

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E FARMACOLÓGICO
DE *Bredemeyera floribunda* WILLDENOW**

JOSÉ LUIZ AIÉLLO RITTO

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientadora:

Prof.^a Dra. ELFRIEDE MARIANNE BACCHI

**São Paulo
2001**

17045

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004463

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação
do Conjunto das Químicas da USP.

Ritto, José Luiz Aiéllo
R615e Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Bredemeyera floribunda* WILLDENOW / José Luiz Aiéllo Ritto.
- São Paulo, 2001.
123p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

1. Farmacognosia 2. Plantas medicinais 3. Produtos naturais :
Química orgânica I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.321 CDD

JOSÉ LUIZ AIÉLLO RITTO

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E FARMACOLÓGICO
DE *Bredemeyera floribunda* WILLDENOW**

Comissão Julgadora

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Prof^ª. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Orientador/Presidente**

**Prof^º Tit. Massayoshi Yoshida
1º Examinador**

**Prof^º Assoc. Fernando de Oliveira
2º Examinador**

**Prof^ª Dra. Lúcia Helena Bebevino
3º Examinador**

**Prof^º Dr. João Ernesto de Carvalho
4º Examinador**

São Paulo, 26 de Julho de 2001

*À Cláudia, Murilo e Mariana;
Pelo incentivo, convivência, compreensão,
Sempre amor e carinho.*

*Aos meus pais: Adoniro e Luzia, pelos
exemplos de dedicação e perseverança,
ensinamentos e carinho,
meu profundo amor.*

*Aos irmãos: Vitor, Sandra e Caio;
Rivelino e Márcia; grandes amigos.*

*Ao Sr. Maurílio e Clotilde, demais familiares,
pela amizade, incentivo e carinho.*

*Dedico e agradeço por todo amor que nos
Une e muito me ajuda.*

“ Sem medo de Ser Feliz !”

A única certeza
É a ter a certeza
De hoje estar feliz.
Poder descobrir a vida
E vive-la.

Poder receber das pessoas
O respeito, o carinho
E poder mostrar o caminho
A se seguir.

Conseguir o impossível
O visível aos olhos
O indispensável ao coração.

A ação do tempo me transforma
Me transporta em um mundo só meu.

Onde tudo é possível
Na medida do possível
Onde encontro o outro lado meu.

(Meu mundo – poesia de Silvia Siqueira Maciel)



À Prof^a Dra. Elfriede Marianne Bacchi

*O meu especial agradecimento à minha amiga e orientadora,
pela confiança, incentivo, humildade, determinação e eficaz
orientação. Muito obrigado.*

“ Empenhar-se é ter percorrido a metade do caminho ... “
CONFÚCIO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Fernando de Oliveira, pela amizade, ensinamentos, constante ajuda e incentivos.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, pelo apoio na realização de várias análises e experimentos, especialmente pela inestimável amizade dos pesquisadores Mary Ann, Rodney, Marili, Adílson, Vera, João Ernesto, Luciana e incentivo recebido dos demais funcionários.

Ao Prof^o Dr. João Ernesto de Carvalho, Prof^o Érica e da pós-graduanda Luciana pela condução dos ensaios farmacológicos, realizados no CPQBA – UNICAMP.

Ao Prof^o Titular Massaioshi Yoshida pela colaboração e incentivos.

À Doutora Maria Inês A. Gonçalves, pela forma prestativa e gentil na realização de espectros de RMN ¹H e ¹³C.

À secretária Elisabete Claro de Souza pela amizade, gentileza e constante apoio.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação Benedita E.S. Oliveira, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima pela gentileza no atendimento e apoio.

Ao raizeiro Sr. Sebastião e seus familiares, pela calorosa acolhida em seus lares, durante as coletas e visitas realizadas nos campos cerrados de Leme-SP.

À Jussara e Lílian, funcionárias do Laboratório de Farmacognosia do Curso de Ciências Farmacêuticas da PUC-Campinãs, pelo constante apoio e colaboração.

Aos professores Orlando Mário Soeiro, Dirceu Brás Ap. Barbano e Marcelo Castaldi pela amizade e colaboração.

Ao José Roberto (Beto), funcionário do Laboratório de pesquisa do Curso de Pós-graduação em Farmácia da Universidade São Francisco - USF, pelo auxílio no preparo e fotografias das lâminas microscópicas.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese.

Índice

1- Introdução.....	01
2- Objetivo.....	04
3. Revisão Bibliográfica.....	05
3.1 Aspectos Botânicos.....	05
3.1.1. O gênero <i>Bredemeyera</i> Willdenow	05
3.1.2. Posição taxonômica da espécie <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	09
3.2. Aspectos Químicos.....	10
3.2.1. Química da família Polygalaceae	10
3.2.2. Química de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	18
3.3. Aspectos Farmacológicos e Usos.....	21
4.1. Material.....	26
4.2. Estudo morfológico e anatômico do vegetal.....	28
4.2.1. Caracterização da droga	28
4.2.2. Estudo químico	29
4.2.2.1. Obtenção da droga pulverizada.....	29
4.2.2.2. - Reações Genéricas de Caracterização de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	29
4.2.3. Fracionamento cromatográfico de extratos das raízes de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	31
4.2.4. Isolamento de substâncias	32
4.2.4.1. Fracionamento Cromatográfico do resíduo clorofórmico – RClO	32
4.2.4.2. Fracionamento do extrato metanólico	33
4.2.4.3. Obtenção da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	35
4.2.5. Caracterização Físico-Química da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	36

4.2.5.1. Avaliação da atividade tensoativa e determinação da Concentração Micelar Crítica – CMC da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	36
4.2.5.2. Determinação do poder espumante conforme ABNT/NBR 1364	37
4.2.5.3. Avaliação da variação do poder espumante da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	38
4.3. Ensaio de Toxicidade e Farmacológicos da Fração Saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.....	39
4.3.1. Observação dos efeitos gerais da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	39
4.3.2. Determinação da Toxicidade aguda (DL ₅₀) da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd. em camundongos	39
4.3.3. Teste da atividade antiulcerogênica em Ratos, pelo método de úlcera induzida por Indometacina.....	40
4.3.4. Determinação da atividade hemolítica <i>in vitro</i> (IH ₅₀).....	42
4.3.5. Determinação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	43
4.3.6. Determinação da Irritação Cutânea Primária em Coelhos	45
5. Resultados	47
5.1. Estudo Farmacobotânico.....	47
5.1.1. Descrição Morfológica do Vegetal – <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	47
5.1.2. Descrição Macroscópica da Droga comercializada como botica inteira - <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.....	53
5.1.3. Descrição Microscópica da Droga comercializada como botica inteira - <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.....	57
5.2. Estudo Químico	62
5.2.1. Reações genéricas de caracterização – triagem fitoquímica.....	62
5.2.2. Reações genéricas de caracterização – triagem fitoquímica.....	62
5.2.2.1. Isolamento de substâncias a partir do resíduo clorofórmico.....	62
5.2.2.1.1. Purificação e análise das frações	63
5.2.2.2. Isolamento de substâncias a partir do extrato metanólico	71

5.2.2.2.1. Purificação e análise da fração 21-26.....	72
5.2.3. Caracterização físico-química da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.....	75
5.2.3.1. Determinação do poder tensoativo e da Concentração Micelar Crítica – CMC da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.....	75
5.2.3.2. Determinação do poder espumante da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i>	76
5.3. Farmacologia.....	78
5.3.1. Observações Gerais (“screening hipocrático”) da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	78
5.3.2. Determinação da Toxicidade aguda (DL ₅₀) em camundongos da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	79
5.3.3. Teste da atividade antiulcerogênica pelo modelo de úlcera induzida por Indometacina da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	79
5.3.4. Determinação da Atividade Antiproliferativa <i>in vitro</i> – atividade citotóxica.....	80
5.3.5. Determinação do índice de hemólise da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	82
5.3.6. Determinação da Irritação cutânea primária em coelhos da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	83
6- Discussão	84
6.1. Aspectos botânicos.....	84
6.1.1. Aspectos gerais	84
6.1.2. Aspectos relacionados á droga.....	86
6.1.2.1. Caracterização macroscópica.....	86
6.1.2.1. Caracterização microscópica.....	87
6.2. Estudos Químicos	89
6.3. Farmacologia.....	99
7. Conclusão.....	106
8. Referências Bibliográficas	109

Índice de Tabelas

Tabela 01 Agliconas saponínicas relatadas em espécies vegetais da família <i>Polygalaceae</i>	11
Tabela 02 Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos derivados do núcleo da <i>PRESSENEGENINA 3-β-O-glicose</i> , encontradas em <i>Polygalaceae</i>	14
Tabela 03 Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos derivados do núcleo do REINOSÍDEO, encontrados em <i>Polygalaceae</i>	17
Tabela 04 Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos isolados de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	19
Tabela 05 Coletas de órgãos subterrâneos de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd. - <i>Polygalaceae</i>	26
Tabela 06 Valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Lesões Ulcerativas	41
Tabela 07 Linhagens celulares utilizadas no ensaio antiproliferativo	43
Tabela 08 Valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Irritação Primária (I.I.P.) em dorso de coelhos	46
Tabela 09 Valores atribuídos para o Índice de Irritação Primária (I.I.P.) em dorso de coelhos e a classificação do efeito irritante	46
Tabela 10 Poder Espumante da <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd., conforme ABNT / NBR 13064	76
Tabela 11 Valores obtidos na determinação da DL ₅₀ da fração saponínica de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	79
Tabela 12 Efeito da <i>Fração Saponínica</i> pela via oral (v.o.) de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd. e da cimetidina (v.o.), em modelo de úlcera induzida por Indometacina.	79
Tabela 13 Inibição de crescimento celular (efeito antiproliferativo celular) da <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	81

Tabela 14	83
Média dos valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Irritação Primária	
Tabela 15	90
Dados de RMN de ^{13}C da substância 1 (palmitato de etila) [300 MHz, CDCl_3 , ppm]	
Tabela 16	92
Dados de RMN de ^{13}C da substância 2 (1,7-diidroxí-3,4,8 trimetoxixantona) [300 MHz, CDCl_3 , ppm]	
Tabela 17	94
Dados de RMN de ^{13}C da substância Me_1 (rutina) [300 MHz, DMSO-d_6 , ppm]	

Índice de Figuras

Figura 01 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: exemplar encontrado a beira da estrada no município de Leme-SP	49
Figura 02 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: exemplar mostrando o aspecto decumbente do vegetal	49
Figura 03 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Ramo foliar	50
Figura 04 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Ramo florido	50
Figura 05 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Ramo com frutos	51
Figura 06 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Partes de órgãos vegetais	51
Figura 07 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Fragmentos de raiz	52
Figura 08 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Fragmentos de raiz	55
Figura 09 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Destaque de fragmento da droga	55
Figura 10 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Fragmento de raiz	56
Figura 11 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: A e B: Secção transversal de raiz	58
Figura 12 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Secção transversal de raiz	59
Figura 13 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: Secção longitudinal radial	59
Figura 14 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.: A - Secção longitudinal radial passando pelo parênquima cortical e B- secção longitudinal radial do lenho	60

Figura 15 <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.:Figuras A e B. Secção longitudinal.	61
Figura 16 Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 1 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	64
Figura 17 Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 1 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	65
Figura 18 Espectro de massas da substância 1 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	66
Figura 19 Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	67
Figura 20 Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2 (expandido) de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	68
Figura 21 Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	69
Figura 22 Espectro de massas da substância 2 de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.Extrato clorofórmico	69
Figura 23 Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (DMSO-d_6) da substância Mel de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	73
Figura 24 Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (DMSO-d_6) da substância Mel de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	74

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Determinação da atividade tensoativa de <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd. em água a 20°C	75
Gráfico 2 Determinação da atividade tensoativa do <i>Lauril Sulfato de Sódio - L.S.S.</i> em água a 20°C	76
Gráfico 3 Variação do Poder Espumante em função da concentração (mg/mL) e do tempo (minutos) de preparações aquosas da <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	77
Gráfico 4 Efeito da <i>Fração Saponínica</i> pela via oral (v.o.) de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd. e da cimetidina (v.o.), em modelo de úlcera induzida por indometacina	80
Gráfico 5 Curva dose-resposta da atividade antiproliferativa celular da <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	81
Gráfico 6 Determinação do Índice de Hemólise da <i>Fração Saponínica</i> de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	82

1 - INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são largamente empregadas no Brasil, tanto no ambiente rural como no urbano, muitas de acordo com práticas tradicionais desenvolvidas pela população indígena ou que foram trazidas por povos imigrantes da Europa, África e da Ásia ⁵⁴.

Apesar da intensa destruição de suas áreas de vegetação nativa ocorrida no Brasil nos últimos 20 anos, o país ainda mantém regiões onde as populações tradicionalmente recorrem ao uso de espécies vegetais para fins medicinais. A forma de obtenção das plantas, através de intenso extrativismo, muitas vezes para atender a uma demanda fora da região, coloca em risco diversas espécies medicinais nativas ⁷.

Dentre os tipos de vegetação presentes no território brasileiro, o cerrado constitui tipo peculiar, representando cerca de 25% da área do país, caracterizando-se pela pobreza dos solos e pela riqueza em plantas medicinais por outro ⁵⁰.

Por cerrado entende-se a forma brasileira da vegetação chamada savana, cujo similar mais perfeito é a forma africana. A savana caracteriza-se pela conjunção de um estrato composto de pequenas árvores tortuosas e esparsas e de um estrato baixo constituído de gramíneas com alguns arbustos e subarbustos ⁹³.

O cerrado é o único bioma do território brasileiro que não é protegido pela Constituição Nacional de 1988, sendo considerado o ecossistema de maior área agricultável, com várias formações vegetais distintas, que vão desde o campo úmido até o cerradão, passando pelas matas ciliares e matas secas. Isto faz com que o cerrado seja considerado hoje a savana de maior biodiversidade do mundo e toda

essa riqueza biológica está ameaçada pela expansão desordenada da fronteira agrícola e do uso não sustentável do solo, onde a destruição se faz com maior intensidade ⁴³.

A *Bredemeyera floribunda* Willd. – Polygalaceae, é espécie que medra em todas as regiões de cerrado do país. Na medicina popular esta planta tem sido empregada para muitas finalidades, freqüentemente coletada por raizeiros e comercializada em feiras-livres, mercados e outros tipos de áreas públicas, tendo inclusive alcançado o grande comércio na década de 60, como fonte de saponinas para uso em indústria fotográfica.

No interior de São Paulo e outras regiões do Brasil, esta espécie cuja denominação popular é variada, vem sendo empregada no tratamento de feridas, furunculose, picadas de insetos, doenças da pele, como febrífugo, diurético, para baixar a pressão, em moléstias do fígado, problemas circulatórios, expectorante e contra picada de cobras ^{12:70;83;88;114}.

Em razão deste variado emprego popular, tem-se a denominação mais comumente citada desta planta como botica inteira ⁷⁰, embora receba outros nomes como: raiz de João-da-Costa em São Paulo, Mato Grosso e Goiás; raiz de cobra e suma branca no Ceará ⁸⁸.

Embora a Botica Inteira – *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) tenha sido estudada sob vários aspectos, a complementação do estudo farmacognóstico e farmacológico é

importante para o desenvolvimento do potencial econômico e terapêutico da espécie e do aprimoramento de pesquisas com plantas medicinais do cerrado brasileiro.

2 - OBJETIVO

2- OBJETIVO

É objetivo do presente trabalho a realização de estudo farmacognóstico e farmacológico das raízes de botica inteira, a *Bredemeyera floribunda* Willdenow - Polygalaceae, através dos seguintes aspectos:

1) Farmacobotânicos:

- Realização de revisão da posição sistemática da espécie.
- Caracterização macro e microscópica da droga, constituída pelos órgãos subterrâneos do vegetal.

2) Fitoquímicos:

- Realização de triagem fitoquímica da droga.
- Extração e caracterização da fração saponínica da droga.
- Isolamento e identificação de substâncias.
- Determinação do poder tensioativo da fração saponínica.

3) Farmacologia da fração saponínica:

- Realização de "screening hipocrático".
 - Determinação de DL₅₀ pela administração por via intraperitoneal (i.p.) e pela via oral (v.o.) em camundongos.
 - Determinação da Atividade Antiúlcera.
 - Determinação do Índice de Hemólise (IH₅₀).
 - Realização de triagem "in vitro" para atividade anticancer.
 - Determinação da Irritação Dérmica Primária em Coelhos.
-

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para melhor localização dos assuntos relacionados com *Bredemeyera floribunda* Willdenow - POLYGALACEAE a revisão da literatura foi dividida nas três seguintes partes: aspectos botânicos, aspectos químicos e aspectos farmacológicos e usos.

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.

A Família Polygalaceae está dividida em 3 tribos ,doze gêneros e aproximadamente 800 espécies ⁴⁷.

O gênero *Bredemeyera* Willdenow foi estabelecido por WILLDENOW ^{60;116} em 1801 com apenas uma espécie, a *Bredemeyera floribunda* Willdenow, tendo o holótipo sido coletado na cidade de Caracas. O nome *Bredemeyera* foi dado por Willdenow em homenagem à Franz Bredemeyer, jardineiro chefe em Schönbrunn perto de Viena, que colecionava plantas da América do Sul⁶⁹.

Esta espécie foi citada como sendo um arbusto sempre verde, que se desenvolve à margem das matas com flores e frutos durante o ano todo ⁶⁹.

3.1.1. O gênero *Bredemeyera* Willdenow

Após revisão das espécies do gênero *Bredemeyera* Willdenow (POLYGALACEAE) do Brasil, MARQUES⁶⁹, em 1980, descreve em seu estudo 11 espécies, 1 variedade e 3 formas , a saber:

1- *Bredemeyera floribunda* Willd.

Gest. Nat. Freunde Berl. New Schr. 3:42.t.6.1801

2- *Bredemeyera brevifolia* (Benth.) Benn.

in Martius, *Fl.Bras.* 13(3):49.t.17.1874

- bas. *Catocoma brevifolia* Benth.
in Hook., *Journ. Bot.* 4:103. 1842
- 3- *Bredemeyera altissima* (Poepp et Endl.) Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):50. 1874
bas. *Catocoma altissima* Poepp. Et Endl.
Nov. Gen. et Sp. 3(1-6): 65.t.273. 1845
- 4- *Bredemeyera lucida* (Benth.) Klotz. ex Hassk.
in *Plantae Junghuhnianae* 2(2):189. 1852
Bredemeyera lucida (Benth.) Klotz
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):51. 1874
bas. *Catocoma lucida* Bentham
in Hook, *Journ. Bot.* 4:103. 1842
- 5- *Bredemeyera martiana* Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):49. 1874
- 6- *Bredemeyera laurifolia* (St. Hil.)Klotz. ex Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):52. 1874
Bredemeyera laurifolia Klotz. ex Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):52. 1874
bas. *Comesperma laurifolia* St. Hil.
in St. Hil., Jus. Et Cambes., *Fl. Bras. Mer.* 2:56. 1829
- 7- *Bredemeyera autranii* Chod.
Bull. Herb. Boiss. 2:172. 1894
- *Bredemeyera autranii* Chod. f. *obovata* Marq.
Marques in *Rodriguésia* 32(54):287. 1980
- 8- *Bredemeyera velutina* Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):53. 1874
- 9- *Bredemeyera kunthiana* (St. Hil.) Klotz. ex Benn.
in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):53. 1874
Bredemeyera kunthiana Klotz. ex Benn.
in Hook, *Journ. Bot.* 4:103. 1842 pro syn.
bas. *Comesperma kunthiana* St. Hil.

in St. Hil., Jus. Et Cambes., *Fl. Bras. Mer.* 2:54.t.90.1829

- 10- *Bredemeyera densiflora* Benn. var. *densiflora* Benn. (var. típica)
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):52.t.18.fig2. 1874
Bredemeyera densiflora Benn. var. *glabra* Benn.
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):52. 1874
- 11- *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn.
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):50.t.18.fig1. 1874
 bas. *Catocoma myrtifolia* Spruce ex Benn.
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):51. 1874 pro syn.
- *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn. f. *myrtifolia*
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):50.t.18.fig1. 1874
 - *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn. f. *parviflora* (Benn) Marq.
 Marques in *Rodriguésia* 32(54):283. 1980
 bas. *Catocoma parviflora* Spruce ex Benn.
 in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):51. 1874
 - *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn. f. *huberiana* (Chod.) Marq.
 Marques in *Rodriguésia* 32(54):283. 1980
 bas. *Bredemeyera huberiana* Chod.
Bull. Herb. Boiss. 2:172.1894

As espécies do gênero *Bredemeyera* Willdenow são plantas, principalmente, de capoeiras, podendo ser encontradas também em mata de terra firme, cerrado e restinga, quase sempre em solo arenoso⁶⁹.

A nomenclatura do gênero *Bredemeyera* Willdenow, criado em 1801 foi submetido a várias opiniões, tendo sido alvo de controvérsias e de reestudos:

DE CANDOLLE³⁰, em 1824, redescreve o gênero de Willdenow, porém o considera duvidoso. SAINT HILAIRE⁹⁴, em 1829, não aceita o gênero *Bredemeyera* Willdenow e distribui suas espécies no gênero *Comesperma* Labill., criado em 1806. Nesta ocasião inclui *Bredemeyera*

floribunda Willd. como espécie pertencente ao gênero *Comesperma* Labill., junto com as espécies *Comesperma Kunthiana* St.Hil. e *Comesperma laurifolia* St.Hil.

Os desencontros prosseguem com ENDLICHER⁴⁶ em 1840 e com BENTHAM¹⁰ em 1852, onde este último não conhecedor do gênero *Bredemeyera* Willd. cria o novo gênero *Catocoma* Benth.

HASSKARI⁵⁶ em 1852 aceita o gênero *Bredemeyera* Willd. e coloca em sua sinonimia o gênero *Catocoma* Benth.

PLANCHON e TRIANA⁹⁰ em 1862 mantém o gênero *Catocoma* Benth. Neste mesmo ano, BENTHAM e HOOKER¹¹ tomam conhecimento do gênero *Bredemeyera* Willdenow e aceitam a sinonimia de *Catocoma* Benth.

BENNETT⁹ em 1874 redescreve *Bredemeyera floribunda* Willd. e designa o gênero, considerando o princípio da prioridade, adotando o nome genérico *Bredemeyera* criado por WILLDENOW em 1801.

As descrições farmacognósticas da raiz de *Bredemeyera floribunda* Willd. foram apresentadas por MARTINS⁷⁰, tendo a autora descrito de modo superficial as características macroscópicas e microscópicas deste órgão vegetal. Afirma que a espessura da região cortical varia de 1/3 a 1/6 da espessura total do órgão. Afirma ainda ser a região do cilindro central de coloração amarelo claro, sendo a parte lenhosa algo mais escura deixando perceber, mesmo à vista desarmada, a presença de orifícios correspondentes a vasos do xilema. A autora descreve ainda que o súber, a porção cortical externa, o floema e estruturas presentes no lenho são importantes para a caracterização microscópica da raiz.

SALGADO-LABORIAU e MORHY⁹⁵ estudaram os grãos de pólen de *Bredemeyera floribunda* Willd. e de outras espécies do

cerrado. Observaram que os grãos de pólen de *Bredemeyera floribunda* Willd. apresentam característico polimorfismo, sendo portadores de 7 a 11 colporos.

3.1.2. Posição taxonômica da espécie *Bredemeyera floribunda* Willdenow

De acordo com MELCHIOR⁷² em Engler's Syllabus Der Pflanzenfamilien a posição sistemática da espécie *Bredemeyera floribunda* Willdenow é a seguinte:

- 17ª Divisão - *Angiospermae* Brongniart
A. Brongniart in *En. Gen.* ed.2. 26.1850
- 1ª Classe - *Dicotyledoneae* De Candolle
A.P. De Candolle *Syst. Nat.* 1: 123.1817
- 1ª Subclasse - *Archichlamydeae* Engler
A. Engler, in Engler et. Prantl. *Natürl. Pflanzenf. Nachtr.* ed.1, 1(165): 344.1897
- 31ª Ordem - *Rutales* Engler
A. Engler, in Engler et. Prantl. *Natürl. Pflanzenf. Nachtr.* 3, 4.1896.
- 12ª Família - *Polygalaceae* Jussieu
in *Mem. Mus. d'Hist. Nat.* 1, 385-392. 1815
- 1ª Tribo - *Polygaleae* Chodat
in *E.-P. Nat. Pflanzenf. Nachtr.* 3, (4), 323-345.1896
- Gênero - *Bredemeyera* Willdenow
in Willdenow, *Gest. Nat. Freunde Ber. Neu. Schr.* 3, t.6, 412. 1801
- Espécie - *Bredemeyera floribunda* Willdenow
in Willdenow, *Gest. Nat. Freunde Ber. Neu. Schr.* 3, t.6, 412. 1801

3.2. ASPECTOS QUÍMICOS

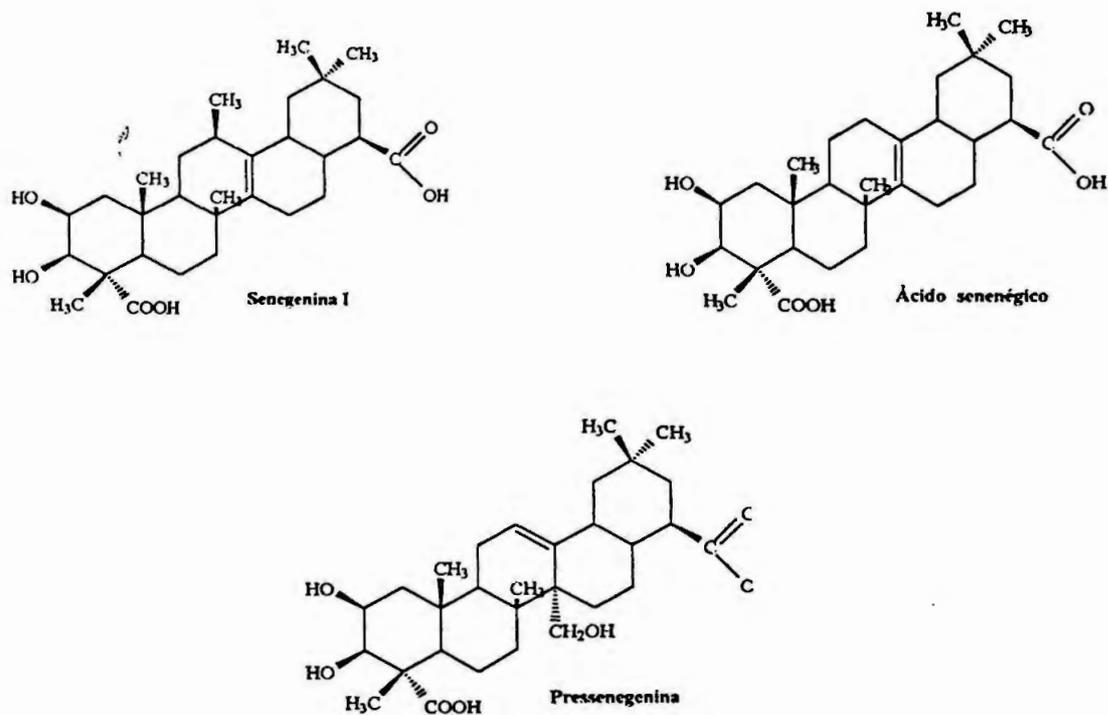
3.2.1. Química da Família *Polygalaceae*

Em relação aos aspectos químicos das *Polygalaceae*, o gênero *Polygala* foi o mais estudado até o momento, tendo as primeiras publicações referido-se à espécie *Polygala senega* Chodat. Esta espécie vegetal foi muito utilizada na Europa nos meados do século XIX, para os tratamentos de pneumonia e afecções nervosas⁴¹.

Este fato chamou a atenção de pesquisadores da época, e na tentativa de descobrirem a substância responsável pelo uso apregoadado Quevenne isola um pó amorfo branco de *Polygala senega*, e denomina de ácido poligálico⁴¹, sendo até hoje empregado como expectorante⁵².

Vários pesquisadores trabalharam na proposição da fórmula centesimal do ácido poligálico, onde WEDEKINDE e KRECKE⁴¹ em 1924 afirmaram que esta molécula possuía 2 grupos funcionais derivados de ácido carboxílico e 2 hidroxilas, denominando o composto de senegenina⁴¹.

Entre 1964 e 1966 PELLETIER e colaboradores elucidaram a estrutura da senegenina, do ácido senegenínico^{104;105} e da pressenegenina⁸¹.



