feita com Sudan III (C. I. 26100) (SASS, 1951) em material fixado em formalina neutra tamponada ou em glutaraldeído. O material controle foi submetido a banho de clorofórmio e metanol (1:1, v/v) de acordo com Pearse (1968).

- A presença de substâncias fenólicas foi avaliada com solução de cloreto férrico (JOHANSEN, 1940). O teste controle foi realizado com pré-tratamento em bicromato de potássio 5% por 24 h (REEVE, 1959 *apud* WHITTIER & PETERSON, 1995).

- A presença de açúcares foi detectada com o emprego dos reagentes de Fehling e Benedict (MACLEAN & IVIMEY-COOK, 1952).

Também foi analisada a natureza dos cristais através do uso de ácido acético a 10% e ácido nítrico a 10% (MACLEAN & IVIMEY-COOK, 1952).

As lâminas dos cortes histológicos foram montadas em água ou glicerina a 50%, dependendo do teste empregado.

Estas análises foram realizadas pela Prof^a Ana Claudia de Macêdo Vieira.

3.7.2 - Registro fotográfico

As fotografias de campo foram obtidas a partir do uso de câmaras fotográficas com filme Kodak Gold ASA 100 e ASA 400. As fotografias em laboratório foram feitas sob microscópio, com equipamento fotográfico acoplado, portando filme Kodak Gold ASA 100.

As fotos foram realizadas pela Prof^a Ana Claudia de Macêdo Vieira

3.8 – Caracterização cromatográfica dos extratos de *Byrsonima sericea*

Para visualização de grupos de substâncias similares contidas em cada partição, foi realizado Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com sistemas eluentes com diferentes polaridades, a saber:

- ✓ Hexano: Acetato de Etila 7:3
- ✓ Hexano: Acetato de Etila 1:1
- ✓ Hexano: Acetato de Etila 3:7

- ✓ Diclorometano:Acetato de Etila 1:1

Utilizou-se como sistema revelador solução a 5% de H₂SO₄ em etanol e observação prévia na lâmpada de ultra-violeta a 254 nm.

3.9 – Estudo da partição em hexano do extrato etanólico das folhas de *Byrsonima sericea*

Optou-se por iniciar os estudos fitoquímicos com a partição em hexano já que quando submetido à CCD, a natureza triterpênica das substâncias pode ser evidenciada pela coloração rósea obtida na amostra após revelação das amostras. Além de que, dentre os poucos relatos na literatura acerca da composição química deste gênero, a maioria indica a presença de triterpenos (MENDES, *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2006).

Cerca de 10 g da partição hexânica foi ressuspensa em diclorometano e adicionada em sílica gel. A mistura foi submetida à evaporação em rota-evaporador a temperatura (40°C) e pressão constante para preparo da pastilha de sílica com o extrato.

Esta pastilha foi cromatografada em coluna de vidro contendo sílica gel. Utilizou-se como fase móvel gradiente crescente de polaridade dos solventes, Hexano:Acetato de Etila até Acetato de Etila puro. As frações recolhidas possuíam cerca de 200 mL de volume. Doze frações foram recolhidas e analisadas por cromatografia em camada delgada e reunidas de acordo com as semelhanças cromatográficas, fornecendo três junções (Figura 13). A tabela 1 representa o sistema eluente usado em relação ao fracionamento inicial.

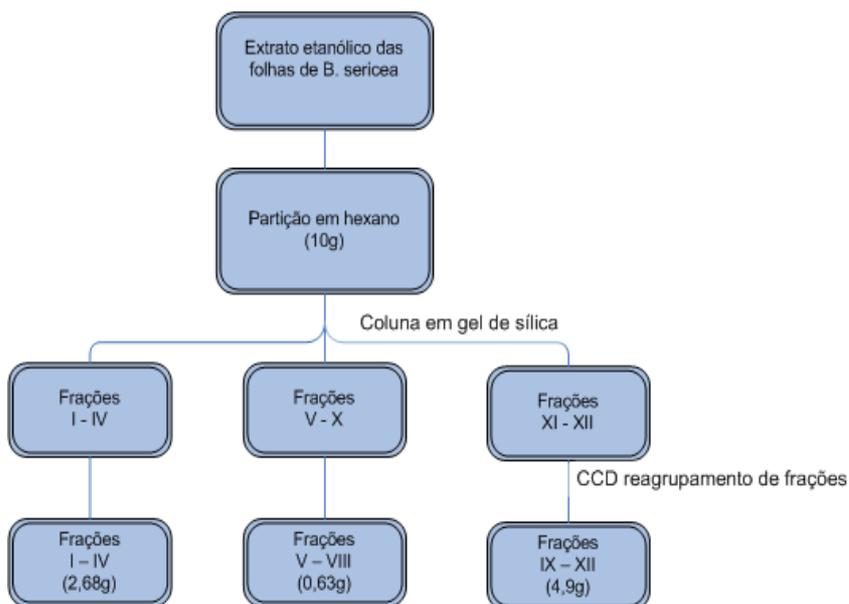


Figura 13 – Partição em hexano das folhas de *B. sericea*

Tabela 1 – Sistema eluente utilizado na partição hexânica

Frações	Sistema Eluente
I – IV	Hexano:Acetato de Etila 9:1
V – VIII	Hexano:Acetato de Etila 1:1
IX – XII	Acetato de Etila

As frações I – IV da partição em hexano, após reunidas (peso 2,68 g) foram novamente cromatografadas em sílica gel (mesh 60), em coluna de vidro (BSH FII), utilizando como fase móvel Hexano:Acetato de Etila na proporção 9:1. O volume recolhido de cada fração foi cerca de 20 ml. Das cinquenta e duas frações recolhidas, as frações 6, 7 e 8 apresentaram uma alta formação de um precipitado branco com formato de agulhas. Estas frações foram novamente reunidas e submetidas à recristalização. O produto obtido (80 mg) foi submetido a espectroscopia de RMN H^1 e C^{13} , fornecendo a primeira substância isolada da

partição em hexano das folhas de *B. sericea* (BS 01). A figura 14 representa o fracionamento realizado.

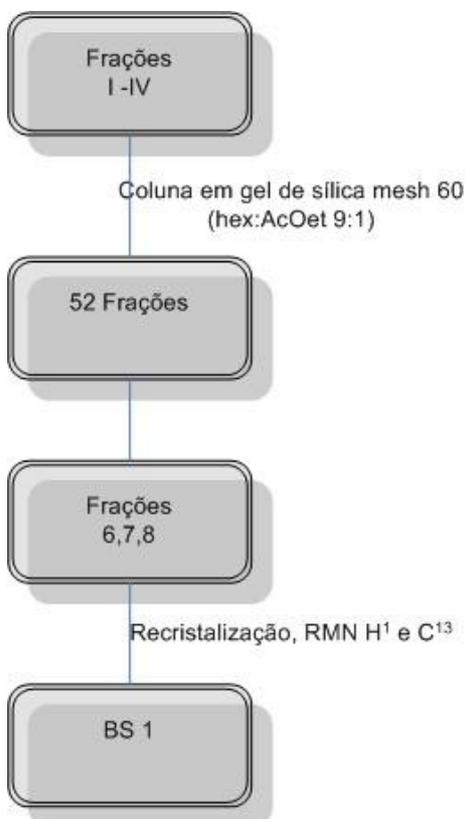


Figura 14 – Obtenção da substância BS01

A junção das frações IX – XII (peso 5 g) da partição inicial hexânica (BSH FI) foi cromatografada em gel de sílica (mesh 60) em coluna de vidro (BSH FIII). O sistema solvente utilizado como fase móvel foi Hexano:Acetato de Etila na proporção 8:2. Vinte e cinco frações foram recolhidas (cerca de 20 mL cada) e analisadas por CCD com fase móvel Hexano:Acetato de Etila 8:2. As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas fornecendo 4 junções. Especialmente, as frações 11 e 12 apresentaram alto grau de pureza quando submetidas a CCD e analisadas à lâmpada de UV. Estas frações foram reunidas e submetidas à recristalização. O produto da recristalização foi submetido a

espectroscopia de RMN H^1 e C^{13} , fornecendo a segunda substância isolada da partição em hexano das folhas de *B. sericea* (BS 02).

A figura 15 representa o fracionamento realizado.

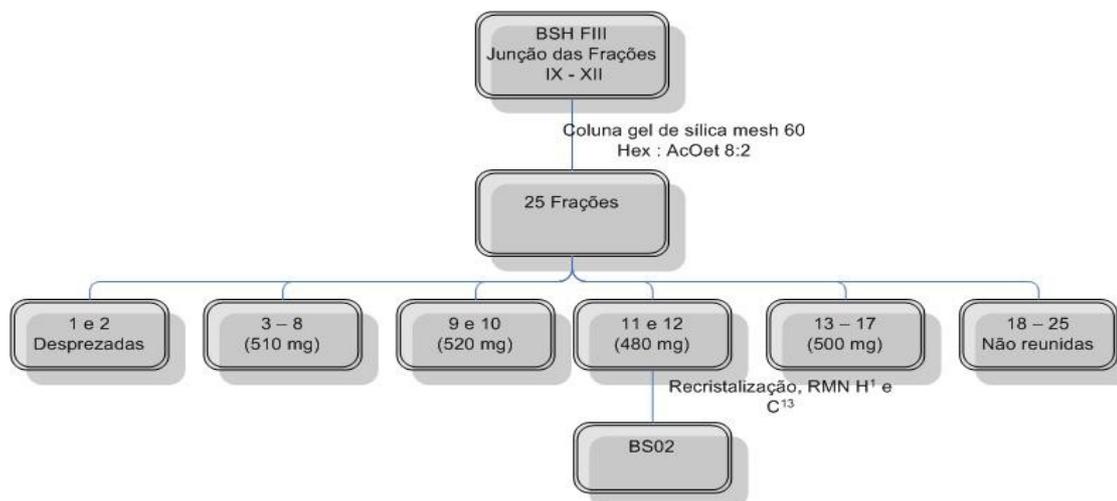


Figura 15 – Obtenção da substância BS02.

3.10 - Estudo da partição em Diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Byrsonima sericea*

Cerca de 7,0 g da partição em diclorometano do extrato etanólico das folhas de *B. sericea*, foi ressuspensa em diclorometano e adicionado sílica gel (mesh 60). A mistura foi submetida à evaporação em rota-evaporador a temperatura (40°C) e pressão constante para preparo da pastilha de sílica com o extrato.

A pastilha foi cromatografada em coluna de vidro com sílica gel - mesh 60 (BSD FI). A fase móvel utilizada foi Diclorometano:Acetato de Etila em gradiente crescente de polaridade até utilizar Acetato de Etila puro. 162 frações com cerca de 20 mL foram recolhidas. A tabela 2 representa as frações e o respectivo sistema eluente utilizado.

Tabela 2 – Sistema eluente utilizado na partição em Diclorometano

Frações	Diclorometano:Acetato de Etila
1 – 20	9:1
21 – 45	7,5:2,5
46- 80	5:5
81 – 162	0:10

Estas frações foram analisadas quanto ao perfil cromatográfico utilizando sistema eluente Hexano:Acetato de Etila 8:2 e reunidas conforme semelhança. Seis grupos de frações foram obtidos conforme representado na figura 16.

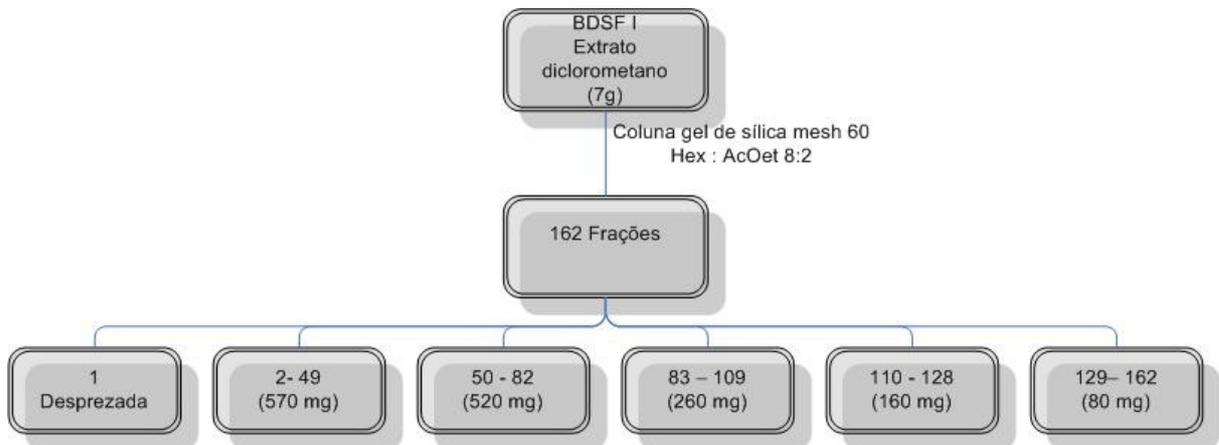


Figura 16 – Partição em Diclorometano de folhas de *B. sericea*

A junção da fração 50-82 (BSD FII) foi cromatografada em coluna de vidro com gel de sílica. Cinquenta e duas frações foram recolhidas com 5 ml cada. Como sistema eluente foi utilizado gradiente crescente de polaridade conforme a tabela 3 representa.

