



Marcus Vinícius Terashima De Pinho

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos
obtidos de *Laguncularia racemosa* e atividade inibitória sobre SPLA2
extraída de *Bothrops jararacussu***

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Marcus Vinícius Terashima De Pinho

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos obtidos de
Laguncularia racemosa e atividade inibitória sobre SPLA2 extraída de *Bothrops*
jararacussu

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título
de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO MARCUS VINÍCIUS
TERASHIMA DE PINHO ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCOS HIKARI
TOYAMA.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Toyama", is written above a horizontal line.

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P655w Pinho, Marcus Vinícius Terashima de, 1987-
Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de extratos obtidos de *Laguncularia racemosa* e atividade inibitória sobre SPLA2 extraída de *Bothrops jararacussu* / Marcus Vinícius Terashima de Pinho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcos Hikari Toyama.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Laguncularia racemosa*. 2. Anti-inflamatórios. 3. Flavonóides. 4. Combretaceae. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phytochemical study and pharmacological activity from *Laguncularia racemosa* extracts and inhibitory activity of SPLA2 extracted from *Bothrops jararacussu*

Palavras-chave em inglês:

Laguncularia racemosa
Anti-inflammatory agents
Flavonoids
Combretaceae

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Marcos Hikari Toyama [Orientador]
Marcelo José Pena Ferreira
Felipe Meira de Faria

Data de defesa: 28-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARCUS VINÍCIUS TERASHIMA DE PINHO

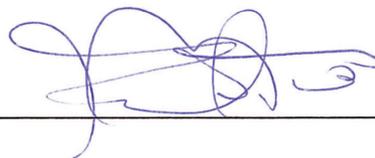
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARCOS HIKARI TOYAMA

MEMBROS:

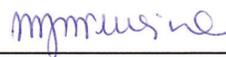
1. PROF(A). DR(A). MARCOS HIKARI TOYAMA



2. PROF(A). DR(A). FELIPE MEIRA DE FARIA



3. PROF(A). DR(A). MARCELO JOSÉ PENA FERREIRA



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 28 de agosto de 2014

RESUMO

A *Laguncularia racemosa*, popularmente conhecida como mangue branco é uma das três principais árvores encontradas nos manguezais brasileiros. Esta espécie também está presente em outros países além do Brasil e na medicina popular é usado como tônico, adstringente e outras doenças. No Brasil é uma planta relativamente bem estudada, existem poucos estudos fitoquímicos. As Fosfolipases A2 são enzimas responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídeos de membrana gerando o ácido araquidônico, que é o principal metabólito da cascata da inflamação. Nesta pesquisa apresentamos os resultados do estudo fitoquímico de *L. racemosa* a partir do particionamento dos seus extratos metanólico e hidroalcoólico, utilizando as técnicas de CLAE, EM e RMN. Além disso, mostramos o efeito dos extratos sobre a atividade enzimática e farmacológica da sPLA2 de *Bothrops jararacussu* medindo a atividade antiinflamatória e miotóxica. Foram selecionadas as fases em AcOEt e BuOH do extrato metanólico para investigação química e farmacológica. A fase em AcOEt foi submetida a EM que permitiram a identificação de 10 novos flavonóides glicosilados sendo que alguns raros e derivados da quercetina e miricetina. A fase em n-BuOH após fracionamento em cromatografia em coluna permitiu o isolamento de 12 grupos (L1-L12), sendo que L4 quando submetidos a CLAE EM/EM mostrou a presença de 8 flavonoides parecidos com os presentes na fase em AcOEt. As fases em AcOEt e n-BuOH nas doses de 5, 10 e 20mg/Kg inibiram de forma significativa a atividade edematogênica da sPLA2, sendo que a máxima inibição foi de 88% e 94%, respectivamente para as fases testadas. As fases não inibiram de forma significativa a atividade miotóxica da sPLA2. A atividade enzimática das sPLA2 tiveram valores reduzidos para 58% e 64% em presença das fases AcOEt e BuOH do extrato metanólico. Os resultados mostram que o manguezal tem um grande potencial para o estudo de novas moléculas antiinflamatórias mediadas pela PLA2 e que o efeito antiedematogênico induzido pelas fases testadas decorre da diminuição da atividade enzimática da sPLA2, corroborado pelo fato de que a atividade miotóxica não foi inibida pelas fases e somente a atividade edematogênica.

Palavras chave: *Laguncularia racemosa*; antiinflamatórios; flavonóides; combretaceae

ABSTRACT

Laguncularia racemosa, popularly known as white mangrove is one of the three main trees found in Brazilian mangroves. This species is also present in other countries besides Brazil and is used in folk medicine as a tonic, astringent, and other diseases. This plant in Brazil is relatively well studied, there are few phytochemical studies. Phospholipases A2 are the enzymes responsible for the hydrolysis of membrane phospholipids producing arachidonic acid, which is the principal metabolite of the inflammation cascade. In this study we present the results of *L. racemosa* phytochemical study from its partitioning of methanol and hydroalcoholic extracts, using the techniques of HPLC, NMR and MS. Furthermore, we show the effect of the extracts on the enzymatic and pharmacological activity of *Bothrops jararacussu* sPLA2 measuring the anti-inflammatory activity and myotoxic. The phases selected were EtOAc and BuOH of methanol extract for chemical and pharmacological research. The EtOAc phase was subjected to MS which allowed the identification of 10 new flavonoid glycosides and some rare and derivatives of quercetin and myricetin. The n-BuOH phase after fractionation on chromatography column allowed the isolation of 12 groups (L1-L12), wherein L4 when subjected to HPLC MS / MS showed the presence of 8 with similar flavonoids present in the EtOAc phase. The phases in EtOAc and n-BuOH at doses of 5, 10 and 20 mg / kg significantly inhibited the edema activity of sPLA2, and maximal inhibition was 88% and 94% respectively for the tested phases. The phases did not inhibit significantly the activity of sPLA2 myotoxicity. The enzymatic activity of sPLA2 had lower values for 58% and 64% in the presence of EtOAc and BuOH phases of the methanol extract. The results show that the mangrove has great potential for the study of new anti-inflammatory molecules mediated by PLA2 and the antiedematogenic effect induced by the tested phases from the inhibitions of enzymatic activity of sPLA2, corroborated by the fact that the myotoxic activity was not inhibited by phases and only edematous activity.

Keywords: *Laguncularia racemosa*; anti-inflammatory, flavonoids; combretaceae

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xv
AGRADECIMENTOS	xvii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xix
LISTA DE TABELA.....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Naturais	1
1.2. Produtos Naturais e o Mangue	3
1.3. Flavonóides provenientes do Mangue.....	5
1.4. <i>Laguncularia racemosa</i>.....	7
1.5. Inflamação e a PLA2	9
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos gerais	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Instrumentos e Reagentes empregados.....	17
4.2. Coleta e identificação do material vegetal.....	18
4.3. Animais experimentais	18
4.4. Procedimentos experimentais	18
4.4.1. Obtenção dos extratos metanólico e hidroalcoólico.....	18
4.4.2. Obtenção das fases de partição do extrato metanólico bruto	19

4.4.3. Obtenção das fases de partição do extrato hidroalcoólico bruto.....	19
4.4.4. Purificação da sPLA2 de <i>Bothrops jararacussu</i>	20
4.4.5. Avaliação da atividade antifosfolipásica das fases e grupos selecionados	21
4.4.6. Inibição do edema de pata em camundongos, induzido pela injeção intraplantar de sPLA2.....	21
4.4.7. Inibição do efeito miotóxico medido pela Creatina Quinase (CK) sérica induzido por sPLA2	22
4.4.8. Inibição do edema de pata em camundongos, induzido pela injeção intraplantar das fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico incubadas com sPLA2.....	22
4.4.9. Fracionamento da fase em n-butanol do extrato metanólico em Sephadex LH-20	23
4.4.10. Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS	27
5.1. Análises em CLAE-UV das fases selecionadas	27
5.2. Identificação dos flavonóides da fase em acetato de etila do extrato metanólico por CLAE-DAD-EM	31
5.3. Análises em CLAE-UV das frações obtidas no fracionamento por Sephadex LH-20 da fase em n-BuOH do extrato metanólico.....	33
5.4. Identificação dos flavonóides da fração L4 da fase em n-butanol do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> por CLAE-EM.....	35
5.5 Efeito da administração intraperitoneal da fase em AcOEt do extrato metanólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos	38
5.6 Efeito da administração intraperitoneal da fase em n-BuOH do extrato metanólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos	39
5.7 Efeito da administração intraperitoneal da fase aquosa, resultante dos procedimentos de partição com o extrato metanólico, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos.....	40

5.8. Efeito da administração intraperitoneal da fase em AcOEt oriunda do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos	42
5.9. Efeito da administração intraperitoneal da fase em n-BuOH do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos	43
5.10. Efeito da administração intraperitoneal da fase aquosa resultante dos procedimentos de partição do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos.....	44
5.11. Influência da incubação entre as fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico, ambas com a sPLA2 no edema de pata induzido pela injeção intraplantar do incubado em camundongos	46
5.12. Efeito inibitório das fases de extratos de L. racemosa sobre a atividade fosfolipásica da sPLA2.....	47
5.13. Efeito inibitório dos grupos obtidos no fracionamento da fase em n-butanol do extrato metanólico de L. racemosa sobre a atividade fosfolipásica da sPLA2	49
5.14. Inibição da atividade miotóxica da sPLA2 resultante da incubação com as fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	73

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a natureza,
por prover tudo de necessário para a realização deste
e, principalmente por prover a vida.**

**Também dedico aos meus pais,
por me ensinar a base da educação e do conhecimento.**

**Por final, dedico a minha esposa,
pelo amor, carinho, dedicação e força durante todos estes
anos juntos.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Dra. Daniela Toyama, minha orientadora de TCC que pôde propiciar esta chance.

Ao meu orientador, Dr. Marcos Hikari Toyama pela oportunidade, pelo espaço e pelo conhecimento repassado.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie, por me dar toda a base de formação necessária para o meu crescimento profissional.

Em especial, o Dr. Marcelo José Pena Ferreira, por toda a dedicação, conhecimento, disponibilidade, paciência e amizade conquistada.

Aos meus pais, Denise e Marcos, pelo apoio não apenas nos momentos difíceis, mas em todas as etapas da vida.

A minha esposa Agna por me incentivar todos os dias e acreditar que tudo vai dar certo!

O meu grande amigo Michael, por dividir os bons momentos e também as angústias. A Laci e Aline por me ajudarem sempre que podiam.

Aos colegas da UNESP, Baloo, Daniel, Camila e Mariana pelas horas de alegria e ensinamentos que vivemos no laboratório.

Aos colegas do Mackenzie, professores, técnicos, alunos de mestrado e de IC pela alegria compartilhada dia-a-dia durante vários meses.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP pelo ótimo trabalho que realizam, por me socorrerem nas dúvidas procedimentais, nos experimentos e na concessão do comitê de ética.

Ao curso de Pós Graduação da FCM, por me oferecer a estrutura necessária.

Aos colegas da Residência Farmacêutica, pela amizade e apoio durante essa etapa.

A agência de fomento CNPq, pela bolsa concedida durante o período.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 – Estrutura geral dos flavonoides.	6
Figura 2 – <i>Laguncularia racemosa</i> popularmente conhecida como mangue branco.	8
Figura 3 – Fluxograma para a obtenção dos extratos e fases de partição.	20
Figura 4 – Fluxograma de fracionamento da fase em n-BuOH do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> e reunião dos grupos com suas respectivas massas.	24
Figura 5 – Cromatograma da fase AcOEt do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	27
Figura 6 – Espectros de absorção em UV dos picos 3 e 4 do cromatograma da fase em AcOEt do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	28
Figura 7 – Espectros de absorção em UV dos picos 5 e 6 do cromatograma da fase em AcOEt do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	29
Figura 8 – Cromatograma da fase em n-BuOH do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	30
Figura 9 – Representação dos flavonóides identificados na fase em acetato de etila do extrato metanólico.	31

Figura 10 – CLAE-EM da fase em acetato de etila oriunda do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	32
Figura 11 – Cromatograma do grupo L4, fracionado da fase n-BuOH do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> .	33
Figura 12 – Espectros de absorção em UV dos picos 3 à 7 do cromatograma da fração L4.	34
Figura 13 – Cromatograma do grupo L7, f apresentando um pico majoritário em $T_r = 3,7$	35
Figura 14 – Representação dos flavonóides identificados na fase em AcOEt do extrato metanólico.	36
Figura 15 – Cromatograma realizado no IQ-USP em CLAE-EM do grupo L4 proveniente do fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>L. racemosa</i> .	37
Figura 16 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em acetato de etila do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05	38
Figura 17 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em butanol do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05	40

Figura 18 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase aquosa do extrato metanólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05 **41**

Figura 19 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em acetato de etila do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05 **42**

Figura 20 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em n-butanol do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05 **44**

Figura 21 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase aquosa resultante da partição do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05 **45**