A partir da elucidação deste núcleo triterpênico, a pressegenina, inúmeros trabalhos foram apresentados, relacionando as agliconas obtidas por hidrólise dos respectivos glicosídeos saponínicos de *Polygalaceae*, conforme tabela abaixo:

TABELA 01

Agliconas saponínicas relatadas em espécies vegetais da família *Polygalaceae*

Espécie	Origem	Aglicona	Referência
<i>Polygala bakeriana</i> Chod.	França	Pressegenina	5
<i>Polygala senega</i> Chod.	França	Pressegenina	17
<i>Polygala chinensis</i> L.	Índia	Pressegenina	18
<i>Polygala usafuensis</i> Gürke	Zaire	Pressegenina	34
<i>Polygala nambalensis</i> Gürke	Zaire	Pressegenina	34
<i>Polygala arenaria</i> Willd.	Zaire	Pressegenina	35
<i>Polygala vulgaris</i>	França	Pressegenina	39
<i>Polygala affinis</i> D.C.	França	Pressegenina	40
<i>Polygala capillaris</i> E. Mey	Bélgica	Pressegenina	37

TABELA 01

Agliconas saponínicas relatadas em espécies vegetais da família *Polygalaceae* (continuação)

<i>Polygala pygmaea</i> Gürke	Zaire	Pressegenina	38
<i>Polygala chamaebuxus</i>	Bélgica	Pressegenina	37
<i>Polygala ruwenzoriensis</i> Chod.	Zaire	Pressegenina	39
<i>Polygala myrtifolia</i> L.	África do Sul	Pressegenina	36
<i>Polygala acicularis</i> Oliv.	Zaire	Pressegenina	32
<i>Polygala persicarifolia</i>	Zaire	Pressegenina	33
<i>Polygala exelliana</i> Troupin	Zaire	Pressegenina	41
<i>Polygala calcarea</i> F.W. Scultz	França	Pressegenina	41
<i>Polygala pruinosa</i> Bois.	Turquia	Pressegenina	58
<i>Polygala albida</i>	Zaire	Pressegenina	79
<i>Polygala tenuifolia</i>	Japão	Tenuifolina	80
<i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	Brasil	Ácido bredemólico	110
<i>Carbolobiu glabrescens</i> Hutch.	Congo	Pressegenina	29
<i>Carbolobiu lutea</i> G. Don.	Nigéria	Pressegenina	37
<i>Muraltia heisteria</i> (L.) D.C.	África do Sul	Pressegenina	40
<i>Muraltia ononidifolia</i> E.Mey.	África do Sul	Pressegenina	40
<i>Muraltia satureoides</i> Burch.	África do Sul	Pressegenina	40
<i>Nylandtia spinosa</i> (L.) Dum.	África do Sul	Pressegenina	41
<i>Securidaca longepedunculata</i> Fresen.	Zaire	Pressegenina	76
<i>Securidaca welwitschii</i> Oliv.	Zaire	Pressegenina	29
<i>Xanthophyllum octandrum</i>	Austrália	Ácido oleanólico	58

Do ponto de vista do estudo químico, outra fase de destaque nos trabalhos de isolamento, purificação e elucidação

estrutural dos glicosídeos saponínicos de Polygalaceae se deu a partir da publicação de BRIESKORN & RENKE¹⁷ onde os autores isolaram um glicosídeo saponínico de *Polygala senega* Chodat, determinando os açúcares ligados na porção C-28 da aglicona da pressenegenina, sem no entanto caracterizar a sequência e posição destes açúcares.

Posteriormente as estruturas dos glicosídeos saponínicos presentes em *Polygala senega* Chodat foram elucidadas por completo e os compostos denominados de senegeninas I, II, III e IV^{106;111}.

O isolamento de glicosídeos saponínicos obtidos a partir das raízes da planta conhecida como "onji" no Japão, a *Polygala tenuifolia*, forneceu 6 compostos chamados de onjisaponinas A, B, C, D, E e F^{96;97}.

Os glicosídeos saponínicos de *Polygala chinensis* e *Polygala pruinosa* tiveram suas estruturas estabelecidas por BRIESKORN & KILBINGER¹⁸ e SEZIK & YESILADA¹⁰² respectivamente.

DELAUDE e col.⁴² estudaram *Polygala ruwenzoriensis* proveniente do Zaire e ONYAMBOKO e col.⁷⁹ estudaram *Polygala albida*. Ambos isolaram glicosídeos saponínicos, determinaram o núcleo da aglicona como sendo a pressenegenina e os açúcares presentes, entretanto não concluíram quanto à sequência e posição destes açúcares.

Da *Polygala japonica* foi isolado um glicosídeo saponínico em que a aglicona é derivada do núcleo da bayogenina, e a diferença em relação a pressenegina está na presença de somente um grupo de ácido carboxílico em C28⁵⁸.

Para melhor elucidar, segue abaixo tabela contendo os glicosídeos saponínicos encontrados em *Polygalaceae*, pertencentes ao núcleo PRESSENEGENINA 3- β -O-glicose (Tenuifolina).

Tabela 02

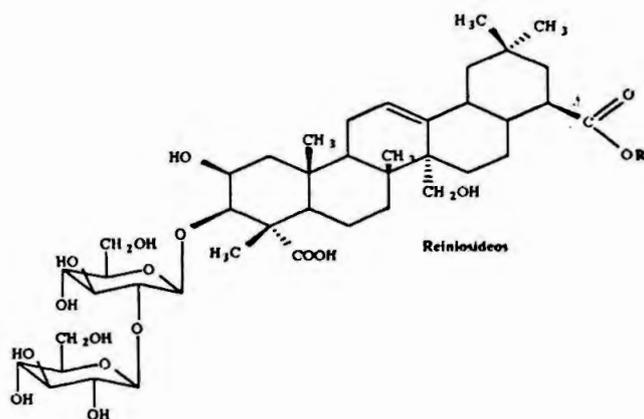
Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos derivados do núcleo da *PRESSENEGENINA 3- β -O-glicose*, encontrados em *Polygalaceae*

Porção osídica em C28	Espécie	Referência
<p>Senegenina II</p>	<i>Polygala senega</i> Chodat	106; 111
<p>Senegenina III = Onjisaponina B</p>	<i>Polygala senega</i> Chodat <i>Polygala tenuifolia</i>	97; 106; 111
<p>Senegenina IV</p>	<i>Polygala senega</i> Chodat	106; 111

Tabela 02

Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos derivados do núcleo da *PRESSENEGENINA 3-β-O-glicose*, encontrados em Polygalaceae (continuação)

Porção osídica em C28	Espécie	Referência
<p style="text-align: center;"> 3 Ramn Apiose 2 3 C28 — Fucose — Ramnose — Xilose — Galactose 4 1 4 1 4 1 1 4 1 4 1 4-metoxi-cinamoil </p> <p style="text-align: center;">Onjisaponina A</p>	<i>Polygala tenuifolia</i>	97
<p style="text-align: center;"> 2 1 4 1 4 1 C28 — Fucose — Ramnose — Xilose — Galactose 4 1 4 1 4 1 1 4 1 4 1 3,4,5-trimetoxi-cinamoil </p> <p style="text-align: center;">Onjisaponina C</p>	<i>Polygala tenuifolia</i>	97
<p style="text-align: center;"> 2 1 4 1 4 1 C28 — Fucose — Ramnose — Xilose — Apiose 4 1 4 1 4 1 1 4 1 4 1 3,4,5-trimetoxi-cinamoil </p> <p style="text-align: center;">Onjisaponina E</p>	<i>Polygala tenuifolia</i>	97
<p style="text-align: center;"> Xilose Arabinose 3 3 1 1 C28 — Fucose — Ramnose — Apiose 2 1 4 1 3 4 1 4 1 3 1 4 1 4 1 3,4,5-trimetoxi-cinamoil </p> <p style="text-align: center;">Onjisaponina F</p>	<i>Polygala tenuifolia</i>	96
<p style="text-align: center;"> Xilose 3 1 4 1 C28 — Fucose — Ramnose — Apiose 2 1 4 1 4 1 4 1 1 4 1 4 1 3,4,5-trimetoxi-cinamoil </p> <p style="text-align: center;">Onjisaponina G</p>	<i>Polygala tenuifolia</i>	96
<p style="text-align: center;"> C28 — (Fucose; Glicose; Ramnose; Galactose; Xilose; Arabinose) * </p> <p style="text-align: center;">* sequencia não determinada</p>	<i>Polygala ruwenzonensis</i>	39

**Tabela 03**

Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos derivados do núcleo do REINOSÍDEO, encontrados em Polygalaceae

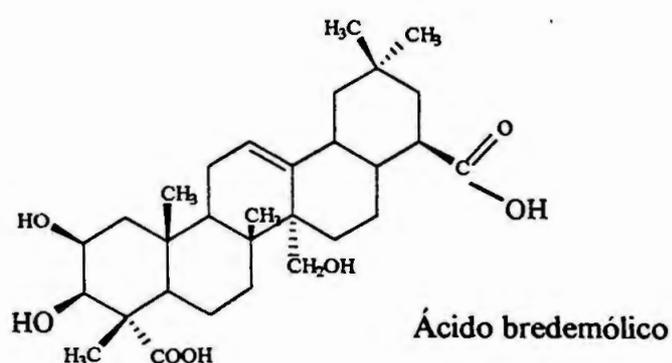
Porção osídica em C28	Espécie	Referência
<p style="text-align: center;"> $\text{C28} \text{---} \overset{2}{\text{Fucose}} \text{---} \overset{1}{\text{Ramnose}} \text{---} \overset{4}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{1}{\text{Xilose}}$ Reinosídeo C </p>	<i>Polygala reinii</i>	73
<p style="text-align: center;"> $\text{C28} \text{---} \overset{2}{\text{Fucose}} \text{---} \overset{1}{\text{Ramnose}} \text{---} \overset{4}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{1}{\text{Xilose}}$ <div style="margin-left: 100px;"> $\begin{array}{c} \\ 3 \\ \\ 1 \\ \text{Apiose} \end{array}$ </div> Reinosídeo D </p>	<i>Polygala reinii</i>	73
<p style="text-align: center;"> $\text{C28} \text{---} \overset{2}{\text{Fucose}} \text{---} \overset{1}{\text{Ramnose}} \text{---} \overset{4}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{1}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{4}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{1}{\text{Xilose}}$ Reinosídeo E </p>	<i>Polygala reinii</i>	73
<p style="text-align: center;"> $\text{C28} \text{---} \overset{2}{\text{Fucose}} \text{---} \overset{1}{\text{Ramnose}} \text{---} \overset{4}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{1}{\text{Xilose}} \text{---} \overset{4}{\text{Galactose}} \text{---} \overset{1}{\text{Galactose}}$ Reinosídeo F </p>	<i>Polygala reinii</i>	73

3.2.2. Química de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Do gênero *Bredemeyera* Willdenow os trabalhos de isolamento e identificação de substâncias foram realizados somente com a espécie *Bredemeyera floribunda* Willd.

WASICKY & FERREIRA¹¹⁴ obtiveram uma massa de substância de coloração amarelada a partir de precipitação com éter etílico dos extratos hidroalcoólicos das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. Esta mistura de substâncias, após reações fitoquímicas de caracterização, evidenciou-se tratar de glicosídeos saponínicos.

TSCHESCHE & GUPTA¹¹⁰ a partir de extratos obtidos das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd., isolaram após hidrólise ácida, o ácido bredemólico.



Da espécie encontrada no Brasil foram isolados e identificados os glicosídeos saponínicos bredemeyerosídeo B²⁸, bredemeyerosídeo D⁸³ e xantonas pentaoxigenadas^{85;107}.

Os bredemeyerosídeos B e D foram obtidos a partir de extrato metanólico das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd., realizando sucessivas partições com sistema água/n-butanol, precipitação com éter etílico e isolamento e purificação através de sistema cromatográfico, empregando cromatografia em coluna, tendo como adsorventes o Sephadex LH-20 e Silica-gel para coluna aberta. Para Cromatografia de Média Pressão empregaram colunas de fase reversa (RP-8) ^{28;83}.

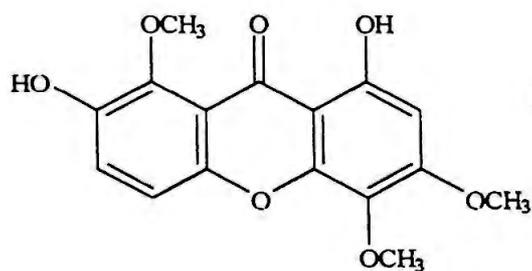
Os açúcares correspondentes aos bredemeyerosídeos B e D foram obtidos por reação de hidrólise ácida, seguidos de sililização, separação por cromatografia gasosa e identificação espectrométrica ^{28;83}.

Tabela 04

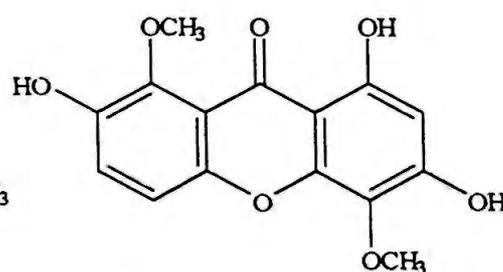
Porção osídica referente ao C28 dos glicosídeos saponínicos isolados de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Porção osídica em C28	Espécie	Referência
$ \begin{array}{ccccccc} & & 2 & & 1 & & 4 & & 1 \\ \text{C28} & \text{---} & \text{Fucose} & \text{---} & \text{Ramnose} & \text{---} & \text{Xilose} \\ & & & & & & & & \\ & & 3 & & 3 & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & 1 & & 1 & & & & \\ & & \text{Ramnose} & & \text{Apiose} & & & & \end{array} $	<i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	28
$ \begin{array}{ccccccc} & & 2 & & 1 & & 4 & & 1 \\ \text{C28} & \text{---} & \text{Fucose} & \text{---} & \text{Ramnose} & \text{---} & \text{Xilose} \\ & & & & & & & & \\ & & 3 & & & & & & \\ & & & & & & & & \\ & & 1 & & & & & & \\ & & \text{Ramnose} & & & & & & \\ & & \text{Bredemeyerosídeo D} & & & & & & \end{array} $	<i>Bredemeyera floribunda</i> Willd.	83

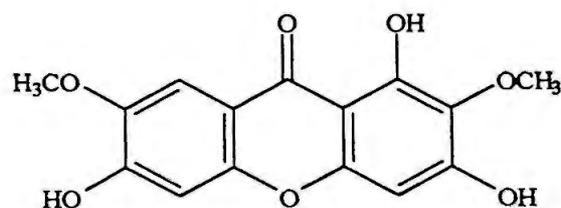
SILVEIRA e colaboradores¹⁰⁷ obtiveram a partir dos extratos clorofórmico e etanólico das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. xantonas pentaoxigenadas: 1,7-diidroxi-3,4,8-trimetoxixantona, 1,3,7-triidroxi-4,8-dimetoxixantona e 1,3,6-triidroxi-2,7-dimetoxixantona.



1,7-diidroxi-3,4,8-trimetoxixantona



1,3,7-triidroxi-4,8-dimetoxixantona



1,3,6-triidroxi-2,7-dimetoxixantona

3.2.3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E USOS.

Preparados obtidos a partir das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. tem merecido atenção por parte de grupos de pesquisadores no Brasil.

Na medicina popular esta planta tem sido empregada para muitas finalidades. No interior de São Paulo e outras regiões do Brasil, esta espécie cuja denominação popular é variada, vem sendo empregada no tratamento de feridas, furunculose, picadas de insetos, doenças da pele, como febrífugo, diurético, para baixar a pressão, em moléstias do fígado, problemas circulatórios, como expectorante e contra picada de cobras^{12;70;83;88;114}.

Em razão deste variado emprego popular, tem-se a denominação mais comumente citada desta planta como botica inteira⁷⁰.

WASICKY e FERREIRA¹¹⁵ avaliaram a influência da fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), observando-se que na presença de soluções diluídas da fração saponínica na proporção de 1: 500.000 ocorreram significativas alterações, favorecendo o crescimento.

RAO e col.⁹² estudaram o efeito protetor do extrato etanólico de raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. nos modelos de

úlceras induzidas por etanol e ácido acetil salicílico. Neste trabalho os autores empregaram doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato etanólico e avaliaram: a) redução da hiperemia na mucosa estomacal; b) redução de lesão gástrica provocada por etanol; c) redução de lesão gástrica provocada por ácido acetil salicílico. Os autores verificaram que o extrato testado com a dosagem de 200 mg/kg possui efeito protetor contra úlcera induzida nos modelos experimentais realizados.

Bredemeyerosídeo B, um glicosídeo saponínico obtido de *Bredemeyera floribunda* Willd. foi testado por PEREIRA e col.⁸⁴ em modelo experimental de triagem farmacológica de substâncias isoladas, buscando avaliar a proteção em ratos contra veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*). Foram empregados vários compostos isolados de diversas plantas medicinais, incluindo o glicosídeo saponínico bredemeyerosídeo B de *Bredemeyera floribunda* Willd., avaliando-se a diminuição da letalidade em ratos após a administração do veneno de jararaca (5mg/kg, sub-cutâneo), após 6, 24 e 48 horas. Os resultados demonstraram que no grupo testado com bredemeyerosídeo B (100mg/kg, via oral) a porcentagem de sobrevivência em ratos foi de 80% em todos os intervalos observados.

BEVENINO & MELLO AIRES¹³ e BEVENINO & SANIOTO¹⁴, estudaram os extratos obtidos de raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. em modelos experimentais para determinação da atividade antiipertensiva, de efeitos na diurese, filtração glomerular e tubular dos rins em ratos e os efeitos de transporte de água através da

pele de sapo com ensaio "in vitro". Para a avaliação dos efeitos na pressão arterial e excreção renal em ratos, foram empregadas doses de 20 a 80 mg/kg de extrato etanólico liofilizado, administrado por via parenteral em ratos, monitorando a pressão arterial e coletando, através de cânula urinária, amostras de urina em diferentes intervalos de tempo.

Os extratos apresentaram efeito hipotensor a partir de 30 mg/kg, sendo a resposta dose-dependente até 76 mg/kg, e a partir desta concentração verificou-se intenso efeito hipotensor não reversível. O efeito diurético foi bastante pronunciado, com excreção de sódio e potássio, sendo estas propriedades dissociadas do efeito hipotensor. Os autores sugerem tratar-se de influência dos extratos ao nível de transporte tubular no néfron.

Na seqüência dos trabalhos¹³ foram avaliados especificamente os efeitos da filtração glomerular e a função tubular renal em ratos na presença de extrato etanólico obtido de *Bredemeyera floribunda* Willd. Neste experimento administrou-se o extrato através de infusão intravenosa contínua (0,05mg/min/100g), avaliando-se a pressão arterial, o fluxo urinário e os íons presentes na urina dos animais. Durante o experimento, os autores não observaram variação significativa na pressão arterial monitorada, entretanto verificaram um grande aumento do fluxo urinário, da filtração glomerular e excreção de sódio com o "clearance" aumentado. Outro grupo de animais foi tratado com solução de inulina, induzindo o efeito diurético. Neste grupo observou-se o aumento significativo da reabsorção de água.

Os autores sugerem um efeito direto na filtração glomerular, possivelmente pela ação tensioativa entre componentes estruturais das membranas dos glomérulos ou concomitantemente, por esta ação aliada à diminuição da pressão de perfusão renal. Também sugerem uma ação preferencial do extrato nas células tubulares proximais, possivelmente no sistema de transporte contra-corrente envolvendo o mecanismo (Na^+ / K^+) - ATPase ou em outras proteínas presentes nas membranas celulares, envolvidas no mecanismo de transporte de sais¹³.

O extrato etanólico das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. foi novamente ensaiado¹⁴ buscando verificar "in vitro" a correlação da atividade diurética no transporte de absorção de água em pele de sapo nas condições basais com estímulo hormonal através da ocitocina. Os efeitos na absorção percutânea foram avaliados antes e após a adição do extrato na dosagem de 1mg/mL, empregando as duas faces das superfícies da pele do sapo, compreendendo a camada externa epitelial e a camada interna serosa. Os resultados indicaram a ocorrência de inibição do estímulo hormonal da ocitocina no transporte de água da camada epitelial, não sendo observadas alterações significativas nas demais condições ensaiadas.

SANTOS e col.⁹⁸ testaram a atividade hemolítica de vários glicosídeos saponínicos isolados de diversas espécies vegetais, dentre estes o bredemeyerosídeo D de *Bredemeyera floribunda* Willd. O objetivo do trabalho foi uma triagem de tais substâncias, buscando a seleção do melhor composto saponínico para ser posteriormente

ensaiado como adjuvante na formulação de vacina contra *Leishmania donovani*, atuando como agente imunogênico. Os resultados apontaram para um Índice de Hemólise - IH₅₀ de 175 µg/mL para o bredemeyerosídeo D e valores acima de 500 µg/mL para a periandrina II de *Periandra mediterranea* L., esta última sendo a escolhida para continuidade dos estudos da atividade imunogênica de saponinas para uso como adjuvante em vacinas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O material vegetal utilizado na elaboração deste trabalho foi coletado nos campos cerrados do município de Leme, Estado de São Paulo, onde o vegetal ocorre com frequência.

Foram efetuadas ao todo tres coletas assim discriminadas:

Tabela 05

Coletas de órgãos subterrâneos de *Bredemeyera floribunda* Willd. - Polygalaceae..

Amostra	Data da coleta	Descrição da coleta
01	09/97	o vegetal encontrava-se com grande quantidade de flores e botões florais . Folhas fortemente escuras e brilhosas. Foram coletados ao todo cerca de 1,2 kg de material, correspondendo aos órgãos subterrâneos, compostos pela raiz principal e raízes secundárias.
02	03/98	o vegetal mostrava-se com ausência de flores. Folhas fortemente esverdeadas. Foram coletados cerca de 0,8 kg de material, correspondendo aos órgãos subterrâneos, compostos pela raiz principal e raízes secundárias.
03	10/99	as partes aéreas do vegetal mostravam-se nitidamente mais claras que as realizadas em coletas anteriores. Ramos em forma de panículas com flores e grande quantidade de frutos na forma de cápsulas e sementes, exalando forte odor característico. Foram coletados cerca de 1,0 kg de raízes .

O material coletado foi dividido em duas partes, sendo uma destinada ao estudo morfológico e anatômico e outra, destinada ao preparo de extratos.

Com o material florido foram preparadas exsiccatas, sendo depositadas no herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, onde permanecem como testemunha de estudo farmacognóstico.

O material foi identificado pelo Professor Assoc. Fernando de Oliveira, do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Francisco - USF.

4.2. ESTUDO MORFOLÓGICO E ANATÔMICO DO VEGETAL.

Os órgãos subterrâneos da planta, destinados ao estudo morfológico e anatômico, foram coletados de vegetais desenvolvidos, cujas peças mediam cerca de 30 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro. As raízes foram cortadas em fragmentos, com tamanhos de aproximadamente 5 cm de comprimento, e espessura variável de acordo com a região fragmentada.

Após a divisão destes órgãos, parte do material foi fixado em solução de F.A.A. a 50% (etanol 50% - 90 mL; formol 5 mL; ácido acético glacial - 5 mL) e álcool etílico a 70%⁷⁸.

Com este material foram efetuados cortes à mão-livre, submetidos a descoloração pela solução de hipoclorito de sódio a 5%, lavados convenientemente com água, corados pela solução de Azul de Astra e Safranina-1% montados entre lâmina e lamínula imersos em água glicerinada 1:1 segundo técnica descrita por OLIVEIRA & AKISUE⁷⁷.

As fotografias que ilustram este trabalho foram executadas com fotomicroscópio Olympus e máquina fotográfica Pentax K100.

4.2.1. Caracterização da Droga.

A caracterização macroscópica do vegetal foi executada através da observação à vista desarmada e com auxílio de lupa. As mensurações foram executadas empregando-se réguas comuns.

Como forma de caracterização empregaram diversos reativos e soluções, a fim de destacar os principais elementos presentes no material vegetal^{59:70}. Para isto empregou-se na realização

dos testes soluções de floroglucina clorídrica, solução de lugol 5%, solução de cloreto férrico a 5%, solução de hidróxido de sódio a 30 % e ácido sulfúrico concentrado^{59;70}.

4.2.2. ESTUDO QUÍMICO

4.2.2.1. Obtenção da droga pulverizada

As raízes seccionadas foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 45 °C durante 4 dias. Após a secagem, a droga foi pulverizada em moinho do tipo misto (facas e martelos), até a obtenção de Pó Grosso segundo a Farmacopéia Brasileira⁴⁹.

4.2.2.2. - Reações Genéricas de Caracterização de Classes de Substâncias.

As classes de substâncias presentes nas raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. foram evidenciadas através de metodologias de triagem indicadas por diversos autores^{27;44;55;112}.

Foram feitos ensaios para as seguintes classes de substâncias:

ALCALÓIDES: dois gramas do pó da droga foram extraídos com 15 mL de ácido clorídrico diluído a 2% e, a seguir, o extrato obtido submetido a purificação segundo o processo de Stass-Otto²⁷. Os seguintes reativos de precipitação foram empregados: reativo de Bertrand, reativo de Dragendorff e reativo de Mayer.

TANINOS E SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS: procedeu-se inicialmente, à verificação do sabor adstringente da droga para avaliar a presença de taninos. A seguir, dois gramas do pó da droga

avaliar a presença de taninos. A seguir, dois gramas do pó da droga foram levados a fervura com 20 mL de água. A mistura foi filtrada e o extrato aquoso resultante foi dividido em tres tubos, testados separadamente através da observação de formação de precipitados nas presenças de: solução de subacetato de chumbo a 10%, solução de cloreto férrico a 2% e solução de gelatina a 2%.

ANTRADERIVADOS: os extratos hidroalcoólicos da droga foram submetidos à reação de Borntraeger. Dois gramas da droga foram levados à fervura com 30 mL de etanol a 60%. A mistura foi filtrada e a solução resultante foi acidulada com ácido sulfúrico a 10% e extraída com 5 mL de hexano. Cerca de 3 mL do extrato hexânico foi transferido para outro tubo e adicionando-se 1 mL de solução de hidróxido de potássio a 0,1N. O tubo foi arrolhado e agitado, observando-se a coloração da fase alcalina.

FLAVONÓIDES: dois gramas da droga foram aquecidos até a fervura com 20 mL de etanol a 70%. A mistura foi submetida a filtração e o extrato obtido foi submetido a reação de Shinoda e a reação com cloreto de alumínio a 5%.

Reação de Shinoda: a 5 mL do extrato hidroalcoólico, colocado em tubo de ensaio, adicionaram-se um fragmento de magnésio metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. Procedeu-se de maneira semelhante com outro tubo contendo somente a solução hidroalcoólica. Observou-se a seguir comparativamente, as colorações desenvolvidas nos dois tubos.

Reação com a solução de cloreto de alumínio a 5%: em pedaço de papel de filtro foram colocadas duas gotas de solução hidroalcoólica da droga em pontos diferentes. Em um dos pontos adicionou-se uma gota da solução reagente e de forma comparativa verificou-se o surgimento ou intensificação de fluorescência sob luz ultra-violeta a 366 nm.

ÓLEO ESSENCIAL: efetuou-se a verificação do odor aromático da droga e do seu hidrodestilado. Meio grama de pó da droga foi colocado no interior de um anel metálico disposto sobre uma lâmina de microscopia. Cobriu-se o conjunto com outra lâmina de microscopia aquecendo-se a seguir. As gotículas depositadas na lâmina superior, que durante o aquecimento foi resfriada com algodão umedecido em água gelada, foram testadas com o reagente de Sudan III.

SAPONINAS: dois gramas do pó da droga foram fervidos com 15 mL de água e a seguir submetidos a filtração. O extrato aquoso obtido foi transferido para tubo de ensaio o qual foi arrolhado e submetido à agitação com o intuito de se verificar atividade afrogênica.

TRITERPENÓIDES: dois gramas da droga foram aquecidos até a fervura com 20 mL de etanol a 70%. A mistura foi submetida a filtração, parte do etanol evaporado e extraídos com 2 porções de 5 mL de clorofórmio. O extrato clorofórmico foi submetido à evaporação do solvente e ao resíduo procedeu-se a reação de Lieberman-Burchard.

4.2.3. Fracionamento cromatográfico de extratos das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd.

O fracionamento cromatográfico e isolamento de substâncias foi executado a partir dos extratos clorofórmico e metanólico.

Cerca de 800g de raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. foram macerados com hexano durante 48 horas e extraídos em percolador com cerca de 4 litros do mesmo solvente. O extrato obtido foi filtrado e a seguir evaporado em evaporador rotativo sob vácuo até consistência semi-sólida, sendo denominado de **extrato hexânico - EHe**.

Após a extração com hexano, o pó da droga foi submetido à secagem para retirada do solvente retido por impregnação, e em seguida devolvido ao interior do percolador, deixando-se macerar com clorofórmio durante 48 horas.

Decorrido este período, realizou-se a percolação utilizando-se cerca de 3,5 litros do mesmo solvente. Os extratos clorofórmicos reunidos foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo sob vácuo até consistência semi-sólida, sendo denominados de **extrato clorofórmico - ECl_o**. Em seguida a droga foi retirada do interior do percolador e submetida à secagem ao ar livre, a fim de retirar o excesso de solvente impregnado.