Tabela 3 – Sistema eluente para fracionamento de BSD FII

Fração BSD FII	Sistema eluente
1 - 22	Hexano:Acetato de Etila 5:5
23 - 43	Hexano:Acetato de Etila 4:6
44 - 52	Hexano:Acetato de Etila 3:7

Novamente, as frações foram submetidas a análise por CCD, utilizando o mesmo sistema eluente da coluna cromatográfica. As frações com perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas, fornecendo 3 grupos principais. As frações reunidas 6-10 (peso 80 mg) apresentaram alto grau de pureza e após recristalização foi enviada para análise por espectroscopia de RMN H^1 e C^{13} , fornecendo a substância BS 03. A figura 17 representa esta etapa do processo de isolamento e purificação da partição em diclorometano do extrato etanólico de *B. sericea*.

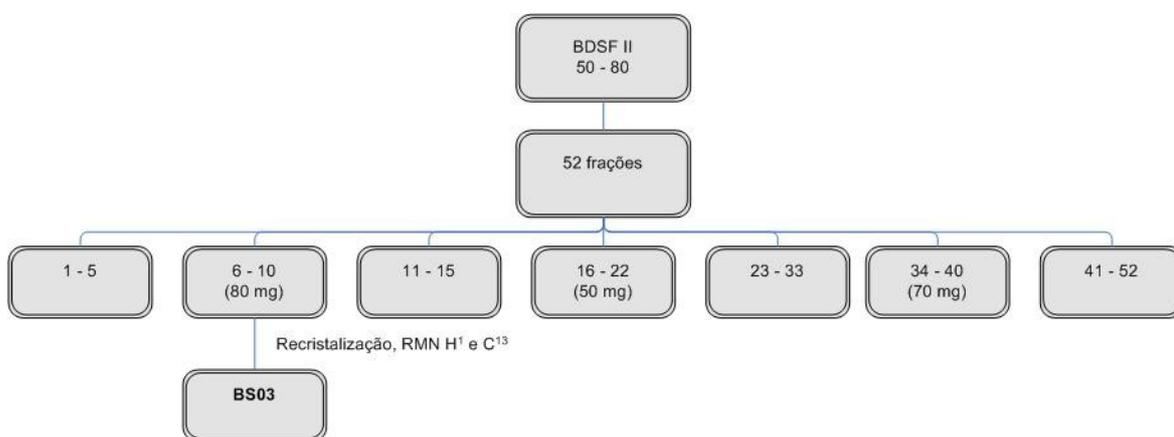


Figura 17 – Obtenção da substância BS03

A substância BS 01 foi analisada no aparelho Gemini 200 (200 MHz), as substâncias BS 02 e BS 03 em aparelho Bruker (500 e 400 MHz respectivamente). $CDCl_3$ (77.0 ppm) foi utilizado com padrão interno. DEPT (135) foi utilizado para determinação de multiplicidade.

Os espectros obtidos foram comparados com dados da literatura para sua elucidação estrutural.

A partição em acetato de etila não foi analisada.

3.11 – Avaliação farmacológica das partições obtidas a partir do extrato etanólico de *Byrsonima sericea*

A avaliação da atividade farmacológica das partições etanólica, hexânica, em diclorometano e em acetato de etila do extrato etanólico de *Byrsonima sericea*, foi focada no teste anti-malarial, já que dentre as várias propriedades atribuídas as plantas deste gênero, existem relatos de uso etnofarmacológico com finalidade antiparasitária e para o tratamento de febre (SANNOMIYA *et al.*, 2005). O experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Imunofarmacologia (Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz).

Utilizou-se como droga controle a cloroquina. Os animais Swiss webster (SW) foram infectados com 10^8 hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados por 04 dias consecutivos com diferentes concentrações das partições diluídas em DMSO 1%. Após esse período, foi avaliado o percentual de parasitemia em esfregaços (realizados em lâminas coradas pelo método Panótico). A sobrevivência dos animais também foi acompanhada por um período de 15 dias.

3.12 – Elaboração de formulação dermocosmética contendo extrato etanólico de *Byrsonima sericea*

O objetivo pretendido ao elaborar uma formulação para uso tópico (uso dermocosmético) com extrato etanólico de *Byrsonima sericea* e 2-dimetilaminoetanol (DMAE), ativo cosmético com amplo uso na indústria cosmética por promover efeitos firmadores na pele a longo prazo, seria relacionar os terpenos presentes neste extrato a uma

melhor resposta do produto cosmético. Ou ainda, acrescentar efeitos benéficos à formulação devido à composição natural do extrato, já que outras espécies do gênero *Byrsonima* possuem ações antiinflamatórias e antioxidantes já descritas. Como já citado, o uso de DMAE associado a extratos de plantas já foi anteriormente avaliado (SOMMERFELD, 2007).

Nesta etapa do estudo, avaliou-se a estabilidade da formulação proposta, segundo o Guia para Realização de Estudos de Estabilidade (ANVISA, 2005), objetivando identificar degradação química e/ou mudanças físicas no produto. Conforme a norma técnica, o doseamento ocorreu nos tempos 0, 3 e 6 meses. A formulação foi armazenada em câmara climática com temperatura e umidade pré-definidas (40 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$).

A formulação proposta está descrita na tabela 4.

A fim de verificar se o extrato etanólico de *B. sericea* poderia interferir no doseamento do ativo DMAE, uma formulação idêntica a anteriormente descrita porém sem o extrato etanólico de *B. sericea* foi elaborada e avaliada.

Tabela 4 – Formulação dermocosmética proposta

Componentes	Concentração (%)
<i>Fase Oleosa</i>	
Cera auto emulsificante	8 %
Vaselina líquida	8 %
Monoestearato de glicerila	4 %
Lanolina anidra	2 %
<i>Fase Alcoólica</i>	
Metilparabeno	0,1 %
Propilparabeno	0,1 %
Álcool etílico	5 %
Propilenoglicol	2 %
Extrato etanólico de <i>B. sericea</i>	5 %
<i>Fase Aquosa</i>	
Glicerina	12 %

DMAE bitartarato	5%
Água destilada	Qsp 100g

3.12.1 – Técnica de doseamento da formulação dermocosmética contendo DMAE e extrato etanólico de *Byrsonima sericea*

A titulação potenciométrica em meio não aquoso é uma metodologia que se mostra adequada para a determinação de substâncias fracamente básicas ou fracamente ácidas, assim como para alguns sais de amônio quaternário. Esta metodologia é comumente utilizada por alguns fornecedores para a determinação quantitativa do DMAE na matéria-prima. Deccache (2006) validou esta metodologia durante avaliação de uma formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares.

3.12.2 – Condições analíticas para doseamento da formulação dermocosmética

A metodologia seguiu os seguintes parâmetros:

- ✓ Solução Titulante - HClO_4 0,1 N
- ✓ Padrão primário para fatoração: Biftalato de Potássio previamente dessecado por 4 horas a 105 °C
- ✓ Solvente: Ácido Acético Glacial P.A. 50,0 mL + Anidrido Acético 1,0 mL
- ✓ Tempo de agitação das amostras antes da titulação: aproximadamente 2 minutos;
- ✓ Velocidade da hélice: Graduação 4
- ✓ Eletrodo: Dupla ponte CV4 Mettler Tolloed
- ✓ Eletrólito: KCl 3M/LiCl 3M em ácido acético P.A.

Esta metodologia foi utilizada durante a avaliação do estudo de estabilidade acelerado.

4 – Resultados

4.1 – Caracterização da espécie

A espécie *Byrsonima sericea* é um arbusto ou árvoreta (Figura 18) que ocorre do primeiro cordão arenoso até as regiões de mata nas restingas de Maricá e no segundo cordão arenoso na restinga de Itaipuaçu ambos municípios localizados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Apesar de outras espécies do gênero terem aplicação etnofarmacológica ampla, esta espécie possui apenas algumas poucas citações referentes à identificação de constituintes químicos, sem nenhuma referência quanto a aplicação farmacológica (SOUZA *et al.*, 1970; SANNOMYIA *et al.*, 2005)



**Figura 18 – Arbusto ou árvoreta representativo da espécie *Byrsonima sericea*
Foto: Prof^ª Ana Claudia de Macêdo Vieira**

4.2 -Caracterização química da espécie *Byrsonima sericea*

Segundo a metodologia de Mattos et al. (1988), o resultado referente as classes químicas presentes nas partições de *Byrsonima sericea* estão descritos na tabela 05.

Tabela 05 – Classes químicas presentes nas partições de *Byrsonima sericea*

Substância ↓	Extrato →	Hexano	Diclorometano	Acetato de Etila	Etanol bruto
Flavonóides		-	-	-	✓
Esteróides		✓	✓	-	-
Oses/Osides		-	✓	✓	✓
Alcalóides		-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-

4.3 - Análise anatômica e histoquímica da espécie *Byrsonima sericea*

O corte transversal da região mediana da folha (figuras 19 e 20) revelou epiderme uniestratificada na face adaxial, com células comuns com parede periclinal externa espessada pela presença de grossa cutícula. A epiderme da face abaxial exhibe células comuns menores que as da face adaxial com cutícula espessa e longos flanges, estômatos e numerosos tricomas em T. O mesófilo (figura 20) era constituído de uma camada de parênquima paliçádico e cerca de seis camadas de parênquima esponjoso. Nessa região foram observados feixes vasculares colaterais e idioblastos contendo drusas (figura 20).

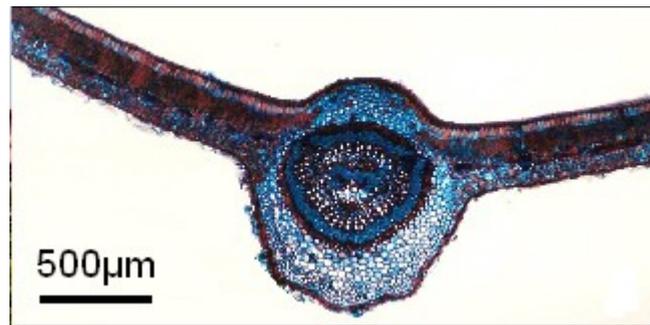


Figura 19 – Corte transversal da região mediana da folha de *B. sericea*
Foto: Profª Ana Claudia de Macêdo Vieira

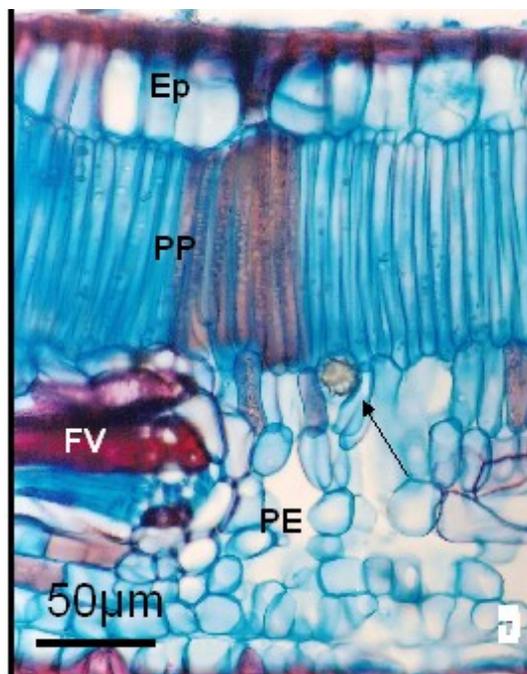
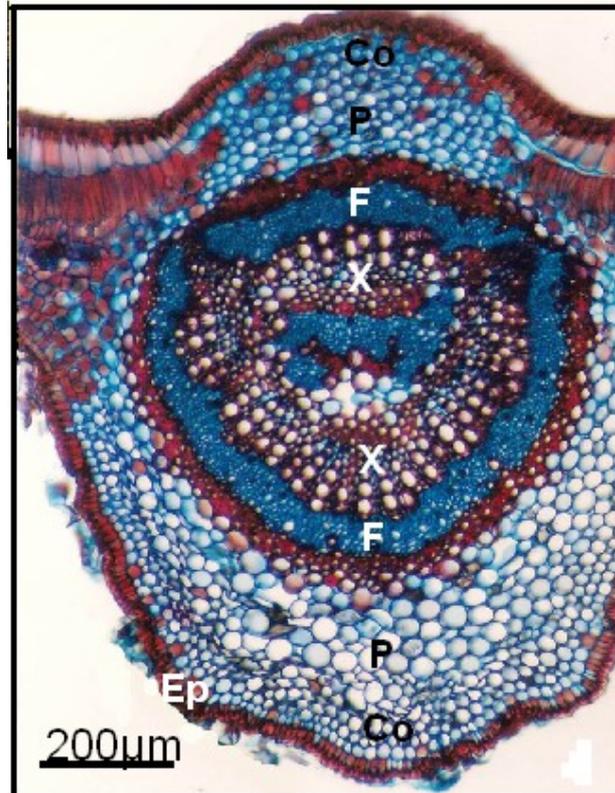