Figura 22 – Edema de pata em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) utilizando como agente flogístico a substância controle (tampão PBS), sPLA2 (12,5µg/pata), as fases em acetato de etila e em butanol do extrato metanólico (12,5µg/pata) e os incubados das fases em acetato de etila e em butanol do extrato metanólico com a sPLA2 (1:1 12,5 + 12,5µg/pata). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05 **46**

Figura 23 – Efeito das fases em acetato de etila, n-butanol e aquosa dos extratos metanólico e hidroalcoólico e dos respectivos extratos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **48**

Figura 24 – Efeito das fases em acetato de etila, n-butanol e aquosa dos extratos metanólico e hidroalcoólico e dos respectivos extratos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o NOBA como substrato com tempo de incubação de 60 minutos. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **48**

Figura 25 – Efeito da fase em butanol do extrato metanólico e de seus grupos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o NOBA como substrato. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **49**

Figura 26 – Efeito da fase em butanol do extrato metanólico e de seus grupos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o NOBA como substrato com tempo de incubação de 60 minutos. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **50**

Figura 27 – Atividade da enzima Creatina Quinase de camundongos tratados com sPLA2 (50µL, 25µg), solução salina, fase em AcOEt do extrato em MeOH (50µL, 25µg) e incubado entre sPLA2 e fase em AcOEt do extrato em MeOH (50µL, 25µg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **51**

Figura 28 – Atividade da enzima Creatina Quinase de camundongos tratados com sPLA2 (50µL, 25µg), solução salina, fase em n-BuOH do extrato em MeOH (50µL, 25µg) e incubado entre sPLA2 e a fase em n-BuOH do extrato em MeOH (50µL, 25µg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05 **51**

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico da fase em n-BuOH do extrato metanólico de <i>L. racemosa</i> – grupos, frações reunidas e massas obtidas.	25
Tabela 2. Dados de CLAE-EM da fase em acetato de etila proveniente do extrato metanólico das folhas de <i>Laguncularia racemosa</i>	32
Tabela 3. Dados de CLAE-EM da fração L4 fase em n-butanol proveniente do extrato metanólico das folhas de <i>Laguncularia racemosa</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila

AINE: anti-inflamatório não esteroide

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ara: Arabinosídeo

AUC: Área sob a curva

Ca²⁺: Íon cálcio

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CI₅₀: concentração inibitória 50%

CK: Creatina quinase

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COX-1: Cicloxigenase-1

COX-2: Cicloxigenase-2

cPLA2: Fosfolipase A2 citossólica

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetil Sulfóxido

ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima

et al: e colaboradores

EM: Espectrometria de massas

Glc: Glicosídeo

H₂O: água destilada

HDL: lipoproteínas de alta densidade

Hex: Hexano

km²: quilômetros quadrados

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

MeOH: Metanol

mg: miligrama

mL: mililitro

n-BuOH: n-Butanol

nm: nanômetros

NOBA: ácido 4-nitro-3-octanoil benzoico

PBS: phosphate buffered saline

PGE2: prostaglandina E2

pH: Potencial hidrogeniônico

PLA2: Fosfolipase A2

Rha: ramnosídeo

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

sPLA2: Fosfolipase A2 secretória

T_r: Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

Virus HCV: Virus da Hepatite C

Xil: Xilosídeo

μM: micromolar

μg: micrograma

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

Há muito tempo compostos provenientes de produtos naturais, notavelmente os originados de plantas, têm sido uma importante fonte de agentes terapêuticos. Segundo Gurib-Fakim (2006) cerca de 50% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são produtos naturais advindos de plantas, algas e microorganismos. Estes produtos têm sido frequentemente utilizados pelos humanos para combater doenças crônicas e agudas. A investigação sobre as possíveis aplicações destes produtos naturais sobre determinados tipos de doenças está condicionado aos resultados de uma bateria de ensaios realizados tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” (Toyama *et al.*, 2009).

A maior fonte do uso de plantas medicinais está nos conhecimentos etnofarmacológicos de comunidades tradicionais (Viegas *et al.*, 2006). Contudo, este conhecimento transmitido de forma oral vem se perdendo por razões históricas e pelo avanço da medicina tradicional. Hoje existe um mercado promissor para a descoberta de novos medicamentos e fármacos a partir de plantas, assim as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novos fármacos e compostos com atividade terapêutica (Calixto, 2005).

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas é considerado um fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e terapêuticas ao longo do tempo (Viegas, Bolzani e Barreiro, 2006). A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animal-inseto-plantas. Neste sentido, a natureza forneceu muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (Viegas, Bolzani e Barreiro, 2006).

Baseados no conhecimento empírico sobre propriedades terapêuticas de algumas plantas, foram desenvolvidos alguns dos mais valiosos medicamentos

utilizados na medicina científica, como os digitálicos, quinina, morfina, atropina, aspirina, entre outros (Simões *et al.*, 2007).

Na atualidade, há uma enorme variedade de compostos encontrados em plantas. As pesquisas que se apoiam nestas substâncias são realizadas a partir dos compostos puros ou semi-purificados e trazem consigo um grande potencial para inovações farmacológicas e pesquisas de novos modelos moleculares (Marcussi *et al.*, 2007).

Entretanto, os produtos naturais geralmente não são utilizados na sua forma pura, sendo mais comumente utilizados como protótipo ou modelo para o engenho de fármacos sintéticos. Além disso, também exibem características moleculares complexas, que virtualmente inviabilizam sua síntese. Esta complexidade estrutural é relativamente comum e que também reflete sua grande diversidade estrutural (Barreiro e Bolzani, 2009).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos especiais, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica (Filho e Yunes, 1997)

O mesmo ocorre na pesquisa de produtos naturais marinhos, na qual temos micro e macro algas, corais e fungos produtores de metabólitos especiais. Nesta área do conhecimento, temos moléculas de grande interesse biológico, pois assim que são liberados pelos organismos, são rapidamente diluídos no mar, caracterizando compostos de grande potência, pois mesmo em baixas concentrações podem exercer efeitos tóxicos (Boopathy e Kathiresan, 2010; Teixeira, 2013). Neste sentido, estudos farmacológicos, biológicos, químicos e multidisciplinares são fundamentais para avaliar o potencial farmacêutico das frações bem como das substâncias puras. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade farmacológica foi realmente determinado.

Uma revisão publicada por Oliveira e colaboradores (2013), nos mostra que as pesquisas de produtos naturais vão além da procura de metabólitos especiais em plantas, microrganismos e animais. Na busca por novas moléculas, estes pesquisadores usam da engenharia genética para encontrar os genes que codificam os metabólitos especiais, facilitando a pesquisa e o estudo de etapas metabólicas, tanto em plantas quanto em microrganismos. Um outro exemplo desta multidisciplinaridade

relacionado às pesquisas de produtos naturais está compreensão das rotas metabólicas envolvidas na biossíntese destes compostos, o que tem levado a várias pesquisas no sentido de aumentar a velocidade dessas rotas metabólicas para aumentar a produção de determinados metabólitos.

Desta forma, para obter substâncias puras dotadas de efeitos biológicos, são requeridos dedicação e da determinação dos pesquisadores, além de uma ampla colaboração multidisciplinar (Filho e Yunes, 1997).

1.2. Produtos Naturais e o Mangue

O mangue define um ecossistema intertidal úmido, sendo formado por uma associação entre plantas e animais que estão próximas a áreas costeiras e estuarinas, sendo estes, locais que possuem distintas condições de salinidade e chuva decorrente da ação das marés. Seu constante desenvolvimento e manutenção dependem de climas úmidos e quentes condizentes com as áreas litorâneas onde se encontram.

É um ecossistema importante e relativamente jovem em comparação com outros tipos de biomas e ocupa uma área de aproximadamente 8% de toda linha costeira global e no Brasil este bioma esta presente ao longo da costa brasileira, que representa aproximadamente a 8,5% de todo manguezal do planeta (Spalding et al., 2010; Giri et.al. 2010).

Essas condições tornam os manguezais um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, contribuindo como principal exportador de matéria orgânica para o estuário, para reprodução de peixes, crustáceos e moluscos, sendo considerado berçário para algumas espécies. (Bandaranayake, 1998).

No Brasil prevalecem somente três espécies de plantas que são o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), enquanto que o mangue preto (*Avicennia schaueriana*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) (Miles et al., 1999).

A vegetação dos manguezais é usada como matéria prima para a criação de produtos tradicionais e artesanais e também fornece alimento para os moradores de áreas próximas ao mangue. Extratos e produtos químicos de mangues são utilizados principalmente na medicina popular indiana, como inseticidas e piscicidas

(antiespasmódico) e estas práticas continuam até a atualidade (Bandaranayake, 2002). No entanto, a extração de novos compostos químicos provenientes de mangue, para além dos já conhecidos ainda permanece aberta a novas investigações.

No Brasil, temos presente apenas os 3 gêneros já citados, sendo que os mais estudadas estão presentes apenas em países da Ásia, África e Oceania (Bandaranayake, 2002).

Existem estudos mostrando que as plantas do mangue sintetizam compostos bioativos que podem ser utilizados na área médica, agrônômica, cosmética e outras relacionadas na forma de sais, ácidos orgânicos, carboidratos, hidrocarbonetos, benzoquinonas, naftofuranos, sesquiterpenos, triterpenos, alcalóides, flavonóides, polímeros, derivados sulfurosos e taninos (Li *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 1999; Sharaf *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008).

Um exemplo disso são os trabalhos realizados com o gênero *Avicennia* pertencente à família Acanthaceae, uma espécie cosmopolita amplamente distribuída ao longo dos litorais tropicais e subtropicais. As cascas, folhas e frutos dessa planta têm sido utilizadas na medicina tradicional no Egito como tratamento para doenças de pele. Investigações posteriores realizadas com diferentes partes da planta (casca, folha, galhos, etc) de *Avicennia marina* e do processamento principalmente de fungos endofíticos resultou no isolamento de mais de 100 compostos naturais, sendo a maioria destes inéditos. Grande parte dos compostos produzidos pelos fungos endofíticos eram diferentes dos do hospedeiro, porém alguns metabólitos especiais de *Avicennia marina* foram encontrados nos fungos e alguns metabólitos especiais dos fungos endofíticos encontrados foram encontrados na planta. As investigações realizadas com essa planta mostra que existe uma relação de simbiose entre o fungo endofítico e a planta e que ambas compartilham de estruturas químicas semelhantes (Zhu *et al.*, 2009).

Quanto aos estudos farmacológicos e biológicos, foram demonstradas atividades diversas por parte de extratos de espécies presentes em manguezais, como: antioxidante (Sánchez *et al.*, 2006; Berenguer *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2009), cicatrizante (Fernandez *et al.*, 2002), antibacteriano (Melchor *et al.*, 2001; Rotimi *et al.*, 1988; Abeysinghe e Wanigatunge, 2006; Ravikumar *et al.*, 2010), antiinflamatório (Kapil *et al.*, 1994), antitumoral (Loder e Russell, 1969) e antiulceroso (de Faria *et al.* 2012).

Além disso, outros estudos também mostraram diterpenos isolados de *Caesalpinia mimosoides* e *Excoecaria agallocha* com atividade antiinflamatória (Yodsaoue *et al.*, 2010; Li *et al.* 2010), flavonóides de *Derris scandens* e *Pongamia pinnata* com atividade antiinflamatória (Ganapaty *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006), isoflavonóides de *Derris scandens* e *Ipomoea pes-caprae* com atividade antiinflamatória e antinociceptiva (Ganapaty *et al.*, 2006; Laupattarakasem *et al.*, 2004), monoterpenos de *Ipomoea pes-caprae* com inibição da síntese de prostaglandinas (Pongprayoon *et al.*, 1991), esteroides de *Heritiera littoralis* com inibição da produção de oxido nítrico (Tewtrakul *et al.*, 2010), triterpenos de *Ipomoea pes-caprae* com atividade antinociceptiva (Krogh *et al.*, 1999), xantonas de *Calophyllum inophyllum* com atividade antiinflamatória (Gopalakrishnan *et al.*, 1980) e compostos não identificados de *Calophyllum inophyllum* também com atividade antiinflamatória (Bhalla *et al.*, 1980).

1.3. Flavonóides Provenientes do Manguê

Segundo Pietra 2000, até esta presente revisão haviam sido isolados e caracterizados mais de 8000 diferentes flavonoides, que estão distribuídos em torno de 13 classes. Porém estes números merecem uma revisão mais detalhada, que não é o objetivo desta introdução.

As principais classes de flavonoides são: flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina, fisetina), flavonas (luteolina, apigenina), flavanonas (hesperetina, naringenina), flavonóides glicosídeos (astragalin, rutina), flavonolignanos (silibinin), flavanas (catequina, epicatequina), as isoflavonas (genisteína, daidzeína), antocianidinas (cianidina, delphinidina), aurones (leptosidin, aureusidin), leucoantocianidinas (teracacidin), neoflavonoides (coutareagenin, dalbergin) e chalconas. Todas as classes de flavonóides exibe variedade de atividades biológicas, mas, entre eles, as flavonas foram as mais explorados e a maior parte dos estudos se concentraram nesta classe. Assim, vários derivados naturais, semi-sintéticos e sintéticos de flavonas foram sintetizados e avaliados para diversas actividades terapêuticas, como antiinflamatórios, anti-estrogénica, antimicrobiana, anti-alérgica, anti-oxidante, anti-tumoral e actividades citotóxicas (Singh *et al*, 2014).