Retornou-se o material vegetal para o interior do percolador e cobrindo a droga com metanol (1,6 litros) deixou-se sob maceração durante 48 horas. Decorrido este período, realizou-se a percolação utilizando cerca de 4,0 litros do mesmo solvente. Os extratos reunidos foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo sob vácuo até consistência semi-sólida, sendo denominados de **extrato metanólico - EMe¹¹²**.

4.2.4. Isolamento de Substâncias¹¹²

A partir do resíduo do extrato clorofórmico (10,74 g) realizou-se adição de cerca de 40 mL de n-hexano observando-se a formação de precipitado amarelado. Através de filtração a vácuo e sucessivas lavagens com o mesmo solvente, obteve-se cerca de 4,7g de material denominado de **resíduo clorofórmico - RCl_o**.

4.2.4.1. Fracionamento Cromatográfico do resíduo clorofórmico - RCl_o

Foram empregados os seguintes sistemas cromatográficos no fracionamento e purificação de substâncias:

Sistema cromatográfico em coluna - Clo₁

Tipo e tamanho da coluna: coluna de vidro medindo 50 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro.

Tipo de Adsorvente: silicagel (70-230 mesh ASTM)

Quantidade de Adsorvente : 70 g

Quantidade de Extrato : 3,0 g

Eluentes : Hexano com gradiente crescente de acetato de etila e Clorofórmio com gradiente crescente de metanol.

Volume recolhido em cada fração : 30 ml.

Sistema cromatográfico em camada delgada - Clo₂

Suporte : placa de vidro 15 X 20 cm.

Fase estacionária : silicagel G 60

Fase móvel : Clorofórmio/Metanol - 9:1

Percurso : 12 cm.

Desenvolvimento : simples e ascendente.

Visualização : sob luz ultra-violeta em 365 nm e em seguida à luz do dia, após nebulização com solução de Cloreto Férrico a 5%¹¹².

Sistema para cromatografia preparativa – Clo₃

Suporte : placa de vidro 15 X 20 cm.

Fase estacionária : silicagel G 60, com 0,5 micras de espessura

Fase móvel : Clorofórmio/Metanol - 9:1

Percurso : 12 cm.

Desenvolvimento : simples e ascendente.

Visualização : sob luz ultra-violeta em 365 nm.

4.2.4.2. Fracionamento do Extrato Metanólico.

O resíduo do extrato metanólico obtido (150,0 g) foi dividido em duas partes, um destinado ao fracionamento cromatográfico (4g) e o restante destinado à obtenção da Fração Saponínica.

Sistema cromatográfico em coluna - Me₁

Tipo e tamanho da coluna: coluna de vidro medindo 50 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro.

Tipo de Adsorvente: silicagel (70-230 mesh ASTM)

Quantidade de Adsorvente : 100 g.

Quantidade de Extrato : 4,0 g.

Eluentes : Clorofórmio com gradiente crescente de metanol e metanol/água.

Volume recolhido em cada fração : 50 ml.

As frações recolhidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada pelos sistemas cromatográficos abaixo (Me₂ e Me₃) e agrupadas conforme semelhanças evidenciadas nos deslocamentos de percurso (Rf's) e coloração das manchas.

Sistema cromatográfico em camada delgada -Me₂

Suporte : placa de vidro 15 X 20 cm.

Fase estacionária : silicagel G 60

Fase móvel : Clorofórmio/ Ácido acético/ Metanol/ Água - (60:30:15:10)

Percurso : 10 cm.

Desenvolvimento : simples e ascendente.

Visualização : à luz do dia, após nebulização com o *Reagente de Anisaldeído Sulfúrico*¹¹³, seguido de aquecimento a 105°C durante 15 minutos.

Sistema cromatográfico em camada delgada - Me₃

Suporte : placa de vidro 15 X 20 cm.

Fase estacionária : silicagel G 60

Fase móvel : Acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético glacial / água - (100:11:11:26)

Percurso : 10 cm.

Desenvolvimento : simples e ascendente.

Visualização : nebulização com o *Reagente de Ácido Difenilbórico com Polietilenoglicol 4000 (NP/PEG)*¹¹³, seguido de visualização sob luz ultravioleta a 365 nm.

4.2.4.3. Obtenção da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

A uma parte do resíduo obtido na extração com metanol (146,0 g) foram adicionados cerca de 100 ml de metanol e gradativamente, gota a gota o éter etílico, observando a formação de precipitado de aspecto esbranquiçado. Repetiu-se sucessivas vezes a adição de éter etílico na forma citada, seguida de filtração á vácuo, recolhendo os resíduos.

O sobrenadante obtido foi evaporado em evaporador rotativo sob vácuo, e foram adicionados aos poucos, pequenos volumes de acetona, até a formação de nova quantidade de material branco-amarelado. Este procedimento foi realizado em ambiente com baixa umidade.

Os resíduos foram reunidos e lavados sucessivas vezes com acetona, fornecendo cerca de 20,16g de material branco-amarelado denominado de **Fração Saponínica**. A partir deste material realizou-se a caracterização através do perfil cromatográfico por camada delgada empregando-se o sistema cromatográfico Me_3 e procedeu-se aos estudos de caracterização físico-química e biológicos conforme segue.

4.2.5. Caracterização Físico-Química da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Os ensaios abaixo descritos foram realizados empregando-se água purificada por colunas deionizadoras.

4.2.5.1. Avaliação da atividade tensoativa e determinação da Concentração Micelar Crítica - C.M.C. da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Foram preparadas soluções aquosas com a Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. nas concentrações de: 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,005; 0,001 e 0,0001 mg/mL, realizando-se leituras da atividade tensoativa destas soluções a 20°C em tensiômetro digital modelo KIOST, marca KRÜSS e água deionizada para calibração.

Os valores da atividade tensoativa foram obtidos após a imersão de placa de platina, acoplada ao equipamento, no interior de cuba contendo 50 mL de cada amostra, e os valores expressos em mili-Newton/metro (mN/m). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata, sendo realizado em cada intervalo de leitura a flambagem da placa de platina para remoção de resíduos e contaminantes.

O gráfico da atividade tensoativa foi construído através dos valores obtidos, sendo a concentração de cada amostra em mg/mL registrado no eixo das ordenadas e os valores obtidos de tensão superficial em mili-Newton/metro (mN/m) no eixo das abscissas.

A curva do gráfico foi traçada empregando os melhores pontos de acordo com o índice mais satisfatório de R^2 , obtido pela regressão polinomial de segundo grau, conforme a equação da reta ($y = -3,4727\text{Ln}(x) + 36,144$).

A Concentração Micelar Crítica - C.M.C. em mg/mL foi determinada no eixo x através do ponto de intersecção das tangentes traçadas nas retas^{86;91}.

Como comparativo foi empregado o tensoativo Lauril Sulfato de Sódio - LSS, em solução aquosa, nas mesmas concentrações e condições que o descrito para a Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

4.2.5.2. Determinação do Poder Espumante conforme ABNT/NBR 13064³

Cerca de 50 mL da solução a 1% da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. foram transferidos para proveta graduada com tampa. Procedeu-se a agitação através da inversão da proveta em ângulo de 180° por 30 vezes. Decorridos 15 minutos foi medido o volume ocupado pela espuma formada. Outras leituras foram efetuadas com 30 minutos e 120 minutos.

Os valores foram expressos em porcentagem de Poder Espumante (%PE), calculados pela média de tres determinações para cada intervalo de tempo, pela equação abaixo:

$$\% \text{ PE} = (\text{VE}/\text{VS}) \times 100, \quad \text{onde:}$$

% PE= poder espumante, em porcentagem.

VE= volume de espuma obtido, em mL.

VS= volume da solução (50 mL).

4.2.5.3. Avaliação da variação do Poder Espumante da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Foram preparadas soluções aquosas com a Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. nas seguintes concentrações: 20; 10; 2; 0,5; 0,4; 0,1 e 0,001 mg/mL e transferidos exatamente 50 mL de cada solução para proveta graduada com tampa.

Cada amostra foi agitada através da inversão agitação através da inversão da proveta em ângulo de 180° por 30 vezes e seguido de leituras referentes ao volume ocupado pela espuma formada nos intervalos de tempo de: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Os resultados foram referentes à média de tres determinações para cada amostra, relacionando o volume de espuma formado no interior da proveta (mL) em função da concentração das soluções preparadas (mg/mL) e do tempo (minutos).

4.3. ENSAIOS DE TOXICIDADE E FARMACOLÓGICOS DA FRAÇÃO SAPONÍNICA DE *Bredemeyera floribunda* WILLD.

4.3.1. Observação dos Efeitos Gerais do Extrato Liofilizado (E.L.) em Camundongos.

Camundongos machos albinos adultos, pesando entre 25 a 40 gramas, foram distribuídos em 6 grupos com 5 animais cada e 1mL de cada preparação da Fração Saponínica foi injetada nas dosagens de 5, 30, 60, 150 e 300 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). Para injeção, a Fração Saponínica foi diluída em solução de NaCl a 0,9% (solução salina). Um grupo de animais foi injetado nas mesmas condições somente com a solução salina (1mL cada) para servir de controle. Os efeitos gerais foram observados, mantendo-se os animais com deambulação livre em superfície plana, durante vários intervalos em um período de 6 horas.

Os efeitos gerais resultantes desta observação foram compilados em tabelas, seguindo o modelo para "Screening hipocrático" descrito por MALONE e ROBICHAUD⁶⁷.

4.3.2. Determinação da Toxicidade Aguda (DL₅₀) da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. em Camundongos.

A camundongos machos, albinos, adultos, pesando entre 25 a 40 gramas, foi administrada dose única por via oral, através de entubação intra-gástrica - "gavage", preparado a partir da Fração Saponínica, nas dosagens de 300; 600; 1200 mg/kg.

Para os grupos testados com a via de administração intraperitoneal (i.p.), foi empregada a Fração Saponínica nas dosagens de 50 , 150 e 350 mg/kg, administrada uma única vez.

Todas as diluições foram realizadas com a Fração Saponínica em solução de NaCl a 0,9%(solução salina). Um grupo de animais foi tratado somente com solução salina para servir de controle. A letalidade foi verificada em intervalos de 15 minutos nas primeiras 6 horas e a cada 12 horas para os intervalos que se seguiam, até completar um período de 72 horas¹⁰⁹.

4.3.3. Teste da Atividade Antiulcerogênica em Ratos, pelo modelo de úlcera induzida por Indometacina

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250 a 300 gramas, submetidos a jejum de 24 horas, com o fornecimento de água *ad libitum*, distribuídos em quatro grupos de 5 animais cada.

Um dos grupos foi tratado com solução de NaCl a 0,9% (solução salina) na dosagem de 10mL/kg, outro com solução aquosa de cimetidina com dosagem de 100mg/kg, e os demais grupos receberam a Fração Saponínica diluída em solução de NaCl a 0,9% nas dosagens de 100 e 300mg/kg. Todas as administrações foram realizadas pela via oral.

Após 30 minutos dos tratamentos, cada animal recebeu uma injeção subcutânea de solução aquosa de indometacina na dose de 30 mg/kg. Decorridas 4 horas após a administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o estômago de cada animal foi retirado e aberto ao longo da curvatura maior, para a realização de análise e contagem das lesões ulcerativas⁷⁵.

Valores foram atribuídos, considerando o tipo e tamanho das lesões apresentadas, conforme tabela abaixo:

Tabela 06

Valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Lesões Ulcerativas (I.L.U.).

Tipo de lesão	Valores
Perda de pregas	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Petéquias (até 10)	2 pontos
Petéquias (acima de 10)	3 pontos
Úlceras até 1 mm	n x 2 pontos *
Úlceras > 1 mm	n x 3 pontos *
Úlceras perfuradas	n x 4 pontos *

* "n" refere-se ao número de lesões encontradas.

O Índice de Lesões Ulcerativas (I.L.U.) de cada animal foi obtido através da somatória de valores atribuídos de acordo com os parâmetros da tabela acima, preconizada por MORIMOTO e col. ⁷⁵. Posteriormente realizou-se a média destes índices e para cada grupo de tratamento o cálculo da **porcentagem de inibição** do aparecimento de lesões.

A análise estatística dos resultados, foi obtida através da análise de variância, aceitando-se 0,05 como nível mínimo de **significância**, expressando os resultados em Índice de Lesões Ulcerativas - I.L.U.

4.3.4. Determinação da Atividade Hemolítica *in vitro* (IH₅₀).

Hemácias foram obtidas de sangue de carneiro, recolhidas em solução de NaCl a 0,9%. Este material foi lavado por várias vezes através da adição de solução fisiológica (NaCl a 0,9%), com posterior centrifugação a 1000 rpm/ 3 minutos, seguida de retirada do líquido sobrenadante.

Após sucessivas lavagens com solução de NaCl-0,9% e retirada do sobrenadante, com o conteúdo de hemácias depositado no fundo do tubo de centrífuga, adicionou-se volume suficiente de solução fisiológica até a obtenção de uma suspensão a 2% (v/v). Sucessivas diluições da Fração Saponínica em solução de NaCl a 0,9%, forneceram amostras em concentrações diferentes e expressadas em mg/mL. Em tubos de centrífuga, adicionou-se exatamente 1 mL da amostra e o mesmo volume de suspensão de hemácias - 2%, sendo posteriormente mantidos à temperatura de 37°C. Decorridos 30 minutos à 37°C, os tubos contendo o material foram centrifugados a 1000 rpm, transferindo-se parte do sobrenadante para cubeta de quartzo e procedeu-se a leitura da absorbância a 545 nm.

A determinação do índice de hemólise^{86:98} foi calculado com base na média de tres determinações para cada concentração das amostras testadas, através da projeção no eixo x do ponto obtido na reta, correspondente a metade da diferença entre os valores de absorbância para a ausência de hemólise e a hemólise total das células presentes no tubo .

4.3.1.5. Determinação da Atividade Citotóxica *in vitro*

Os testes para atividade anticancer *in vitro* foram realizados junto ao Laboratório de Ensaios Farmacológicos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - C.P.Q.B.A. da UNICAMP sob coordenação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

Foram empregadas linhagens celulares cedidas pelo *National Cancer Institute* - N.C.I. (E.U.A.) e utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa. Estas células foram cultivadas em meio de cultura denominado (DMEN) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB) e mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido.

As linhagens celulares empregadas foram as seguintes:

Tabela 07

Linhagens celulares utilizadas no ensaio antiproliferativo.

Tipo celular	Linhagem	Tipo de cultura
Pulmão	NCI460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
	NCI ADR*	
Melanoma	UACC-62	Aderida

* Linhagem celular resistente a quimioterápicos de referência
(5-fluorouracil, camptotecina e doxorrubicina)

A amostra referente à Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. foi ressuspensa em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 g/mL. Aliquotas deste material foram retiradas e diluídas apropriadamente com o meio de cultura

DMEM/SFB, acrescidas de 50µg/mL de gentamicina, obtendo-se as seguintes concentrações de amostra: 20, 30, 60 e 125µg/mL.

Foram inoculados em Placa Teste com 96 compartimentos, exatamente 100µL/compartimento de cada linhagem celular cultivada no meio de cultura **DMEM/SFB/gentamicina**, seguido de incubação a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar. Decorridas 24 horas de incubação (**TEMPO ZERO - T0**), procedeu-se a leitura do grupo controle pela técnica do **Ensaio com Sulforodamina B (SRB)** e foram adicionados exatamente 100µL/compartimento de cada concentração da amostra junto às linhagens celulares cultivadas. A Placa Teste foi novamente incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar durante 48 horas.

Após o término do período de incubação, a Placa Teste foi centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e os conteúdos celulares foram fixados com 50µL/compartimento de solução de ácido tricloroacético a 50% e mantidas a 4° C durante 1 hora. Em seguida foram realizadas 4 lavagens consecutivas com água deionizada e secagem a temperatura ambiente.

O **Ensaio com Sulforodamina B (SRB)** ocorreu através da coloração do material proliferativo celular com a adição de 50 µL/compartimento de solução de sulforodamina B (SRB) a 0,4% (p/v) em solução de ácido acético a 1% e manutenção a 4°C durante 30 minutos. O excesso de corante foi removido com 4 lavagens consecutivas empregando-se solução de ácido acético a 1%, seguidas de escoamento e secagem à temperatura ambiente.

O material corado e de origem protéica, proveniente das células cultivadas, foi solubilizado com o emprego do produto **Trizma Base®** pH 10,5 na concentração de 10 µM/compartimento e exposição da Placa Teste por 5 minutos em banho com ultra-som.

Após o tratamento acima, foi determinada a densidade óptica através de leitura da absorbância em 560 nm, empregando-se equipamento automatizado para leitura da Placa Teste, conforme modelo de MONKS e col. ⁷⁴.

Os resultados foram obtidos pelas médias das leituras realizadas e comparação com o respectivo grupo controle (T0) de cada linhagem celular. Os valores foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento celular.

4.3.6. Determinação da Irritação Cutânea Primária em Coelhos.

Dez coelhos adultos, tiveram o dorso tricotomizado em uma área de aproximadamente 6,0 cm², sendo divididos em dois grupos, um com pele intacta e outro com a pele escovada até o surgimento de abrasão cutânea (Ab).

Cada animal recebeu topicamente no dorso, nos dois grupos testados, a amostra correspondendo a 0,5g de Fração Saponínica homogeneizada em cerca de 1,0 mL de polissorbato 80 como veículo líquido, aplicados na pele sobre a região preparada no dorso e cobertos com 2 camadas de gaze cirúrgica esterilizada e fixada por fita adesiva. Em cada grupo de animais testados, um animal de cada grupo teve aplicado topicamente somente o polissorbato 80 como controle.

Decorridas 24 horas a partir do término da aplicação da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., as gazes foram removidas, procedendo-se a análise da superfície cutânea do dorso, atribuindo-se valores às reações observadas, conforme delineado na tabela a seguir, sendo nova leitura realizada após 72 horas.

Tabela 08

Valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Irritação Primária (I.I.P.) em dorso de coelhos

Tipo de lesão	Valores
Formação de Eritema e Escaras	
Sem eritema	0 ponto
Eritema muito leve	1 ponto
Eritema bem definido	2 pontos
Eritema moderado a severo	3 pontos
Severo eritema a leve formação de escara	4 pontos
Formação de Edema	
Sem edema	0 ponto
Edema muito leve (pouco perceptível)	1 ponto
Edema leve (bordas e elevação definidas)	2 pontos
Edema moderado (elevação em torno de 1 mm)	3 pontos
Edema severo (elevação > 1 mm da área exposta)	4 pontos

Os resultados foram obtidos de acordo com o Índice de Irritação de cada animal, conforme o modelo de DRAIZE⁴⁵, através da somatória de valores atribuídos de acordo com os parâmetros da tabela acima. Posteriormente realizou-se a média destes índices para cada grupo de tratamento e o cálculo do Índice de Irritação Primário, segundo fórmula e critérios de avaliação abaixo:

$$\text{Índice de Irritação} = \{(\text{eritema-escara})_{24h} + (\text{eritema-escara})_{72h} + (\text{eritema-escara})_{Ab24h} + (\text{eritema-escara})_{Ab72h} + (\text{edema})_{24h} + (\text{edema})_{72h} + (\text{edema})_{Ab24h} + (\text{edema})_{Ab72h}\} : 8$$

Tabela 09

Valores atribuídos para o Índice de Irritação Primária (I.I.P.) em dorso de coelhos e a classificação do efeito irritante⁸⁷

Valores de Índice de Irritação Primário	Classificação do efeito irritante
0,00	Sem irritação
0,04 a 0,99	Irritação pouco perceptível
1,00 a 1,99	Irritação leve
2,00 a 2,99	Irritação branda
3,00 a 5,99	Irritação moderada
6,00 a 8,00	Irritação severa

5 - RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDO FARMACOBOTÂNICO

5.1.1. Descrição Morfológica do Vegetal - *Bredemeyera floribunda* Willd.

A planta possui porte subarborescente e suas partes aéreas podem atingir de 2 a 3 metros de altura. O caule apresenta-se subereto e seus ramos são cilíndricos, glabrescentes, e com frequência apoiando-se sobre suportes sem possuir gavinhas e sem enrolar-se sobre eles (Fig. 01 e 02).

Folhas são simples, alternas, inteiras, glabras, curtamente pecioladas ou subsésseis e desprovidas de estípulas. A lâmina foliar é muito variável na forma e no tamanho, predominando limbo elíptico, ápice acuminado, margem lisa e base levemente arredondada e assimétrica, e medindo de 3,5 a 10 cm de comprimento por 1,4 a 4 cm de largura e sua consistência varia de cartácea a coriácea. Destacam-se pela coloração vivaz que varia de verde escuro ao claro e pela nervação penada (Fig. 03).

O caule ramifica-se desde a base, apresenta coloração pardo acizentada e disposição simpodial (Fig. 01 e 05), mede quando bem desenvolvido de 5 a 10 cm de diâmetro próximo a base.

As inflorescências são abundantes e em forma de panículas terminais, com zona intermediária provida de brácteas. As flores variam de alvas até amareladas, são pediceladas, subsésseis ou sésseis, tribracteoladas. O cálice possui cinco sépalas que são caducas no fruto (Fig. 04 e 06).

Corola apresenta 5 pétalas livres, de forma variada: uma central, chamada *carena*, que cobre os órgãos reprodutores, unguiculada e cuculada, livre ou levemente presa na base à bainha estaminal, duas

laterais externas, rudimentares, e outras duas laterais internas, pouco menores ou do mesmo tamanho da carená (Fig. 06).

Estames são em número de 8, hipóginos e apresentam filetes unidos acima da parte mediana em uma bainha fendida no ápice. A bainha estaminal é externamente pubescente no ápice.

O ovário é súpero, bicarpelar, com inserção erecta, glabro ou pouco pubescente em sua porção inferior com dois óvulos do tipo anátropo.

O fruto é uma cápsula bivalvar, loculicida, espatulada, coreácea, levemente enrugada e de coloração castanho (Fig.05 e 06).

As sementes são oblongas, velutinas, de coloração castanha claro e exibem longos tufo de pelos branco-amarelados (Fig.06).

A raiz principal é pivotante e se aprofunda quase que verticalmente, podendo atingir profundidade em torno de 2 a 3 metros dependendo do tipo de solo, sendo mais profunda em solos arenosos, que é característico na região de onde o material em estudo foi coletado.

As raízes laterais, em grande número, são longas e distribuem-se praticamente ao redor de todo o eixo principal do arbusto, atingem profundidade de até 1,5 metros, espalhando-se quase que horizontalmente. Possuem coloração marrom claro, são pouco espessas, variando o seu diâmetro de 0,5 a 2 centímetros e apresentam odor característico e sabor fortemente amargo (Fig.07).



Fig.01- *Bredemeyera floribunda* Willd.: exemplar encontrado a beira da estrada no município de Leme-SP.



Fig.02- *Bredemeyera floribunda* Willd.: exemplar mostrando o aspecto decumbente do vegetal.



Fig.03- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Ramo foliar destacando a coloração verde intenso da lâmina foliar em contraste com a cor amarelada das nervuras.



Fig.04- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Ramo florido.



Fig.05- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Ramo com frutos, destacando a forma espatular das cápsulas.

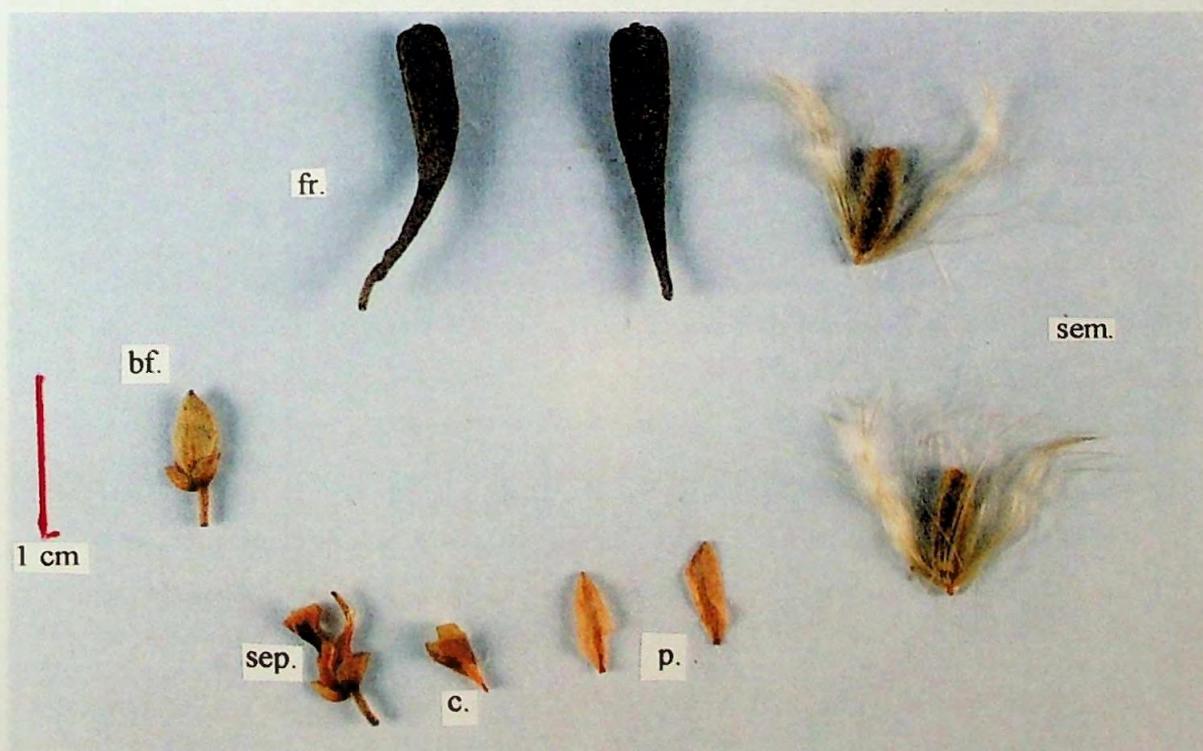


Fig.06- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Partes de órgãos: 1-Frutos (fr.); 2-Botão floral (b.f.); 3-Partes da flor: pétalas (p.); carena (c.); sépalas (sep.); 4-Sementes (sem.).



Fig.07- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Fragmentos de raiz.

5.1.2. Descrição Macroscópica da Droga Comercializada como botica inteira - *Bredemeyera floribunda* Willdenow

A droga denominada botica inteira, obtida a partir das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willdenow, apresenta-se constituída por fragmentos de dois tipos a saber:

1- Fragmentos em forma cilíndrica. Estes fragmentos medem geralmente de 5-10 cm de comprimento por 1 a 3,5 cm de diâmetro (Fig.07 e 08). Esta forma é constituída em sua maioria por fragmentos de raízes laterais (Fig. 07).

A parte externa das raízes apresenta coloração castanho-amarelada. Estrias bem evidentes, dispostas no sentido longitudinal, podem ser observadas ao lado de cicatrizes arredondadas em forma de crateras ou de protuberâncias. Estrias dispostas no sentido transversal são observadas principalmente em regiões onde as raízes apresentam-se sinuosas (Fig.08 e 09).

As cicatrizes crateriformes ou as em forma de protuberância estão quase sempre relacionadas à queda de raízes secundárias (Fig. 09 e 10).

Em secção transversal, as raízes mostram região externa de coloração marrom-amarelada, que pode chegar a atingir até a metade do seu diâmetro. O restante é constituído pelo cilindro central, de coloração amarelo claro com a parte lenhosa muito dura e de fratura fibrosa (Fig. 08). A droga apresenta sabor fortemente amargo e odor característico.

2- Fragmentos em forma de lascas retangulares. Estes fragmentos medem geralmente 5 cm de comprimento por 3 cm de largura e cerca de 1 cm de espessura.

A casca dos fragmentos algumas vezes se destaca da região do lenho que em sua região mais externa adquire coloração amarelo-claro (Fig.08 e 09). Nestes tipos de fragmentos predominam o lenho, sendo este muito duro e de fratura nitidamente fibrosa (Fig.08).

A região da casca apresenta-se bastante fina e envolvida frequentemente por súber que exhibe aspecto esfoliativo. Externamente apresenta as características morfológicas e de coloração citadas anteriormente (Fig.10).

Fragmentos de raízes jovens, de aproximadamente 1 cm de diâmetro quando observados em secção transversal exibem externamente um anel muito fino de coloração um pouco mais escura que o resto da estrutura, representado pela periderme (Fig. 10). A região cortical é bem evidente de coloração brancacenta e corresponde a cerca de dois terços da estrutura total. A região do cilindro central, cuja secção transversal é em forma de circunferência exhibe cor castanho amarelado, contrastando nitidamente com a região cortical (Fig. 10).



Fig.08- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Fragmento de raiz.



Fig.09- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Destaque de fragmento da droga, mostrando estrias transversais e longitudinais e saliências como crateras e protuberâncias na superfície.