Figura 20 – Mesófilo com parênquima paliçádico e esponjoso
Foto: Profª Ana Claudia de Macêdo Vieira

Na nervura central da região mediana da folha (figura 21) as células comuns da epiderme de ambas as faces apresentam-se menores que na lâmina foliar. Na face inferior, tricomas foram observados entre as células comuns da epiderme. Junto à epiderme da adaxial foram observadas de uma a duas camadas de colênquima, e junto à face abaxial, foram observadas três a quatro camadas de colênquima angular. Um número variável de camadas parenquimáticas foram observadas em ambas as faces, formando uma região cortical. A



região vascular (figura 21) apresentou formato circular e desenvolvimento secundário dos tecidos condutores, com um anel esclerenquimático circundando o floema. Entre o floema e o xilema secundários, foi observada uma região cambial. Na parte central da região vascular, foi observada presença de floema e parênquima medular

**Figura 21 – Nervura central da região mediana da folha de *B. Sericea*
Foto: Profª Ana Claudia de Macêdo Vieira**

Os testes histoquímicos revelaram a presença de substâncias fenólicas nos tecidos parenquimáticos, como evidenciado na figura 22 e de substâncias lipofílicas como pode ser observado na figura 23, dentre estas ácidos graxos de cadeia longa. Houve resultados positivos também nos testes para detecção de lignina e amido. Os testes realizados mostraram

que os cristais do tipo drusa presentes em idioblastos dos parênquimas são constituídos por oxalato de cálcio.

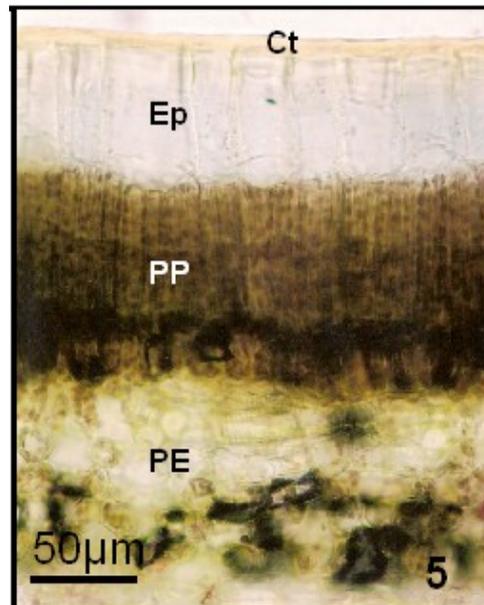


Figura 22 – Tecido parenquimático com presença de substâncias fenólicas
Foto: Profª Ana Claudia de Macêdo Vieira

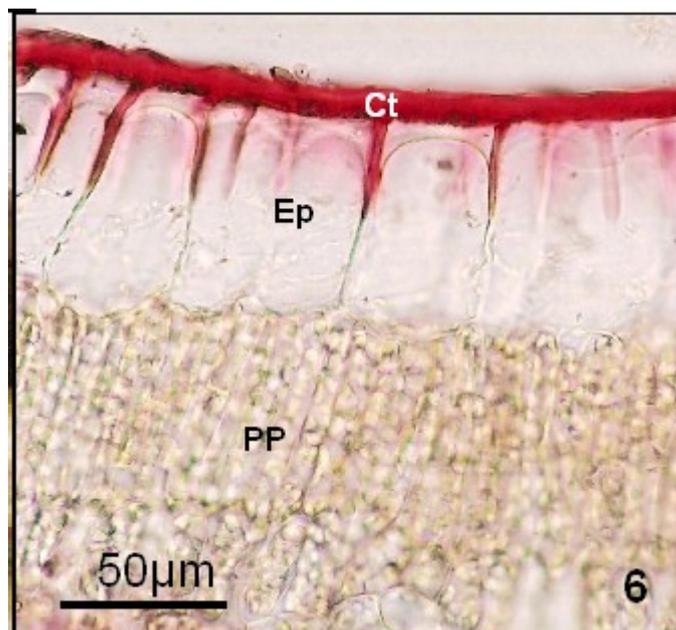


Figura 23 – Tecido parenquimático com presença de substâncias lipofílicas
Foto: Profª Ana Claudia de Macêdo Vieira

4.4 – Identificação das substâncias isoladas na partição em hexano do extrato etanólico de *Byrsonima sericea*

Duas substâncias – BS 01 e BS 02 - foram isolados a partir da partição hexânica. A substância BS01 foi obtida a partir das frações 6, 7, 8 da partição BSH FII, enquanto a substância BS02 foi obtida a partir das frações 11 e 12 da partição BSH FIII. Ambas após recristalização foram enviadas a análise por espectroscopia por RMN H^1 e C^{13} .

A partir da análise dos espectros de RMN C^{13} e H^1 e tomado-se por base dados previamente obtidos na literatura (KULSHRESHTHA, 1972; MAHATO, 1994; QUIEROGA *et al.*, 2000, CASTOLA *et al.*; 2002; AGETA *et al.*; 2005), caracterizou-se as substâncias obtidas como: BS 01 – friedelina e BS 02 - lupeol. Os dados de RMN H^1 e C^{13} encontram-se listados nas tabelas 06 a 08. As figuras 24 a 28 representam as estruturas e os espectros obtidos para as substâncias friedelina e lupeol.

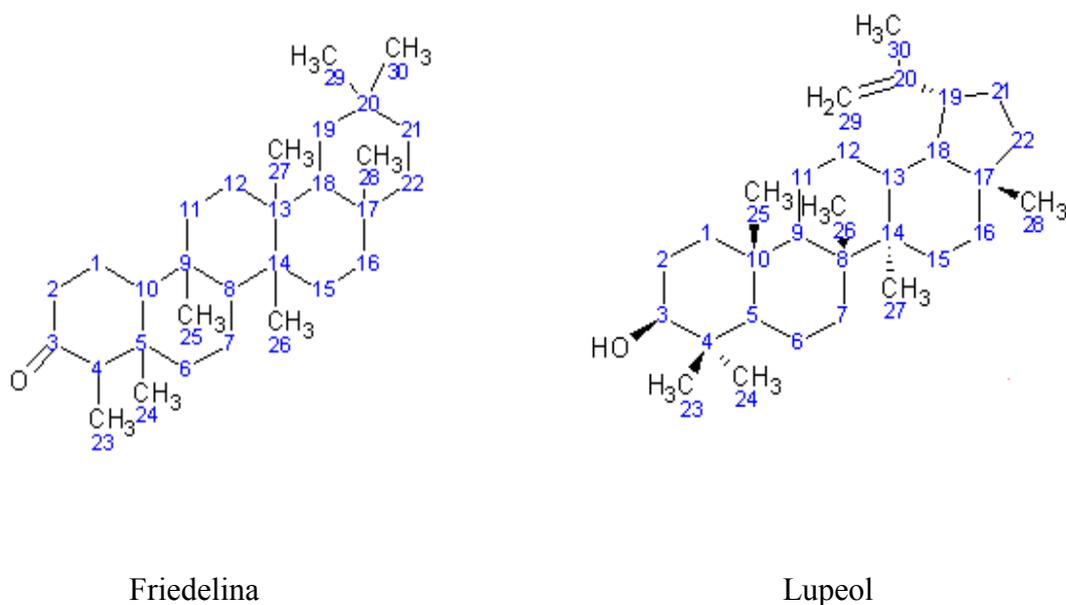


Figura 24 – Estruturas isoladas e identificadas na partição em hexano de *Byrsonima sericea*

Tabela 6 – Dados de RMN H¹ e C¹³ para Friedelina (CDCl₃, 200 MHz)

* Dados descritos por AGETA et al., 2005

Posição	δH^1 *	δH^1 BS 01	δC^{13} BS 01
1	-	-	22,18
2	-	-	41,17
3	-	-	213,17
4	-	-	58,1
5	-	-	42,03
6	-	-	41,41
7	-	-	18,12
8	-	-	52,98
9	-	-	37,32
10	-	-	59,35
11	-	-	35,50
12	-	-	30,38
13	-	-	39,57
14	-	-	38,17
15	-	-	32,29
16	-	-	35,90
17	-	-	29,87
18	-	-	42,67
19	-	-	35,22
20	-	-	28,05
21	-	-	32,64
22	-	-	39,14
23	0,88 (3H, d, J=6,6 Hz)	0,871 (3H, d)	6,73
24	0,73 (3H, s)	0,726 (3H, s)	14,55
25	0,87 (3H, s)	0,897 (3H, s)	17,85
26	1,00 (3H, s)	0,955 (3H, s)	20,16
27	1,05 (3H, s)	1,052 (3H, s)	18,56
28	1,18 (3H, s)	1,183 (3H, s)	31,99
29	0,95 (3H, s)	0,955 (3H, s)	34,92

30

1,00 (3H, s)

1,007 (3H, s)