Como podemos ver na Figura 2, os flavonoides possuem duplas ligações covalentes conjugadas em sua molécula, sendo responsáveis pela absorção dos raios

UV nas folhas (Harbone, 1977), pigmentação nas flores (Harbone, 1985) e ação antioxidante (Harbone, 1985; Harbone e Williams, 2000). Por outros mecanismos, sua estrutura confere as plantas, proteção contra fungos, insetos, bactérias e vírus, além de interferirem em processos germinativos de sementes e reprodução de mudas (Harbone, 1985; Harbone e Williams, 2000).

Dentre essas atividades, a de maior importância para nós é a antioxidante, podendo ser atribuída por desempenhar os papéis de sequestradores de radicais livres e quelantes de ferro (Ratty e Das, 1988). Essas propriedades protegem os tecidos contra o ataque de espécies reativas de oxigênio e da ação da lipoperoxidação, processos que estão diretamente envolvidos em diversas enfermidades como aterosclerose, câncer e inflamações crônicas (Halliwell e Gutteridge, 1994).

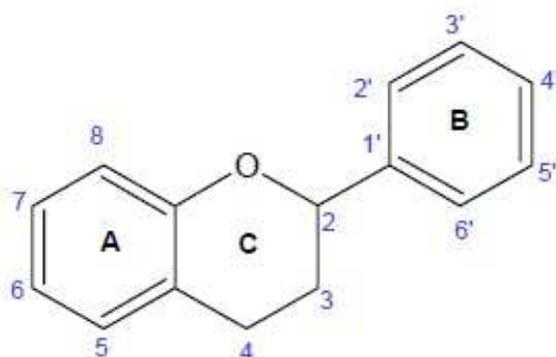


Figura 1 – Estrutura geral dos flavonoides.

Os flavonoides também atuam na inibição de enzimas tais como lipoxigenase e cicloxigenase (Hoult *et al.*, 1994); monoxigenase (Siess *et al.*, 1995); xantino-oxidase (Cotelle *et al.*, 1996); fosfolipase A2 (Gil *et al.*, 1994; Lättig *et al.*, 2007) e proteínas quinases (Cushman *et al.*, 1991).

A inibição de enzimas específicas do metabolismo do ácido araquidônico reduz a formação dos eicosanoides, conferindo aos flavonoides propriedades antiplaquetárias (Tzeng *et al.*, 1991); anti-isquêmicas (Rump *et al.*, 1995); antialérgicas e antiinflamatórias (Middleton Jr e Kandaswami, 1993).

Numa revisão feita por Shilpi e colaboradores, 2012, foram evidenciados flavonóides e isoflavonóides com atividade antiinflamatória e antinociceptiva isolados de *Derris scandens*. Um dos grupos de estudo utilizou como teste farmacológico o teste de edema de pata, amplamente utilizado para avaliação farmacológica inflamatória de

extratos e novos compostos. Também foram utilizados outros testes como o de contorções induzidas por ácido acético e teste da formalina para a obtenção dos resultados de antinocicepção.

Em 2009, numa outra revisão realizada por Li e colaboradores, foi reportado o isolamento de 10 flavonóides no gênero *Acanthus*, entre eles os conhecidos quercetina, apigenina, luteolina e outros derivados glicosilados. Suas atividades farmacológicas não foram testadas. Nesta mesma revisão foi reportado o isolamento dos flavonóides quercetina e kaempferol glicosilados com o fragmento galoil da espécie *Pemphis acidula*, uma planta do mangue japonês, todos com atividade anti-radicalar significativa.

Li e colaboradores, 2009, ainda relataram 8 flavonóides em *Heritiera littoralis*, entre eles novamente a quercetina, kaempferol, miricetina, eriodictiol e seus derivados glicosilados. Popularmente essa planta é utilizada para tratar diversos tipos de diarreia. Também é evidenciado o uso terapêutico popular de espécies do mangue, principalmente para doenças do trato gastrointestinal além de outros usos etnofarmacológicos pouco estabelecidos (Tewtrakul *et al.*, 2010). Esta grande revisão reúne trabalhos feitos de 1995 até 2007 nos quais foram isolados 228 metabólitos entre eles 22 flavonóides, mostrando que pouco deste imenso ecossistema foi explorado.

Sharaf e colaboradores, 2000, isolaram de *Avicennia marina* quatro flavonóides glicosilados mostrando atividades citotóxicas frente células BT-20.

Além disso, Shi e colaboradores, 2010, relatam que a planta possui grande conteúdo de taninos em suas cascas e folhas. Esse mesmo trabalho isolou 4 flavonóides dessa mesma planta, representando uma parte menor de seus metabólitos.

1.4. *Laguncularia racemosa*

A *Laguncularia racemosa* (mangue branco; também conhecida pela sinonímia como *Conocarpus racemosa*; figura 3) é uma espécie de planta pertencente à Combretaceae, gênero *Laguncularia* (Gaertn. f. 1805). É uma planta nativa da costa da África Ocidental, do Senegal aos Camarões, na costa atlântica das Américas desde as Bermudas, Flórida, Bahamas, México, Caribe e sul até o Brasil; e na costa do Pacífico da América do Norte, México até noroeste do Peru, incluindo as ilhas Galápagos.



Figura 2 – *Laguncularia racemosa* popularmente conhecida como mangue branco.

Dentro da família Combretaceae além da *Laguncularia* como gênero monotípico da costa africana e nas Américas, existe também a presença da *Lumnitzera* com duas espécies que são muito parecidos com a *Laguncularia*, mas são espécies predominantes na Ásia (Tomlinson, 1986).

Apesar de ser um gênero amplamente estudado (Alongi *et al.* 2002; Lee, 1995), os estudos farmacológicos e fitoquímicos ainda são poucos.

Na Índia, a casca dessa planta é utilizada como tônico, adstringente, contra aftas, disenteria, febre amarela, hipertermia e escorbuto, além de apresentar atividades antimicrobianas (Bandaranayake, 1998).

Durante a pesquisa bibliográfica foi encontrado apenas um estudo relatando suas atividades farmacológicas, neste, foram isolados 27 compostos fenólicos, dentre eles 4 flavonóides, os quais foram observados em alguns compostos atividades antioxidante e inibitória de proteínas quinase. Na atividade antioxidante, os compostos foram comparados ao ácido caféico, levantando a hipótese de que a capacidade de sequestrar radicais livres é inerente ao grupo cafeoil. Já a inibição de proteínas quinase nos levam a crer que esses compostos apresentam propriedades anti-tumorais. Além disso, estas moléculas foram testadas para a ação inseticida, na qual análogos do

ácido elágico foram inseridos na dieta de insetos o que levou a inibição do crescimento de suas larvas. (Shi *et al.*, 2010). Também temos dois estudos fitoquímicos que isolaram outras moléculas com possíveis atividades como polissacarídeos, lipídios e um nor-sesquiterpeno sulfatado (Pinto *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 2008).

Estudos realizados com microrganismos endofíticos nos mostram que estes podem formar uma relação de simbiose com a planta, utilizando-a como fonte de substratos, nutrientes e proteção, e a planta utiliza da produção de metabólitos especiais dos endófitos com a finalidade de evitar a herbivoria e o ataque de patógenos. Assim, os fungos endofíticos presentes no ecossistema marinho podem produzir moléculas das mais diversas, possuindo intrinsecamente um enorme potencial biotecnológico pois sua estrutura celular é diferenciada, suportando grandes variações de pH e salinidade decorrentes do manguezal. Podemos citar diversos estudos (Ebrahim *et al.*, 2012; Arruda *et al.*, 2010; Silva, 2004) que nos mostram atividades farmacológicas provenientes de novas substâncias extraídas dos fungos endofíticos que habitam espécies do mangue.

Em 2009, Mendonça e colaboradores revelaram uma associação entre a quantidade de fenóis e o número de galhas, e nesse estudo foi observado que os insetos evitavam estas plantas galhadas, provavelmente pela grande quantidade de metabólitos especiais. Desses compostos, o majoritário era o ácido gálico. A classe dos compostos fenólicos possuem uma alta capacidade adstringente, já que os taninos ligam-se irreversivelmente à proteínas e outros biopolímeros. Esta grande quantidade de taninos é uma forma de adaptação ao ambiente de alta salinidade, selecionando assim as plantas mais aptas com grande quantidade de compostos fenólicos (Godoy *et al.*, 1997).

1.5. Inflamação e a PLA2

As doenças inflamatórias, embora tenham sido descritas há muitos anos, continuam sem um tratamento efetivo que apresente poucos efeitos adversos, inclusive, a dificuldade de adesão ao tratamento está no alto número de reações adversas causadas pelos anti-inflamatórios, principalmente os efeitos gastrointestinais.

Portanto, as indústrias farmacêuticas têm grande interesse em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos com alta atividade anti-inflamatória e reduzidos

efeitos adversos. Como exemplo, podemos citar a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) de segunda geração, que inibem seletivamente a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma tentativa de reduzir os efeitos indesejados causados pela inibição de sua isoforma constitutiva, a ciclooxigenase-1 (COX-1). Isso decorre do fato de que apesar de décadas de pesquisa, os corticoides e os AINEs continuam sendo os principais recursos terapêuticos para o controle da inflamação. Porém o uso destes fármacos induz o aparecimento de vários efeitos adversos significativos, principalmente quando utilizados de forma crônica ou prolongada. (Yamanaka *et al*, 2013)

São inúmeras as consequências do processo inflamatório crônico, desde a degradação tecidual, fibrose, dor contínua até a perda total de função. Além disso, com o envelhecimento da população mundial, as doenças crônicas passaram a representar uma expressiva e crescente demanda aos serviços de saúde. (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004).

As fosfolipases A2 (PLA2) CE 3.1.1.4 são enzimas que liberam ácidos graxos a partir do carbono secundário do glicerol. Esta fosfolipase reconhece especificamente a ligação acil dos fosfolipídios, e por meio de uma substituição nucleofílica do tipo II, ocorre hidrólise do ácido araquidônico e dos lisofosfolipídeos. As PLA2 são comuns em muitos organismos vivos e podem ser encontrados nos meios extracelular e intracelular, que são referidos como PLA2 secretória (sPLA2) e PLA2 citosólica (cPLA2), respectivamente (Lambeau e Gelb, 2008).

O mecanismo de catálise enzimática realizada pela sPLA2 foi deduzido a partir de resultados oriundos de análises realizadas através de difração de raios-X de alta resolução de diversas sPLA2, que mostraram a conservação molecular de características estruturais comuns encontradas no sítio catalítico, incluindo uma diade His-Asp no sítio catalítico e um íon Ca^{2+} (Verheij *et al.*, 1981).

Além da análise destes dados de sPLA2 puras, as análises dos resultados de cristalização de sPLA2 com inibidores análogos de transição foram importantes para desvendar a mecânica molecular do processo catalítico das sPLA2. Assim fundamentalmente temos dois mecanismos básicos de catálise enzimática das sPLA2, que apresentam diferenças não significativas. De forma geral, nos dois modelos temos a histidina como agente deprotonador da água e os íons Ca^{2+} que estabilizam molecularmente o substrato ao sítio catalítico do ácido aspártico (Verheij *et al.*, 1981).

As sPLA2 podem executar várias funções fisiológicas vitais e têm sido isoladas de várias fontes: veneno de cobra, de pâncreas de mamíferos, pulmão, mucosa gástrica, fígado, baço, macrófagos alveolares, membranas intestinais, coração, placenta, cérebro, plaquetas e células beta pancreáticas.

O papel das sPLA2 na digestão de fosfolipídios alimentares e como antibacterianos já é bem caracterizado, porém a análise de vários outros resultados mostra que algumas dessas sPLA2, especialmente durante o processo inflamatório, estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolipídios celulares, o que leva a biossíntese de eicosanoides.

Além desses dados experimentais com sPLA2 humana, existe um grande conjunto de dados que mostram que sPLA2 de serpentes, que assim como a sPLA2 humana, são potencialmente pró-inflamatórias e também envolve a produção de ácido araquidônico e consequente biossíntese de eicosanóides (Oliveira *et al.*, 2009; Toyama *et al.*, 2011). Evidências experimentais mostram claramente que as sPLA2 também podem modular a atividade funcional das cPLA2, mediada por receptores específicos para as sPLA2 (Fonteh *et al.*, 2000). Apesar de ser um evento conhecido ainda é um mecanismo que vem sendo constantemente trabalhado.

Recentemente Bryant e colaboradores, 2011, apresentaram um conjunto de resultados que mostrou o aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2), consequência da produção de ácido araquidônico, mesmo na presença de bloqueadores específicos para a entrada do ácido araquidônico exógeno. Desta forma, esses pesquisadores, demonstraram o que foi denominado por seu grupo de bifuncionalidade das sPLA2, uma vez que o aumento de ácido araquidônico e PGE2 foi realizado pela ação específica de cPLA2, que foram ativadas pela sPLA2 exogenamente administradas em culturas de células. Essa capacidade moduladora das sPLA2 sobre o metabolismo celular do ácido araquidônico também é observado para outros modelos celulares como a secreção de insulina.