Fig.10- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Fragmentos de raiz: 1- mostrando as cicatrizes e estrias de raiz secundária ; 2- o aspecto esfoliativo da casca; 3- aspectos do cilindro central em secção transversal.

5.1.3. Descrição Microscópica da Droga Comercializada como botica inteira - *Bredemeyera floribunda* Willdenow.

A periderme apresenta súber (Fig.11-A e B, s.) pouco desenvolvido, formado geralmente por cinco a nove camadas de células tabulares achatadas, de paredes delgadas e levemente coloridas de pardo.

O parênquima cortical (Fig.11-A, p.c.), muito desenvolvido, é constituído por um tecido de células repletas de grãos de amido. Os grãos de amido são simples, e com menor frequência, compostos, apresentando diâmetro de até 30 micra. Os grãos de amido são esféricos ou cupuliformes e apresentam hilo central e puntiforme bem característico (Fig.12, am.).

O parênquima cortical engloba em sua parte externa grupo de braquiescleritos providos de paredes lignificadas e possuidores de lúmen de diâmetro variado onde são bem visíveis as pontuações localizadas nas paredes das células. Nesta região rica em células pétreas é comum a presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de prismas (Fig.,13 e 14-A, cr., c.p.).

A zona lenhosa bem desenvolvida mostra vasos isolados distintos e esparsos, fibras xilemáticas e células do parênquima axial e horizontal (Fig. 14-B e 15-A).

Os vasos na maioria das vezes são do tipo pontuados e as fibras apresentam lúmen estreito (Fig.15-A). Os raios vasculares (Fig.15-B, r.v.) apresentam de 1 a 4 células de largura por muitas em altura. Apresentam forma fusiforme e as células externas com frequência são mais alongadas (Fig.15-B, r.v.).

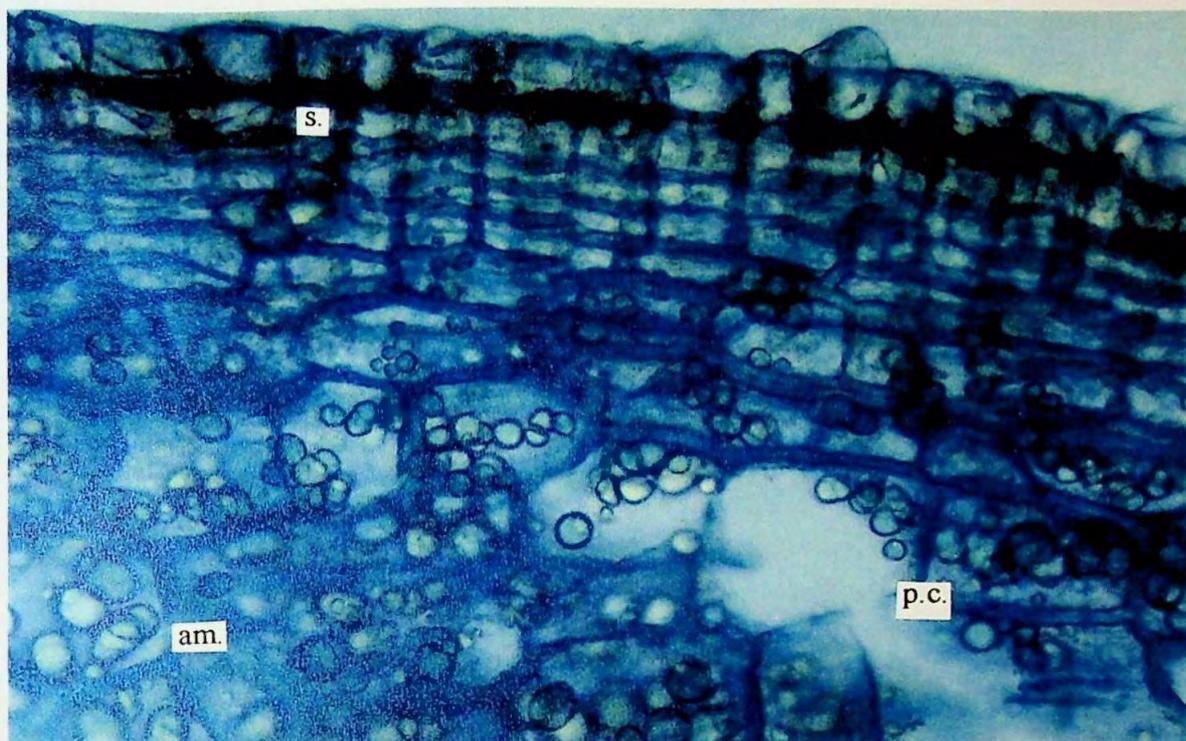


Figura 11-A

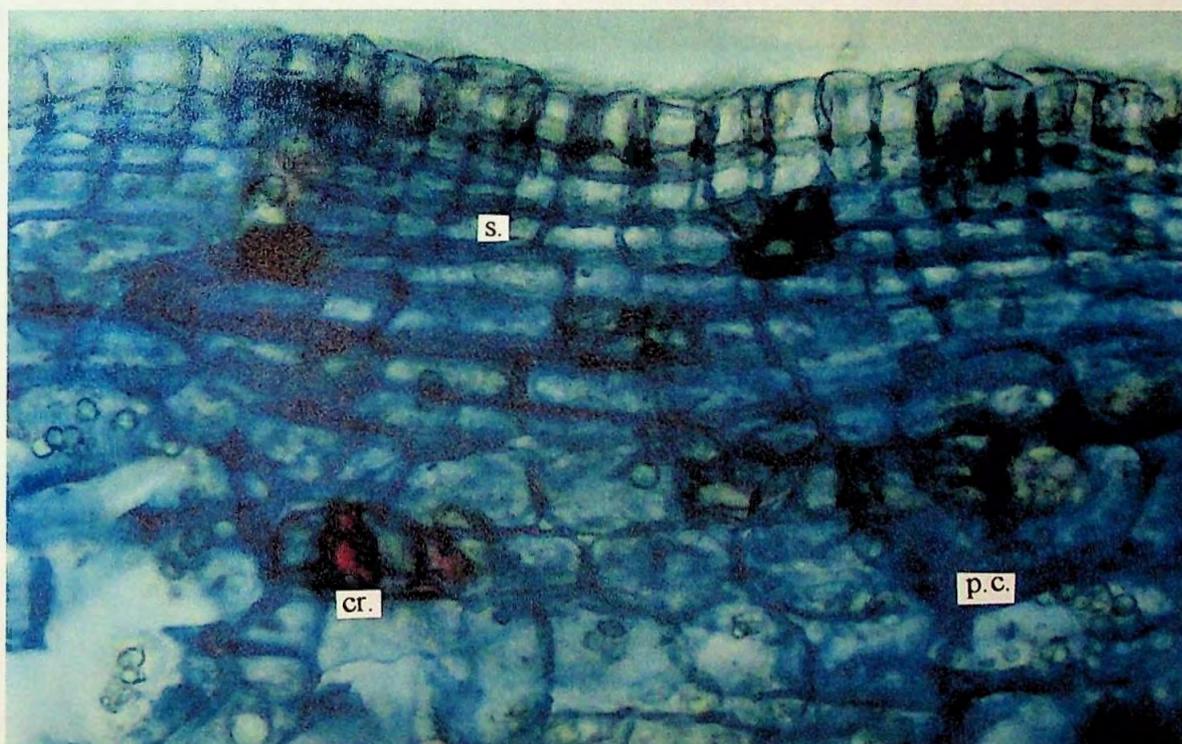


Figura 11-B

Fig.11- *Bredemeyera floribunda* Willd.: A e B: Secção transversal de raiz: s.- súber; p.c.- parênquima cortical; am.- amido; cr.- cristal prismático.

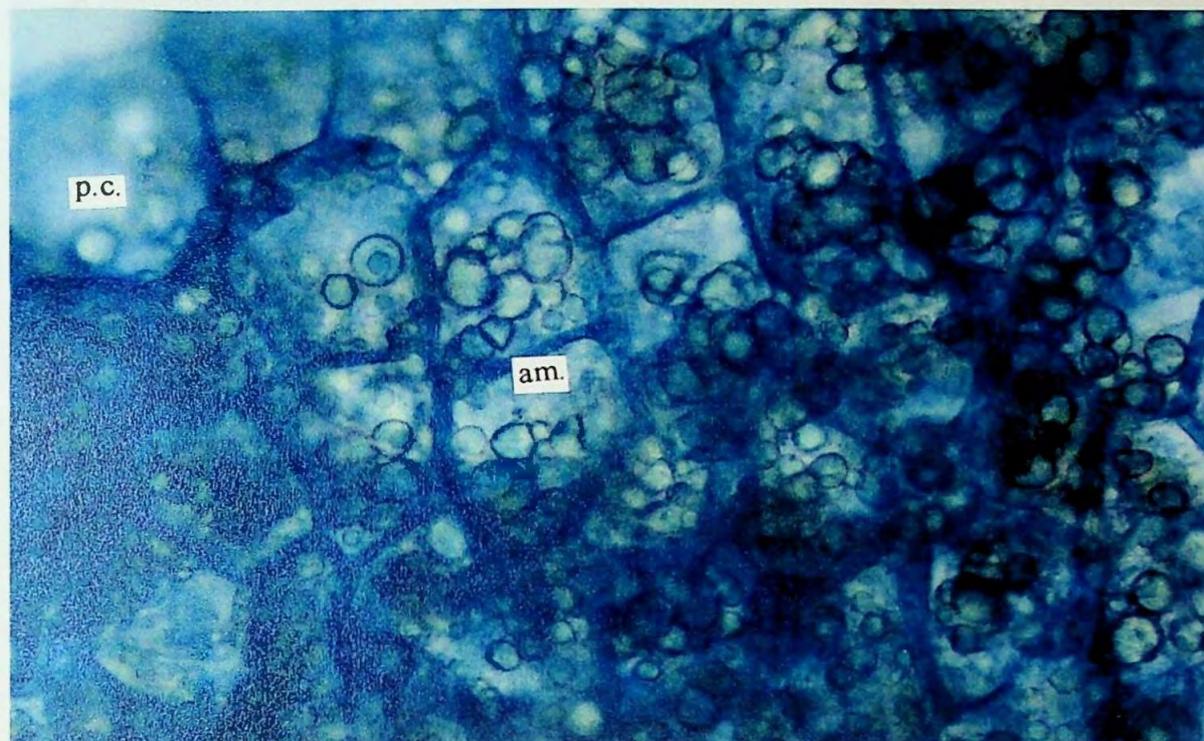


Fig.12- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Secção transversal de raiz:
p.c.- parênquima cortical; am.- amido.



Fig.13- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Secção longitudinal radial:
c.p.- grupo de células pétreas.

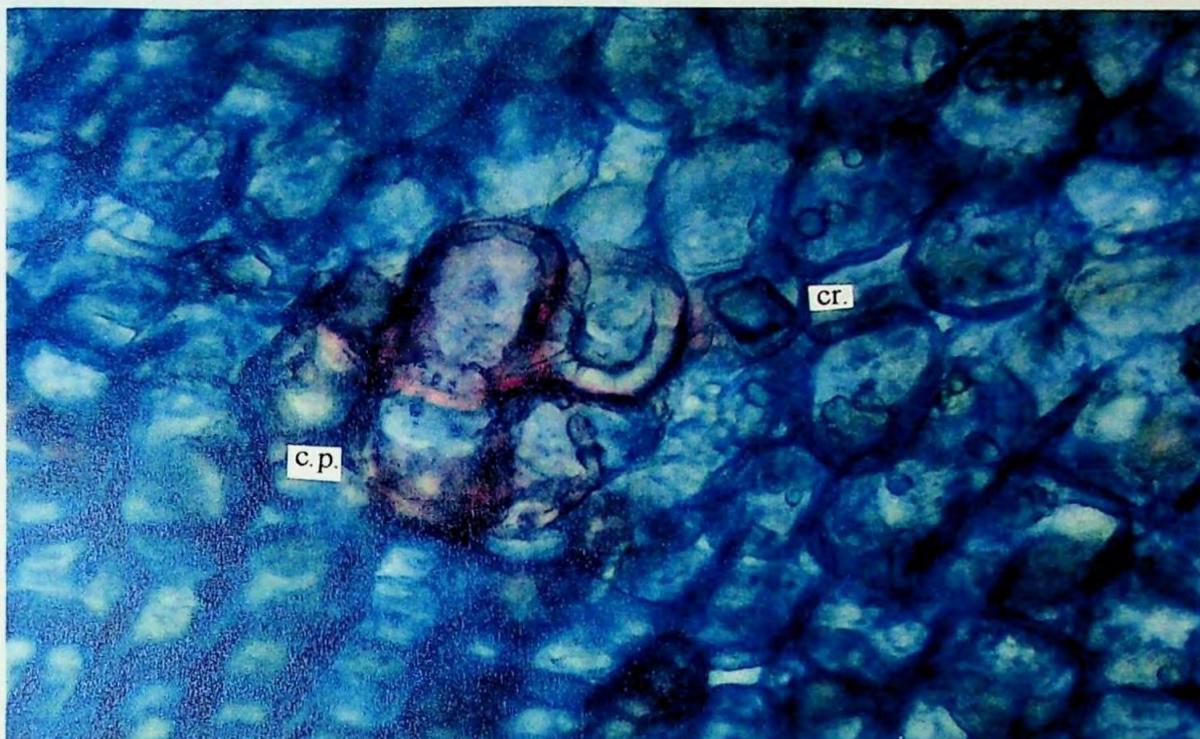


Figura 14-A

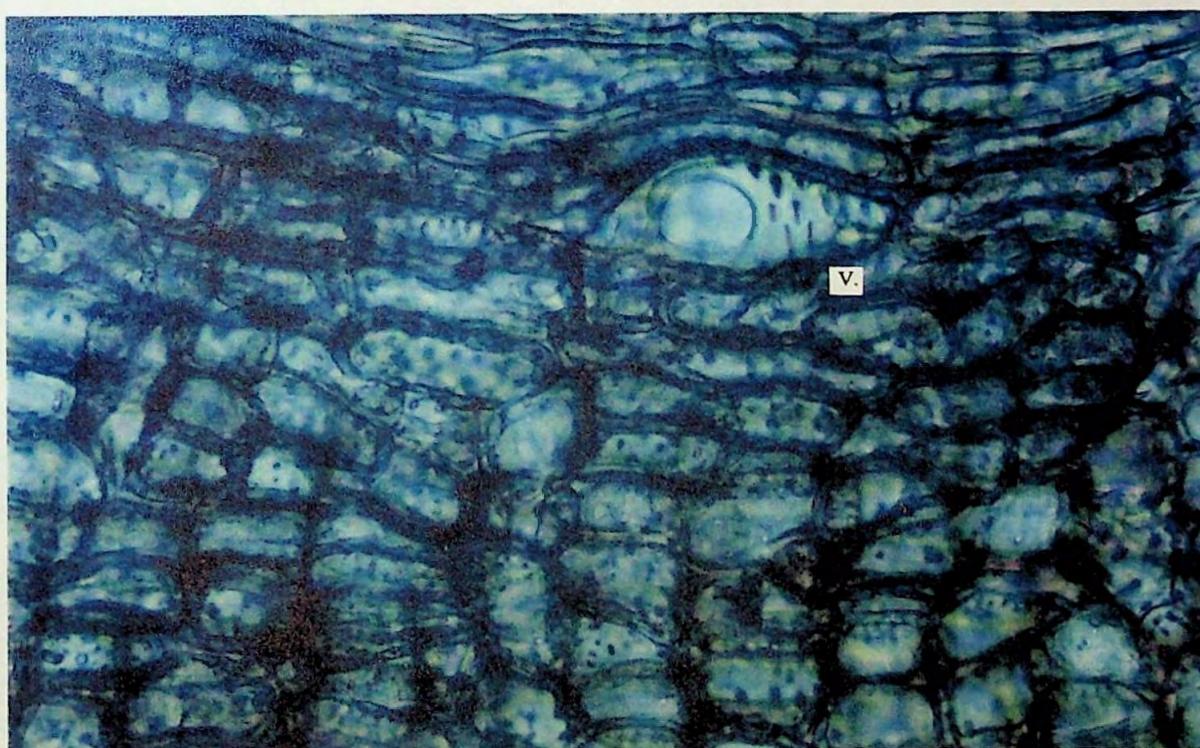


Figura 14-B

Fig.14- *Bredemeyera floribunda* Willd.: A - Secção longitudinal radial passando pelo parênquima cortical: cr.- cristal prismático; c.p.- células pétreas(braquiescleritos); B- secção longitudinal radial do lenho: v.- vaso.

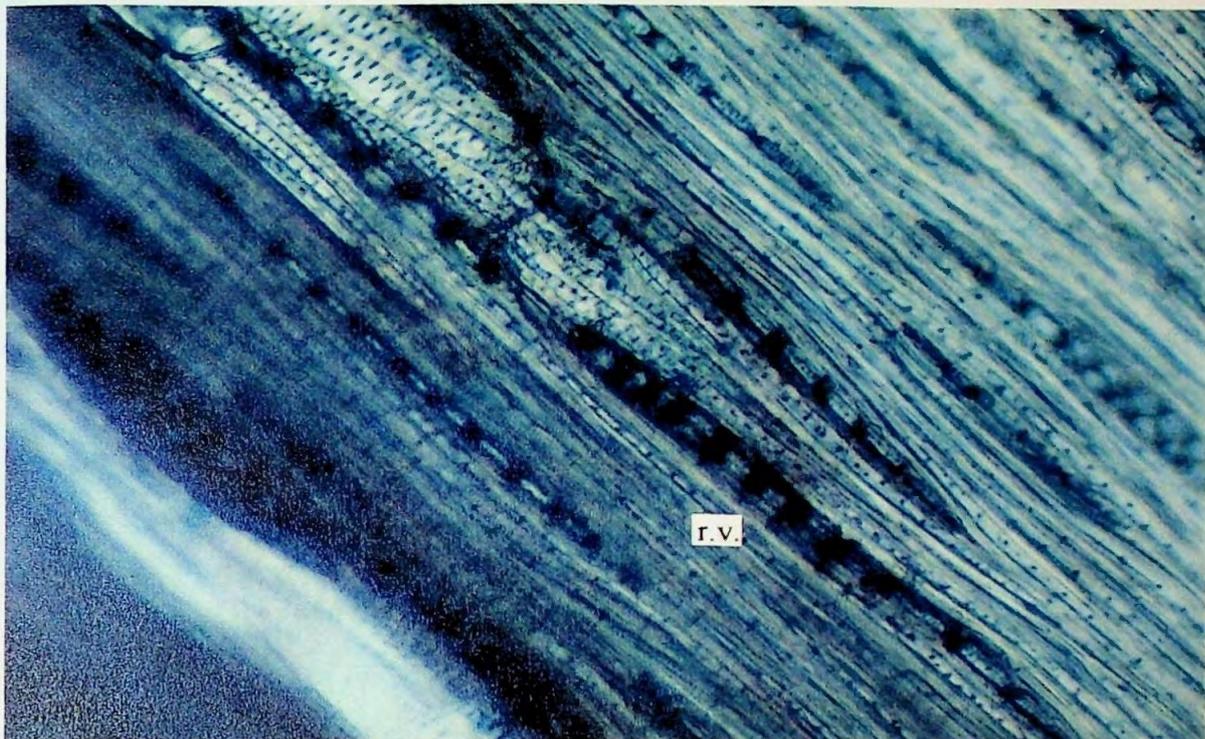


Figura 15-A

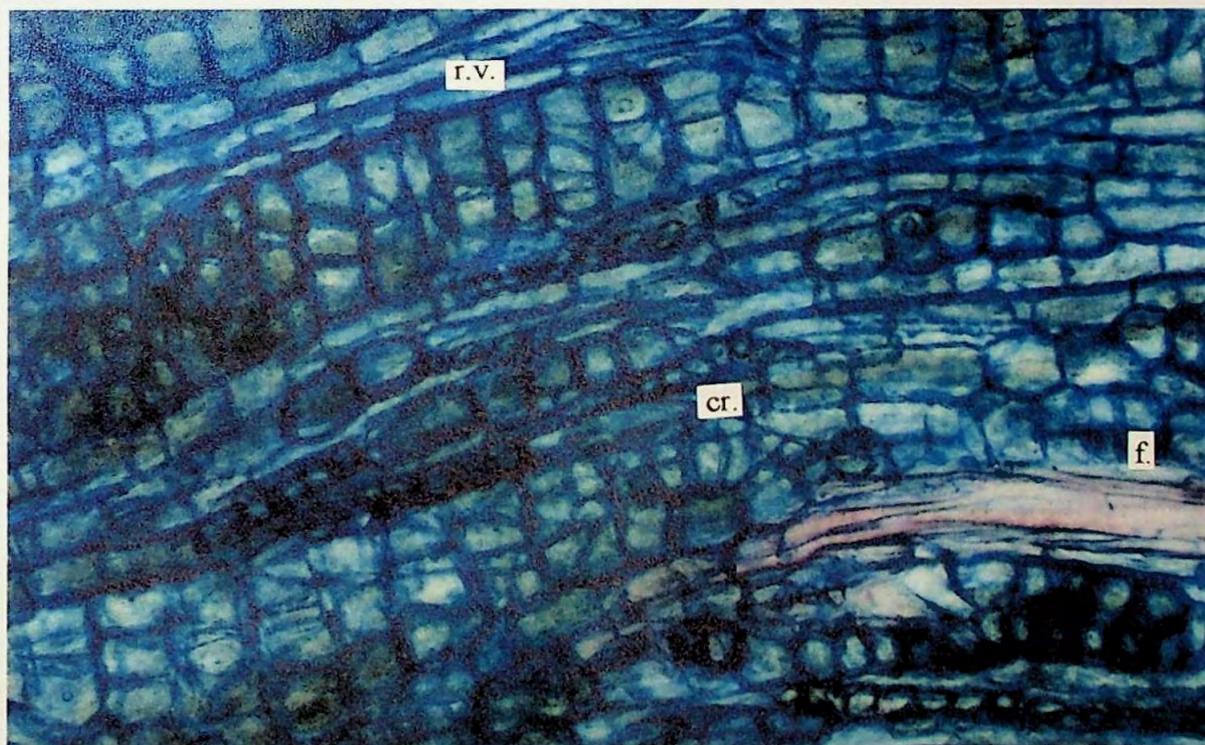


Figura 15-B

Fig.15- *Bredemeyera floribunda* Willd.: Secção longitudinal: A- aspecto pontuado dos vasos. B - f.- fibra; r.v.- raio vascular; cr.- cristais prismáticos.

5.2. ESTUDO QUÍMICO

5.2.1. Reações genéricas de caracterização – triagem fitoquímica

Os ensaios preliminares visando a triagem fitoquímica, revelaram a presença dos seguintes grupos de substâncias: triterpenóides, flavonóides e saponinas.

5.2.2. Isolamento de Substâncias

5.2.2.1. Isolamento de Substâncias a partir do Resíduo Clorofórmico.

O resíduo clorofórmico (RClo) após fracionamento cromatográfico empregando o Sistema RClo forneceu 230 frações, ordenadas conforme abaixo:

Volume (mL)	Fase Móvel	Frações
360	hexano	1 – 12
90	Hexano/acetato de etila – 95:5	13 – 16
120	Hexano/acetato de etila – 90:10	17 – 19
270	Hexano/acetato de etila – 85:15	30 – 39
720	Hexano/acetato de etila – 80:20	40 – 64
240	Hexano/acetato de etila – 75:25	65 – 73
210	Hexano/acetato de etila – 70:30	74 – 81
240	Hexano/acetato de etila – 65:35	82 – 88
120	Hexano/acetato de etila – 60:40	89 – 92
150	Hexano/acetato de etila – 55:45	93 – 98
30	Hexano/acetato de etila – 50:50	99 – 100
60	Hexano/acetato de etila – 45:55	101 – 106
150	Hexano/acetato de etila – 40:60	107 – 112
180	Hexano/acetato de etila – 35:65	113 – 119
150	Hexano/acetato de etila – 30:70	120 – 125
660	Clorofórmio/Metanol - 95:5	126 – 148
180	Clorofórmio/Metanol - 90:10	149 – 155
150	Clorofórmio/Metanol - 85:15	156 – 161
90	Clorofórmio/Metanol - 80:20	172 – 175
390	Clorofórmio/Metanol - 75:25	176 – 189
120	Clorofórmio/Metanol - 50:50	190 – 194
1050	Metanol	195 - 230

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (Sistema Clo2) e agrupadas convenientemente, conforme segue:

Frações	Descrição
6 - 16	Sólidos amareloesbranquiçados amorfos
23 - 39	cristais amarelados amorfos
42 - 50	Cristais amarelos em agulhas
61 - 66	Cristais amarelados amorfos
85 - 115	Sólidos alaranjados amorfos

5.2.2.1.1. Purificação e análise das frações.

Os resíduos obtidos nas frações foram lavados sucessivas vezes, empregando-se clorofórmio e metanol, fornecendo as seguintes amostras:

- Fração 6 - 16
- Fração 23 - 29
- Fração 42 - 50

A fração 6-16 foi denominada de substância 1 e as frações 23-29 e 42-50 mostraram-se impuras. Os resíduos correspondentes à tais frações foram reunidos e submetidos à técnica de cromatografia preparativa através do sistema cromatográfico Clo3 para purificação. Após o isolamento chegou-se a um resíduo amarelado, denominado de substância 2.

As substâncias obtidas foram transferidas para o interior de dessecador e realizadas análises espectrais.

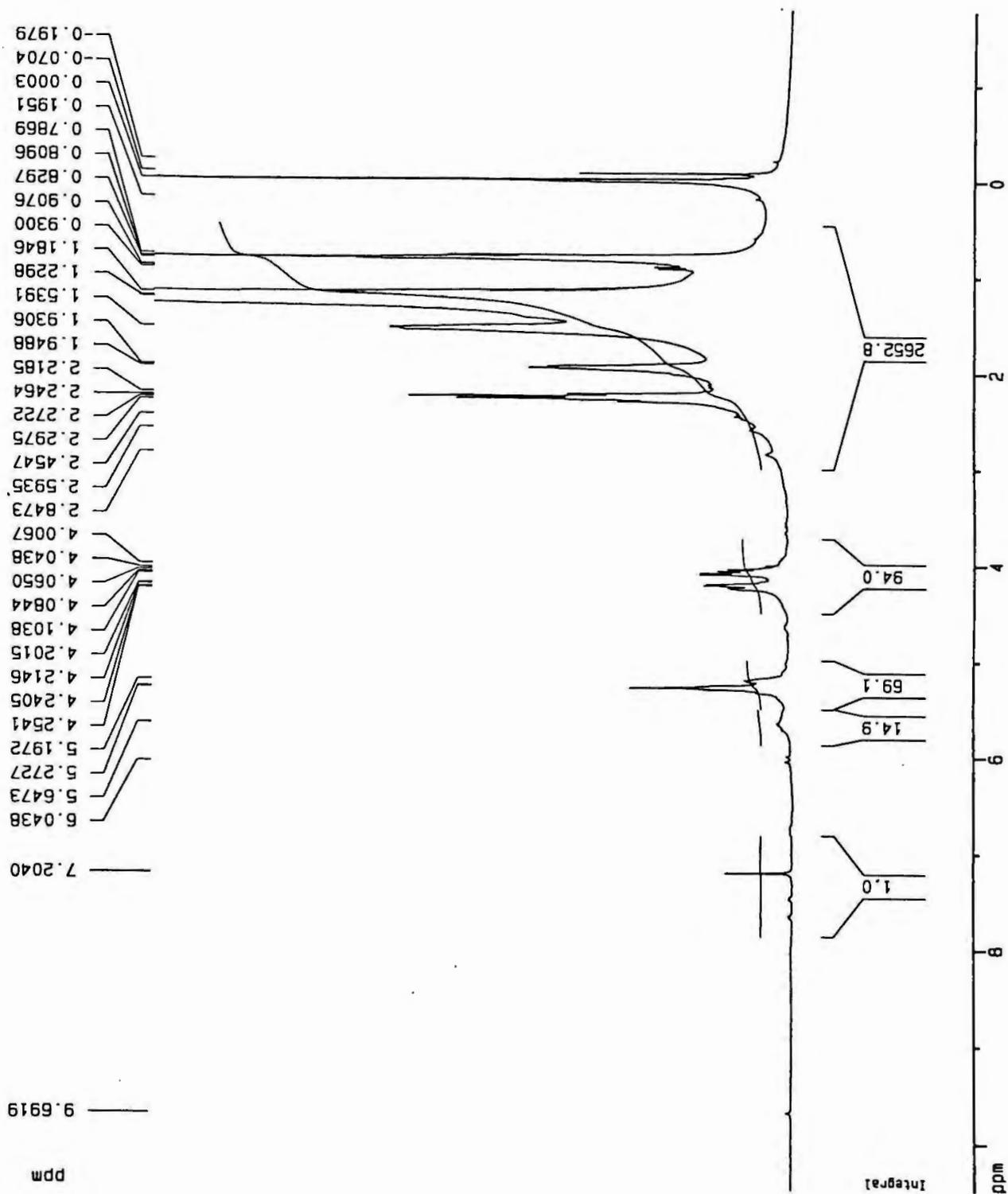


Figura 16

Spectro de R.M.N. de ¹H a 300 MHz - (CDCl₃) da substância 1
Bredemeyera floribunda Willd. Extrato clorofórmico.