31,68

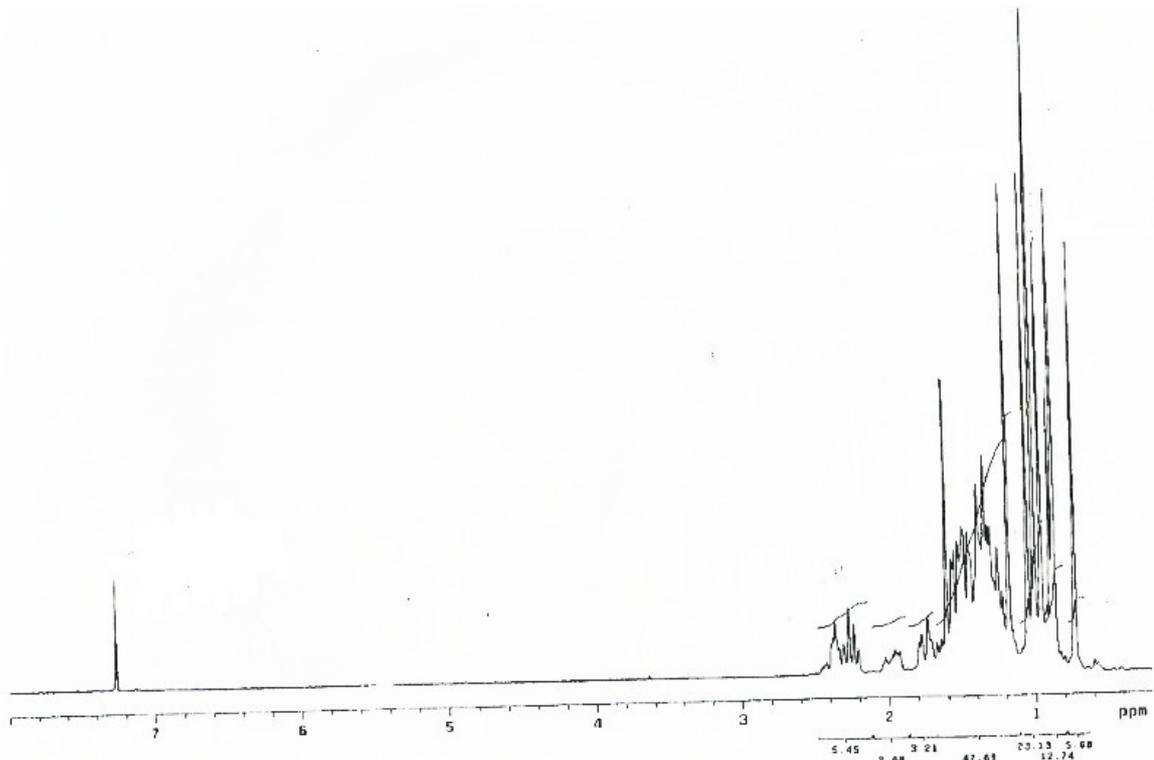


Figura 25 – Espectro RMN H^1 da substância Friedelina – $CDCl_3$, 200 MHz

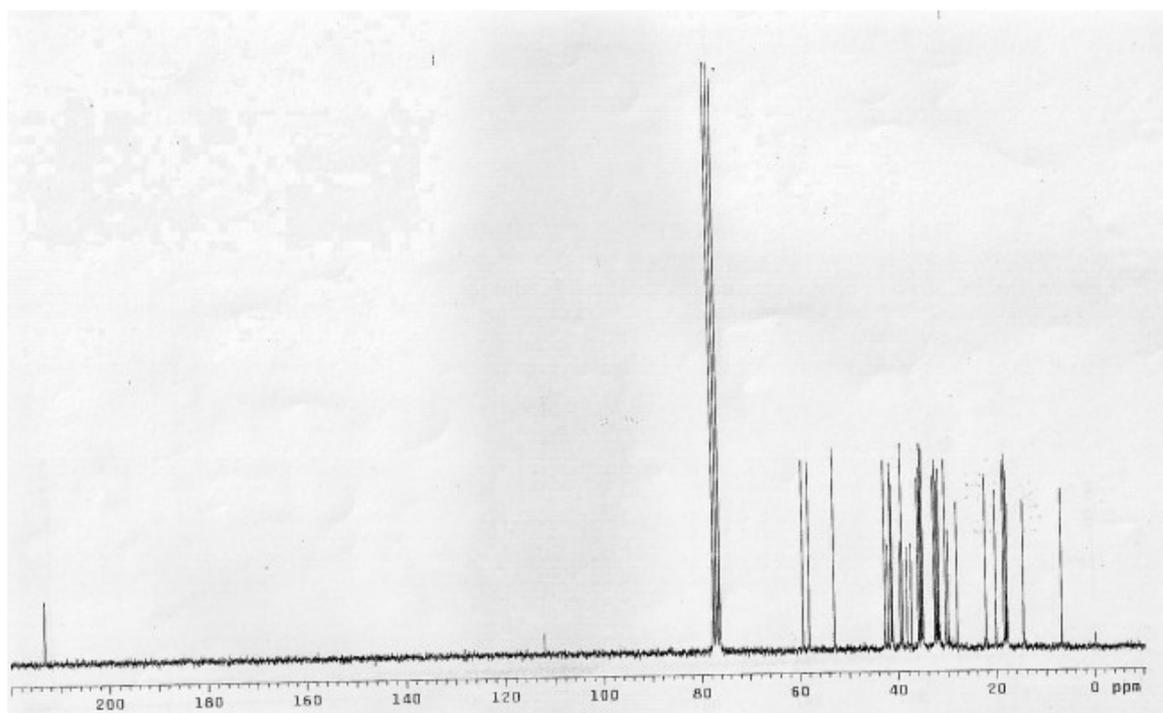


Figura 26 – Espectro RMN C¹³ da substância Friedelina – CDCl₃, 200 MHz

Tabela 07 - Dados de RMN H¹ e C¹³ para Lupeol (CDCl₃, H¹ 500 MHz, C¹³ 125 MHz)

* Dados descritos por ROCHA, 2004

Posição	δH^1 *	δH^1	δC^{13}
1	-	-	38,70
2	-	-	27,46
3	3,18 (1H, dd, J=4,0 e 11,0 Hz)	3,18 (1H, dd)	79,04
4	-	-	38,81
5	-	-	55,30
6	-	-	18,35
7	-	-	34,32
8	-	-	40,88
9	-	-	50,49
10	-	-	37,21
11	-	-	20,97
12	-	-	25,20
13	-	-	38,10
14	-	-	42,88
15	-	-	27,49
16	-	-	35,62
17	-	-	43,04
18	-	-	48,02
19	2,38 (1H, m)	2,38 (1H, m)	48,36
20	-	-	150,99
21	-	-	29,86
22	-	-	40,04
23	0,76 (3H, s)	0,76 (3H, s)	28,01
24	0,78 (3H, s)	0,79 (3H,s)	15,38
25	0,83 (3H, s)	0,83 (3H, s)	16,14
26	0,94 (3H, s)	0,94 (3H,s)	16,01

27	0,96 (3H, s)	0,97 (3H, s)	14,58
28	-	-	18,03
29	4,68 (1H, d, J= 4 Hz)	4,57, 4,68 (d)	109,34
30	1,68 (3H, s)	1,68(3H, s)	19,34

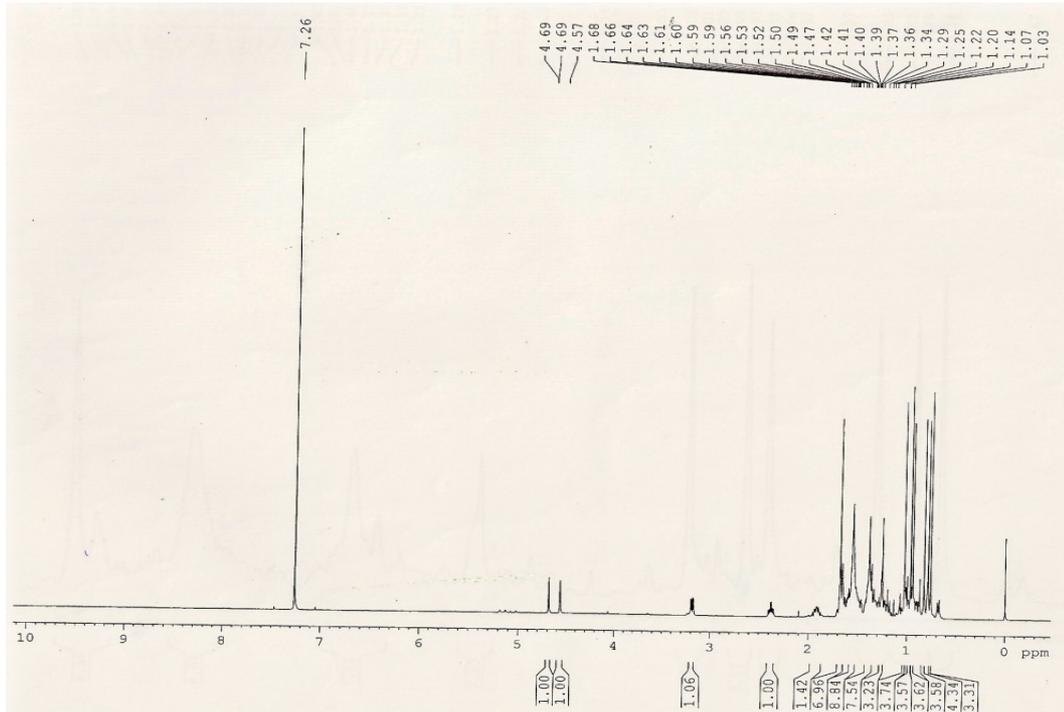


Figura 27 – Espectro RMN H¹ da substância Lupeol – CDCl₃, 500 MHz

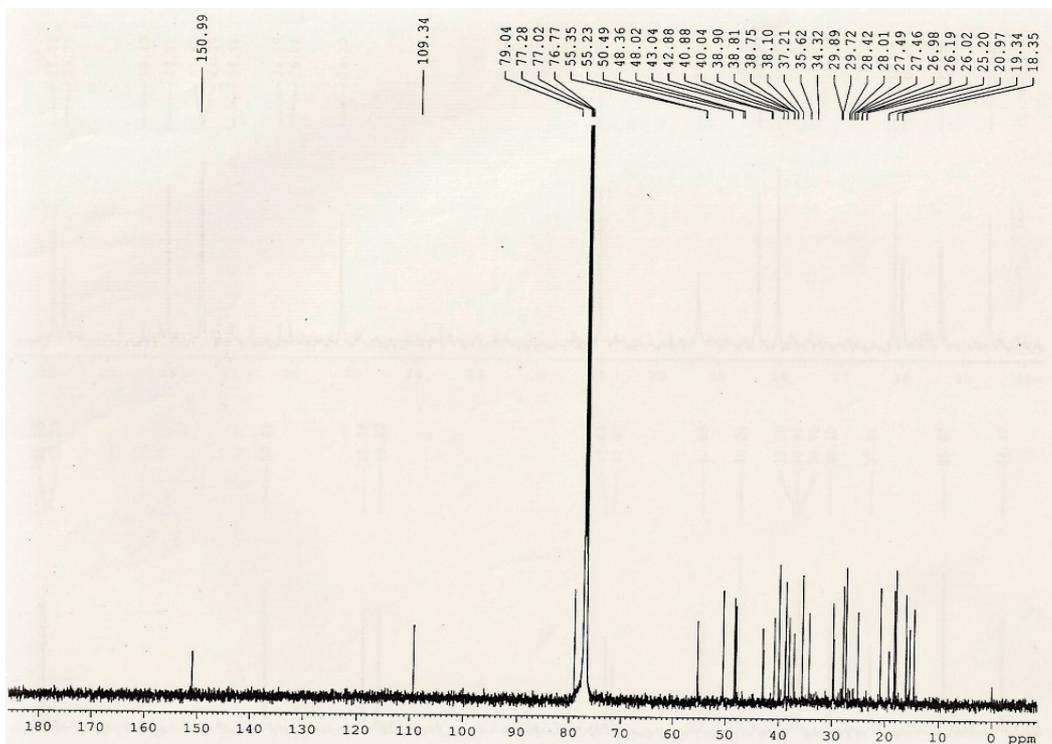
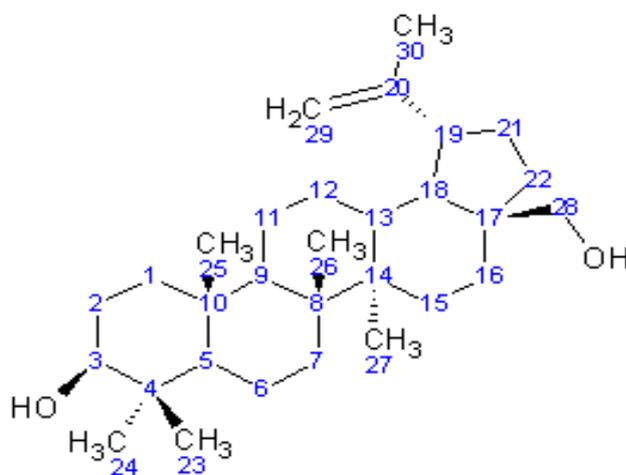


Figura 28 – Espectro RMN C^{13} da substância Lupeol – $CDCl_3$, 125 MHz

4.5 – Identificação da substância isolada na partição em Diclorometano do extrato etanólico de *B. sericea*

A substância BS 03, isolada da partição em diclorometano (BSD FII), após ser submetido a recristalização foi enviado para análise por espectroscopia de RMN H^1 e C^{13} .

A partir da análise dos espectros de RMN C^{13} e H^1 e tomado-se por base dados previamente obtidos de literatura (TINTO, 1992; MAHATO, 1994), caracterizou-se a substância BS 03 como betulina. Os dados de RMN H^1 e C^{13} encontram-se listados na tabela 08. As figuras 29 a 31 representam a estrutura e os espectros obtidos para a substância betulina.