Em 2005, Nogueira e colaboradores mostraram que a administração exógena de sPLA2 em células β -pancreáticas isoladas de ilhotas de Langerhans foi capaz de induzir um aumento da secreção de insulina maior do que aquelas observadas em presença de altas concentrações de glicose.

Matsuzawa e colaboradores, 1996, observaram experimentalmente que a sPLA2 secretada a partir de células neuronais pode regular o processo de degranulação de

mastócitos conduzindo à liberação de neurotransmissores principalmente catecolaminas de mastócitos de ratos. A ideia da importância das sPLA2 como moléculas moduladoras do metabolismo celular já é bem sedimentada por diversos autores. Os pontos ainda não compreendidos dizem respeito ao nível molecular, mais especificamente a nível de receptores e sinalização celular.

Estudos realizados em 2008 por Oliveira e colaboradores, mostraram que lectinas de baixo peso molecular com grande afinidade por manose isoladas de algas *Bryothamnion triquetrum* foram capazes de inibir o edema e a agregação plaquetária induzida por sPLA2 isolada da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*. Nesse mesmo estudo, Oliveira e colaboradores sugeriram que regiões específicas desta sPLA2 poderiam estar envolvidas na interação molecular com determinados receptores celulares para sPLA2.

Além da grande diversidade estrutural das Fosfolipases A2, foi recentemente descoberto um novo tipo de PLA2 cálcio independente associada a lipoproteínas plasmáticas denominadas de Lp-PLA2, que são produzidas principalmente em mastócitos, linfócitos T e monócitos. As Lp-PLA2 são encontradas no plasma e aproximadamente 80% estão associadas obrigatoriamente a lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Os 20% restantes estão associadas a lipoproteínas de alta densidade (HDL).

A Lp-PLA2 é produzida por macrófagos e outras células inflamatórias, é expressa em maiores concentrações em lesões ateroscleróticas avançadas do que em lesões em fase inicial. Várias linhas de evidência sugerem que a oxidação da LDL tem um papel crítico no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose. A Lp-PLA2 participa na modificação oxidativa da LDL hidrolisando a fosfatidilcolina oxidada, gerando lisofosfatidilcolina e ácidos graxos não oxidados, ambos potentes produtos inflamatórios que contribuem para a formação de placas ateroscleróticas (SBC, 2013). A Lp-PLA2 demonstrou variações intra e interindividuais modestas, proporcionais a outros marcadores lipídicos cardiovasculares e substancialmente menos que a proteína C-reativa. Além disso, a Lp-PLA2 não é elevada em condições de inflamação sistêmica e pode representar um marcador mais específico de inflamação vascular. A variação biológica relativamente pequena da Lp-PLA2 e sua especificidade são valiosas na determinação e monitoramento de riscos cardiovasculares (Braun e Davidson, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A presença deste grande número de espécies vegetais coloca o Brasil como um dos países com a maior biodiversidade vegetal do mundo e muitas delas destacadas pelo seu uso como medicamento. Diante dessa diversidade da flora brasileira, pode-se esperar que ao menos 10.000 sejam úteis para o desenvolvimento de fármacos, aromatizantes, condimentos, corantes, edulcorantes, conservantes, anti-oxidantes e vitaminas. Com esse número de espécies, não se limita o descobrimento de plantas ricas em produtos bioativos, que podem ter aplicação direta na prática médica ou servirem de modelo para síntese de novos fármacos. (IBD, 2005) Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (Barreiro e Bolzani, 2009).

Segundo projeções de Carvalho e colaboradores, (2008), até 2008 houve 512 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, sendo 80 associados e 432 simples, ou seja, obtidos de derivados de um única espécie vegetal. Dentre os medicamentos fitoterápicos registrados, as principais formas farmacêuticas cadastradas foram as cápsulas e comprimidos. Entre as demais se têm a solução oral, o xarope, as drágeas, o elixir e as tinturas. Existe a predominância de formas farmacêuticas sólidas no registro de fitoterápicos, sendo registradas na agência nacional de vigilância sanitária - ANVISA cerca de 162 espécies vegetais originárias principalmente de países asiáticos, europeus e da América do Sul. (Silva *et al.*, 2006).

Dentro dessa perspectiva, esperávamos que o Brasil fosse privilegiado, detendo um terço de toda a flora mundial. Além disso, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais advindos de plantas, desde a quimiotaxonomia, fitoquímica, farmacologia e outras áreas relacionadas (Joly *et al.*, 2011). Barreiro e Bolzani, 2009, apontam diversos estudos químicos e farmacológicos realizados com espécies da flora nativa, assim como Santos e Siani, 2013, que ressaltam as potencialidades na utilização de várias delas, bem como a necessidade de maiores estudos sobre a flora tropical brasileira.

No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos. O maior mercado está na Europa, sendo que cerca de 50% deste mercado concentra-se na Alemanha. Digno de nota é o fato de a América Latina, com 7 países considerados megabiodiversos (Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, México, Panamá e Peru) participa apenas com 5% desse total (Alves, 2013). O único exemplo que temos de anti-inflamatório fitoterápico oriundo de pesquisa 100% nacional é o Acheflan® (Aché), indicado para o tratamento tópico de processos inflamatórios como contusões. É encontrado nas formas farmacêuticas de aerossol e creme, contendo como princípio ativo o óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% dos sesquiterpenos α -humuleno e β -cariofileno (Ache, 2011).

Outros países também têm utilizado os produtos naturais como fonte alternativa de extração de fármacos para a indústria farmacêutica. Cerca de 60% dos fármacos lançados nos EUA entre 1985 e 1995 são de origem natural. Infelizmente, vale lembrar que muitos dos fármacos descobertos no exterior, foram retirados da flora do nosso país. (Simões *et al.*, 2007) Contudo, sob a ótica da pesquisa de produtos naturais, a busca de novos compostos biologicamente ativos no manguezal ainda é pouco estudada (Bandaranayake, 1998; Bandaranayake, 2002).

O ambiente inóspito do mangue o faz um ótimo ecossistema para a busca de novos produtos naturais. As condições climáticas e ambientais severas forçam as espécies vegetais a se adaptarem tanto fisiologicamente quanto quimicamente para sobreviverem neste ambiente. Ademais, as plantas contidas neste ecossistema tem de suportar o ataque de microrganismos e o herbivorismo. Com a evolução química, este processo de adaptação gera o desenvolvimento de metabólitos especiais, principal fonte de descoberta de novos fármacos (Mendonça *et al.*, 2009). Muitos dos metabólitos especiais existentes no mangue ocorrem na forma biologicamente inativa, sendo ativados em resposta ao ataque de patógenos ou a danos teciduais.

Como já mencionado acima, existem poucos estudos (Pinto *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010) que explorem a fitoquímica e a farmacologia da espécie *Laguncularia racemosa*. Assim podemos considerar este um dos primeiros estudos nessa linha de pesquisa para essa espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição fitoquímica da espécie *Laguncularia racemosa*, e verificar, dos extratos obtidos, as atividades antifosfolipásica, antiedematogênica e antimiotóxica induzidas por sPLA2 extraída do veneno total de *Bothrops jararacussu*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a estrutura química dos compostos químicos contidos nos extratos de *Laguncularia racemosa* utilizando as técnicas espectroscópicas de Ultravioleta e Massas.
- Estudar a atividade antiedematogênica das fases de partição obtidas a partir de extrato bruto de *Laguncularia racemosa* utilizando o ensaio de edema de pata em camundongos.
- Estudar a atividade antifosfolipásica das fases de partição obtidas a partir de extrato bruto e das frações extraídas de *Laguncularia racemosa* utilizando o ensaio de inibição enzimática específico para sPLA2.
- Estudar a atividade antimiotóxica das fases de partição obtidas a partir de extrato bruto de *Laguncularia racemosa* utilizando o ensaio de quantificação sérica de creatina quinase em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instrumentos e Reagentes empregados

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram feitas em um Cromatógrafo Dionex® P680A equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos (UV), modelo UVD 340U, injetor manual Rheodyne® 8125 com loop de 20 μL , e módulo de tratamento de dados CHROMELEON. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Acclaim® 120 de fase reversa C18 (250 x 4,60 mm) e 5 μm de diâmetro de partícula. As amostras submetidas à análise por CLAE foram pré-tratadas em cartucho OASIS® Speed C18/18% e sistema a vácuo (MARCONI®), visando à retirada de qualquer substância que pudesse ficar retida na coluna cromatográfica. As análises em CLAE-UV foram realizadas utilizando sistema eluente: água acidificada com ácido acético a 0,1% (Tampão A) e metanol (Tampão B), aplicando um gradiente 70% A / 30% B até 100% B em 35 minutos. Todas as análises foram realizadas com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção em 275 nm.

As análises por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM) foram registrados em um CLAE da Shimadzu, constituído por bomba LC-10AD vp, controladora SLC-10A vp, detector UV-Vis SPD-M10Avp, injetor automático SIL-10AF, coluna cromatográfica Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6mm, 5 μm) e módulo de tratamento de dados LCsolution versão 1.24 – Shimadzu. O espectrômetro de massas utilizado foi o Bruker, modelo Esquire plus 3000, com analisador de íon trap, fonte de íons por elétron-spray e módulo de tratamento de dados Esquire control versão 5.2. Essas análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Para a concentração dos extratos e frações cromatográficas utilizou-se o rotaevaporador BUCCHI, sob pressão reduzida, com bomba de vácuo BUCCHI modelo V- 700/710.

Na separação cromatográfica em coluna aberta foi utilizado gel de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). As análises cromatográficas em camada delgada comparativa (CCDC) foram realizadas em placas de sílica 60 F₂₅₄ da Merck em cuba cromatográfica, utilizando metanol como solvente e acetato de etila com metanol (1:1) como sistema eluente. A revelação das placas cromatográficas foi realizada por irradiação no ultravioleta nos comprimentos de onda de 254nm e 356nm.

Para as extrações e análises cromatográficas (em camada delgada e eluições das colunas cromatográficas) foram utilizados solventes grau P.A., da marca Synth. Para as análises em CLAE foram usados solventes grau CLAE, da marca Vetec.

4.2. Coleta e identificação do material vegetal

As partes aéreas de *Laguncularia racemosa* (L.) C.F.Gaertn. utilizadas no estudo fitoquímico foram coletadas por Msc. Henrique Gaeta e Msc. Camila Lehnhardt Pires em uma área impactada de São Vicente, São Paulo e identificadas pela Dra. Selma Dzimidas Rodrigues, no dia 09 de fevereiro de 2012. Uma exsicata está depositada no herbário da faculdade UNISANTA sob o número 8256.

4.3 Animais experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos fêmeas da raça Swiss (25 a 30 gramas) provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, alocados em estantes ventiladas, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22-25 °C) com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo CEUA/IB UNICAMP N° 2898-1)

4.4. Procedimentos experimentais

4.4.1. Obtenção dos extratos metanólico e hidroalcoólico

No primeiro momento, o material coletado foi lavado com água para retirar o material particulado impregnado e cerca de duas horas depois, foi congelado com nitrogênio líquido, o qual posteriormente passou pelo processo de liofilização. No dia seguinte foi triturado, resultando em 39,4g de massa total.

O pó das partes aéreas de *L. racemosa* foi submetido à extração exaustiva com hexano e após remoção do solvente a pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo, obteve-se 29,37g de extrato hexânico.

A seguir, a torta resultante foi dividida em duas partes, a primeira para a obtenção do extrato metanólico e a segunda para a obtenção do extrato hidroalcoólico. Para a obtenção do extrato metanólico foi utilizado metanol P.A. enquanto o extrato hidroalcoólico foi obtido através de uma mistura de água destilada:metanol na proporção 4:6. Após obtenção de ambos os extratos e remoção do solvente utilizando evaporador rotativo obtivemos 3,97g de massa de extrato metanólico bruto e 4,22g de massa de extrato hidroalcoólico bruto.

4.4.2. Obtenção das fases de partição do extrato metanólico bruto

Para obter as partições desejadas, a massa total do extrato metanólico (3,97g) foi ressuspendido em 75mL de uma mistura de metanol:H₂O (1:4) e com o auxílio de um funil de separação e dos solventes em escala crescente de polaridade foram obtidas as fases de partição em hexano (Hex) (203mg), em diclorometano (DCM) (22mg), em acetato de etila (AcOEt) (194mg) e em n-butanol (n-BuOH) (372mg). A fase aquosa (Aq) restante foi submetida a liofilização o qual nos rendeu 1,221g de fase aquosa. As fases em diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa do extrato metanólico foram analisadas em CLAE-UV para monitoramento do perfil químico. Com estas fases, também foram realizados os ensaios biológicos que compreendem o edema de pata em camundongos e a inibição da atividade enzimática de PLA2. O procedimento está ilustrado na Figura 4.