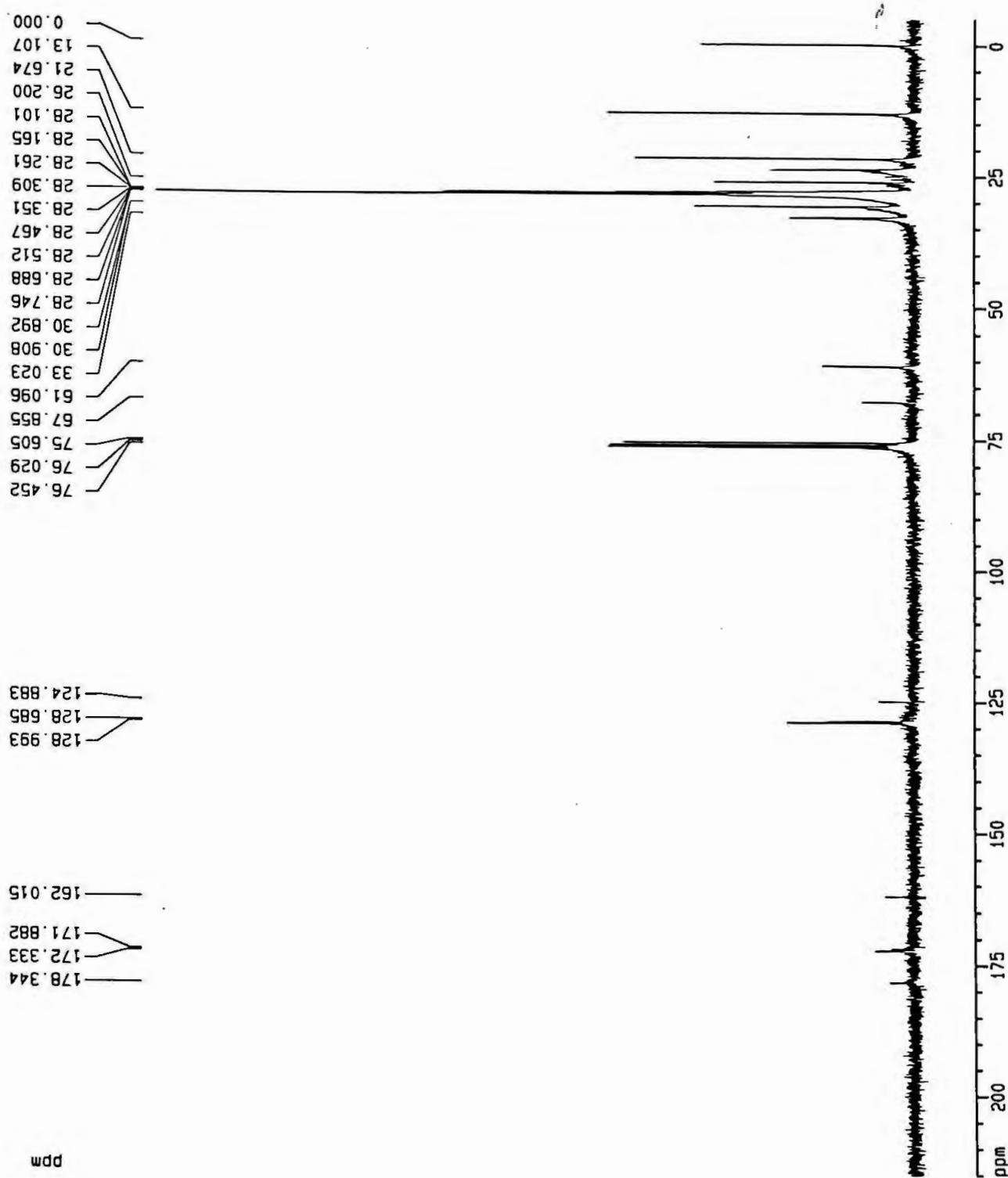


Figura 17

Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 1
Bredemeyera floribunda Willd. Extrato clorofórmico.

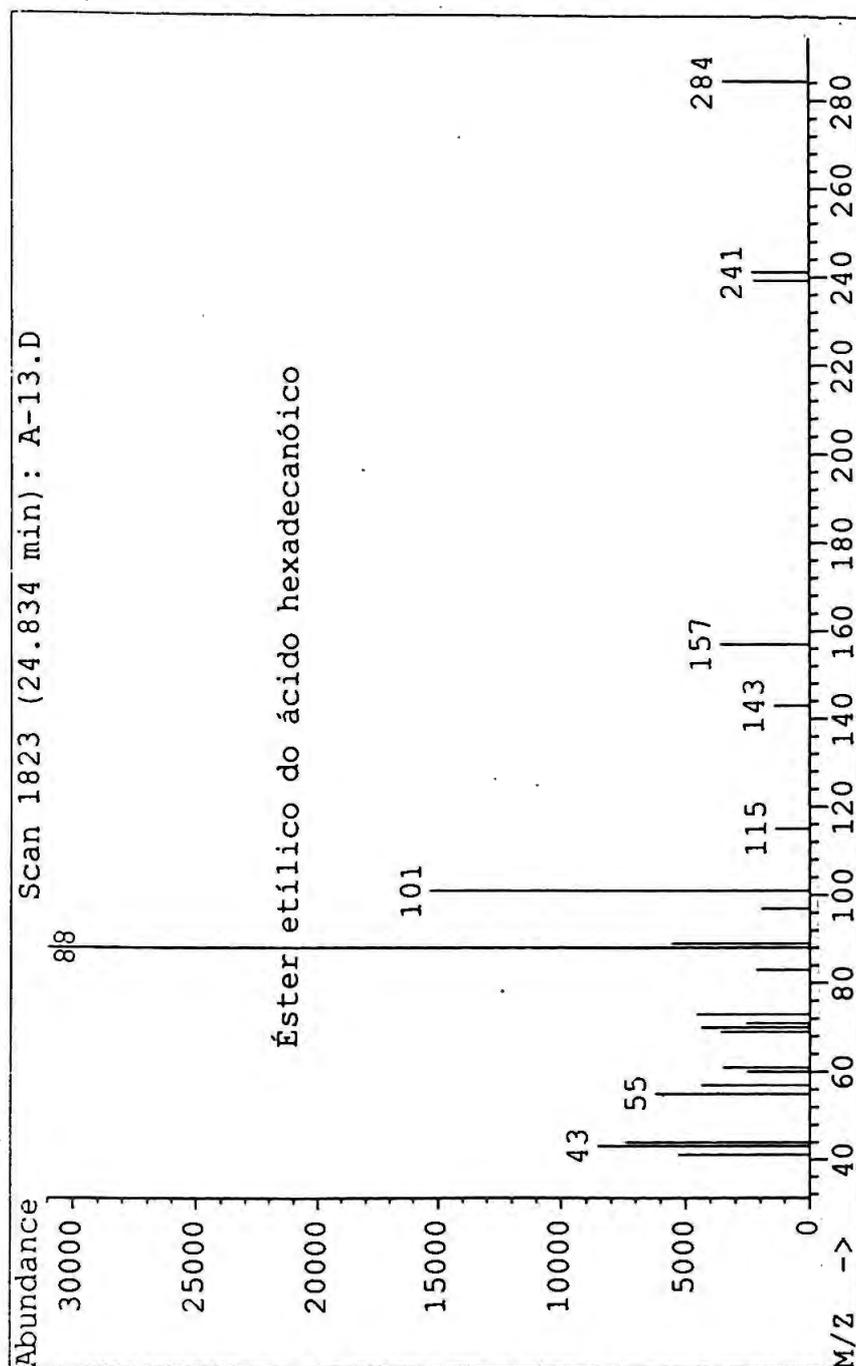


Figura 18

Espectro de massas da substância 1 de *Bredemeyera floribunda* Willd.
Extrato clorofórmico.

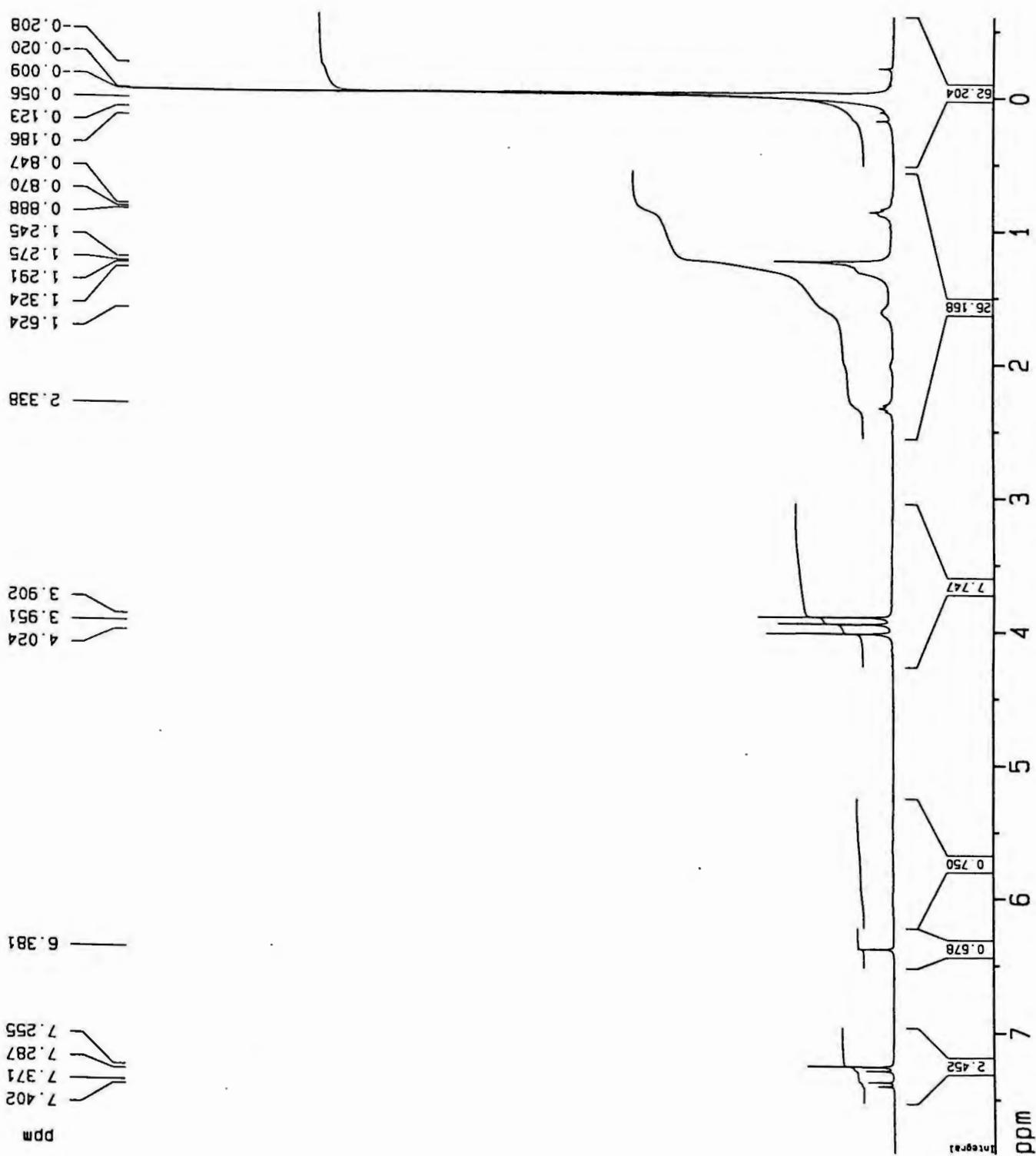


Figura 19

Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2
Bredemeyera floribunda Willd. Extrato clorofórmico.

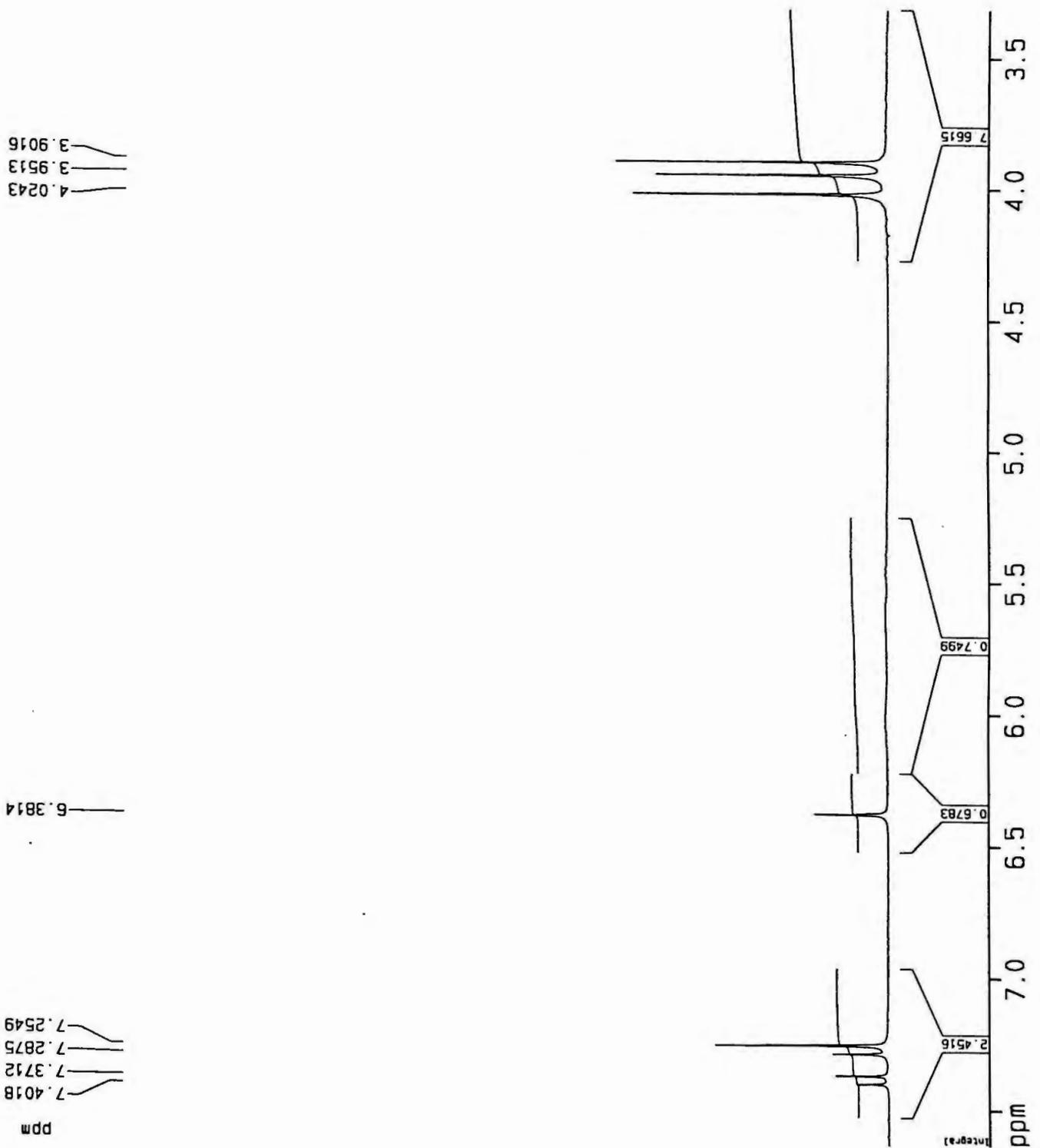


Figura 20

Espectro de R.M.N. ^1H a 300 MHz a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2 (expandido). *Bredemeyera floribunda* Willd. Extrato clorofórmico.

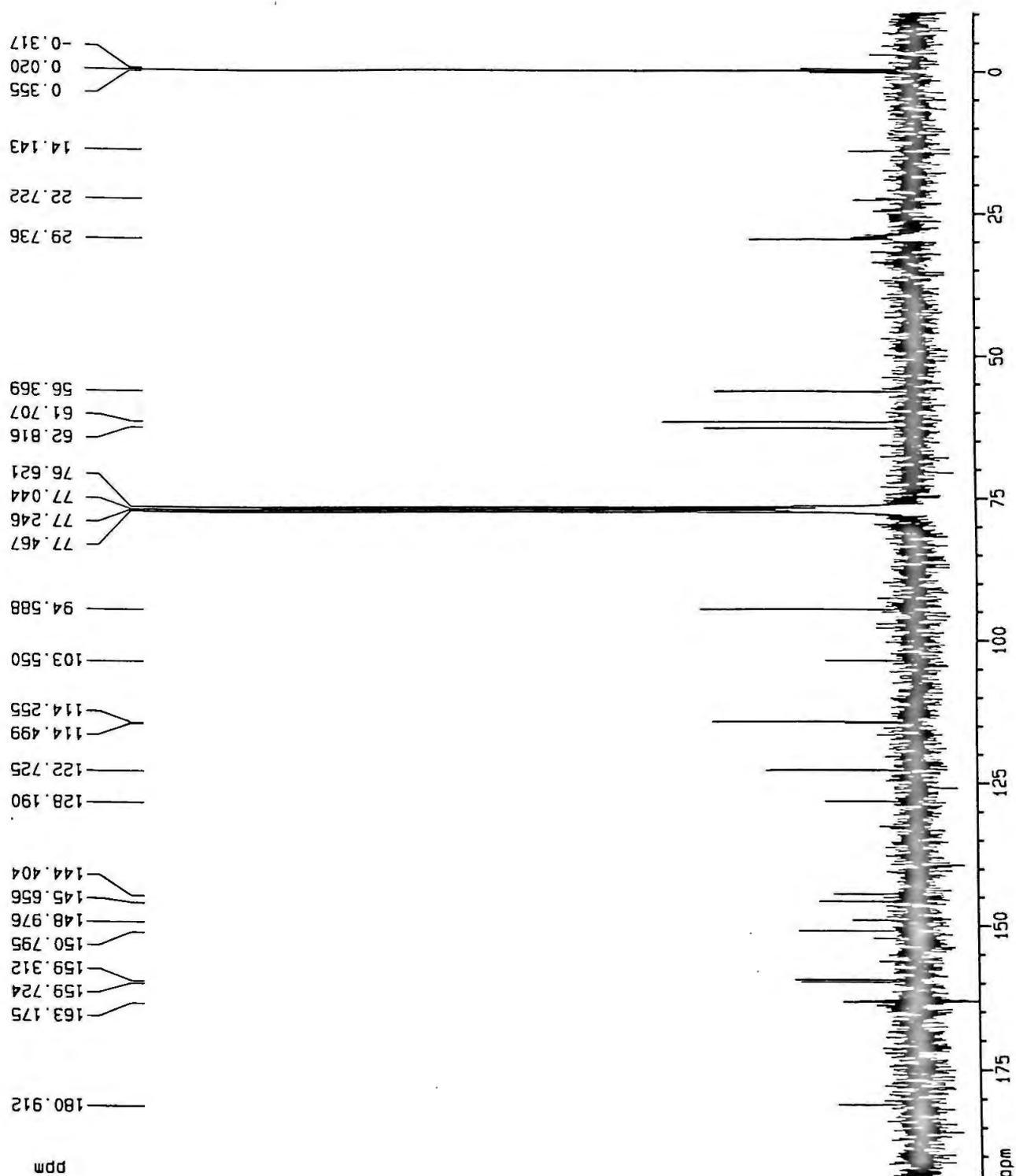


Figura 21

Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (CDCl_3) da substância 2
Bredemeyera floribunda Willd. Extrato clorofórmico.

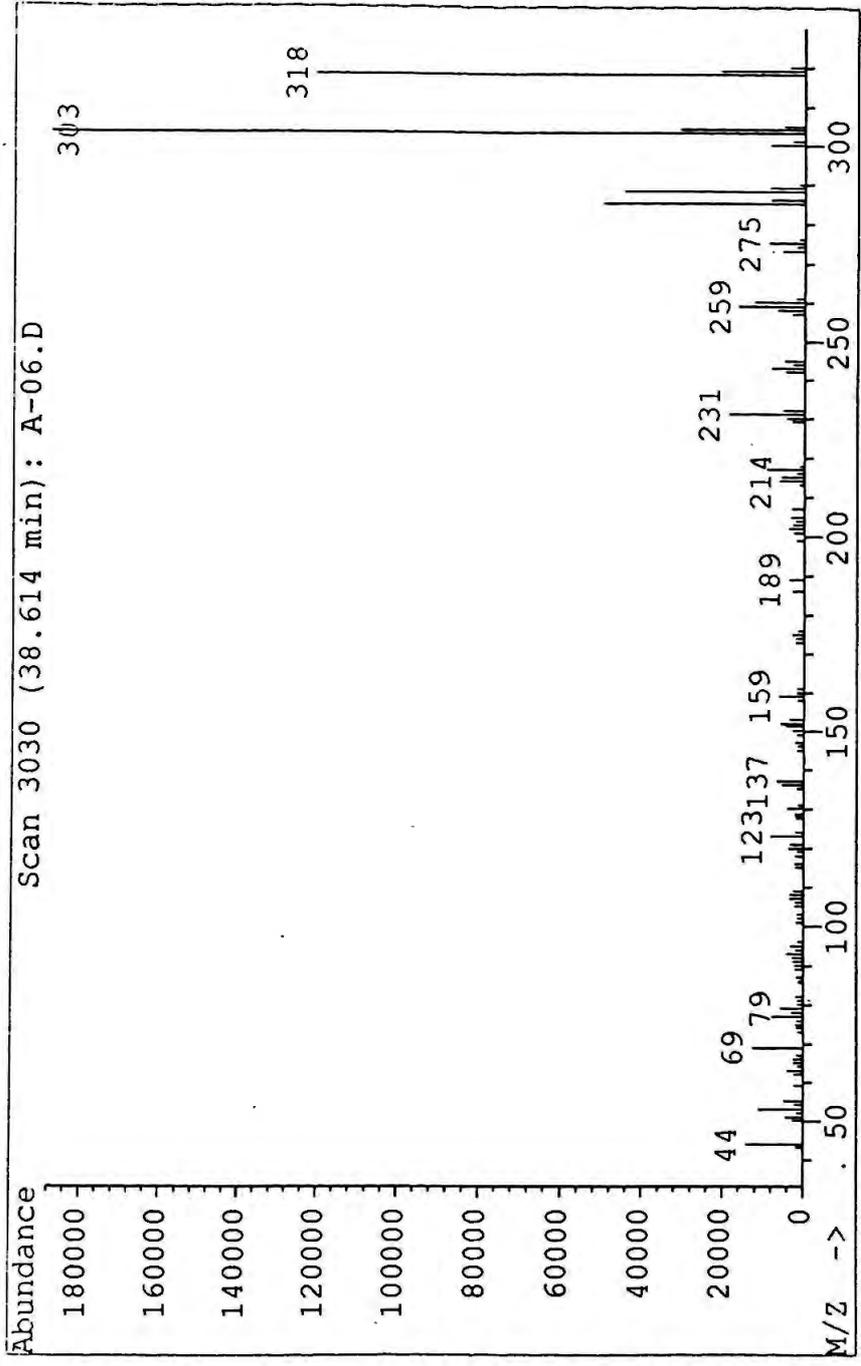


Figura 22
Espectro de massas da substância 2 de *Bredemeyera floribunda* Willd.
Extrato clorofórmico.

5.2.2.2. Isolamento de Substâncias a partir do Extrato Metanólico.

O Extrato metanólico após fracionamento cromatográfico empregando o Sistema Me1 forneceu 59 frações, ordenadas conforme abaixo:

Volume (ml)	Fase Móvel	Frações
150	clorofórmio/metanol - (95:5)	1-3
300	clorofórmio/metanol - (90:10)	4-9
100	clorofórmio/metanol - (85:15)	10-12
200	clorofórmio/metanol - (80:20)	13-16
250	clorofórmio/metanol - (75:25)	17-21
300	clorofórmio/metanol - (65:35)	22-27
200	clorofórmio/metanol - (50:50)	28-31
200	clorofórmio/metanol/água - (30:10:1)	32-35
800	clorofórmio/metanol/água - (30:10:5)	36-52
100	clorofórmio/metanol/água - (20:30:5)	53-54
250	clorofórmio/metanol/água - (30:40:10)	55-59

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (Sistema Me₂) e agrupadas conforme segue:

Frações	Descrição
1-5	material denso alaranjado
6-10	resíduo-amarelo claro
17-20	sólidos amarelados
21-26	sólidos amarelados
27-28	poucos cristais amarelados
29	pouca quantidade de cristais
30-39	resíduo castanho
40-47	resíduos castanho-amarelados
47-50	pouco material
51-55	pouco material
56-59	pouco material

5.2.2.2.1. Purificação e análise da fração 21 - 26.

Os resíduos obtidos desta fração foram lavados sucessivas vezes com clorofórmio e em seguida recristalizados com metanol, obtendo-se substância de coloração fortemente amarelada e denominada de substância Me_1 .

A substância Me_1 apresentou faixa de fusão em torno de 194-197°C. Foi submetida à análise cromatográfica em camada delgada (Sistema Me_2 e Sistema Me_3). Comparando-se com padrão conhecido de rutina, verificou-se o mesmo perfil cromatográfico com valores de Rf em torno de 0,4 para os Sistemas Me_2 e Me_3 .

A substância Me_1 foi transferida para o interior de dessecador e realizadas análises espectrais.

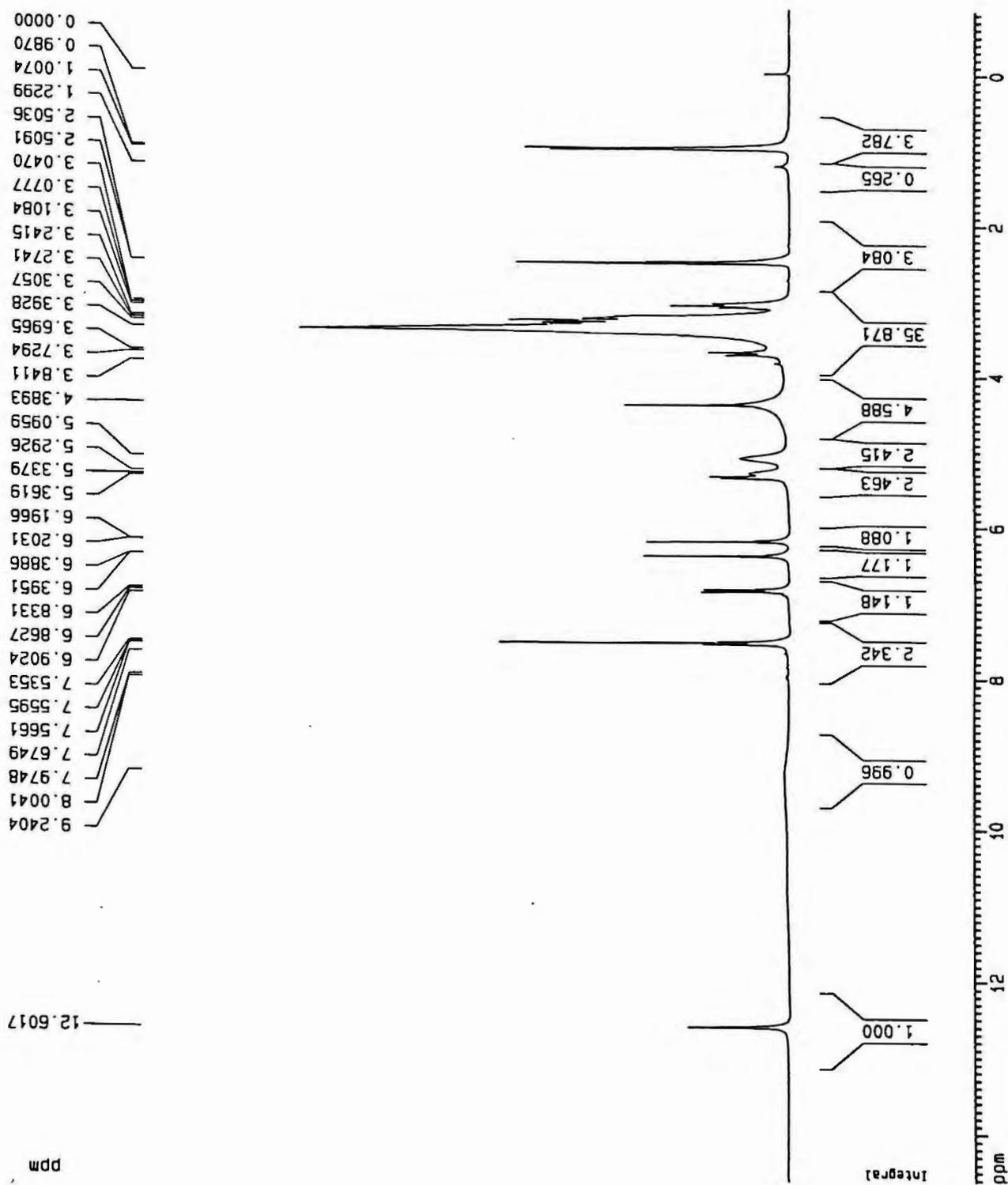


Figura 23

Espectro de R.M.N. de ^1H a 300 MHz - (DMSO- d_6) da substância Me_1 *Bredemeyera floribunda* Willd. Extrato metanólico.