Betulina

Figura 29 – Estrutura isolada e identificada na partição em Diclorometano de *B. sericea*

Tabela 08 - Dados de RMN H¹ e C¹³ para Betulina (CDCl₃, H¹ 400 MHz, C¹³ 100 MHz)

* Dados descritos por TINTO et al; 1992

Posição	δH¹ *	δH¹ BS 03	δC¹³ BS 03
1	1,65, 0,89	1,64, 0,89	38,70
2	<1,58>	1,59	27,38
3	3,18	3,18	79,00
4	-	-	38,88
5	0,67	0,67	55,29
6	1,52, 1,38	1,53, 1,37	18,33
7	<1,39>	1,39	34,23
8	-	-	40,94
9	1,27	1,27	50,42
10	-	-	37,18
11	1,41, 1,19	1,42, 1,20	20,85
12	1,63, 1,03	1,62 1,02	25,24
13	1,64	1,63	37,34
14	-	-	42,73
15	1,70, 1,04	1,70, 1,04	27,07
16	1,93, 1,20	1,93, 1,21	29,19
17	-	-	47,00
18	1,57	1,57	48,81
19	2,38	2,39	47,80
20	-	-	150,47
21	1,95, 1,40	1,95	29,77
22	1,86, 1,02	1,85, 0,99	33,98
23	0,96	0,96	28,00
24	0,76	0,76	15,37
25	0,82	0,82	16,11
26	1,02	1,02	16,00
27	0,98	0,98	14,75
28	3,77, 3,31	3,78, 3,32	60,58
29	4,68, 4,58	4,68, 4,57	109,69
30	1,68	1,68	19,11

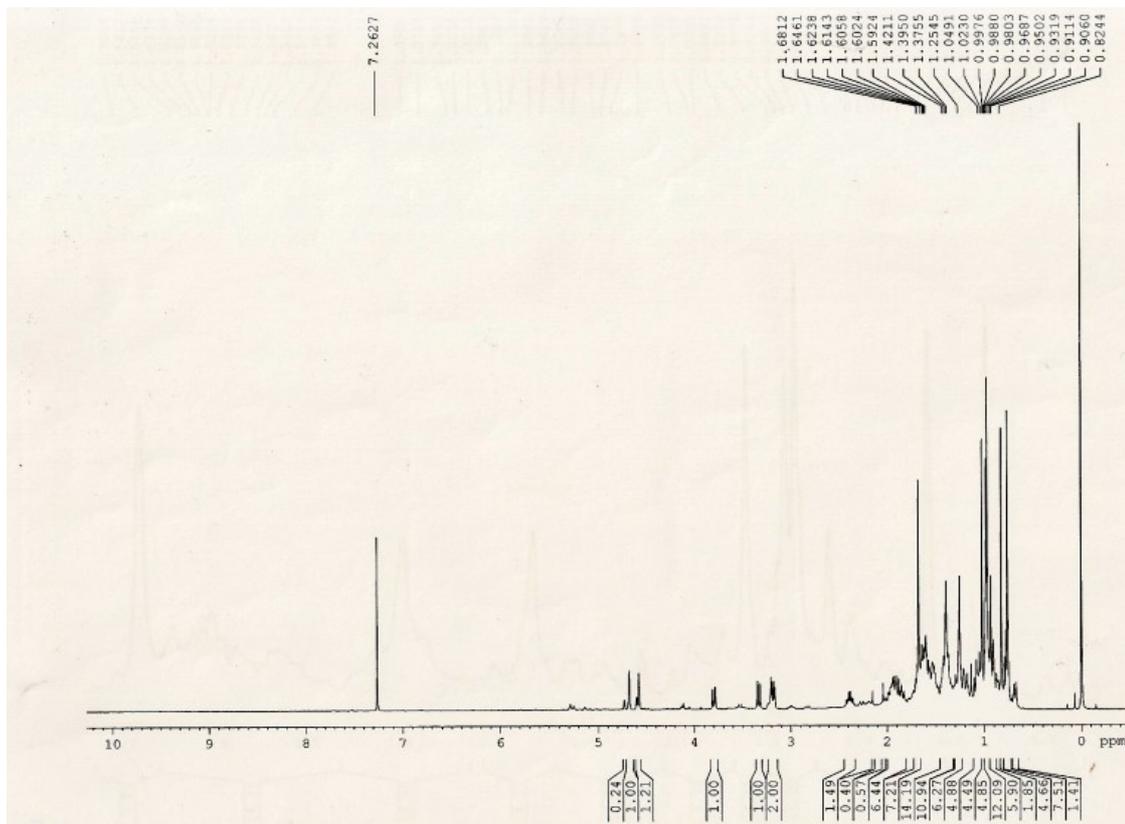


Figura 30 – Espectro RMN H^1 da substância Betulina – $CDCl_3$, 400 MHz

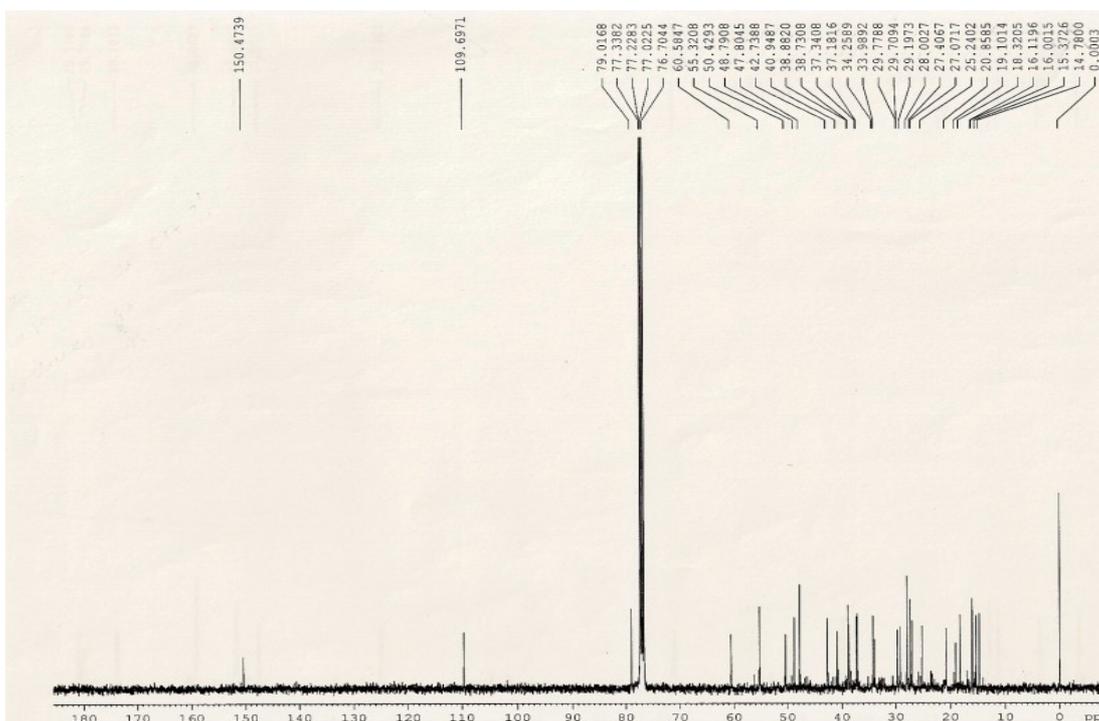


Figura 31 – Espectro RMN C¹³ da substância Betulina – CDCl₃, 125 MHz

4.6 – Resultado da avaliação farmacológica das partições do Extrato Etanólico de *Byrsonima sericea*

O modelo experimental proposto pelo grupo foi o ensaio de quatro dias, onde animais da estirpe *Swiss webster* (18-25 g) são infectados com *Plasmodium berghei* (10⁸) e duas horas após a infecção o tratamento via oral (200 µL) é iniciado, perdurando por mais três dias. Como controle foi utilizada a droga padrão anti malarial cloroquina (25 mg/ kg peso corporal).

Os animais foram avaliados em relação aos parâmetros parasitemia (96 horas após infecção) e sobrevivência à infecção com o parasita. Seguem abaixo os resultados obtidos.

No primeiro experimento (figura 32), as partições BsAc e BsEt foram testadas nas doses de 10 e 100 mg/kg. O produto BsAc inibiu a parasitemia na menor dose em aproximadamente 46% e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais. Estes efeitos não foram observados para BsEt.

Em um segundo experimento (figura 33) foram testadas duas doses das partições BsDM (10 e 100 mg/kg peso corporal) e uma do BsHx (30 mg/kg peso corporal). O tratamento com a partição BsDM na dose de 10 mg/kg causou pouca inibição em relação à parasitemia dos animais. Em relação à sobrevivência, o tratamento com as duas partições na dose testada elevou a taxa de sobrevivência dos animais. Com base nestes dados retestamos a fração BsAc.

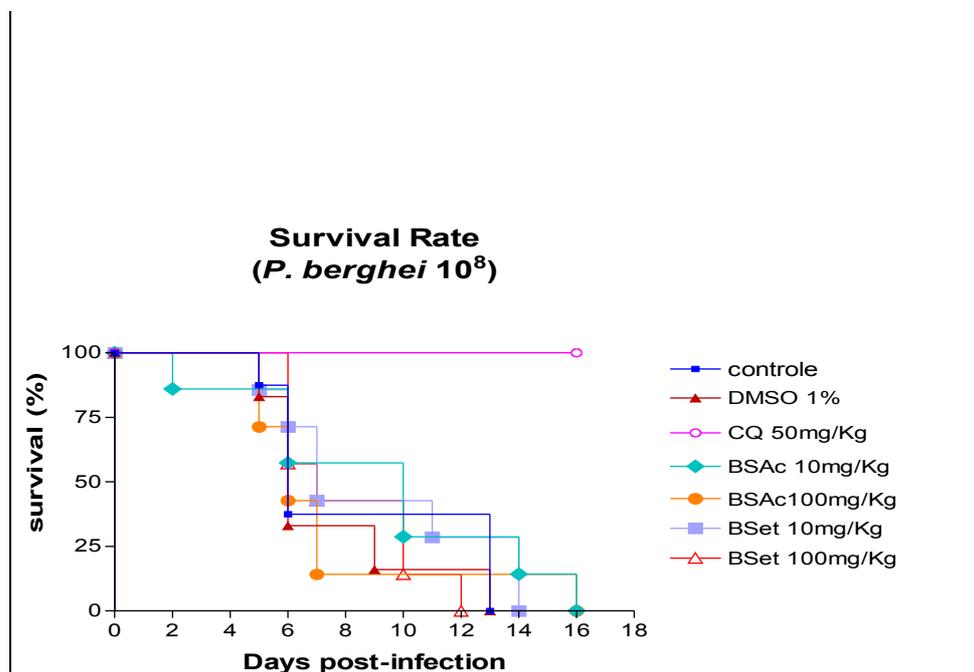
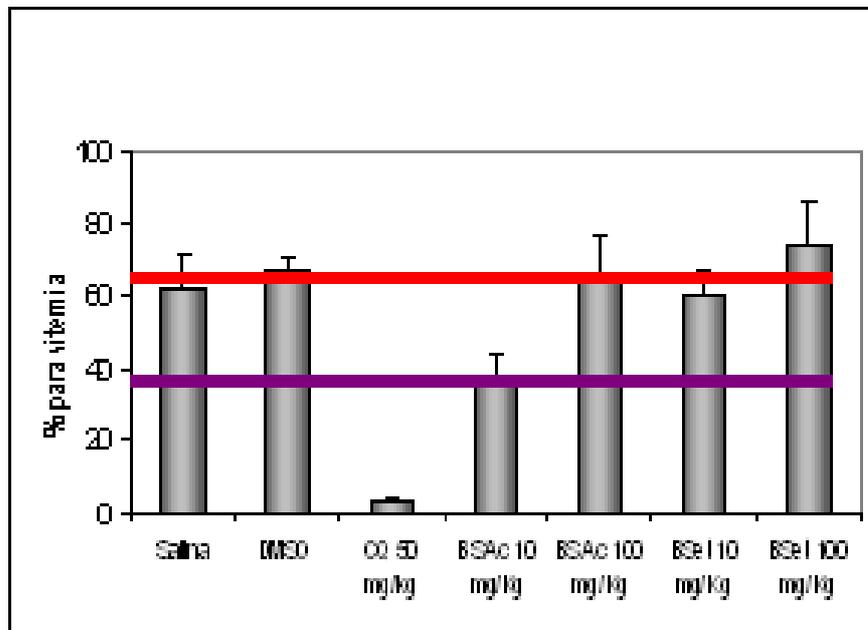


Figura 32 – Avaliação farmacológica da partição em Acetato de Etila (BsAc) e em Etanol (BsEt)