4.4.3. Obtenção das fases de partição do extrato hidroalcoólico bruto

O procedimento de partição deste extrato é semelhante ao utilizado no particionamento do extrato metanólico bruto. Sendo assim, todo o conteúdo (4,22g) do extrato hidroalcoólico bruto foi solubilizado em 100mL de água destilada e então com o auxílio de um funil de separação e de solventes em escala crescente de polaridade foram obtidas as fases de partição em hexano (0,8mg), em diclorometano (6,5mg), em acetato de etila (330mg) e em n-butanol (456mg). A fase aquosa foi submetida a liofilização onde obtivemos 1,112g. As fases em diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa do extrato hidroalcoólico foram analisadas em CLAE-UV para realizar o monitoramento do perfil químico. Com estas fases, também foram realizados os

ensaios biológicos de edema de pata em camundongos e a inibição da atividade enzimática de sPLA2. O procedimento está ilustrado na Figura 4.

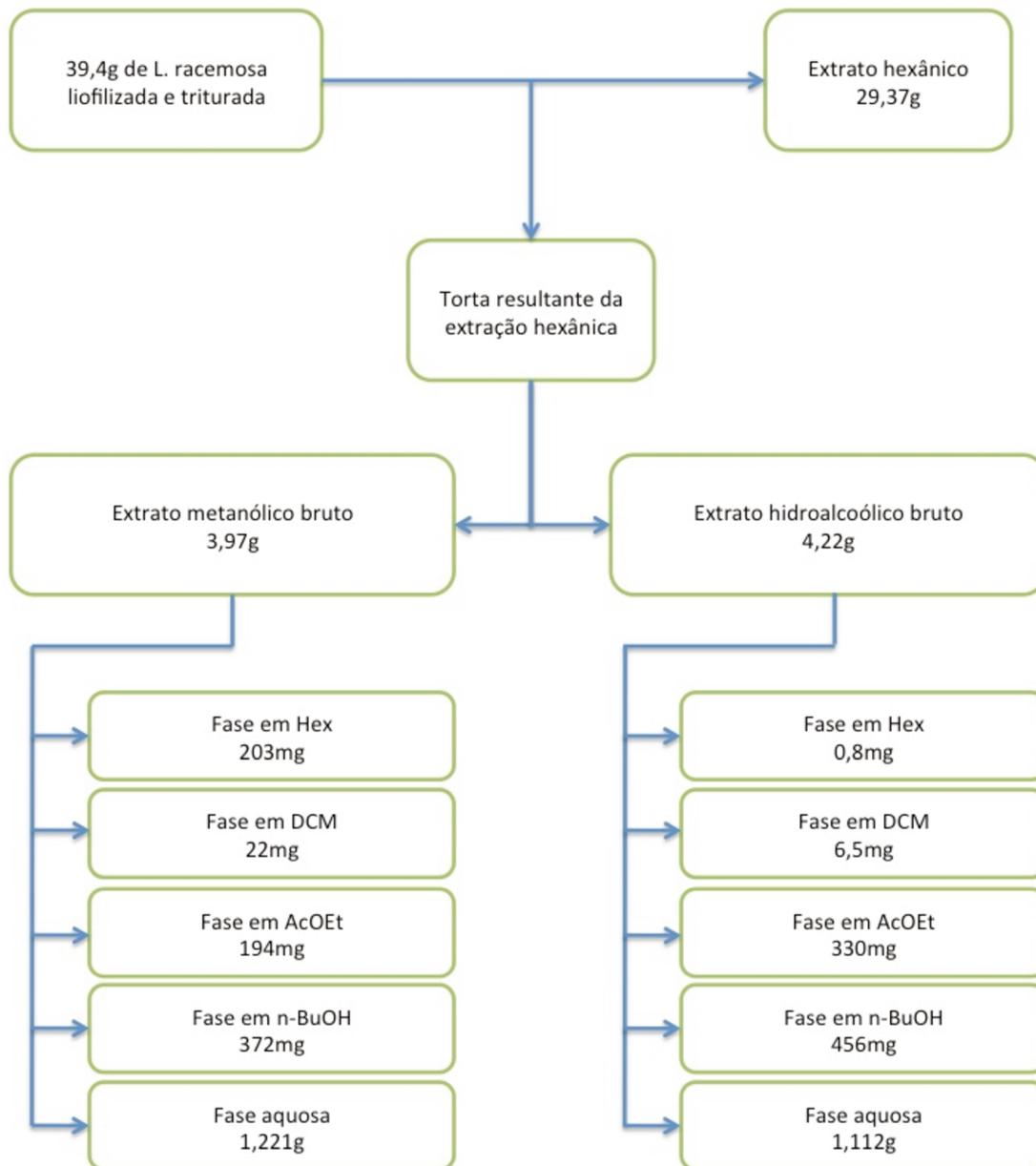


Figura 3 – Fluxograma para a obtenção dos extratos e fases de partição.

4.4.4. Purificação da sPLA2 de *Bothrops jararacussu*

A purificação foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Toyama *et al.*, 1999. O veneno total de *Bothrops jararacussu* foi submetido ao fracionamento em uma coluna de troca iônica TSK SP5PW (8mm x 80mm), previamente equilibrada com uma solução de bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 7,8 (tampão A) por um período de 30

minutos. Aproximadamente 10 mg de amostra foi dissolvida, com 250µL de tampão A (Bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8), após centrifugação e filtração a amostra foi aplicada na coluna. A eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear contínuo de tampão B (bicarbonato de amônio 1,0, pH 7,9) e o monitoramento do fracionamento foi realizado por absorvância de 280nm. Após a eluição das frações, estas foram liofilizadas para posterior uso nos ensaios de inibição enzimática, creatina quinase e edema de pata em camundongos.

4.4.5. Avaliação da atividade antifosfolipásica das fases e grupos selecionados

A avaliação da atividade antifosfolipásica foi feita em espectrofotômetro Spectra Max 190 em modo de detecção no comprimento de onda de 405nm, com placas de ELISA de 96 poços, incubada na temperatura de 37°C. Foram realizadas medidas a cada 5 minutos por um período de 90 minutos.

Em cada poço da placa de ELISA utilizamos 150 µL de tampão PBS, 25 µL de amostra (1mg/mL), o substrato cromogênico NOBA (2mg/mL) e 25µL de sPLA2 (1mg/ml). Todas as substâncias foram solubilizadas em acetonitrila e todas as análises foram feitas em duplicata.

Este experimento possibilitou caracterizar se os inibidores alteram e em que grau, a atividade enzimática da sPLA2, bem como, avaliar a intervalos regulares o comportamento cinético da enzima, incubada ou não com o inibidor.

4.4.6. Inibição do edema de pata em camundongos, induzido pela injeção intraplantar de sPLA2

Cada grupo de animais (n=10) recebeu uma injeção intraperitoneal de 50µL contendo: PBS (controle negativo), dexametasona 10mg/mL (controle positivo) e as fases de *L. racemosa* em 3 dosagens (5, 10 e 20 mg/kg), 30 minutos antes da injeção intraplantar de sPLA2 250µg/mL (20µL/pata). O volume das patas foi medido imediatamente antes da injeção e após, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos da injeção usando um plestimômetro de pata (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). Foi calculada a

AUC (área sob a curva) para avaliar o efeito geral da amostra, e não apenas o efeito em cada ponto da curva inflamatória.

Com este ensaio, podemos verificar a atividade antiinflamatória sistêmica, avaliando a potencia do extrato em determinados intervalos de tempo, nos dando pistas sobre as rotas metabólicas que o extrato pode afetar e a magnitude de seu efeito.

As fases em Hex e em DCM do extrato metanólico não foram testadas, já que as mesmas fases do extrato hidroalcoólico não possuíam massa suficiente para a realização deste experimento.

4.4.7. Inibição do efeito miotóxico medido pela Creatina Quinase (CK) sérica induzido por sPLA2

Foram injetados no músculo gastrocnemius direito aproximadamente 25µl (2,0 µg/µL) das fases em AcOEt do extrato metanólico e n-BuOH do extrato metanólico previamente incubados por 30 minutos com sPLA2, e após 3 horas o sangue dos animais foi colhido da aorta abdominal e colocado em banho-maria para a preparação do soro. Os animais controle (n=5) foram submetidos ao mesmo procedimento dos animais tratados, somente inoculados com 25µL de PBS, 25µL da fase AcOEt e 25µl da fase n-BuOH. Os soros dos animais controle não foram diluídos para a determinação dos níveis de CK kit Granustest 2,5 da Merck, sendo que os soros dos animais tratados foram diluídos 10 vezes. As leituras (a 365nm) foram realizadas em intervalos de 1 minuto. A atividade está expressa em unidade por litro (U/L).

4.4.8. Inibição do edema de pata em camundongos, induzido pela injeção intraplantar das fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico incubadas com sPLA2

Cada grupo de animais (n=5) recebeu uma injeção intraplantar de 20µL contendo: PBS (controle), sPLA2 (12,5µg/pata), as fases em AcOEt e em n-BuOH do extrato metanólico (12,5µg/pata) e as fases em AcOEt e em n-BuOH do extrato metanólico previamente incubadas por 30 minutos com sPLA2 (1:1 12,5 + 12,5µg/pata). O volume das patas foi medido imediatamente antes da injeção do estímulo e após, 15,

30, 60, 120, 180 e 240 minutos da injeção usando um plestimômetro de pata (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). Foi calculada a AUC para avaliar o efeito geral da amostra.

Neste ensaio, podemos avaliar se a incubação das fases com a enzima leva a sua inibição ou favorece seu poder catalítico. Entretanto, não estamos avaliando o efeito sistêmico da fase em questão.

4.4.9. Fracionamento da fase em n-butanol do extrato metanólico em Sephadex LH-20

Após as análises em CLAE-UV e os ensaios biológicos, decidimos realizar o fracionamento da fase em n-BuOH do extrato metanólico pois esta fase obteve os melhores resultados nos ensaios de inibição enzimática e de edema de pata em camundongos. O fracionamento foi realizado com a fase em n-BuOH do extrato em metanol utilizando 275 mg do total de 372 mg. Essa massa total já tinha sido utilizada para os testes de edema de pata, inibição enzimática e creatina quinase, e, nesse ponto do estudo, restavam cerca de 300 mg desta fase. A massa não utilizada no fracionamento foi reservada para possíveis testes ou intercorrências. Assim, 275 mg da fase em n-butanol do extrato metanólico foi submetida à cromatografia em coluna (CC) de Sephadex LH-20, utilizando metanol P.A. como sistema eluente. As frações foram colhidas em frascos de vidro âmbar a cada 1mL. Através deste procedimento, foram obtidas 195 frações, que foram submetidas a análise por CCDC, possibilitando a reunião das frações em 12 grupos, conforme fluxograma apresentado na Figura 5 e dados apresentados na Tabela 1. Esses grupos também foram submetidos as análises por CLAE-UV e ensaios de inibição enzimática para sPLA2.

4.4.10. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média, acompanhados de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os dados obtidos nos ensaios de edema de pata foram avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA two way) seguido do teste de Tukey. Nos ensaios de inibição enzimática e creatina quinase, foi utilizado o teste de análise de variância de uma via (ANOVA one way) seguido do teste de Dunnet. O nível de significância adotado foi de

5%. Todos os cálculos foram realizados no programa *GraphPad Prism* versão 6.0 para Macintosh (San Diego, Califórnia).