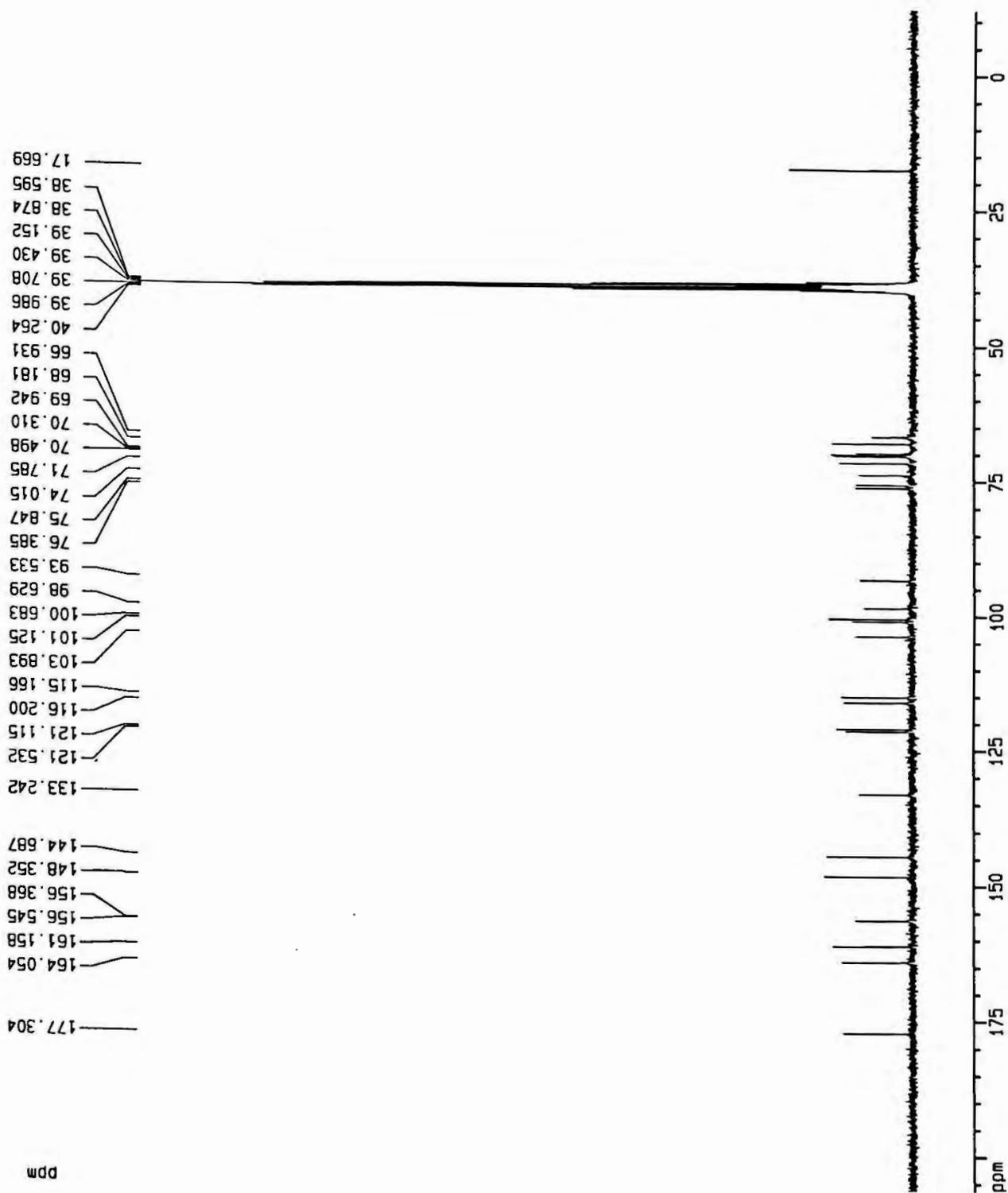


Figura 24

Espectro de R.M.N. de ^{13}C a 300 MHz - (DMSO- d_6) da substância Me_1
Bredemeyera floribunda Willd. Extrato metanólico.

5.2.3. Caracterização Físico-Química da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd.

5.2.3.1. Determinação do Poder Tensoativo e da Concentração Micelar Crítica - C.M.C. da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Os Gráficos 1 e 2 mostram as curvas obtidas nas determinações do Poder Tensoativo pela leitura em Tensiômetro digital de variadas concentrações de soluções aquosas a partir da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd. e do Lauril Sulfato de Sódio. As Concentrações Micelares Críticas foram obtidas através do ponto de intersecção entre as melhores retas calculadas por regressão polinomial (R^2).

Gráfico 1

Determinação da atividade tensoativa de *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd. em água a 20°C

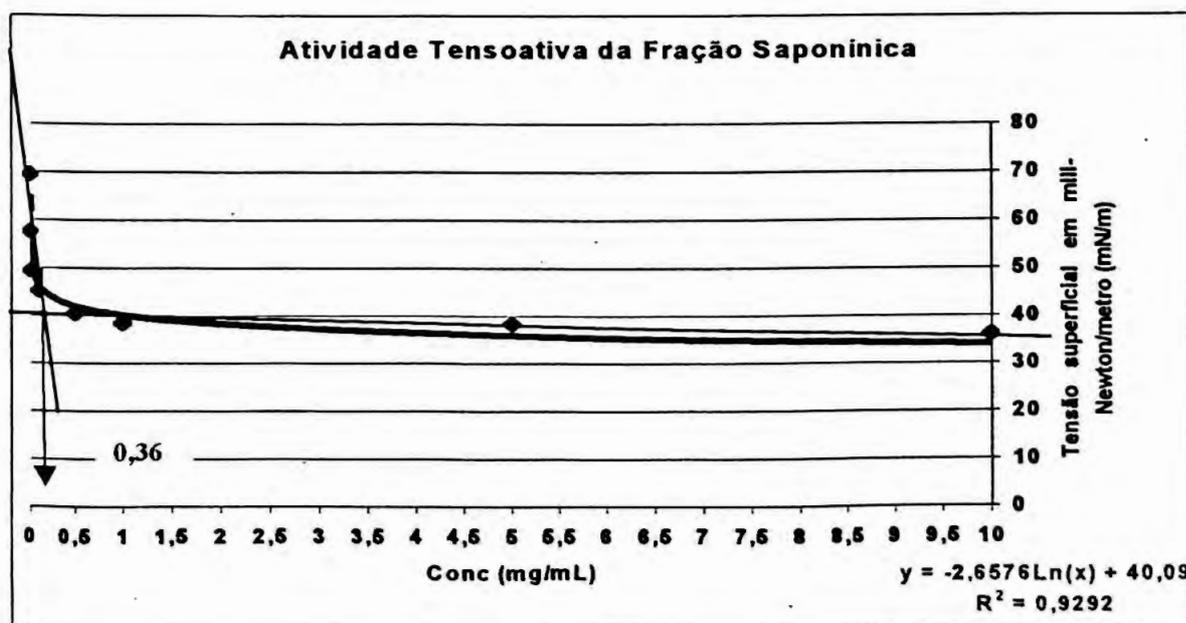
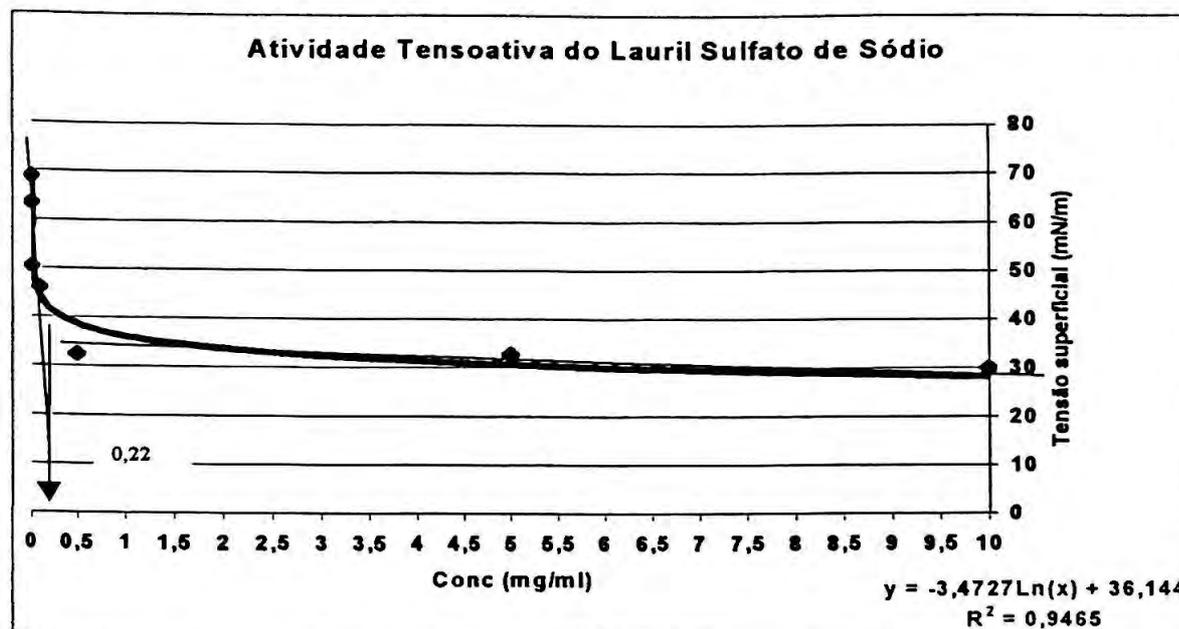


Gráfico 2

Determinação da atividade tensoativa do *Lauril Sulfato de Sódio - L.S.S.* em água a 20°C.



5.2.3.2. Determinação do Poder Espumante da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., conforme ABNT / NBR 13064³

Os valores obtidos na Determinação do Poder Espumante da *Fração Saponínica de Bredemeyera floribunda* Willd. estão compilados na Tabela abaixo:

Tabela 10

Poder Espumante da *Fração Saponínica de Bredemeyera floribunda* Willd., conforme ABNT / NBR 13064³

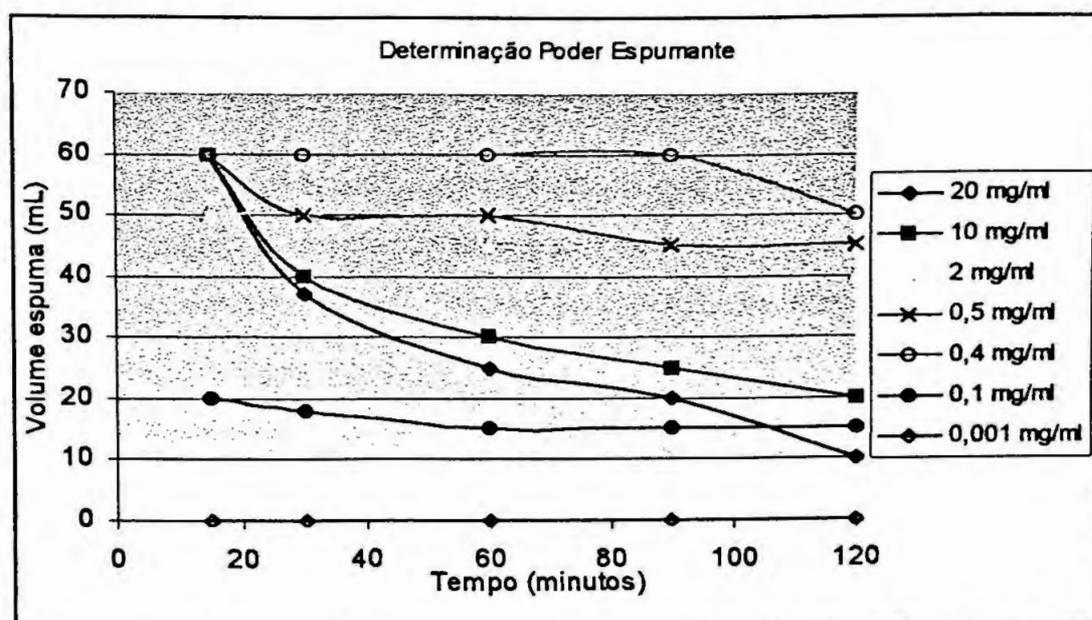
Tempo (min.)	% Poder Espumante
15	120
30	80
120	40

O Gráfico 03 mostra as variações na capacidade de formação de espuma da *Fração Saponínica de Bredemeyera floribunda*

Willd. em função da concentração (mg/mL) e do tempo (minutos) de suas preparações aquosas.

Grafico 3

Variação do Poder Espumante em função da concentração (mg/mL) e do tempo (minutos) de preparações aquosas da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd.



5.3. FARMACOLOGIA

5.3.1. Observações Gerais (“screening hipocrático”) da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd..

Nas primeiras 4 horas, após a administração da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd., foram observados os seguintes sinais:

Administração em Camundongos:

Doses: 5, 30, 60 mg/kg (i.p.)

- ⇒ Diminuição da Atividade Exploratória
- ⇒ Diminuição do tônus Muscular
- ⇒ Diminuição da Resposta ao Toque
- ⇒ Incoordenação Motora
- ⇒ Ptose Palpebral

Doses: 100 mg/kg (i.p.)

- ⇒ Hipotonicidade Muscular
- ⇒ Intensa Depressão Respiratória
- ⇒ Piloereção

Doses: 150 e 300 mg/kg (i.p.)

- ⇒ Hiporreatividade a estímulos externos
 - ⇒ Morte após 6-24 horas
-

5.3.2. Determinação da Toxicidade Aguda (DL₅₀) em Camundongos da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd..

Tabela 11

Valores obtidos na determinação da DL₅₀ da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Via intra-peritoneal (i.p.)	Via oral (v.o.)
230 ± 13,7 mg/kg	superior a 1,5 g/kg.

5.3.3. Teste da Atividade Antiulcerogênica pelo modelo de úlcera induzida por Indometacina da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd..

No modelo de úlcera induzida por indometacina a Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., administrada por via oral nas dosagens de 100 e 300 mg/kg, não apresentou atividade antiulcerogênica. Os resultados, expressos como média ± desvio padrão da média do Índice de Lesões Ulcerativas - I.L.U., estão demonstrados na Tabela 12 e Gráfico 3.

Tabela 12

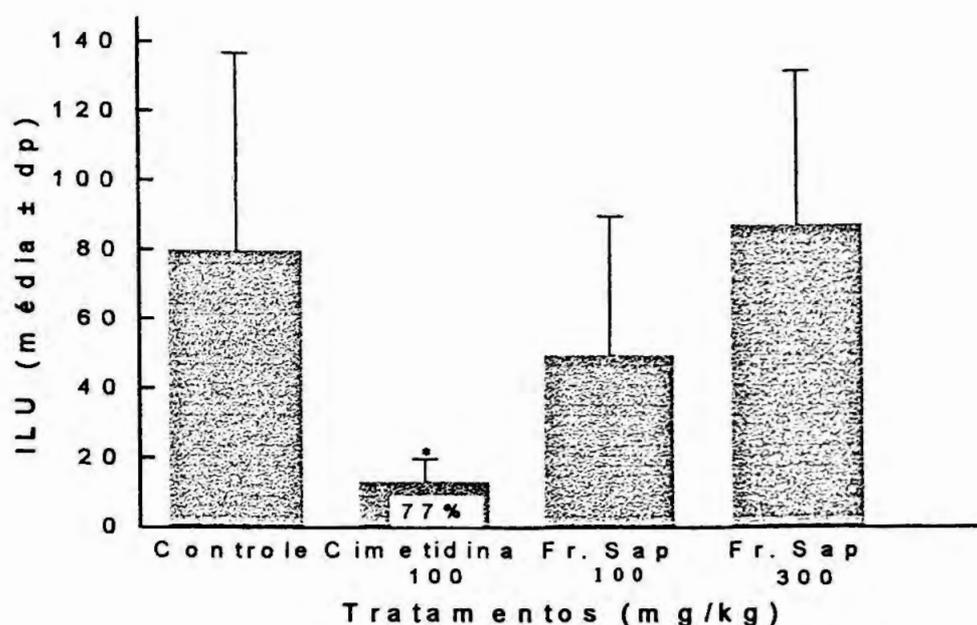
Efeito da Fração Saponínica pela via oral (v.o.) de *Bredemeyera floribunda* Willd. e da cimetidina (v.o.), em modelo de úlcera induzida por indometacina

Grupo de tratamento	% de inibição	Valores de I.L.U. média ± desvio padrão da média
Controle	--	79,8 ± 56,9 (n=6)
Cimetidina	76,9 %	13,5 ± 5,99* (n=6)
Fr Saponínica 100 mg/Kg	13,8 %	50,0 ± 39,9 (n=6)
Fr Saponínica 300 mg/Kg	--	87,17 ± 44,4 (n=6)

(ANOVA: $F_{(3,18)} = 4,14$ $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$)

Gráfico 4

Efeito da *Fração Saponínica* pela via oral (v.o.) de *Bredemeyera floribunda* Willd. e da cimetidina (v.o.), em modelo de úlcera induzida por indometacina.



ANOVA: $F_{(3,18)} = (4,14)$ $p < 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$

5.3.4. Determinação da Atividade Antiproliferativa *in vitro* – atividade citotóxica.

No ensaio para avaliação da atividade antiproliferativa celular *in vitro* da *Fração Saponínica* de *Bredemeyera floribunda* Willd., os resultados estão expressos em porcentagem de inibição de crescimento celular, conforme demonstrado na Tabela 13 e Gráfico 5 a seguir:

Tabela 13

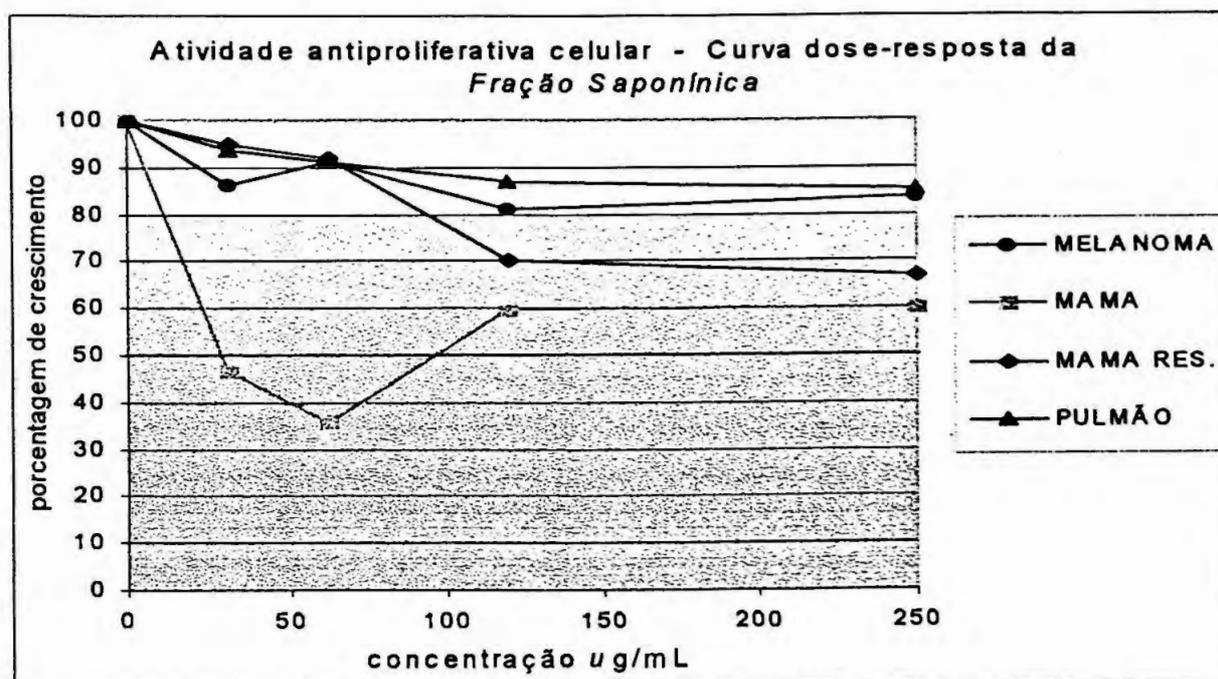
Inibição de crescimento celular (efeito antiproliferativo celular) da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Linhagem celular	Concentração $\mu\text{g/mL}$				
	0	31,25	62,5	120	250
Melanoma UACC-62	100	86	91	81	83,8
Mama MCF-7	100	46,7	35,8	59,8	60,2
Mama Res.* NCI ADR	100	95	92	70	67
Pulmão UACC-62	100	93,6	91,3	86,9	85,5

* Linhagem celular resistente a quimioterápicos de referência (5-fluorouracil, camptotecina e doxorrubicina)

Gráfico 5

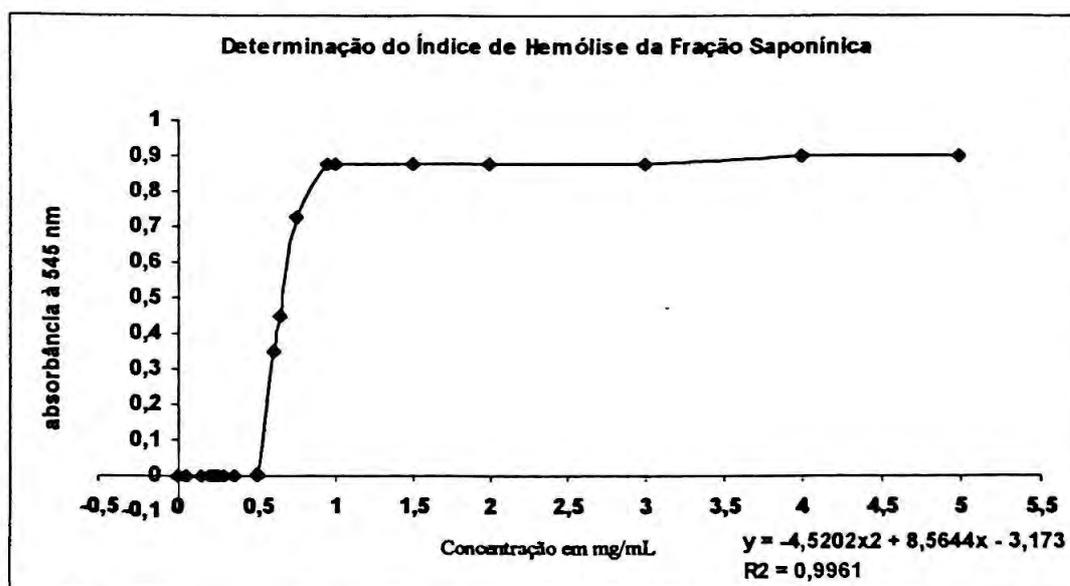
Curva dose-resposta da atividade antiproliferativa celular da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.



5.3.5. Determinação do Índice de Hemólise da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Decorridos 30 minutos de contato entre amostras contendo a Fração Saponínica e suspensão de hemácias a 37°C, os tubos contendo os materiais foram centrifugados a 1000 rpm, e com parte do sobrenadante procedeu-se a leitura da absorbância à 545 nm, determinando percentual de hemólise, cujos resultados encontram-se no Gráfico 6 abaixo.

Gráfico 6
Determinação do Índice de Hemólise da Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.



5.3.6. Determinação da Irritação Cutânea Primária em Coelhos.

Decorridas 24 horas a partir do término da aplicação da *Fração Saponínica de Bredemeyera floribunda* Willd., as gazes foram removidas, analisando-se a superfície cutânea do dorso e foram atribuídos valores às reações observadas conforme Tabela 14 a seguir, sendo nova leitura realizada após 72 horas.

Tabela 14

Média dos valores atribuídos para efeito de cálculo do Índice de Irritação Primária (n=5).

Tipo de lesão	ocorrência	
	24 h	72h
Formação de Eritema e Escaras		
Sem eritema	3	3
Eritema muito leve	2	1
Eritema bem definido	0	1
Formação de Edema		
Sem edema	4	4
Edema muito leve (pouco perceptível)	1	1
Edema leve (bordas e elevação definidas)	0	0
Índice de Irritação = 7/8	MÉDIA	0,875

Os resultados foram obtidos de acordo com o Índice de Irritação de cada animal, conforme o modelo de DRAIZE⁴⁵, sendo a média destes índices o valor de 0,875 e avaliado como IRRITANTE POUCO PERCEPTÍVEL, conforme critérios de classificação da tabela 09.

6 - DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

6.1. ASPECTOS BOTÂNICOS

6.1.1 Aspectos gerais

A família Polygalaceae Brown foi criada por **BROWN**²⁰ para englobar os gêneros *Polygala* L., *Salmonia* Lour. e outros, cujas características morfológicas não comportavam adequadamente sua localização anterior. Brown, ao criar a nova família, estabeleceu como principais caracteres de definição flor hipógina, corola sempre irregular e freqüentemente reduzida a três pétalas, ligadas a filetes soldados, de estames cujas anteras eram simples e deiscentes.

JUSSIEU⁶¹ ampliou a diagnose sobre o gênero *Polygala* L., com observações sobre a carúncula das sementes, citando apenas algumas espécies de LINNAEUS. Estudou outros gêneros, além de *Polygala* L., tais como *Tetratheca* Sm., *Muraltia* Neck (*Heisteria* L.), *Comesperma* Labill., *Bredemeyera* Willd. e *Hebeandra* Bompl., relacionando as afinidades existentes entre eles. A finalidade principal de seu trabalho era complementar uma proposição feita em 1809, reunindo tais gêneros sob uma nova família. A demora de **JUSSIEU** em concluir tal proposição deu a **BROWN** a prioridade em assumir a criação da família Polygalaceae⁶⁸.

Vários autores, como **HUMBOLDT**, **BONPLAND** et **KUNT**, **De CANDOLLE**, **ENDLICHER**, **BENNET** e **HUTCHINSON**, atribuem erroneamente, a **JUSSIEU** a prioridade da classificação de tal família⁶⁸.

Conforme relatado na revisão bibliográfica deste trabalho a nomenclatura do gênero *Bredemeyera* Willdenow, criado por **Willdenow**¹¹⁶ em 1801 também foi submetida a várias opiniões e alvo de controvérsias e de reestudos.

As divergências tiveram início com SAINT-HILAIRE⁹⁴ não aceitando o gênero *Bredemeyera* Willd., onde redescreve o gênero *Comesperma* Labill. e nele inclui *Bredemeyera floribunda* Willd.⁶⁸.

BENTHAM¹⁰ em 1842 cria o gênero *Catocoma* Bent. por considera-lo tanto no hábito, como na estrutura da flor e do fruto muito diferente do gênero *Comesperma* Labill. e faz novas combinações, dentre elas *Catocoma floribunda* (St.Hill) Bent.⁶⁸.

BENNET⁹ em 1874 redescreve *Bredemeyera floribunda* Willd. e designa o gênero considerando o princípio da prioridade⁶⁵, adotando o nome genérico *Bredemeyera* criado por WILLDENOW em 1801⁶⁹.

A revisão das espécies do gênero *Bredemeyera* Willd. do Brasil foi muito bem estudado por MARQUES⁶⁹, inclusive tendo a pesquisadora assumido a autoria da descrição de 3 novas formas para as seguintes espécies:

Bredemeyera autranii Chod.

Bull. Herb. Boiss. 2:172. 1894

- *Bredemeyera autranii* Chod. f. *obovata* Marq.

Marques in *Rodriguésia* 32(54):287. 1980

Bredemeyera myrtifolia (Spruce ex Benn)Benn.

in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):50.t.18.fig1. 1874

bas. *Catocoma myrtifolia* Spruce ex Benn.

in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):51. 1874 pro syn.

- *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn. f. *parviflora* (Benn) Marq.

Marques in *Rodriguésia* 32(54):283. 1980

bas. *Catocoma parviflora* Spruce ex Benn.

in Martius, *Fl. Bras.* 13(3):51. 1874

- *Bredemeyera myrtifolia* (Spruce ex Benn)Benn. f. *huberiana* (Chod.) Marq.

Marques in *Rodriguésia* 32(54):283. 1980

bas. *Bredemeyera huberiana* Chod.