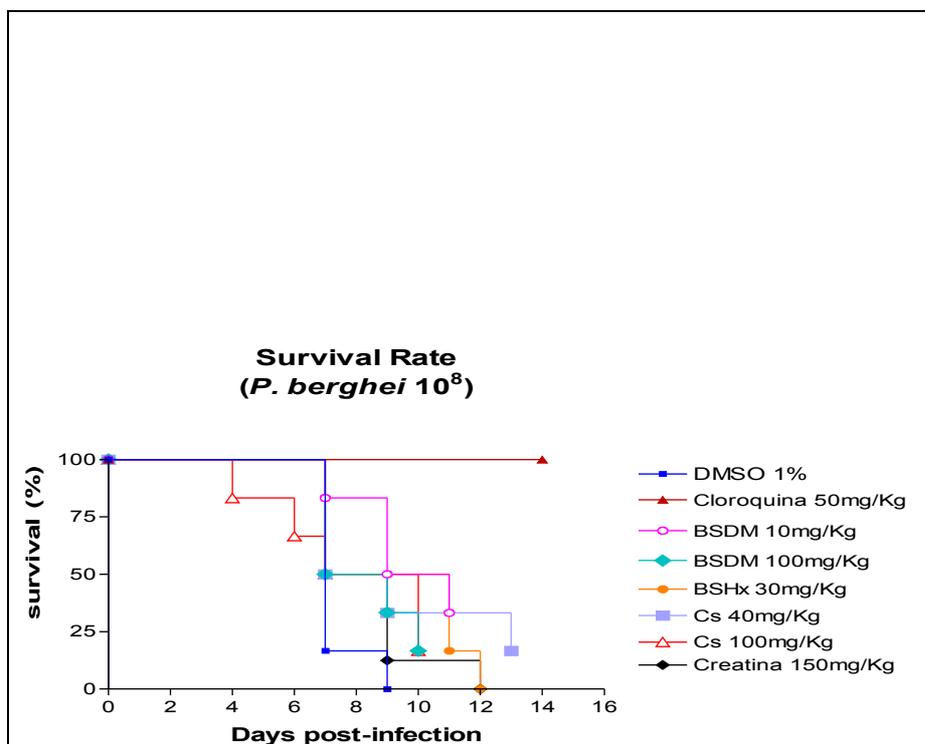
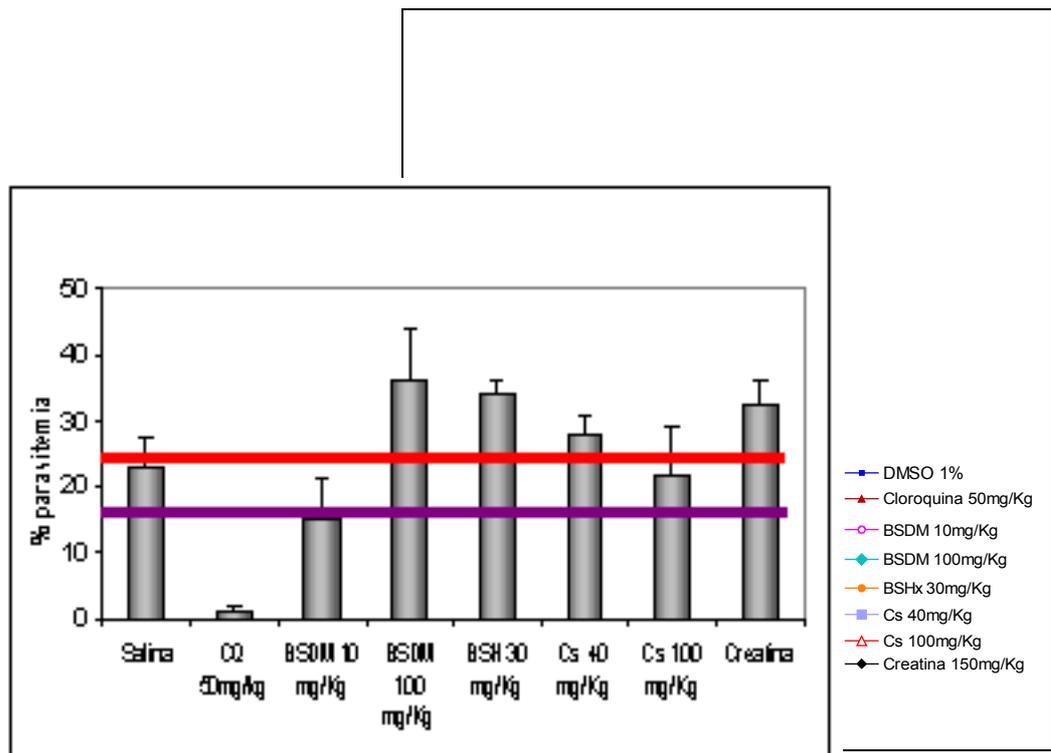


Figura 33 – Avaliação farmacológica da partição em diclorometano (BsDM) e em hexano (BsHX).

O efeito das partições de diclorometano (BsDM) e de acetato de etila (BsAc) na parasitemia e na sobrevida de animais foi avaliado inoculando-os com hemácias infectadas com *P. berghei* 10^8 (figura 34 e figura 35) ou 10^7 (figura 36). Os animais foram infectados no dia 0 e tratados durante quatro dias com diferentes doses das partições. Após 24h do último tratamento foi avaliado o percentual de parasitemia no sangue dos animais (esfregaço corado pelo método Panótico) e observado a sobrevida dos animais.

Os resultados indicaram que a partição BsDM nas doses utilizadas (figura 34) não foi capaz de reduzir a parasitemia provocada pela infecção com *P. berghei* nos animais. Conseqüentemente, também não foi observado aumento da sobrevida dos animais nestas condições experimentais.

Quando analisamos o efeito da fração BsAc, observamos que a dose de 50 mg/kg apresentou uma discreta redução da parasitemia (25%), sem contudo ser observado aumento na sobrevida dos animais (figura 36).

Estes resultados sugerem que novos testes devem ser realizados com a fração BsAc utilizando doses mais altas para melhor avaliação de seu potencial antimalarial e antiparasitário.

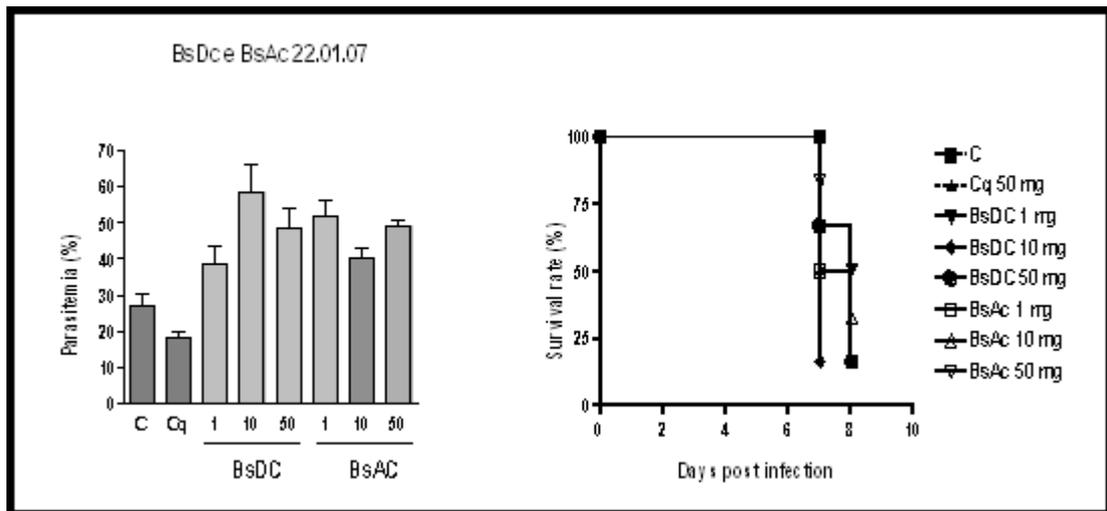


Figura 34 – Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos animais infectados com *P. berghei* 10⁸ e tratados com partículas em diclorometano (BsDM)

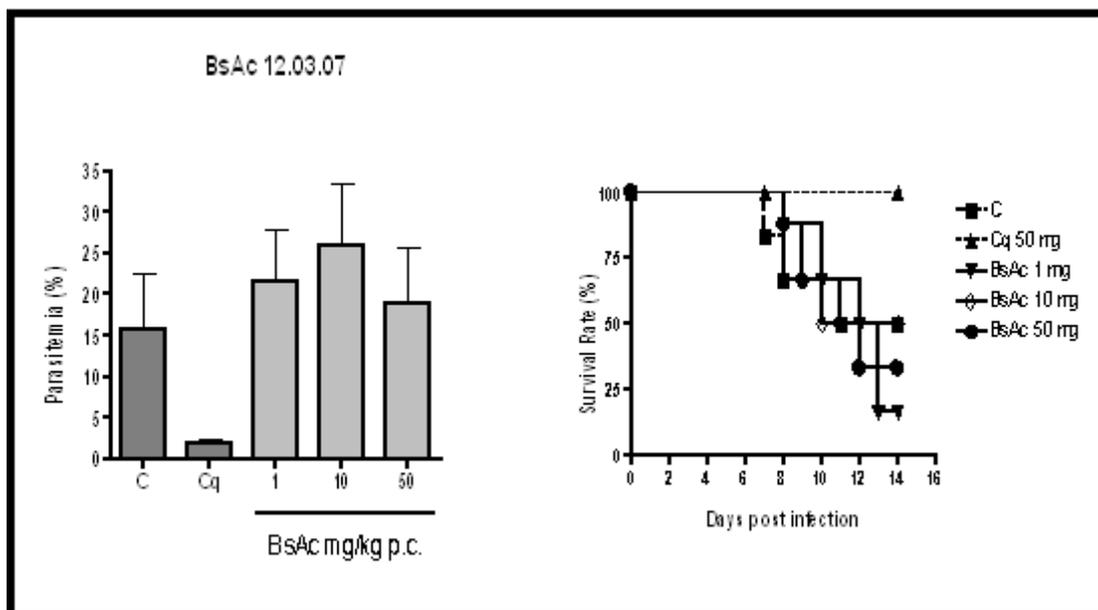


Figura 35 - Avaliação da parasitemia e sobrevivida dos animais infectados com *P. berghei* 10⁸ e tratados com partições em acetato de etila (BsAc)

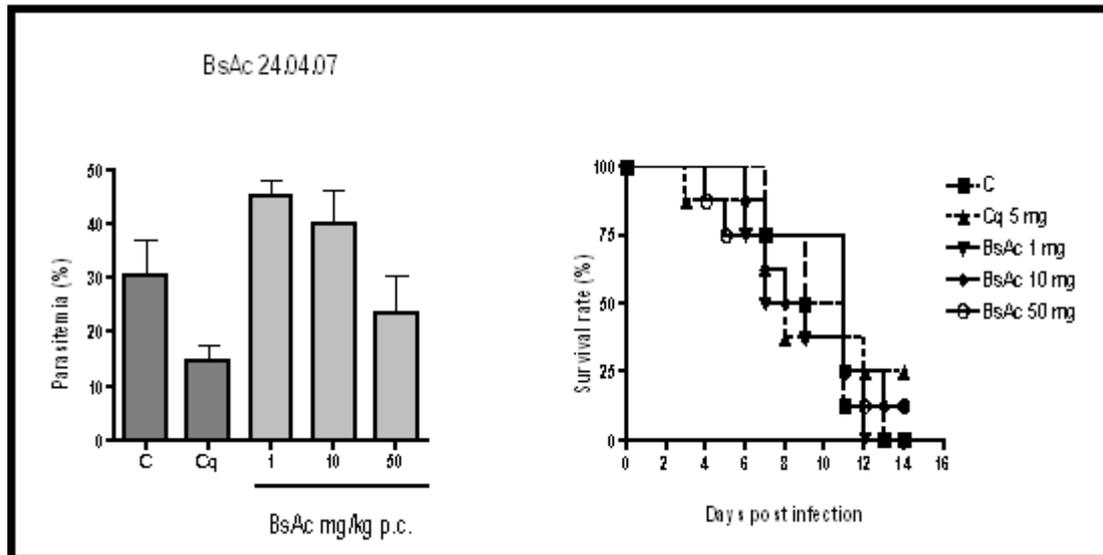


Figura 36 - Avaliação da parasitemia e sobrevivida dos animais infectados com *P. berghei* 10⁷ e tratados com partições em acetato de etila (BsAc)

O tratamento com o BsAc na dose de 50 mg/kg p.c. inibiu em 31% a parasitemia no teste de 4 dias. A figura 37 reúne os dados obtidos.