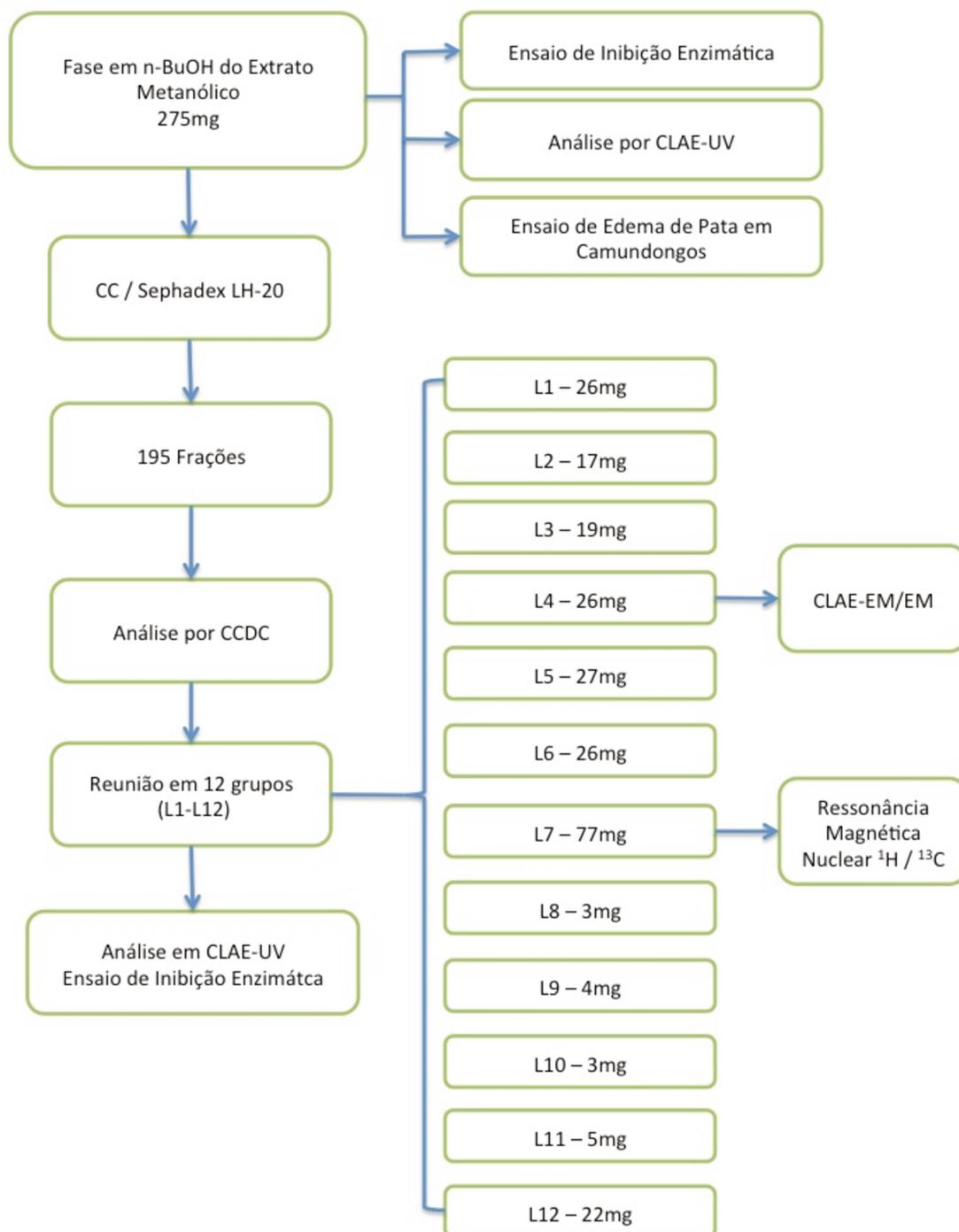


Figura 4 – Fluxograma de fracionamento da fase em n-BuOH do extrato metanólico de *L. racemosa* e reunião dos grupos com suas respectivas massas.

Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico da fase em n-BuOH do extrato metanólico de *L. racemosa* – grupos, frações reunidas e massas obtidas.

Grupos (L)	Frações	Massas
L1	1-9	26 mg
L2	10-14	17 mg
L3	15-20	19 mg
L4	21-34	26 mg
L5	35-59	27 mg
L6	60- 112	26 mg
L7	113-158	77 mg
L8	159-162	3 mg
L9	163-171	4 mg
L10	172-173	3 mg
L11	174-178	5 mg
L12	179-195	22 mg

5. RESULTADOS

5.1. Análises em CLAE-UV das fases selecionadas

Para as análises em CLAE-UV foram excluídas as fases em hexano do extrato metanólico e do extrato hidroalcoólico, constituída por material de caráter apolar e assim, possuir grande potencial de impregnar na coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈.

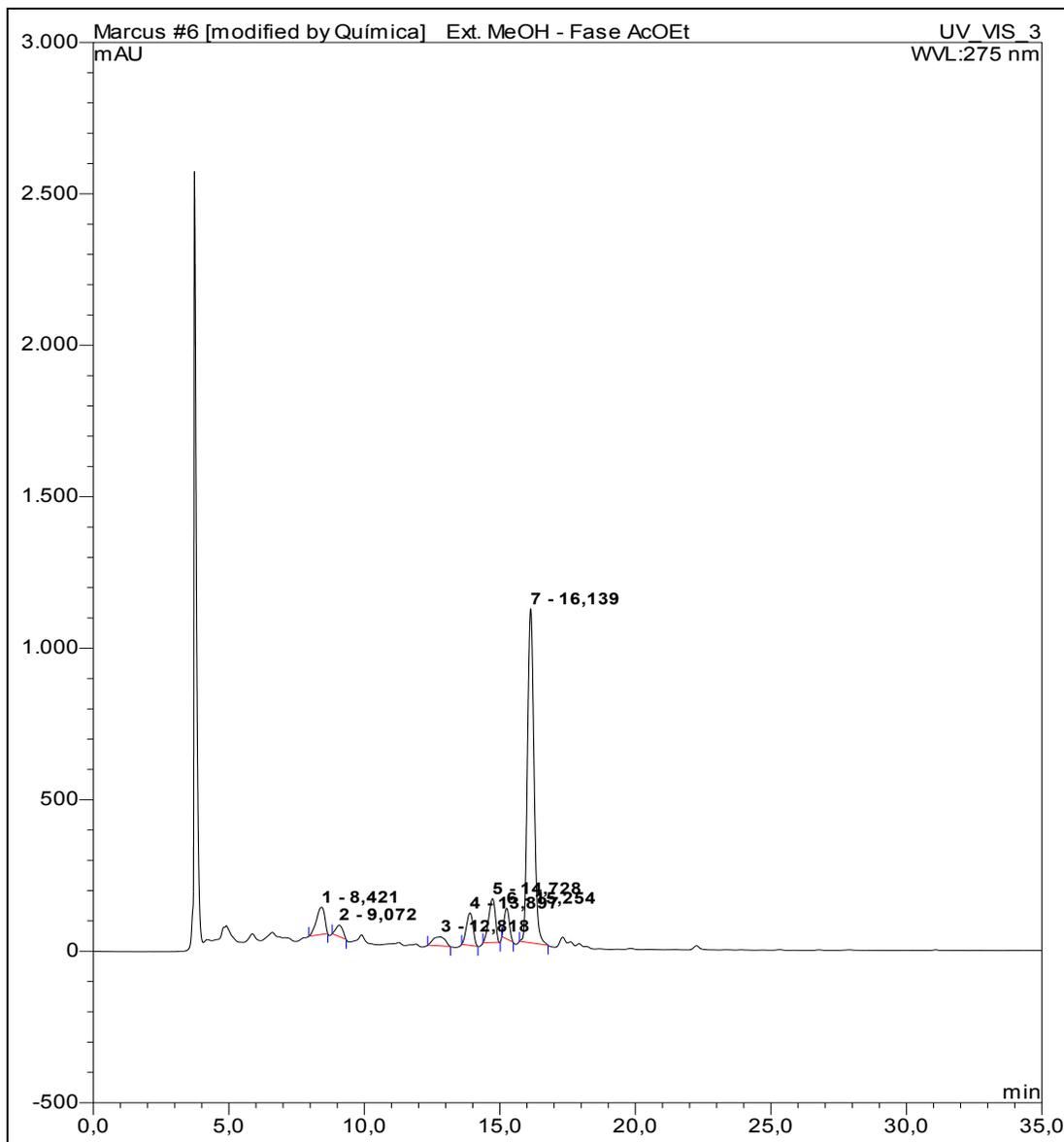


Figura 5 – Cromatograma da fase AcOEt do extrato metanólico de *L. racemosa*.

Todos os cromatogramas realizados mostram um pico com tempo de retenção 3,7 min, que conforme a polaridade da fase aumenta, sua intensidade também aumenta, com exceção das fases aquosas tanto do extrato metanólico quanto do hidroalcoólico, que possui este pico com menos intensidade do que a respectiva fase em n-BuOH (Figura 8) . Assim sendo, a intensidade do pico está na ordem crescente: fase DCM < fase AcOEt < fase Aquosa < fase n-BuOH.

Das análises feitas por CLAE-UV, apenas a análise da fase em AcOEt do extrato metanólico nos apresentou dados de interesse para possível isolamento e identificação. Seu cromatograma apresentou 7 picos, excluindo o primeiro que aparece em todas as outras análises conforme descrito acima.

Os picos enumerados 3 a 6 na Figura 6 foram eluidos entre o minuto 12 e o minuto 16, nos fornecendo espectros em UV (Figura 7) com absorção nas regiões de 227 a 228 nm, 260 a 265 nm e 355 a 357 nm, sugerindo a presença de um fragmento de cinamoíla, característico de flavonóides, na amostra (Simões et al, 2007). Apesar da intensidade, o pico de número 7, que obteve maior intensidade dentre os picos minoritários, não apresentava o espectro no UV compatível com nenhum flavonóide conhecido. Este espectro pode ser visualizado no anexo I.

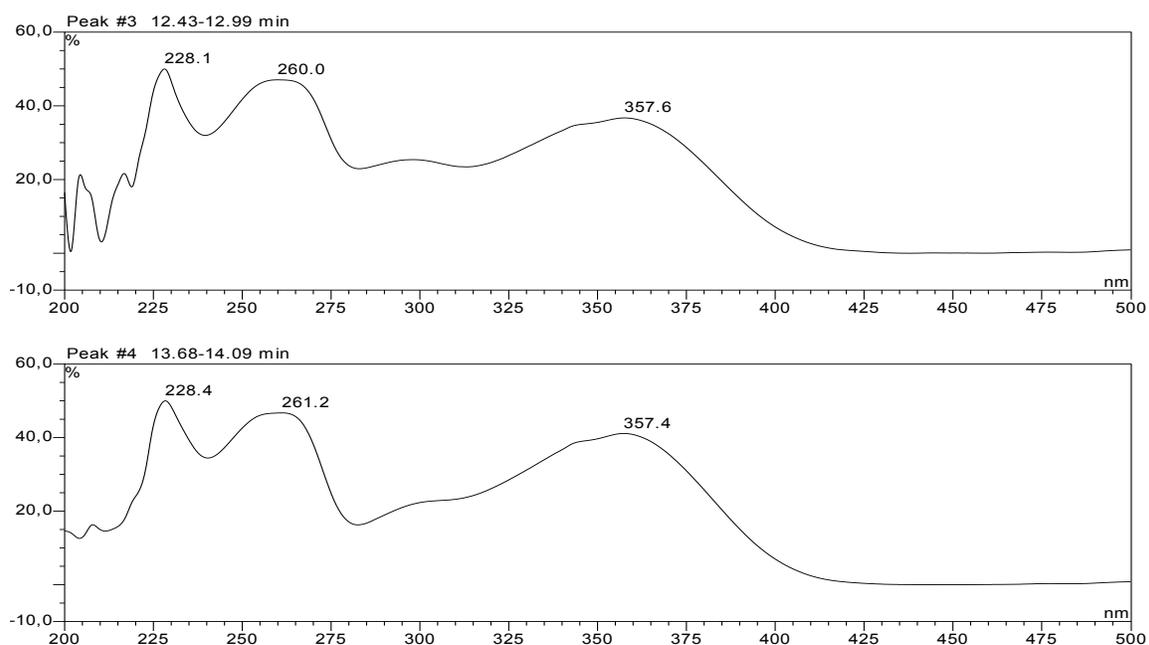


Figura 6 – Espectros de absorção em UV dos picos 3 e 4 do cromatograma da fase em AcOEt do extrato metanólico de *L. racemosa*.

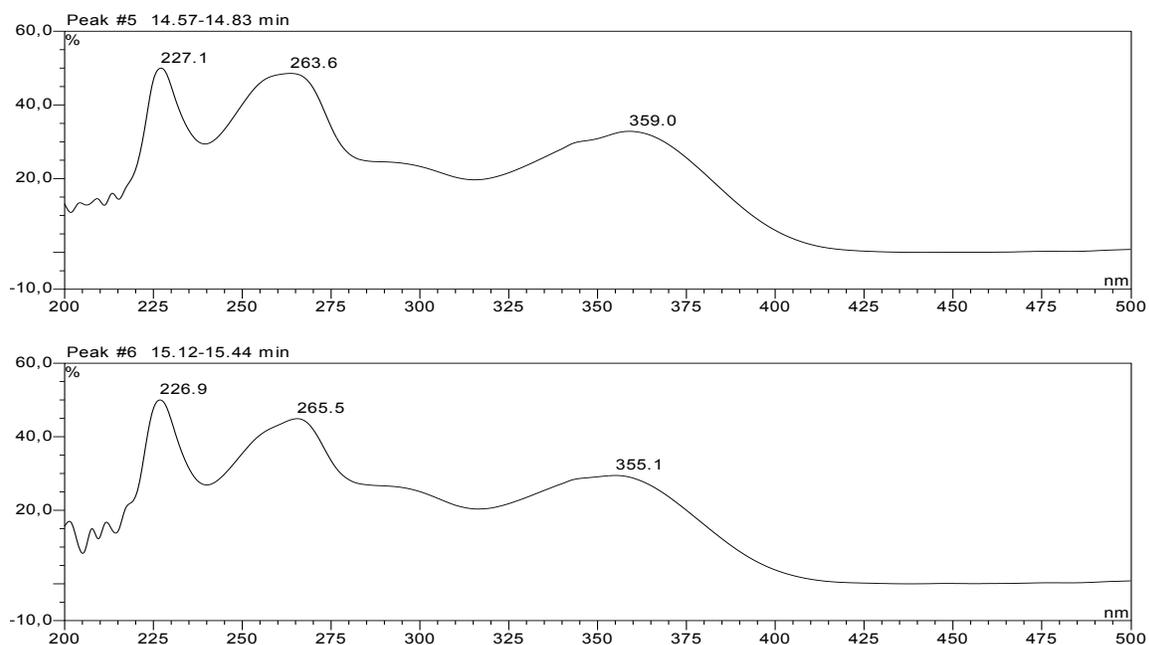


Figura 7 – Espectros de absorção em UV dos picos 5 e 6 do cromatograma da fase em AcOEt do extrato metanólico de *L. racemosa*.