Bull. Herb. Boiss. 2:172.1894

O gênero *Bredemeyera* Willd. apresenta como característica única que a distingue na família Polygalaceae Brown, a presença de nectários localizados na parte inferior da bainha estaminal, enquanto que a prevalência nos demais gêneros desta família é a localização situada entre o anel estaminal e o gineceu⁴⁸.

A descrição original¹¹⁶ refere-se a *Bredemeyera floribunda* Willd como sendo: “*arbustos suberetos ou escandentes a lianas...*”, que faz menção errônea à *Bredemeyera floribunda* Willd., pois a planta possui porte subarborescente, podendo atingir de 2 a 3m de altura, com caules cilíndricos e pouco espessos, permitindo com freqüência esta espécie apoiar-se sobre suportes como cercas, mourões, postes, outras espécies vegetais, sem no entanto possuir gavinhas ou enrolar-se sobre elas (Fig.01 02).

A coloração vivaz que varia de verde escuro ao claro (Fig.03) facilita a localização desta espécie em meio da vegetação de cerrado.

6.1.2 Aspectos relacionados á droga

6.1.2.1 Caracterização macroscópica

A droga comercializada como botica inteira é constituída pelas raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. nas formas de fragmentos em forma cilíndrica ou em forma de lascas retangulares.

Como características importantes na identificação da droga constituída pelas raízes tem-se o seu aspecto externo de coloração castanho-amarelada. Estrias bem evidentes, dispostas no sentido longitudinal, podem ser observadas ao lado de cicatrizes arredondadas em forma de crateras ou de protuberâncias. Estrias dispostas no sentido transversal são observadas principalmente em regiões onde as raízes apresentam-se sinuosas (Fig.08 e 09).

As cicatrizes crateriformes ou as em forma de protuberância estão quase sempre relacionadas à queda de raízes secundárias (Fig. 09 e 10).

Em secção transversal, as raízes mostram região externa de coloração marrom-amarelada, que pode chegar a atingir até a metade do seu diâmetro. O restante é constituído pelo cilindro central, de coloração amarelo claro com a parte lenhosa muito dura e de fratura fibrosa (Fig. 08)..

A fraude de raízes de botica inteira é pouco freqüente e quando ocorre mistura ou substituição é provável que isso se dê mais por acidente do que intencionalmente.

Outro aspecto importante na diagnose das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. deve-se à região da casca, que apresenta-se bastante fina e é envolvida frequentemente por súber que exhibe aspecto esfoliativo (Fig.10).

6.1.2.2. Caracterização microscópica.

As raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. apresentam súber (Fig.11-A e B, s.) pouco desenvolvido, formado geralmente por cinco a nove camadas de células tabulares achatadas, de paredes delgadas e levemente pardas.

O parênquima cortical (Fig.11-A, p.c.), muito desenvolvido, é constituído por um tecido de células repletas de grãos de amido. Os grãos de amido são esféricos ou cupuliformes e apresentam hilo central e puntiforme bem característico (Fig.12, am.).

MARTINS⁷⁰ ao descrever a porção cortical externa afirma o que segue: "*Esparços por todo esse parênquima, há fibras muito espessas, isoladas ou em grupos e cristais de oxalato de cálcio.*" Após minuciosa análise empregando-se planos de cortes nos sentidos

transversal e longitudinal, verificou-se uma divergência neste trecho da descrição, na medida em que se observa que esta região é rica em células pétreas, sendo comum a presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de prismas (Fig.,13 e 14-A, cr., c.p.).

Considera-se, portanto, mais adequado afirmar que o parênquima cortical engloba em sua parte externa grupos de braquiescleritos providos de paredes lignificadas e possuidores de lúmen de diâmetro variado onde são bem visíveis as pontuações localizadas nas paredes das células.

6.2. ESTUDOS QUÍMICOS

Os estudos químicos da *Bredemeyera floribunda* Willd. foram realizados com vistas à caracterização das substâncias possivelmente responsáveis pela atividade terapêutica da planta, observada, de início, nos levantamentos etnobotânicos realizados. O estudo preliminar através de técnicas de abordagem fitoquímica revelou a presença das seguintes classes de substâncias: *compostos triterpenóides, saponinas e flavonóides*. A abordagem fitoquímica consiste em uma seqüência de reações de caracterização e observações analíticas, elaboradas com o objetivo de detectar a ocorrência de quantidades apreciáveis de diversos constituintes em extratos vegetais^{31;71;112}.

Na realização dos fracionamentos cromatográficos partiu-se dos extratos preparados com hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Os extratos que apresentaram quantidades suficientes de resíduos para a realização dos fracionamentos foram os extratos clorofórmico e metanólico, sendo tais selecionados para continuidade dos trabalhos de isolamento.

O fracionamento cromatográfico dos *extratos clorofórmicos* rendeu inúmeras frações, sendo obtidas duas substâncias purificadas em condições de análise espectral, denominadas de substâncias 1 e 2.

Substância 1

No espectro de R.M.N.-¹H da substância 1 (Fig.16,p.64) pode-se verificar sinais característicos na região de 2,8-0,8 ppm de grupos metilenos e metílicos.

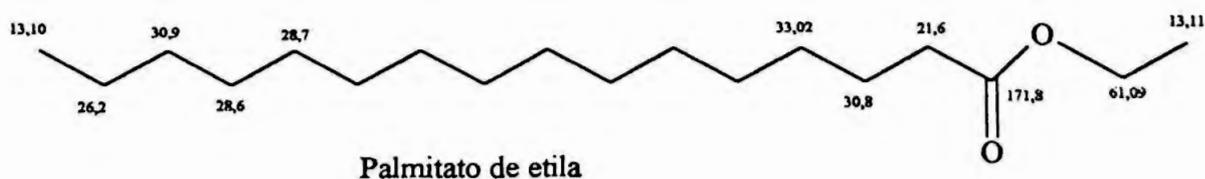
A análise do espectro de R.M.N.-¹³C (Fig.17,p.65) mostra sinais típicos de substância alifática de cadeia longa, principalmente pelos sinais entre 33,02 – 21,67 ppm, característicos de carbonos sp².

O espectro de massas (Fig18,p.66) apresentou para a substância 1 o peso molecular m/z de 284, sugerindo tratar-se do éster etílico do ácido hexa-decanóico (ácido palmítico). O pico do íon molecular intenso em m/z 88 é característico de Rearranjo de McLafferty¹⁰⁸, com quebra da ligação beta em relação ao grupo carbonílico do éster (C=O), contribuindo com a proposição acima. Além disso, o fragmento m/z 241 se dá pela perda do radical etoxil ($m/z - 43$). Após tais evidências as atribuições para os carbonos do espectro de R.M.N.-¹³C (Fig.17,p.65) são os seguintes:

Tabela 15

Dados de RMN de ¹³C da substância 1 (palmitato de etila) [300 MHz, CDCl₃,ppm], isolada de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Carbonos	Literatura ¹⁰⁸	Observado
1	20,0	21,6
2	31,2	30,8
3	32,8	33,0
4-10	30,3 - 30,1	28,5 - 28,1
11	30,5	28,7
12	31,1	28,6
13	32,6	30,9
14	23,2	26,2
15	14,2	13,1
C=O	170,3	171,8
1'	60,0	61,09
2'	13,8	13,1



Substância 2

Nos espectros de R.M.N.-¹H da substância 2 (Fig.19,p.67) observam-se sinais típicos de próton hidroxílico quelatado em 13,03 ppm (1H). Na figura 20 (p.68) os singletos observados em 3,90 (3H), 3,95 (3H) e 4,02 (3H) são os sinais correspondente às 3 metoxilas, compatíveis com os valores de integração do espectro.

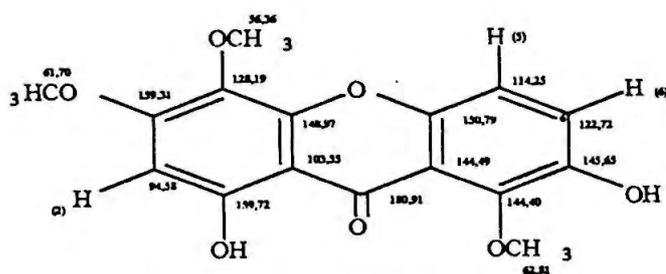
O espectro de R.M.N.-¹³C da substância 2 (Fig.21,p.69) mostra sinal em 180,9 ppm, referente ao carbono carbonílico. O singlete observado no espectro de R.M.N.-¹H em 6,39 ppm (1H) indica ausência de substituição em C-2 e os dubletos evidenciados em 7,27 (1H) e 7,38 (1H) ppm indicam os prótons de C5 e C6 respectivamente.

O espectro de massas da substância 2 (Fig.22,p.70) apresentou peso molecular de m/z 318, tendo o íon molecular intenso com o fragmento corresponde a m/z 303 indicado pela perda de radical metil (m/z - 15). O conjunto de informações nos levou a evidenciação desta substância 2 tratar-se de xantona pentaoxygenada, a 1,7-diidroxí-3,4,8 trimetoxixantona, cuja confirmação se deu pelas atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) para os carbonos no espectro de RMN de ¹³C (Fig.21,p.69) conforme tabela 16 a seguir:

Tabela 16

Dados de RMN de ^{13}C da substância 2 (1,7-diidroxi-3,4,8 trimetoxixantona) [300 MHz, CDCl_3 , ppm], isolada de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Carbonos	Literatura ¹⁰⁷	Observado
1	159,4	159,7
2	94,3	94,5
3	158,7	159,3
4	127,9	128,1
4 ^a	148,8	148,9
4b	150,4	150,7
5	113,9	114,2
6	123,6	122,7
7	146,0	145,6
8	144,7	144,4
8 ^a	114,4	114,4
8b	103,3	103,5
C=O	181,0	180,9
OMe	62,1	62,8
OMe	61,5	61,7
OMe	56,0	56,3



1,7-diidroxi-3,4,8 trimetoxixantona

Esta xantona pentaoxigenada também está presente nas raízes de *Poligala tenuifolia*, onde recebe a denominação de onjixantona II, cujos estudos demonstraram atividade hipoglicemiante através da inibição da

aldose redutase, sendo seu emprego promissor no tratamento da diabetes^{81;107}.

O fracionamento cromatográfico do *extrato metanólico* possibilitou a separação de inúmeras frações, porém de difícil purificação dos resíduos, sendo que somente uma fração mostrou-se satisfatória. Desta fração obteve-se um composto cujas análises por cromatografia em camada delgada sugeriram tratar-se da rutina. Os estudos espectrais para confirmação foram realizados e o resíduo doravante denominado de substância Me₁.

Substância Me₁

Nos espectros de R.M.N.-¹H de Me₁ (Fig.23,p.73) observam-se sinais típicos de próton hidroxílico quelatado em 12,6 ppm (1H). Os sinais obtidos em campo baixo com valores de 0,98 ppm (3 H) sugerem tratar-se de metila e em 3,7 ppm (10H) indicam prótons do açúcar ramnosil, pertinentes com os sinais em 5,3 ppm (1H) e 4,3 ppm (1H) do mesmo grupo.

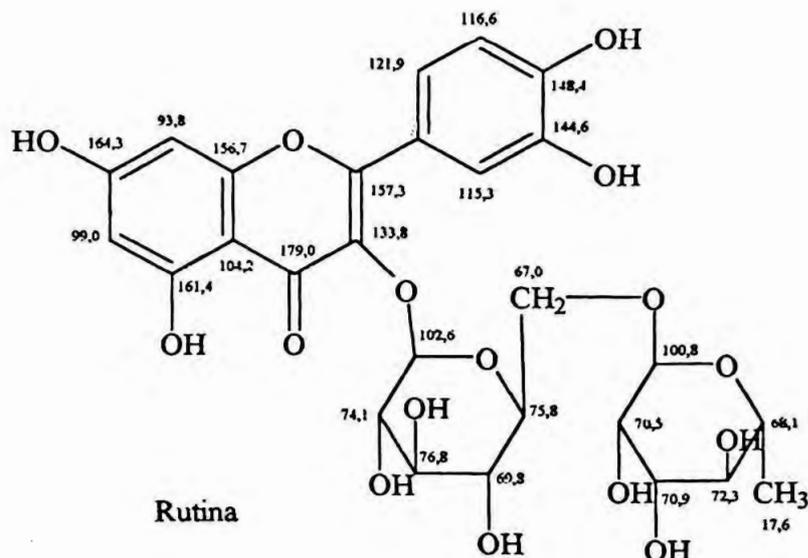
Os dados do espectro de R.M.N.-¹³C (Fig.24,p.74) mostram sinal em 179,0 ppm, referentes ao carbono carbonílico. O sinal observado no espectro de R.M.N.-¹H em 6,38 ppm (1H) indica ausência de substituição em C-8 e o dubleto em 6,2 ppm (1H) ausência em C-6. O anel C é dissustituído nas posições 3 e 4, sendo observados os sinais de dubletos em 7,56 ppm (1H) para H-6' e 7,54 ppm (1H) para H-2'. Os sinais do próton H-3' são observados em 6,84 ppm (1H).

As informações obtidas no espectro de R.M.N.-¹³C (Fig.24,p.74) confirmaram a suposição da substância Me₁ referir-se á rutina. As atribuições dos sinais deste espectro em comparação com dados encontrados na literatura^{1;108} seguem na tabela 17 abaixo:

Tabela 17

Dados de RMN de ^{13}C da substância Me_1 (rutina) [300 MHz, DMSO-d_6 , ppm], isolada de *Bredemeyera floribunda* Willd.

Carbonos	Literatura ¹	Observado
2	157,3	156,3
3	133,8	133,2
5	161,4	161,1
6	99,0	98,6
7	164,3	164,0
8	93,8	93,5
9a	156,7	156,5
9b	104,2	103,8
1'	121,4	121,5
2'	121,9	121,1
3'	116,6	116,2
4'	148,4	148,3
5'	144,6	144,6
6'	115,3	115,1
C=O	179,0	177,3
1''	102,6	101,1
2''	74,1	74,0
3''	76,8	76,3
4''	69,8	69,9
5''	75,8	75,8
6''	67,0	66,9
7''	100,8	100,6
8''	70,5	70,3
9''	70,9	70,4
10''	72,3	71,7
11''	68,1	68,1
12''	17,6	17,6



. Fração saponínica

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou terpênicos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica e outra parte hidrofílica, determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e seu poder espumante¹⁰⁰.

O extrato metanólico mostrou-se rico em frações com resíduos de natureza polar, destacando-se os saponínicos, entretanto inúmeras dificuldades foram encontradas para a separação destas substâncias empregando-se as técnicas usuais de colunas abertas no fracionamento cromatográfico.

As raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. apresentaram teores de saponinas variando de 12 a 18%, sendo esta fração obtida por precipitação a partir dos extratos metanólicos empregando-se solventes de baixa polaridade como o éter etílico e posteriormente a acetona.

Considerando as inúmeras possibilidades de usos das saponinas como agentes formadores de espumas na fabricação de bebidas carbonatadas, agente emulsificante para a indústria de alimentos,

farmacêutica e cosmética, na fabricação de filmes fotográficos e no tratamento de resíduos industriais de empresas petroquímicas^{91;100;103;114}, buscou-se avaliar a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. frente à capacidade de exercer ação surfactante através da modificação da tensão superficial da água e da formação de espuma.

Os fenômenos de tensão superficial e interfacial estão relacionados com forças atrativas, destacando-se a de van der Waals.

As moléculas situadas no interior de um líquido são, geralmente, sujeitas a forças de atração iguais em todas as direções, ao passo que moléculas situadas numa superfície de separação líquido-ar estão submetidas a forças de atração não-balanceadas ou não-equilibradas, resultando em uma força em direção ao líquido¹⁰³.

A tensão superficial (γ_0) de um líquido pode ser entendida como a força que atua ortogonalmente a qualquer segmento unitário imaginado na superfície do líquido.

Quando se trata da superfície de separação entre dois líquidos imiscíveis estão presentes forças intermoleculares não equilibradas e de intensidade menor, gerando as tensões interfaciais. As tensões interfaciais se situam entre tensões superficiais dos dois líquidos¹⁰³.

Na avaliação da tensão superficial da fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., empregou-se Tensiômetro digital de marca KÜSS, equipamento com grande sensibilidade e precisão onde, através do contato e imersão de placa de platina através da superfície da solução aquosa da Fração saponínica, ocorre o registro da Tensão Superficial pela medição do ângulo de contato da placa em relação à superfície do líquido. A diferença entre as diversas inclinações do ângulo de contato (θ) é denominada de contato de angulohisteresis, onde a energia de superfície de contato sempre será positiva. Os sistemas equilibrados diminuem esta energia de superfície e formam micelas.

No gráfico 1 pode-se verificar que à temperatura de 20°C a água apresentou uma tensão superficial de 70,9 mN/m, valores inferiores da tensão superficial foram sendo obtidos com o emprego de soluções preparadas à partir de diferentes concentrações da fração saponínica. Com os valores inferiores à diluição contendo 0,36 mg/mL da fração saponínica, não se observou alteração significativa no registro da tensão superficial medida, ou seja com o incremento da concentração das soluções contendo a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., ocorre a formação de uma camada ocupando as interfaces entre o líquido e os meios em contato com este até determinado ponto.

Verificando-se o comportamento da curva observa-se uma significativa alteração em suas retas tangentes, indicando uma mudança no comportamento organizacional das moléculas em solução. Este ponto é chamado *concentração micelar crítica*, indicando que o sistema adquire características coloidais^{64;91}.

A mesma metodologia e condições foram empregadas para o Lauril Sulfato de Sódio (L.S.S.) e observou-se o igual comportamento da curva, porém com a concentração micelar crítica – c.m.c. de 0,22 mg/mL do tensoativo(Grafico2).

No aspecto relacionado com a variação do poder espumante, de acordo com a metodologia padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – A.B.N.T.³, avaliou-se a capacidade de preparações aquosas contendo a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., apresentarem a formação de espuma abundante e persistente. Os resultados expressos no Gráfico 3 demonstram que o mais alto poder espumante e persistente após 120 minutos foi obtido com a preparação contendo 0,4 mg/mL da fração saponínica.

Avaliando este resultado verificou-se que a amostra com concentração mais próxima da concentração micelar crítica para a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. obteve o melhor

desempenho espumante, mostrando a coerência e compatibilidade desta metodologia com a avaliação realizada com técnica mais elaborada.

Deve-se ressaltar que esta metodologia pode apresentar aspectos negativos em relação a reprodutibilidade dos resultados, na medida em que variações na velocidade e intensidade de força aplicadas na agitação podem alterar tais valores.

6.3. FARMACOLOGIA

Os efeitos gerais (“screening hipocrático”), com camundongos, após a administração da dose de 60 mg/kg pela via intraperitoneal, foram os seguintes: diminuição da atividade exploratória, diminuição do tônus muscular, diminuição da resposta ao toque, incoordenação motora e ptose palpebral. Com o aumento da dose, pela mesma via de administração, ficou evidenciado a hipotonicidade muscular e intensa depressão respiratória. Tais efeitos também foram observados por **BEVENINO e col.**¹² e estão relacionados ao efeito hipotensor da fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

O teste realizado para a determinação da toxicidade aguda DL₅₀, apresentou para a via intra-peritoneal (i.p.) valores de $230 \pm 13,7$ mg/kg e pela via oral (v.o.) os valores foram superiores a 1,5 g/Kg.

Os resultados demonstraram que a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. apresenta-se praticamente atóxica²².

A evolução histórica mostra o emprego de espécies animais buscando avaliar o risco no ser humano que, apesar das diferenças existentes entre qualquer das espécies e o homem, no que diz respeito à absorção, distribuição, biotransformação e eliminação, e da variabilidade interespecie ser mais regra do que exceção, e das extrapolações correspondentes, é sempre importante a resposta de um modelo vivo⁸⁷.

Considerando que a úlcera gastroduodenal possui alta incidência de acometimento na população² e que em triagem de atividade antiulcerogênica do extrato etanólico das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd. os resultados apontados por **RAO e col.**⁹² demonstraram significativa redução no índice de lesões e grande citoproteção nos modelos de úlceras induzidas por etanol na dosagem de 200 mg/kg (v.o.), buscou-se avaliar os efeitos antiulcerogênicos da

fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. nas dosagens de 100 e 300 mg/kg (v.o.).

Para triagem da atividade antiulcerogênica empregou-se o modelo de úlcera induzida por indometacina⁷⁵. Neste modelo experimental tem-se abrangido os mecanismos de citoproteção e secreção ácida gástrica¹⁵. A indometacina é um antiinflamatório não esteroideal inibidor da ciclooxigenase, que é a enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que são substâncias importantes na citoproteção gástrica⁶³.

Neste modelo, a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., administrada por via oral, na dose de 100 mg/kg reduziu o Índice de Lesões Ulcerativa (I.L.U.) em 13,9% sendo estatisticamente não significativo, enquanto que na dosagem de 300 mg/kg (v.o.) não reduziu o Índice de Lesões Ulcerativas (I.L.U.) (Gráfico3). Esse resultado negativo pode ser devido a diferentes modelos de indução ou mais provavelmente, ao efeito obtido por RAO e col.⁹² estar restrito a substâncias presentes no extrato etanólico, e que estão ausentes na fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd.

O uso de técnicas *in vitro* para avaliação de atividade citotóxica tem aumentado em função de avanços tecnológicos, que possibilita o emprego de metodologias semi-automatizadas que avaliam a quimiossensibilidade em células tumorais⁸⁹.

Uma das limitações destes ensaios, quando comparados com ensaios *in vivo*, refere-se ao fato de que na metodologia de triagem *in vitro*, o crescimento de células tumorais ocorre em monocamadas, enquanto que no ensaio *in vivo* a organização do tumor se dá de forma tridimensional com características próprias desta arquitetura celular nos tumores sólidos⁵⁷.

Na metodologia de triagem empregada, considera-se o potencial antitumoral dos extratos baseando-se no Índice de Citotoxicidade –

IC₅₀, que avalia a concentração da amostra testada capaz de apresentar valores de absorvância inferiores a 50% em comparação com a mesma linhagem celular não exposta à amostra e a relação com a concentração da amostra⁸⁹.

Diante do exposto, a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. nas condições ensaiadas apresentou índices de citotoxicidade-IC₅₀ abaixo de 50% somente nas linhagens de células tumorais de mama (MCF7) nas concentrações de 31,25 e 62,5 µg/mL para Índices de Crescimento celular com 35,8% e 46,7% respectivamente, mas os resultados da Tabela 13 e Gráfico 5 demonstram que o crescimento na linhagem de mama (MCF7) não ocorre de forma dose-dependente.

Segundo os critérios de triagem preconizados, a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., nas condições ensaiadas, não se mostrou com potencial para atividade anticâncer nas linhagens celulares tumorais de: melanoma (UACC62), mama (MCF7), mama resistente (NCI-ADR) – (linhagem celular resistente a quimioterápicos de referência, como: 5-fluorouracil, camptotecina e doxorrubicina) e pulmão (NCI-460).

Considerando que as saponinas representam um grupo de substâncias com largo espectro de atividade biológica, é comum espécies que apresentam esses compostos terem o seu uso tradicional disseminado e muitas vezes empregado na forma de panacéas^{23;62}.

Na busca por substâncias que incrementassem a atividade imunoestimulante em vacinas, sucessivas modificações em adjuvantes tradicionais foram realizadas.

O Adjuvante Completo de Freund (ACF) e o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) estão baseados em emulsões água em óleo e são tipicamente empregados em formulações de veículos para vacinas. As observações iniciais de Jules Freund demonstraram que tais sistemas aumentavam a resposta imunológica nas condições ensaiadas²⁴.

Buscando incrementar a atividade imunogênica das vacinas vários estudos^{2,4} foram desenvolvidos empregando-se saponinas de *Quilaisia saponaria* Molina - Polygalaceae, apresentando seletiva resposta estimulante de Linfócitos T do subgrupo Th1.

Imunoadjuvantes são compostos com variadas conformações e atuando por diferentes mecanismos. São organizados e reconhecidos pela habilidade de ativar seletivamente a subpopulação de linfócitos Th1 ou Th2 (CD4+), possibilitando maior controle na resposta imunológica⁴.

O uso de saponinas em aplicações imunológicas teve início em 1920, quando um conjunto de substâncias foi testado como adjuvante nas vacinas contendo formalina-toxóides.

Desde então o emprego de saponinas somente ocorria em fases laboratoriais. A utilização de saponinas como adjuvante de vacinas veio a ocorrer de maneira comercial na década de 60 com o emprego de extrato bruto de *Quilaisia saponaria* Mol. em formulação de vacina para uso veterinário⁶.

Nos anos 70 foi isolado e purificado o constituinte Quilail-A da mistura de saponinas de *Quilaisia saponaria* Mol., cujo emprego como adjuvante mostrou-se mais ativo e menos tóxico que a Fração Bruta⁶.

Posteriormente as saponinas foram empregadas na forma de um complexo imunoestimulante (ISCOM) formado por uma matriz lipofóbica contendo aproximadamente de 10-15% de colesterol e fosfolipídeos, 60-70% de saponinas (Quilail-A) e 10-15% de proteínas⁶. O complexo imunoestimulante (ISCOM) provoca a sua imunogenicidade através da indução da resposta imune mediada pelo sistema Th1, sendo que os resultados experimentais demonstraram induzir forte proteção frente a várias infecções por vírus, bactérias e fungos, com baixa toxicidade^{8,19}.

Buscando o desenvolvimento de vacinas para o controle e erradicação da *Leishmaniose visceral* humana, SANTOS e col.⁹⁸ realizaram triagem com várias espécies vegetais ricas em saponinas e comumente encontradas no Brasil, incluindo a *Bredemeyera floribunda* Willd.

Considerando o indesejável efeito hemolítico característico das saponinas, os autores empregaram como critério de eleição da melhor espécie para continuidade dos estudos o Índice de Hemólise (IH₅₀), ou seja a concentração de amostra capaz de destruir a metade das hemácias presentes no interior de tubo contendo um volume conhecido de suspensão isotonicada de hemácias. Os autores testaram a saponina isolada de *Bredemeyera floribunda* Willd., o *bredemeyerosideo D*, tendo obtido o Índice Hemolítico (IH₅₀) de 175 µg/mL, enquanto que o limite aceitável deveria ser superior a 500 µg/mL⁹⁸.

Empregando metodologia similar no presente trabalho, a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., apresentou IH₅₀ de 610 µg/mL.

Diante dos resultados, verificou-se que a fração saponínica tem poder hemolítico menor que o *bredemeyerosideo D*, entretanto não se justifica o emprego desta fração saponínica apenas com base no Índice de Hemólise (IH₅₀), na medida em que a fração saponínica é mistura complexa, com variações quanto ao número de açúcares presentes para uma aglicona (Pressenegenina) e também quanto aos açúcares presentes.

PILLION e col.⁸⁶ demonstraram a relação estrutura-atividade de saponinas comparando derivados de *Quiluaia saponaria* Mol. através do Índice de Hemólise (IH₅₀) e modificando os açúcares presentes na cadeia lateral destas moléculas.

Outro fator relevante para a utilização de substância isolada como adjuvante para vacinas deve-se à dificuldade de reprodutibilidade e

padronização das substâncias presentes na fração saponínica, podendo variar quali e quantitativamente^{16;21;82}.

A capacidade das saponinas formarem complexos com núcleos esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade¹⁰⁰.

Várias estratégias vêm sendo estudadas na perspectiva de alteração das propriedades de barreiras da pele, possibilitando incrementos na absorção percutânea de fármacos. Os requisitos gerais dos compostos para estas estratégias são ausência de odor, serem quimicamente e fisicamente estáveis, não apresentarem incompatibilidades nas formulações dermatológicas, não provocarem sensibilização ou irritação dérmica e terem custo acessível⁹⁹.

Um produto tópico ideal seria aquele capaz de liberar o fármaco no local e promover uma concentração terapêutica por um tempo tão longo quanto o necessário para a cura ou melhora dos sintomas da doença. Desta forma, pode-se afirmar que o sucesso terapêutico está relacionado com a habilidade de se conseguir concentrações terapêuticas de fármaco no tecido local²⁶.

As formulações tópicas normalmente contêm vários excipientes e estes também partilham na superfície da pele de acordo com suas propriedades físico-químicas. Certos excipientes mudam a integridade do extrato córneo e afetam o processo de difusão do fármaco no tecido^{25;53;101}.

Pelas características das saponinas, pesquisas buscando o emprego farmacêutico como adjuvantes para aumentar a absorção de fármacos vem sendo cada vez mais crescente⁸⁶. Como estudo preliminar, o presente trabalho buscou avaliar o potencial de irritabilidade da fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., empregando a metodologia de Draize⁴⁵. O protocolo deste teste publicado em 1944

permanece praticamente inalterado, sendo realizado em coelhos devido a correlação de resposta. O tempo de exposição de um composto permeável a pele do coelho resulta em um teste que irá identificar muitas substâncias também irritantes à pele humana⁸⁷.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 14 e estando a média do *índice de irritação* em 0,875, pode-se avaliar que a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. promove uma *Irritação Dérmica Pouco Perceptível*.