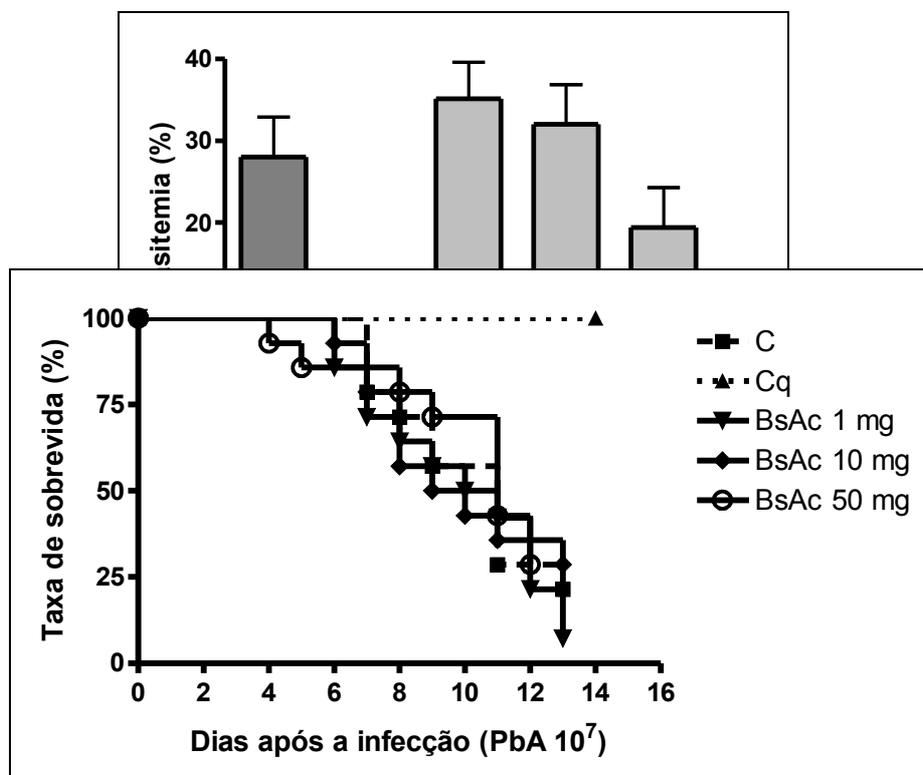


Figura 37 – Efeito da fração BsAc na parasitemia e na sobrevida dos animais infectados

4.7 – Avaliação da Formulação Dermocosmética Desenvolvida

A formulação foi submetida a condições extremas de temperatura pelo período de 6 meses. Nos tempos 0, 3 e 6 meses, as amostras foram submetidas à análise. Em cada tomada de amostra foi utilizado cerca de 1 g da formulação.

Como citado anteriormente, a análise foi conduzida por titulação potenciométrica em meio não aquoso. Assim sendo, utilizou-se como titulante HClO_4 0,1 N ($f_c = 0,9906$) e como solvente para a amostra ácido acético P.A.:anidrido acético (50:1). As análises foram realizadas em duplicata.

Deve-se considerar ainda:

- ✓ PM DMAE bitartarato – 239,23
- ✓ PM DMAE base livre – 89,14
- ✓ 1 ml HClO₄ 0,1N — 23,923 mg DMAE Bitartarato

Para o preparo da formulação, os componentes oleosos (fase oleosa - cera auto emulsificante, lanolina líquida, monoestearato de glicerila e lanolina anidra) foram levados a aquecimento a 75-80 °C. Em outro recipiente, os componentes aquosos (fase aquosa - glicerina, DMAE bitartarato e água purificada) também foram aquecidos a mesma temperatura. Sob agitação constante, a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa. Quando a temperatura atingiu 45 °C, os outros componentes (fase alcóolica – metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, álcool etílico e extrato etanólico de *Byrsonima sericea*) foram adicionados à formulação. Manteve-se agitação constante até resfriamento da formulação.

Uma formulação placebo foi elaborada seguindo o mesmo procedimento, excetuando-se a adição do extrato etanólico de *Byrsonima sericea* na fase alcóolica.

Os dados obtidos estão representados na tabela abaixo:

Tabela 09 – Relação entre volume de solução titulante gasto e período da formulação em estabilidade

Amostra	Peso (g)	Volume gasto HClO₄ 0,1N (ml)
Placebo		
	1,00	0,4937
	1,00	0,5753
Tempo 0		
	1,00	6,7240
	1,00	6,9110
Tempo 3 meses		
	0,9970	6,7103
	1,0733	6,9110

Tempo 6 meses	
1,103	5,1778
1,087	5,7926

Considerando o valor inicial declarado como 5,0% (100%), obtivemos os valores abaixo discriminados, relacionando-os com o percentual inicial declarado.

Tabela 10 – Correlação entre percentual declarado e encontrado durante estudo de estabilidade

<i>Análise</i>	<i>Tempo (dias)</i>	<i>Percentual declarado (%)</i>
T0	0	5,5% (110%)
T3	90	5,5% (110%)
T6	180	4,4 % (88%)

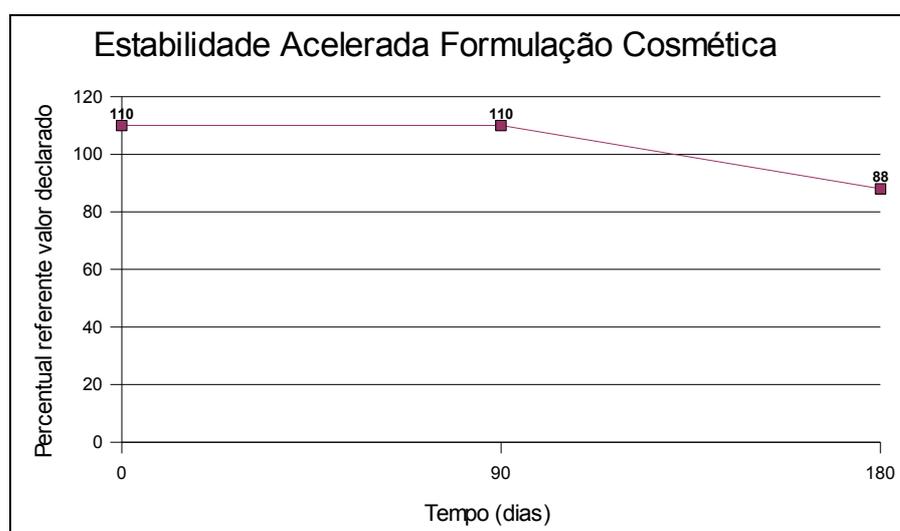


Gráfico 1 – Percentual encontrado na formulação dermocosmética com extrato etanólico de *B. sericea*

Pode-se observar que o teor de DMAE manteve-se estável pelo período de 90 dias, porém, ao final do prazo de 180 dias, a formulação dermocosmética apresentou perda significativa do teor de DMAE, registrando queda maior do que 10% do teor declarado.

5 – Discussão

A família Malpighiaceae está amplamente distribuída nas regiões tropicais, sendo que, dentre os 60 gêneros reconhecidos, 47 são exclusivamente neotropicais. Dentre eles, os mais representativos são: *Banisteria*, *Byrsonima*, *Malpighia*, *Stigmaphyton* e *Thyrallis*. Apesar da grande diversidade de hábitos, morfologia das partes vegetativas dos frutos, a morfologia floral de Malpighiaceae é relativamente constante (VOGEL, 1990).

Não existem relatos na literatura acerca de estudos morfológicos da espécie *Byrsonima sericea*, nem mesmo sobre espécies do mesmo gênero. Existe um relato de estudo da composição química de óleos florais na espécie *Byrsonima crassifolia* que apresenta

variação intra-específica na sua composição floral onde dois tipos de óleos podem ser observados. Assim como estudos de polinização descrevendo o sistema reprodutivo de outras espécies do gênero *Byrsonima*, porém sem descrição anatômica e/ou histoquímica (TEIXEIRA & MACHADO, 2000; BENEZA, 2006).

A espécie *Byrsonima sericea* DC é a espécie mais representativa do gênero nas restingas do Rio de Janeiro (ARAÚJO & HENRIQUES, 1984.). Desta espécie, em especial existem poucos relatos de investigações fitoquímicas e não existem relatos de estudos anatômicos ou histoquímicos descritos na literatura. Entretanto, a atividade parasiticida de outras espécies do gênero e a possibilidade de que estas espécies apresentem flavonóides e terpenóides dentre seus prováveis metabólitos especiais, despertou a possibilidade de que esta fosse estudada em termos fitoquímicos e anatômo-morfológico, buscando a caracterização de forma mais efetiva desta espécie de ampla aplicação etnofarmacológica, e avaliação de seu potencial uso em terapia.

A natureza triterpênica das substâncias isoladas da partição em hexano do extrato etanólico de *B. sericea* foi evidenciada pela coloração rósea obtida na CCD deste, após revelação utilizando-se ácido sulfúrico a 5% em etanol. As substâncias friedelina e lupeol foram identificados através de comparação direta de dados de RMN com dados da literatura.

Friedelina foi isolada como um sólido branco em forma de cristais. O espectro de RMN H^1 mostra principalmente a presença de sete singletos (metilas terciárias) na região de δ 0,7 a 1,20 ppm e um dubleto centrado em δ 0,88 (3H, d, J = 6,6 Hz) que foi atribuído a Me-23 (metila secundária). No espectro de RMN C^{13} aparecem trinta sinais de carbono, sendo um carbonílico em δ 213,17 ppm localizado em C-3. O sinal das metilas caracteriza um triterpeno com esqueleto friedelano.

Lupeol também apresentou-se como um sólido branco, porém amorfo. O espectro de RMN H^1 indica a presença de sete metilas e os sinais são representados com singletos a δ

0,76, 0,78, 0,83, 0,94, 0,96 e 1,68 ppm. Além disso, foi observado um sinal em δ 4,68 (1H, d, $J = 4$ Hz) atribuído ao H-29, em δ 3,18 (1H, dd, $J = 4,0$ e $11,0$) atribuído para H-3 e um outro sinal centrado em δ 2,38 (1H, m) atribuído ao H-19. No espectro de RMN C^{13} foram observados trinta sinais. Os sinais em δ 150,99 e δ 109,34 são referentes aos carbonos de dupla ligação terminal e o sinal 79,04 atribuído ao carbono carbinólico localizado em C-3.

Betulina apresentou-se também como um sólido branco, porém amorfo. O espectro de RMN H^1 indica a presença de seis metilas. Observou-se um sinal em δ 3,18 ppm atribuído a H-3 e outros dois grupos de sinais em δ 4,68 e 4,58 referentes ao H-29 e δ 3,77 e 3,31 referentes ao H-28. O espectro de RMN C^{13} também apresentou 30 sinais, dentre os quais podemos destacar os sinais em δ 150,47 e δ 109,69 ppm referentes a dupla ligação terminal e os sinais δ 60,58 e δ 79,00 referentes aos carbonos carbinólicos C28 e C-3, respectivamente.

SOUZA et al., (1970) haviam relatado a presença de lupeol e ácido betulínico em *Byrsonima sericea*, porém não existem relatos de friedelina nesta espécie. A substância betulina também está sendo relatado pela primeira vez nesta espécie. Essas substâncias poderão servir como marcadores químicos para a espécie *Byrsonima sericea*.

O perfil triterpênico observado na espécie *Byrsonima sericea* relaciona-se com ao uso popular atribuído as espécies deste gênero: ação antiinflamatória, antibacteriana, analgésica e antiespasmódica. Além da ocorrência de sulfonoglicolipídios, esteróides, ésteres aromáticos, proantocianidinas e amentoflavonas nas espécies *Byrsonima crassifolia*, *B. microphylla*, *B. crassa* e *B. verbascifolia*; os triterpenos Δ lupenona, lupeol, β amirina e betulina já foram isolados na espécie *B. microphylla* (SANNOMYIA et al., 2004; AGUIAR, et al. 2005). Estas substâncias apesar de já descritas anteriormente em outras espécies vegetais, são pela primeira vez descritas para a espécie *Byrsonima sericea* (excetuando-se o lupeol), confirmando o padrão quimiosistemático já apresentado por outras espécies do gênero.

Dentre as partições testadas, a partição em acetato de etila inibiu a parasitemia na dosagem 10 mg/kg em cerca de 46% e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais. Em um segundo experimento, quando a fração em diclorometano e acetato de etila foram re-testadas, o tratamento com BSAC na dose 50 mg/kg peso corporal inibiu em 25% a parasitemia no teste ao qual os animais foram submetidos.

Estes resultados podem ser indicativos da presença de substâncias com atividade antimalarial, o que ressalta a importância da complementação do estudo fitoquímico da espécie. Além da complementação com a análise fitoquímica da partição em acetato de etila.