Com estes resultados, a fase em acetato de etila foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (CLAE-EM) para identificação dos constituintes químicos presentes.

Entretanto, os melhores resultados nos ensaios de edema de pata foram observados na fase em n-BuOH do extrato metanólico, seguido da fase em AcOEt do mesmo extrato, o que nos levou a crer que a atividade biológica tinha correlação com a intensidade do primeiro pico, com tempo de retenção de 3,74 min. Por esta razão, foi realizado o fracionamento por Sephadex LH-20 da fase em n-BuOH do extrato metanólico.

Outro fato relevante para a decisão de qual fase seria fracionada foi que a fase em n-BuOH (372mg) possuía quase o dobro de massa quando comparada à fase em AcOEt (194mg).

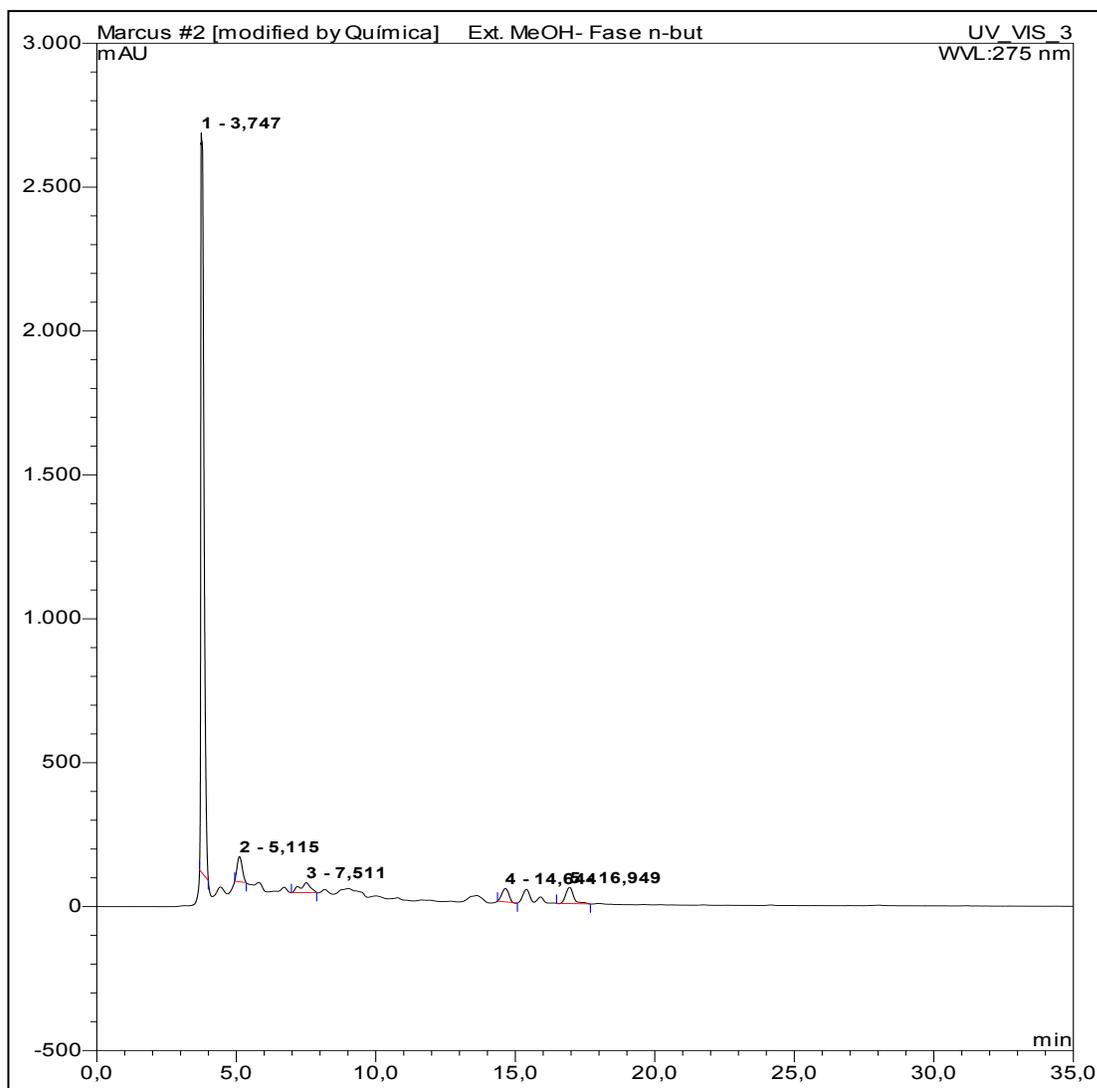
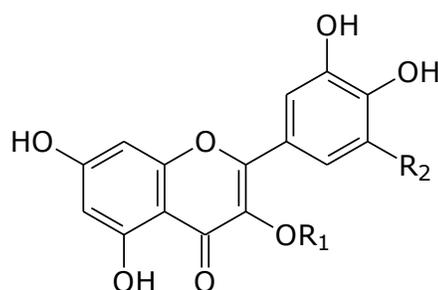


Figura 8 – Cromatograma da fase em n-BuOH do extrato metanólico de *L. racemosa*.

Os cromatogramas das fases restantes foram analisados porém não continham dados cromatográficos e espectroscópicos relevantes para o fracionamento e obtenção de novas moléculas, uma vez que apresentaram baixa atividade nos ensaios de edema de pata e de inibição enzimática. Estes cromatogramas podem ser visualizados no anexo II.

5.2. Identificação dos flavonóides da fase em acetato de etila do extrato metanólico por CLAE-EM

A fase em acetato de etila do extrato metanólico foi analisada por CLAE-EM (Figura 10) e através das fragmentações de massa (Tabela 2) foi possível identificar a presença de dez flavonóides pertencentes as agliconas quercetina e miricetina, os quais foram elucidados como: miricetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, miricetina-3-O-glucosídeo, miricetina-3-O-xilosídeo, miricetina-3-O-arabinosídeo, miricetina-3-O-rhamnosídeo, quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo (isoquercitrina), quercetina-3-O-xilosídeo (reinoutrina), quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) e quercetina-3-O-arabinosídeo, representados na Figura 9.



Flavonóide	R ₁	R ₂
Miricetina-3-O-(galoil)-glicosídeo	Glc-Galoil*	OH
Miricetina-3-O-glicosídeo	Glc	OH
Miricetina-3-O-xilosídeo**	Xil	OH
Miricetina-3-O-arabinosídeo**	Arab	OH
Miricetina-3-O-rhamnosídeo	Rha	OH
Quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo	Glc-Galoil*	H
Quercetina-3-O-glicosídeo	Glc	H
Quercetina-3-O-xilosídeo**	Xil	H
Quercetina-3-O-ramnosídeo	Rha	H
Quercetina-3-O-arabinosídeo**	Ara	H

*A posição de ligação da unidade galoil no glicosídeo não pode ser determinada pela técnica empregada.

**Os glicosídeos não podem ser identificados pela técnica empregada, podendo ser intercambiáveis.

Figura 9 – Representação dos flavonóides identificados na fase em acetato de etila do extrato metanólico.

Tabela 2. Dados de CLAE-EM da fase em acetato de etila proveniente do extrato metanólico das folhas de *Laguncularia racemosa*

t_R (min)	Substância	Ions de massa (m/z) ^a	Ions de massa (m/z) ^b
10,5	Miricetina-3-O-(galoil)-glicosídeo	631→479(pb) [M-H ⁻ -Gal], 316, 271	-
12,2	Miricetina-3-O-glicosídeo	479 [M-H ⁻]→317(pb) [M-H ⁻ -Glc], 287, 179	503 [M+Na ⁺], 481(pb) [M+H ⁺], 319, 74 481 [M+H ⁺]→319(pb) [M+H ⁺ -Glc]
12,6	Miricetina-3-O-xilosídeo ^c	449 [M-H ⁻]→317(pb) [M-H ⁻ -Xyl], 179	-
12,7	Quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo	615 [M-H ⁻]→463(pb) [M-H ⁻ -Gal], 449, 301 [Qrc-H ⁺]	-
13,5	Miricetina-3-O-arabinosídeo ^c	449 [M-H ⁻]→327, 317(pb) [M-H ⁻ -Ara], 179	451 [M+H ⁺], 319 [M+H ⁺ -Ara], 99; 451→319(pb) 465 [M+H ⁺], 319 [M+H ⁺ -Rha], 99; 465→319(pb) 319→301, 290, 273, 245, 195(pb), 166, 153, 133 487 [M+Na ⁺], 465 [M+H ⁺], 384, 303 [M+H ⁺ -Glc], 99; 465→303(pb), 243
13,9	Miricetina-3-O-rhamnosídeo	-	-
14,4	Quercetina-3-O-glicosídeo	463 [M-H ⁻], 329; 463→301(pb) [M-H ⁻ -Glc], 257	457 [M+Na ⁺], 435 [M+H ⁺], 303 [M+H ⁺ -Glc], 99; 435→303(pb), 204
15,3	Quercetina-3-O-xilosídeo ^c	433 [M-H ⁻]→301(pb) [M-H ⁻ -Xyl]	457 [M+Na ⁺], 435 [M+H ⁺], 303 [M+H ⁺ -Glc], 99; 435→303(pb), 204
16,0	Quercetina-3-O-arabinosídeo ^c	433 [M-H ⁻]→301(pb) [M-H ⁻ -Ara]	457 [M+Na ⁺], 435 [M+H ⁺], 303 [M+H ⁺ -Glc], 99; 435→303(pb)
16,6	Quercetina-3-O-rhamnosídeo	447 [M-H ⁻]→301(pb) [M-H ⁻ -Rha], 179	-
17,8	Ácido cafeoil-feruloiil-quinico	529 [M-H ⁻]→445, 367(pb), 353, 191	-

^{a,b} Ionização realizada em modo negativo e positivo, respectivamente; ^c Os glicosídeos não podem ser identificados pela técnica empregada, podendo ser intercambiáveis.

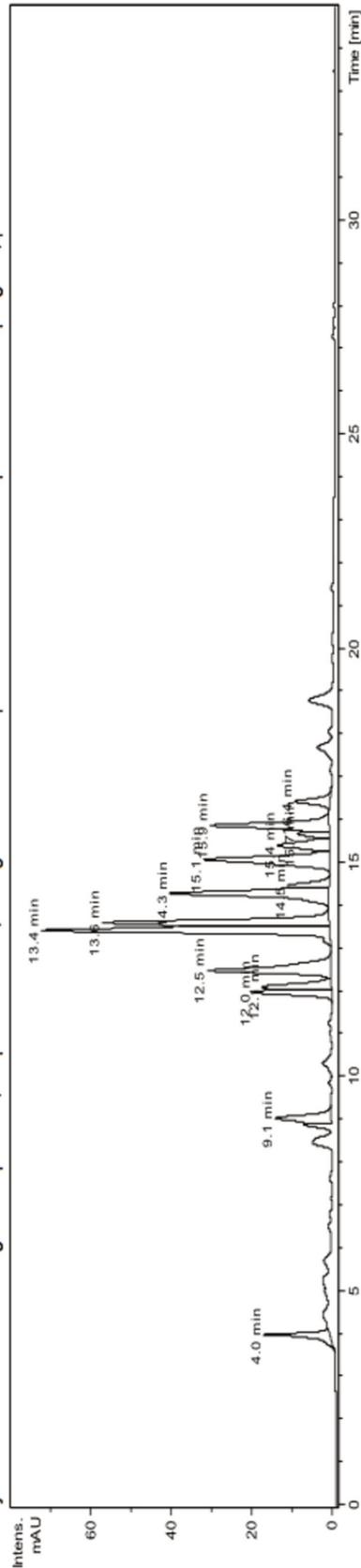


Figura 10 – Cromatograma realizado no IQ-USP em CLAE-EM da fase em acetato de etila oriunda do extrato metanólico de *L. racemosa*.

5.3. Análises em CLAE-UV das frações obtidas no fracionamento por Sephadex LH-20 da fase em n-BuOH do extrato metanólico.

Das frações obtidas, a fração L4 (Figura 11) foi a de maior destaque, possuindo em seu cromatograma 7 picos, dos quais 5 deles (Figura 12) eram sugestivos de serem flavonóides conforme análise dos dados espectrais obtidos. Entre eles está o pico majoritário (pico 4) desse grupo, com tempo de retenção de 13,08min.