7 - CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O estudo farmacognóstico e farmacológico elaborado com a droga e a *Fração Saponinica* de *Bredemeyera floribunda* Willdenow permitiu chegar às seguintes conclusões:

- 1- As características botânicas importantes na identificação da droga comercializada sob a denominação de botica inteira são:

Características macroscópicas: droga em forma cilíndrica medindo geralmente de 5-10 cm de comprimento por 1 a 2,5 cm de diâmetro ou droga em forma de lascas retangulares medindo de 5 cm de comprimento por 3 cm de largura e cerca de 1 cm de espessura. A parte externa das raízes apresenta coloração castanho-amarelada. Estrias bem evidentes, dispostas no sentido longitudinal, podem ser observadas ao lado de cicatrizes arredondadas em forma de crateras ou de protuberâncias. A região da casca apresenta-se bastante fina e é envolvida frequentemente por súber que exhibe aspecto esfoliativo.

Características microscópicas: súber pouco desenvolvido, formado geralmente por cinco a nove camadas de células tabulares achatadas, de paredes delgadas e levemente coloridas de pardo. O parênquima cortical muito desenvolvido, é constituído por um tecido de células repletas de grãos de amido esféricos ou cupuliformes com hilo central puntiforme. O parênquima cortical engloba em sua parte externa grupos de braquiescleritos providos de paredes lignificadas e possuidores de lúmen de diâmetro variado, sendo comum a presença de cristais de oxalato de cálcio na forma de prismas. A zona lenhosa mostra vasos pontuados isolados distintos e esparsos, fibras xilemáticas de lúmen estreito.

- 2- As reações genéricas de identificação de classes de substâncias permitiram constatar a presença de *triterpenóides*, *flavonóides* e *saponinas*.
 - 3- São componentes da raiz: palmitato de etila; 1,7-diidroxí-3,4,8-trimetoxixantona e rutina.
 - 4- A Fração saponínica em água apresentou concentração micelar crítica (CMC) de 0,36 mg/mL e o poder espumante foi mais evidenciado e permanecendo persistente na concentração de 0,4 mg/mL, propriedades compatíveis com agentes surfactantes considerados fortes.
 - 5- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. quando injetada em camundongos, produziu diminuição da atividade exploratória, ptose palpebral e dificuldade de locomoção na dosagem de 60 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.). Doses maiores intensificaram esses efeitos com a produção de dispnéia acentuada, incoordenação motora e hipotonicidade muscular generalizada na dosagem de 100 mg/kg pela via intra-peritoneal (i.p.).
 - 6- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., administrada em dose única, apresenta moderada toxicidade por via intraperitoneal (i.p.) e baixa toxicidade por via oral (v.o.). Os valores da DL₅₀, via (i.p.), foram calculados em 230±13,7 mg/kg, para camundongos e pela via oral, os valores obtidos foram superiores a 1,5 g/kg.
 - 7- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., nas dosagens de 100 mg/kg e 300 mg/kg não reduziu o índice de lesões ulcerativas, induzidas por indometacina.
-

- 8- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., nas concentrações: 31,25µg/mL; 62,5µg/mL; 120µg/mL e 250 µg/mL não reduziu o crescimento celular das linhagens tumorais de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama resistente (NCI ADR) e pulmão (UACC-62) de forma dose-dependente, não atingindo o índice citotóxico (IC₅₀) estabelecido na metodologia de triagem.

 - 9- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. apresenta Índice de Hemólise de 0,61 mg/mL, sendo este valor adequado para estudos de avaliação da atividade imunogênica.

 - 10- A Fração Saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd. provoca Irritação Dérmica pouco perceptível em Coelhos.
-

RESUMO

Bredemeyera floribunda Willdenow, espécie vegetal vulgarmente conhecida como botica inteira, ocorre com frequência nos campos cerrados do país. A botica inteira, cuja parte empregada são as raízes, é utilizada na medicina popular como expectorante, diurética, em problemas circulatórios e para baixar a pressão arterial.

O estudo botânico detalhado das partes empregadas comercialmente foi efetuado e fotografias ilustram a tese. As características botânicas importantes na identificação da droga são: 1) características macroscópicas – as raízes possuem forma cilíndrica e coloração castanho-amarelada. Estrias bem evidentes podem ser observadas ao lado de cicatrizes arredondadas em forma de crateras ou protuberâncias; 2) características microscópicas – súber pouco desenvolvido e parênquima cortical repleto de grãos de amido esféricos ou cupuliformes com hilo central puntiforme. Na região cortical ocorrem grandes grupos de células pétreas, sendo comum a presença de cristais prismáticos.

O estudo químico dos extratos clorofórmicos e metanólicos das raízes, após fracionamento cromatográfico, levou à identificação do palmitato de etila, a 1,7-diidroxi-3,4,8-trimetoxixantona e da rutina.

A avaliação da atividade tensoativa e do poder espumante da fração saponínica foi realizado, sendo determinado o valor de 0,36 mg/mL para a concentração micelar crítica desta fração.

O estudo farmacológico foi realizado com a fração saponínica sob vários aspectos. Com o “screening” hipocrático observou-se, após administração intra-peritoneal (i.p.) em camundongos, a diminuição da atividade exploratória, ptose palpebral e dificuldade de locomoção na

dosagem de 60 mg/kg. Doses maiores intensificaram esses efeitos com a produção de dispnéia acentuada, incoordenação motora e hipotonicidade muscular generalizada (100 mg/kg).

A fração saponínica apresentou moderada toxicidade por via intraperitoneal (DL_{50} $230 \pm 13,7$ mg/kg) e baixa toxicidade pela via oral (DL_{50} acima de 1500 mg/kg). A atividade antiulcerogênica da fração saponínica foi avaliada em ratos, não apresentando redução no índice de lesões ulcerativas, induzidas por indometacina, nas dosagens de 100 e 300 mg/kg pela via oral.

Na avaliação de citotoxicidade *in vitro* a fração saponínica não reduziu o crescimento celular das linhagens tumorais de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), mama resistente (NCI ADR) e pulmão (UACC-62).

O índice de hemólise da fração saponínica foi determinado e apresentou valor de IH_{50} de 0,61 mg/mL. Segundo a metodologia de Draize, a fração saponínica de *Bredemeyera floribunda* Willd., apresentou irritação dérmica pouco perceptível em coelhos.

ABSTRACT

Bredemeyera floribunda Willdenow, vegetable species popularly known as "botica inteira" (whole pharmacy), frequently found in the scrub fields of the country. "Botica inteira", whose used part are the roots, is used in folk medicine as an expectorant, a diuretic, in circulatory problems and to lower the blood pressure.

The detailed botanical study of the commercially used parts has been carried out and photographs illustrate this thesis. The important characteristics to identify the crude drug are: 1) macroscopic characteristics – the roots have cylindrical shape and a yellowish brown color. Quite evident grooves can be seen beside round scars in the shape of craters or lumps; 2) microscopic characteristics – the cork underdeveloped and cortical parenchyma full of spherical starch grains with a central hilo and point type. In the cortical region there are large groups of stone cells, and the presence of prismatic crystals is common.

The chemical study of the chloroform and metanolic extracts of the roots, after chromatography fractionating, led to the identification of ethyl palmitate, 1,7-dihydroxy-3,4,8-trimetoxyxanthone and rutin.

The evaluation of both the surfactant activity and the foaming power of the saponin fraction has been conducted, determining the value of 0.36 mg/mL to be critical micellar concentrate of this fraction.

The pharmacological study has been carried out with the saponin fraction under several aspects. With the hypocratic screening, after intra-

peritoneal route (i.p.) administration in mice, the reduction of the exploratory activity, palpebral ptosis and locomotion difficulties are observed at the dosage of 60 mg/kg. Bigger dosages have intensified these effects, with the production of strong dyspnea, lack of coordination and general muscle relaxation (100 mg/kg).

The saponin fraction has presented moderate toxicity by intraperitoneal route (DL_{50} 230 ± 13.7 mg/kg) and low toxicity orally (DL_{50} above 1500 mg/kg). The antiulcerogenic activity of the saponin fraction has been evaluated in mice, and there was no reduction on the ulceratives lesions index, induced by indometacin, at the dosages of 100 and 300 mg/kg orally.

During the *in vitro* citotoxic evaluation the saponin fraction didn't reduce the cell growth of melanoma tumoral lineage (UACC-62), breast (MCF-7), resistant breast (NCI ADR) and lung (UACC-62).

The haemolytic index of the saponin fraction has been determined and it presented the IH_{50} value of 0.61 mg/mL. According to Draize's methodology, the saponin fraction of *Bredemeyera floribunda* Willdenow has presented a hardly perceptible rash in rabbits.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 N.M.R. of flavonoids**. Elsevier, New York. p.118, 1989.
2. AL MOUTAERY, A.R.; TARIQ, M. Effect of quinacrine, a phospholipase A2 inhibitor on stress and chemically induced gastroduodenal ulcers. **Digestion**, v.58, p. 129-137, 1997.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Tensoativos - Determinação do Poder Espumante. ABNT, Rio de Janeiro, NBR 13064, Jan. 2p, 1994.
4. AUDIBERT, F.M.; LISE, L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Imunology Today**, v.14, n.6, p.281-284, 1993.
5. BABADY-BILA; DARIMONT, E.; DELAUDE, C. Contribution a l'etude Chimiotaxonomique des Polygalaceae. Examen de la saponine du *Polygala bakeriana* Chod.. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.52, n.5, p. 283-284, 1983.
6. BARR, I.; MITCHELL, G.F. ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade. **Immunology and Cell Biology**, v.74, p.8-25, 1996.
7. BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal**, v.12, n.50, p. 35-45, 1982.

➤ De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).As abreviaturas dos títulos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1995.

8. BEHBOUDI, S.; MOREIN, B.; RÖNNBERG, B. Isolation and quantification of *Quillaja saponaria* Molina saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms. *Vaccine*, v.13, n.17, p. 1690-1696, 1995.
 9. BENNETT, A.W. Polygalaceae in Martius, *Flora Brasiliensis*, 13 (3):1-82, t.1-30, 1874.
 10. BENTHAM, G. Polygalaceae in Hooker, *The Journal of Botany*, 4: 99-105, 1852.
 11. BENTHAM, G.; HOOKER, J. Polygalaceae, *Genera Plantarum*, 1: 134-140, 1862.
 12. BEVENINO, L.H.; VIEIRA, F.S.A.; CASSOLA, A. C.; SANIOTO, S.M.L. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* WILLD. I. Effect on arterial blood pressure and renal excretion in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43, p. 197-201, 1994.
 13. BEVENINO, L.H.; MELLO AIRES, M. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* WILLD. II. Effect on glomerular filtration rate and renal tubular function of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43, p. 203-207, 1994.
 14. BEVENINO, L.H.; SANIOTO, S.M.L. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* WILLD. III. Effect on hormone-stimulated water transport in isolated frog skin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43, p. 209-215, 1994.
 15. BIGHETTI, A.E. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da *Mikania laevigata* Schultz.** Bip. 1999. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
-

16. BONATI, A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation? **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p. 195-197, 1991.
 17. BRIESKORN, C.H.; RENKE, F. Chemischer Aufbau, physikalische Eigenschaften und Unterscheidungsmerkmale einiger Polygala Saponine. **Deutschen Apotheker Zeitung**, v.108, p.1601-1605, 1968.
 18. BRIESKORN, C.H.; KILBINGER, W. Structure of saponin of *Polygala chinensis*. **Arch. Pharmaz**, v.308, p. 1601-1605, 1975.
 19. BRITT,W.; FAY,J.; SEALS,J.; KENSIL,C. Formulation of an Immunogenic Human Cytomegalovirus Vaccine: Response in Mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 18-25, 1995.
 20. BROWN, R. *Polygalae in Flandres, A voyage to terra Australis*, v.2, p.542-544, 1814.
 21. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.
 22. CHAN, P.K.;O'HARA,G.P.; HAYES,A.W. Acute and subchronic toxicity. In: Hayes A.W., ed., **Principles and Methods for Toxicology**, New York: Raven Press. p.1-51, 1982.
 23. CHANDEL, R.S.; RASTOGI, R.P. Triterpenoid saponins and sapogenins: 1973-1978. **Phytochemistry**, v.19, p. 1889-1908, 1980.
 24. CHANG, J.C.C.; DIVELEY, J.P.; SAVARY, J.R.; JENSEN, F.C. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. **Advanced Drug Delivery Review**, v.32, p.173-186, 1998.
-

25. CHIOU, G.C.Y.; CHUANG, C.Y. Improvement of Systemic Absorption of Insulin through Eyes with Absorption Enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, n.10, p. 815-818, 1989.
 26. CORRÊA, M.A. **Incorporação de Naproxeno em Sistema Microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica.** 1997. 146f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 27. COSTA, A.F. **Farmacognosia.** 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977, v.2, 1117p.
 28. DAROS, M.R.; MATOS, F.J.A.; PARENTE, J.P. A New Triterpenoid Saponin, Bredemeyeroside B, from the Roots of *Bredemeyera floribunda*. *Planta Medica*, v.62, p. 523-527, 1996.
 29. DAVREUX, M.; DELAUDE, C. Chemistry of *Polygala* saponins. Identification of the saponin extract of *Carbologia glabrescens*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, v.40, p.498-501, 1971.
 30. DE CANDOLLE, A.P. **Prodomus systematis naturalis regioni vegetabilis: Polygalae.** Paris: Argentorali & Londini, v.1, p.321-342, 1824.
 31. DEL LLANO ARCHONDO, M.E. (1999). **Desenvolvimento, estudos de estabilidade e de liberação "in vitro" em formulações para uso tópico contendo extrato de *Centella asiatica* (L.) Urban.** 1999. 139p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 32. DELAUDE, C. Comparative study of saponin extracts of two African *Polygalaceae* *Securidaca longepedunculata* var *Parfifolia* ans
-

- Polygala accicularis*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.40, p. 397-405, 1971.
33. DELAUDE, C. Chemistry of *Polygala* saponins. Identification of the saponin extract of *Polygala erioptera*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.42, n.5-8, p. 264-267, 1973.
34. DELAUDE, C. Saponins in POLYGALACEAE. Identification of saponin extracted from *Polygala nambalensis*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v. 43, p. 249-252, 1974.
35. DELAUDE, C.; Saponins in POLYGALACEAE. Identification of saponin extracted from *Polygala macrostigma*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**,v.43, p. 253-256, 1974.
36. DELAUDE, C. Saponin of *Polygala myrtifolia*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.44, p. 385-386, 1975.
37. DELAUDE, C. Chemical study of POLYGALACEAE saponins. Identification of the *Polygala chamaebuxus* saponin **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.44, p. 495-496, 1975.
38. DELAUDE, C. Chemical study of POLYGALACEAE saponins. Identification of the *Polygala pygmaea* Guerke. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.44, p. 497-500, 1975.
39. DELAUDE, C. Contribution a L'etude Chimique des Saponines des Polygalaceae. Analyse de la saponine du *Polygala vulgaris* L. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.50, n.5-8, p. 264-267, 1981.
40. DELAUDE, C. Contribution a L'etude Chimique des Polygalaceae. Examen de *Polygala affinis*. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.60, n.1,p. 41-43, 1991.
-

41. DELAUDE, C. Les Polygalaceae et leurs saponines. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.61, n.3-4, p. 245-288, 1992.
 42. DELAUDE, C.; BABADY-BILA; HULS,R.; Contribution a L'etude Chimiotaxonomique des Polygalaceae. Examen de la saponine du *Polygala ruwenzoriensis* Chod.. **Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège**, v.50, n.3-4,p. 172-173, 1981.
 43. DIAS, B.F. Conservação da natureza do cerrado brasileiro. **Cerrado**, Brasília:ed. UnB, v.1, p.609, 1994.
 44. DOMINGUEZ,X.A. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Ed. John Wiley. 1973, 289p.
 45. DRAIZE, J.H.; WOODWARD, D.G.; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.82, p.377-390, 1944.
 46. ENDLICHER, S.L. Polygalae in **Genera Plantarum** 1077-1080, 1852.
 47. ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. Berlim: Gebruder Borntraeger Nicolasse, 1964.
 48. ERIKSEN, B. Floral anatomy and morphology in the Polygalaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v.186, p.17-32, 1993.
 49. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo.1988, 488p.
 50. FERRI, M.G. **Plantas do Brasil: Espécies do Cerrado**. São Paulo:Editora Edgard Blücher Ltda, 1969, 239 p.
-

51. FERRI, M.G. **A vegetação do cerrado brasileiro**. In: WARMING, E. & FERRI, M.G.; **Lagoa Santa e a vegetação de cerrados brasileiros**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo. 1973, 424p.
52. FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, p. 621-623, 2000.
53. FRIBERG, S.E.; KAYALI, I.H.; MARGOSIAK, M.; **Stratum Corneum Structure and Transport Properties**. In: OSBORNE, D.W.; AMANN, A.H.; **Topical Drug Delivery Formulations. Drugs and the Pharmaceutical Sciences**. New York: Academic Press. v.42, p. 29-45, 1997.
54. GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALMEIDA, M.B.S.; CARVALHO, E.S.; CASCON, V.; ROCHA, L.M. The official use of medicinal plants in public health. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.339-344, 1997.
55. HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods- a guide to modern techniques of plant analysis**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984, 283p.
56. HASSKARL, J.C. **Bredemeyera Willd. Plantae Junghuhnianae**, part.2: 187-190, 1852.
57. HEPPNER, G.M.; MILLER, B.E. Therapeutic implications of tumor heterogeneity. **Semin Oncol**, v.16, p. 91-105, 1989.
58. HOSTETMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins - chemistry and pharmacology of natural products**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995, 548p.

59. JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice.** San Francisco: W.H. Freeman & Company. 1962, 408p.
 60. JOLY, A.B. **Botânica: Introdução á Taxonomia Vegetal.** São Paulo: Editora Nacional. 1991, 741p.
 61. JUSSIEU, M.A.L. **Sur La Famille Nouvelle Des Plantes Polygalées. Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, v.1, p.385-392, 1815.**
 62. KATO, E.T.M. **Caracterização Farmacognóstica da Raspa de Juá - *Ziziphus joazeiro* Martius.** 1995. 223p. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 63. KATORI, M.; MAJIMA, M. **Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors.** *Nippon Yakurigatku Zasshi*, v.109, n.6, p.247-258, 1997.
 64. KHURY, E.; SEMES, S.; SIEBENROK, E.N.; TREVISAN, C. A.; REPLE, S.I.F. **Concentração Micelar Crítica - Estudo de sua aplicação no desenvolvimento de formulações para shampoos.** *Aerosol & Cosméticos*, v.14, n.87, p.38-40, 1994.
 65. LANJOUW, J.; MANAY, S.H.; McVAUGH, R.; ROBINS, W.; ROLLINS, R.C.; ROSS, R.; ROUSSEAU, J.; SCHULZE, G.M.; De VILMORIN, R.; STAFLEAU, F.A. **International Code of Botanical Nomenclature.** Utrecht: Ed. UNESCO, p.21-50, 1966.
 66. MABRY, T.J.; MARKAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids.** Berlin: Springer-Verlag, Berlin. p. 254-273, 1970.
 67. MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. **A hippocratic screen for pure or crude Drug Materials.** *Lloydia*, v.25, n.4, p.320-332, 1962.
-

68. MARQUES, M.C.M. Revisão das espécies do gênero *Polygala* L. (POLYGALACEAE) do Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia*, v.31,n.48, p. 70-339, 1979.
69. MARQUES, M.C.M. Revisão das espécies do gênero *Bredemeyera* Willd. (POLYGALACEAE) do Brasil. *Rodriguésia*, v.32,n.54, p. 269-321, 1980.
70. MARTINS, J. Caracterização farmacognóstica da Poligalácea *Bredemeyera floribunda* WILLD. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia*, São Paulo, v.7, p. 121-127, 1948/49.
71. MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica Experimental**. Fortaleza:Editora da U.F.C, 1988, p.112.
72. MELCHIOR, H. In: ENGLER, A. **Syllabus der pflanfamilien**. Berlin: Gebruder Bortraeger Nicolasse. v. 2, 1964, 666p.
73. MIYASE, T.; SAITOH, H.; SHIOKAWA, K.; UENO, A. Six New Pressenegenin Glycosides, Reinosides A-F, from *Polygala reinii* Root. *Chem. Pharm. Bull.*, v.43, n.3,p. 466-472, 1995.
74. MONKS, A.; SCUDIERO,D.; SKEHAN,P.; SHOEMAKER,R.; PAULL,K.; VISTICA,D.; HOSE, C.; LANGLEY,J.; CRONISE,P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH,M.; CAMPBELL,H.; MAYO,J.; BOYD,J. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v.83, n.11, p. 757-766, 1991.
75. MORIMOTO,Y.;SHIMOHARA, K.;OSHIMA, S. Effects of the New Anti-Ulcer Agent KB-5492 on Experimental Gastric Mucosal lesions and gastric defensive factors, as compared to those terpenone and cimetidine. *Japan J. Pharmacol.*, v. 57, p.495-505, 1991.

76. OJEWOLE, J.A.; ODEBIYI, O.O.; (1983) Cardiovascular Actions of Aqueous Extracts from the Leaves of *Securidaca longipedunculata* (Polygalaceae). *Int. J. Crude Drug Res.*, v.21, n.01, p. 15-20.
77. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Livraria Atheneu Editora. 1991, 412p.
78. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. *Fundamentos de Farmacobotânica*. São Paulo: Livraria Atheneu Editora. 1986, 216p.
79. ONYAMBOKO, N.V.; DARIMONT, E.; DELAUDE, C. Contribution a L'etude Chimiotaxonomique des Polygalaceae. Examen de la saponine du *Polygala albida* Scinz. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, v.52, n.5, p. 329-330, 1983.
80. PELLETIER, S.W.; NAKAMURA, S. Homoallylic cations involved in the conversion of pressegenin into senegenin. *Tetrahedron Letters*, v. , p. 5303-5306, 1967.
81. PELLETIER, S.W.; NAKAMURA, S.; SOMAN, R. Constituents of *Polygala* species, the structure of tenuifolin, a prossapogenin from *P. senega* and *P. tenuifolia*. *Tetrahedron*, v.27, p. 4417-4427, 1971.
82. PENSO, G. Problemi relative all'uso delle piante medicinali nel mondo. *Bool. Chim. Farm.*, v.116, p.506-519, 1977.
83. PEREIRA, B.M.R., DAROS, M.R.; PARENTE, J.P.; MATOS, F.J.A. Bredemeyeroside D, a novel triterpenoid saponin from *Bredemeyera floribunda*: a potent venom antidote activity on mice. *Phytotherapy Research*, v.10, n.8, p. 666-669, 1996.
84. PEREIRA, N. A.; RUPPELT PEREIRA, B.M.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological Screening of Plant
-

- Recomended by Folk Medicine as Snake Vemom Antidotes; IV. Protection against Jararaca Vemom by Isolated Constituints¹. *Planta Medica*, v.60, p. 99-100, 1994.
85. PERES, V.; NAGEM, T.J. Naturally occurring pentaoxygenated and dimeric xanthones: a literature survey. *Química Nova*, v.20, n.4, p. 388-397, 1997.
86. PILLION, D.J.; AMSDEN, J.A.; KENSIL, C.R.; RECCHIA, J. Structure-Function Relationship among *Quilaja* Saponins Serving as Excipients for Nasal and Ocular Delivery of Insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85,n.05, p. 518-524, 1996.
87. PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos Correlatos e Cosméticos**. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo. p.272-309, 2000.
88. PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro:Imprensa Nacional do Ministério da Agricultura, Ind. e Comércio.1975. v.5, p.594-595.
89. PIZÃO, P.E. **Multilayered postconfluent tumor cell cultures as a model for in vitro chemosensitivity tests**. 1992. 150f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)-Vrije Universiteit, Amsterdam.
90. PLANCHON, J.E.; TRIANA, J. *Catocoma Benth*. *Annales des Sciences Naturalles Série Botanique*, 17 (5):133, 1862.
91. PRATAP, G.; RAO, S.B. Evaluation of Surface Active Properties of Saponins Isolated from *Acacia concima* D.C. Pods. *Fat Science Technology*, v.89, n.05, p. 205-208, 1987.
92. RAO, V.S.N.; MENEZES, A.M.S.; VIANA, G.S.B.; GADELHA, M.G.T. Experimental evaluation of *Bredemeyera floribunda* in

acute gastric lesions induced by ethanol, acetylsalicylic acid and histamine. *Fitoterapia*, v.61,n.01, p. 9-12, 1990.

93. RIZZINI, C.T. Sobre alguns aspectos do cerrado. *Brasil Florestal*, v.1, n.1, p. 20 – 34, 1970.
 94. SAINT-HILAIRE, A.F.C.P. Polygalae in Saint-Hilaire, Jussieu et Cambessèdes, *Flora Brasiliae Meridionalis*, 2: 5-75, t.83-96, 1829.
 95. SALGADO-LABORIAU, M.L.; MORHY, L. Pollen grains of plants of the "cerrado". XXII: *Mysinaceae, Ochnaceae and Polygalaceae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.41, n.2, p. 249-258, 1969.
 96. SAKUMA, S.; SHOJI, J. Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. I. On the Structures of Onjisaponins G and F. *Chem. Pharm. Bull.*, v.29, n.9, p. 2431-2441, 1981.
 97. SAKUMA, S.; SHOJI, J. Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. II. On the Structures of Onjisaponins A, B e E. *Chem. Pharm. Bull.*, v.30, n.3, p. 810-821, 1982.
 98. SANTOS, W.R.; BERNARDO, R.R.; PEÇANHA, L.M.T. ; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P.; SOUZA, C.B.P. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v.15, n.9: 1024-1029, 1997.
 99. SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T.E. *Skin Barrier – principles of percutaneous absorption*. New York:Karger, p.224-235, 1996.
-

100. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. **Saponinas**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 2.ed. Rio Grande do Sul:Ed. Universidade. p. 597-622, 2000.
 101. SEQUEIRA, J.A. Optization of the skin availability of topical products. **Cosmet. Toiletries**, v.105, p.114-121, 1990.
 102. SEZIK, E.; YESILADA, E. A new saponin from the roots of *Polygala pruinosa*. **Fitoterapia**, v.56,p. 159-162, 1985.
 103. SHAW, D.J. **Introdução a química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 185p.
 104. SHIMIZU, S.; PELLETIER, S.W. Cyclo-senegenin, a derivative of Senegenin in *Polygala senega*. **Journal of the American Chemical Society**, v.87, n.9, p. 2065-2066, 1965.
 105. SHIMIZU, S.; PELLETIER, S.W. Elucidation of the Structures of the Sapogenins of *Polygala senega* by Correlation with Medicagenic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v.88, n.7, p. 1544-1549, 1966.
 106. SHOJI, J.; KAWANISHI, S.; TSUKITANI, Y. Studies on the constituents of Senega Radix I. The structure of Senegenins from *Polygala senega* var. *latifolia* Torrey et Gray (Polygalaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, v.19,p.1740, 1971.
 107. SILVEIRA, E.R.; FALCÃO, M.J.C.; MENEZES JUNIOR, A.; KINGSTON, D.G.I.; GLASS, T.E. Penta-oxygenated Xanthenes from *Bredemeyera floribunda*. **Phytochemistry**, v.39, n.6,p. 1433-1436, 1995.
-

108. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Trad. ALENCASTRO, R.C.; 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994. 379p.
109. SOUZA-BRITO, A.R.M. **Manual de Ensaio Toxicológicos "In Vivo"**. São Paulo: Editora Três, 1994. 122p.
110. TSCHESCHE, R.; GUPTA, A.K.S. Über die Sapogenine von *Bredemeyera floribunda* Willd. **Chem Ber.**, v.30, p.1903-1913, 1960.
111. TSUKITANI, Y.; KAWANISHI, S.; SHOJI, J. Studies on the Constituents of Senegae Radix. II. The Structure of Senegenin-II, a Saponin from *Polygala senega* Linné var. *latifolia* Torrey et Gray. **Chem. Pharm. Bull.**, v.21, n.4, p. 791-799, 1973.
112. UGAZ, O.L. **Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales**. 2.ed. Peru: Fondo Editoril P.U.C. 1994. 229p.
113. WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer-Verlag. p.163-244, 1984.
114. WASICKY, R.; FERREIRA, C. As saponinas da raiz de *Bredemeyera floribunda* WILLD., droga da medicina popular brasileira. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia**, São Paulo, v.7, p. 341-350, 1948/49.
115. WASICKY, R.; FERREIRA, C. Influência da saponina da *Bredemeyera floribunda* WILLD. sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Phaseolus vulgaris* L. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia**, São Paulo. v.7, p. 351-359, 1948/49.

116. WILLDENOW, N. ~~Schr.~~ Ges. Naturf. Freunde Berl. 3, p. 411. t. 6. 1801, 1801.