Produtos naturais passaram a ter maior valor na sociedade atual. Uma parte significativa dos consumidores são convictos que os produtos naturais estão associados com segurança e saúde, enquanto produtos sintéticos estão relacionados a efeitos colaterais indesejáveis. Em resposta a essa tendência, cresce em vários setores, dentre os quais podemos citar os setores cosméticos e farmacêutico, pesquisas por produtos que possam agregar estes valores. A “onda verde” leva várias indústrias a buscarem nos produtos naturais novos mercados para expandir seus negócios (MOREIRA *et al.*; 2006).

Desta forma, o desenvolvimento de uma formulação cosmética com extrato de uma espécie nativa associada a um ativo cosmético de uso consagrado pode ser promissor ao associar a busca de produtos “naturais” com o uso de ativos já conhecidos.

Os dados obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada demonstram que houve perda significativa do teor declarado de DMAE Bitartarato. Em relação ao aspecto físico da formulação, este apresentou-se durante todo o estudo cosmeticamente aceitável, porém houve leve escurecimento da formulação, o que poderia tornar-la visualmente menos atrativa. Por apresentar-se de forma instável ao final do período de estudo, a determinação de prazo de validade maior do que 2 anos torna-se inviável, o prazo proposto seria de 12 meses. Novos

estudos devem ser realizados de forma a adequar a formulação dermocosmética ao extrato etanólico de *Byrsonima sericea*, de forma a minimizar as alterações apresentadas.

Estudos de permeabilidade *in vitro* devem ser realizados (RHEE, *et al.* 2001) de forma a esclarecer se o extrato etanólico de *Byrsonima sericea* realmente atua como permeador do ativo cosmético; e se a promoção da permeação não poderia causar efeitos colaterais. Ou seja, causando uma absorção sistêmica do produto.

Esta etapa pode ser complementada com a continuidade do isolamento e identificação dos componentes presentes nas partições de *Byrsonima sericea*.

6 – Conclusões

O presente trabalho representa um marco no estudo tanto histoquímico, anatômico e fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea*. O isolamento das substâncias – friedelina, lupeol e betulina - nunca antes descritas na espécie e no gênero representa um avanço na caracterização desta espécie nativa da região de restinga.

Na avaliação farmacológica, a partição de Acetato de Etila apresentou melhor resultado quanto a inibição da parasitemia e aumento na taxa de sobrevivência dos animais. Desta forma, novas avaliações devem ser realizadas para melhor caracterização desta partição.

A formulação dermocosmética apresentou-se cosmeticamente aceitável. A instabilidade da formulação observada no estudo de estabilidade acelerada reforça a sugestão de buscar alternativas aos problemas encontrados na mesma.

7 - Referências Bibliográficas

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E., *et al.* A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Medica**, v. 60, p. 85-86, 1994.

ANDERSON, W. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 64, p. 210-224. 1990.

AGETA, H.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; *et al.* NMR spectra of tripernoids III. Oleanenes and migrated oleanenes. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 198-203, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE n. 1 de 29 de julho de 2005. **Guia para realização de estudos de estabilidade**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>. Acesso em 10 set 2008.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.

ARAÚJO, D. S. D.; HENRIQUES, R. P. B. Análise florística das restingas do Rio de Janeiro. In: LACERDA, L. D. et al. (Coord.). **Restingas: origem, estrutura, processos**. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 1984. p. 159-193.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **PSTT**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG : Ed. Universidade Federal de Viçosa. 1984. v. 2, p. 325-343.

BÉJAR, E.; MALONE, M. H. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 141-158, 1993.

BENEZA, R. M. C.; PESSONI, L.A. Biologia florestas e sistema reprodutivo de *Byrsonima coccolofolia* (Kunth) em uma savana Amazônica. **Acta Botanica**, v. 36, n. 2, p. 159-158, 2006.

BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CÁCERES, A. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 107-115, 1998.

BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C. T. et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, p. 25-32, 1995.

BOSCOLO, O. H.; MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas citadas como medicinais. Ver. Brás. **Plantas Mediciniais Botucatu**, v. 9, n. 1, p. 8-12, 2007.

BUKATSCH, F. Bemerkugen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 255, 1972.

CACERES, A.; LÓPEZ, B. R.; GIRON, M.; et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 263-276, 1991.

CACERES, A.; LÓPEZ, B.; JUÁREZ, X.; et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. II Evaluation of antifungal activity of 7 American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 207-213, 1993.

CASTOLA, V., BIGHELLI, A; REZZI S.; et al. Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). **Industrial Crops and Products**, v.15, p. 15-22, 2002.

CLARK, G. **Staining procedures**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1981. 512 p.

CHOLBI, M. R., PAYA, M., ALCARAZ, M. J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄ induced microsomal lipid-peroxidation. **Experimentia** v. 47, p. 195-199, 1991.

DANYSZ, A. et AL. Pharmacological properties of 2-dimethylaminoethanol bimanol, DMAE. I. The influence of DMAE on the function of the central nervous and circulatory systems and striated muscles. **Diss Pharm. Pharmacol.**, v. 19, n. 5, p; 463-468, 1967a **Abstract from TOXLIT**, n. 68, p. 1189.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES M. L. da S.; et al. Flavonóides e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Química Nova** v. 26, n. 4, p. 484-487, 2003.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatinga* plants. **Fitoterapia**, v. 78, n.3, p. 215-218, 2007.

DECCACHE, D. S. **Formulação Dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro – 2006.

FILGUEIRAS, T. S.; PEREIRA, B. A. S. Flora do Distrito Federal. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília, DF: ED. UNB, 1990. p. 331-388.

FONSECA-KRUEL, V. S. da; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v.18, n. 1, p. 177-190, 2004.

GALATI, E. M.; MONDELLO, M. R.; GIUFFRIDA, D.; et al. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4903-4908, 2003.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; et al. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 635-643, 1995.

GOEL, R. K.; GAMBHIR, S. S.; DASGUPTA, G. Mechanism of anti-ulcerogenic effect of ametnoflavone. **Indian Journal of Medical Research**, v. 88, p. 192-196, 1988.

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

GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2545-2558, 1989.

GOTTLIEB, O. R.; BOREN, M. R. M. B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M. O. (Orgs) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª. Ed Porto Alegre: UFRG, 2001. cap. 5, pag. 77-90.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. et al. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v..25, p. 487-491, 2002.

HARBONE, B. J.; BAXTER, H. (Eds.) 1995. Phytochemical dictionary. **A Handbook of bioactive Compounds from Plants**. Ch. 37 Phenols and Phenolic Acids, pp. 388-414 and Ch. 53 Triterpenoid saponins, pp. 670-688. Taylor and Francis Ltd. Publisherrs, London.

IWAI, K.; ONODERA, A.; MATSUE, H. Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* Thum.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stree in rats. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 52, p. 443-451, 2001.

JAIN, A. K.; THOMAS, B. W.; PANCHAGNULA, R. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride: I. Effect of terpenes. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 93-101, 2002.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: H. H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York : McGraw-Hill Book Co., 1940. 523 p.

KURZEN, H. The extraneuronal cholinergic system of the skin. Basic facts and clinical relevance. **Hautartz**, v. 55, n. 5, p. 453-459, 2004.

KULSHRESHTHA, M. J.; KULSHRESHTHA D. K.; RASTOGI, R. P. The Triterpenoids. **Phytochemistry**, v. 11, p. 2369-2381, 1972

LANGENHEIN, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1223-1280, 1994.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LING-LEE, M.; ASHFORD, A. E.; CHILVERS, G. A. A histochemical study of polysaccharide distribution in eucalypt mycorrhizas. **New Phytology**, v. 78, p. 329- 335, 1977.

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

MABBERLEY, D. J. **The Plant Book – A portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University Press. 4a. Ed – New York, 1993.

MACLEAN, R. C.; IVIMEY-COOK, W. R. **Textbook of Pratical Botany**. 5. ed. London : Longmans, Greenands Co., 1952. 476 p.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p 1517-1575, 1994.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA, L. C.; et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 79-82, 1999.

MATTOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza. Editora da Universidade Federal do Ceará. 1988

MEIRA NETO, J. A. A. et al. Composição da floresta semidecídua de altitude do Parque Municipal da Grota Funda (Atibaia - Estado de São Paulo). **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 51-74. 1989.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G., DAVID, J. M. et al. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 1999.

MENDONÇA, R. C., FELFILI, J. M., WALTER, B. M. T., et al. **Flora Vascular do Cerrado**. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds.), Cerrado Ambiente e Flora. EMBRAPA, Planaltina, Distrito Federal, 1998, pp. 286-556.

MOREIRA, A. C.; MÜLLER, A. C. A.; PEREIRA JÚNIOR, N.; et al. Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics. **World Patent Information**, v. 28, p. 34-42, 2006.

MORIMOTO, H.; ADA, Y., SEKI, T., et al. In vitro skin permeation of morphine hydrochloride during the finite application of penetration-enhancing system containing water, ethanol and L-menthol. **Biol. Pharm. Bull.** v. 25, p. 134-136, 2002.

MORISSETTE, G.; GERMAIN, L.; MARCEAU, F. The antiwrinkle effect of topical concentrated 2-dimethylaminoethanol involves a vacuolar cytopathology. **British Journal of Dermatology**, v. 156, p. 433-439, 2007.

NGUYEN, V. T. *et al.* Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. **Life Sciences**, v. 72, Issues 18-19, 28 p. 2081-2085, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. Composição florística e estrutura comunitária da floresta de galeria do córrego da Paciência, Cuiabá, M. T. **Acta Botanica Brasílica**, v. 3, n. 1, p. 91-112. 1989.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; MACHADO, J. N. M. Composição florística de uma floresta semidecídua montana, na serra de São José, Tiradentes, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasílica**, v. 7, n. 2, p. 71-88. 1993.

OKADA, Y.; KANEKO, M.; OKAJIMA, H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furanfatly acids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 12, p. 1607-1610, 1996.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London : Churchill Livigstone, 1968. v. 1.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro : IBDF, 1974. v. 5, p. 266-269.

QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F., DIAS, et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72 p. 465-468, 2000.

RADFORD, A. E. et al. **Vascular plants systematics**. New York : Harper & Row, 1974. p 83- 152.

RASTRELLI, L.; DE TOMMASI, N.; BERGER, I.; et al. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 647-650, 1997.

REIS, M.G.; FARIA, D. A., SANTOS, I. A., et al. Byrsonic acid – the clue to floral Mimicry Involving Oil-producing flowers and oil-collecting bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 7, p. 1421-1429, 2007

RHEE, Y.S.; CHOI J.G.; PARK, S.C *et al.* Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, p. 161-170, 2001.

ROCHA, W.C. **Busca de Substâncias Bioativas em plantas amazônicas *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae) e *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae)** – Tese de Doutorado -Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos – SP – 2004.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* /Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, v. 1035, p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SASS, J. S. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames : Iowa Press Building, 1951. 228 p.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plants species from the Amazonian region. **Food Chemistry** v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, J. G.; OLIVEIRA, A. S. A vegetação de restinga no Município de Maricá - RJ. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 253-272. 1989.

SOMMERFELD, B. Randomised, placebo-controlled, double-blind, split-face study on the clinical efficacy of Tricutan® on skin firmness. **Phytomedicine** v. 4, p. 711-715, 2007.

SOUZA, M. P.; MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. et al. Triterpenoids of plants from Northeast Brazil *Byrsonima sericea*, *Crataeva tapla* and *Curatella americana*. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 51, p. 67-70, 1970.

SUHOEN, T. M.; BOUWSTRA J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of Controlled Release** v.59, p.149-161, 1999.

TEIXEIRA; L. A. G.; MACHADO, I. C. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* D.C. (Malpighiaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v. 14, n. 3, p. 347-357, 2000.

TINTO, W.F.; BLAIR, L.C.; ALLI, A. Lupane Triterpenoids of *Salacia cordata*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 3, p. 395-398, 1992.

UHODA, I.; FASKA, N.; ROBERT, C.; et al. Split face study on the cutaneous tensile effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) gel. **Skin Research and Technology**, v.8, p.161-167, 2002.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603-618, 2004.

_____. Essential oils as novel human skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 57, R7-R9, 1989.

_____. Terpenes and the lipid -protein-partitioning theory of skin penetration enhancers. **Pharmacological Research**, v. 8, p. 17-24, 1991.

_____. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. **International Journal of Pharmaceutics** v. 74, p. 157-168, 1991.

WHITTIER, D. P.; PETERSON, R. L. The cuticle on *Psilotum* gametophytes. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1283-1288. 1995.

ZHANG, X. C.; O'NEIL, S. D. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. **The Plant Cell**, v. 5, p. 403-418. 1993.