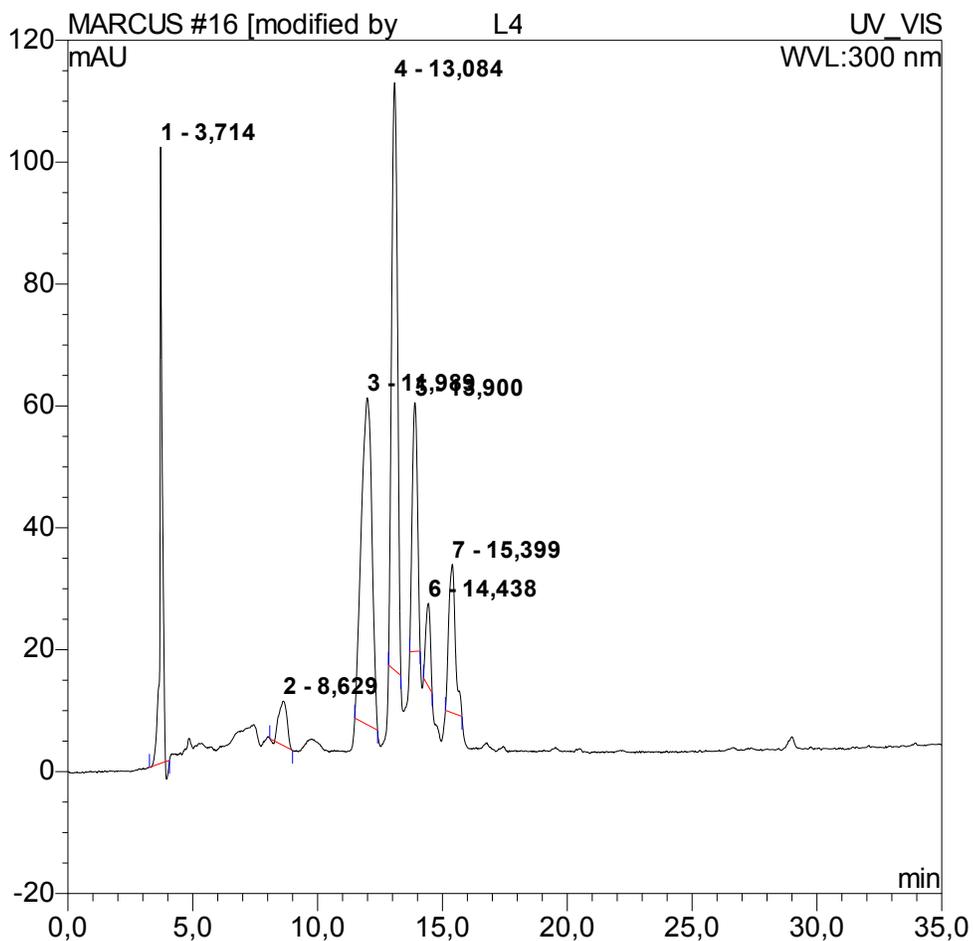


Figura 11 – Cromatograma do grupo L4, fracionado da fase n-BuOH do extrato metanólico de *L. racemosa*.

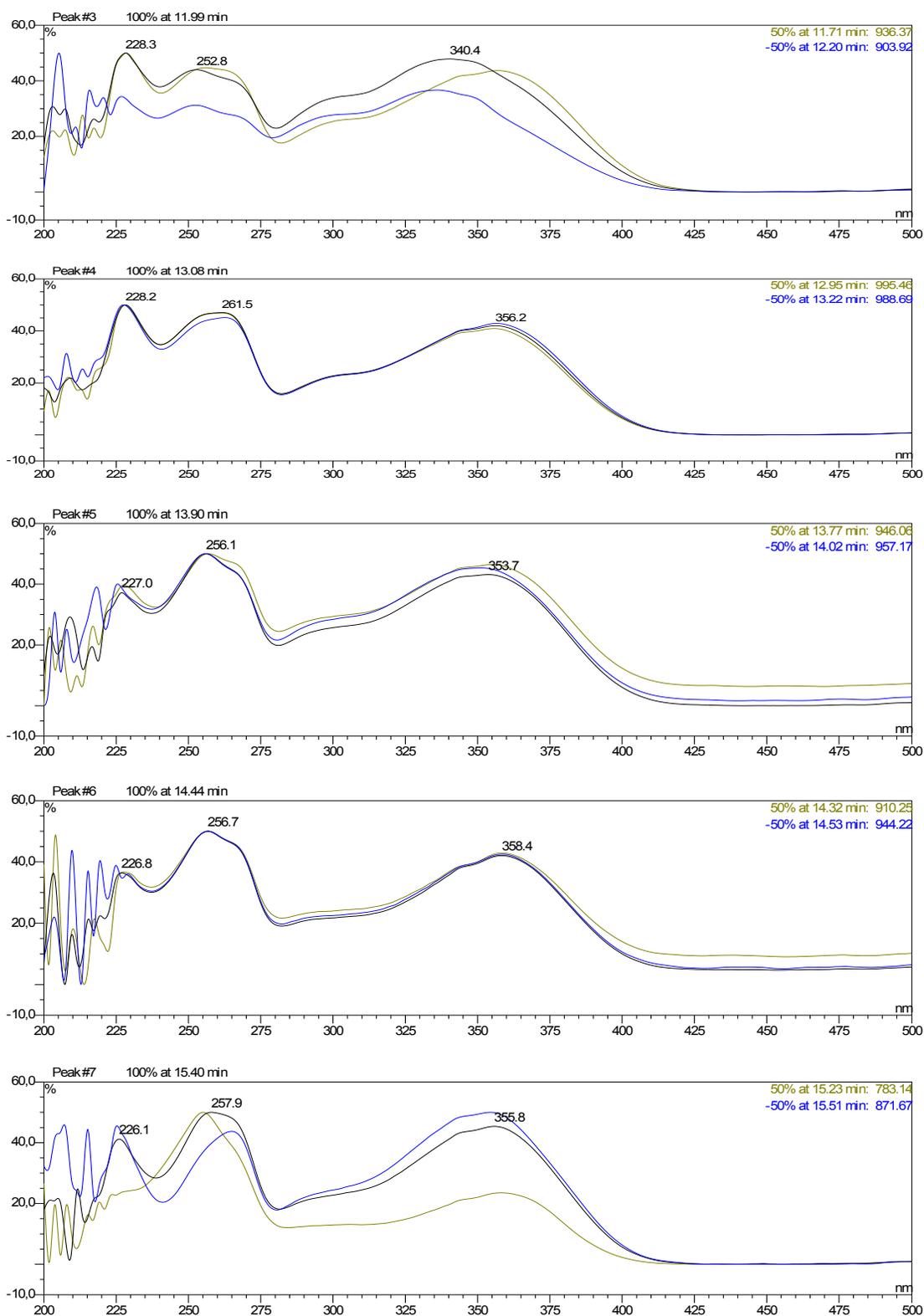


Figura 12 – Espectros de absorção em UV dos picos 3 à 7 do cromatograma da fração L4.

Em contrapartida, na fração L7 (Figura 13), temos o isolamento da substância que acreditamos prover os efeitos farmacológicos. No cromatograma deste grupo temos um pico

majoritário com tempo de retenção de 3,7min, mesmo tempo que aparece o pico majoritário do cromatograma da fase fracionada.

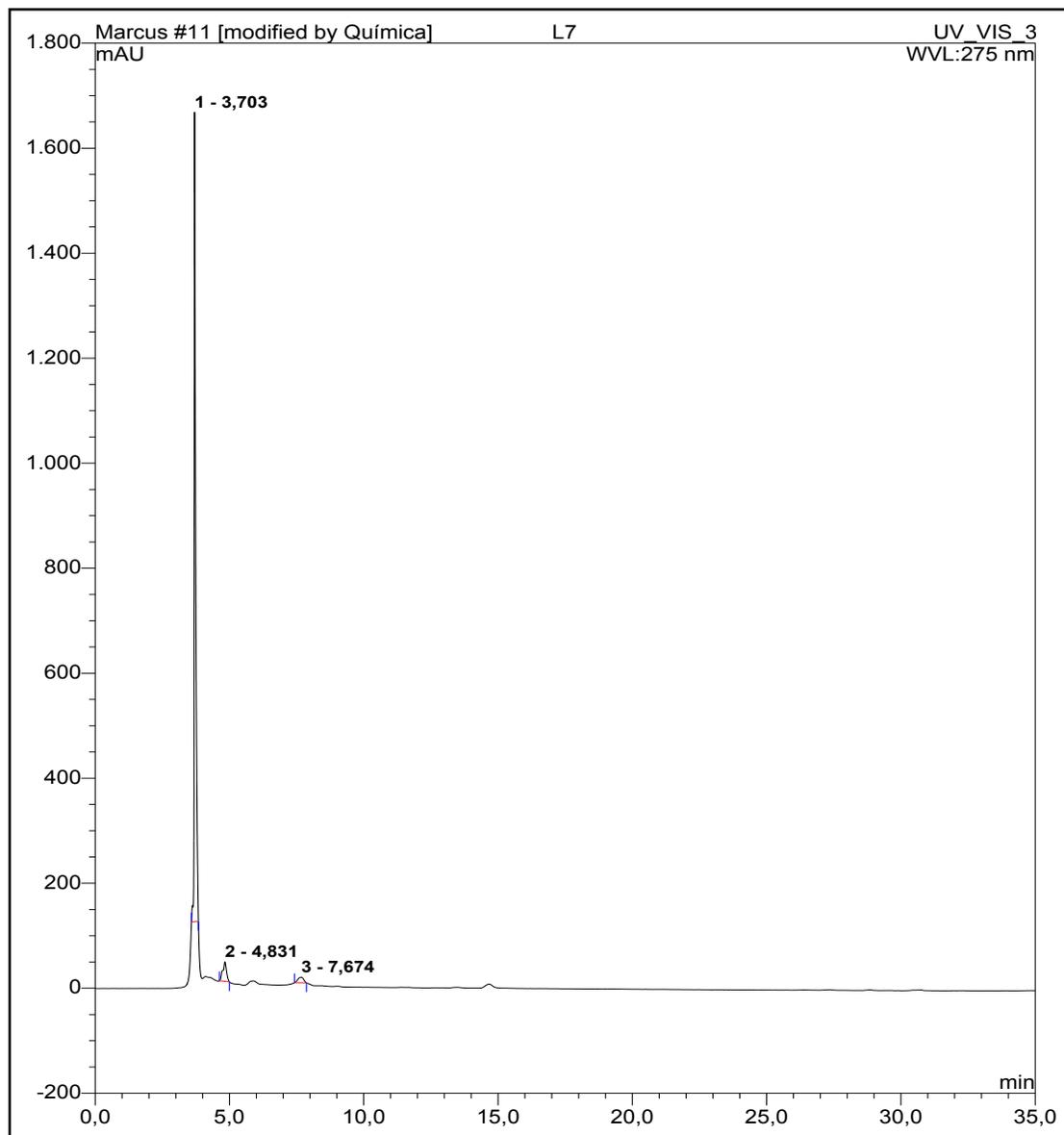
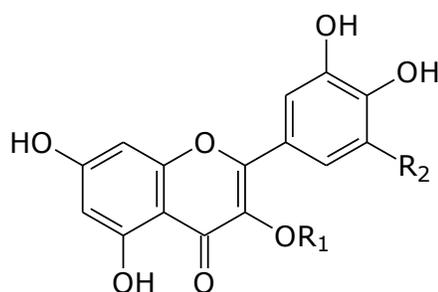


Figura 13 – Cromatograma do grupo L7, apresentando um pico majoritário em $T_r = 3,7$

Com estes resultados, a fração L4 foi analisada por CLAE-EM e a fração L7 submetida à análise por RMN, ambas com a finalidade de elucidação estrutural.

5.4. Identificação dos flavonóides da fração L4 da fase em n-butanol do extrato metanólico de *L. racemosa* por CLAE-EM

A fração L4 da fase em n-BuOH do extrato metanólico foi analisada por CLAE-EM (Figura 15) e através das fragmentações de massa (Tabela 3) foi possível identificar a presença de oito flavonóides pertencentes as agliconas quercetina e miricetina, os quais foram elucidados como: miricetina-3-O-(galoil)-xilósídeo, miricetina-3-O-(galoil)-rhamnosídeo, miricetina-3-O-xilosídeo, miricetina-3-O-rhamnosídeo, quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, quercetina-3-O-(galoil)-xilósídeo, quercetina-3-O-xilosídeo (reinoutrina) e quercetina-3-O-rhamnosídeo (quercitrina), representados na Figura 14.



Flavonóide	R ₁	R ₂
Miricetina-3-O-(galoil)-xilósídeo	Galoil-Xil*	OH
Miricetina-3-O-(galoil)-rhamnosídeo	Galoil-Rha*	OH
Miricetina-3-O-xilosídeo	Xil	OH
Miricetina-3-O-rhamnosídeo	Rha	OH
Quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo	Galoil-Glc*	H
Quercetina-3-O-(galoil)-xilósídeo	Galoil-Xil*	H
Quercetina-3-O-xilosídeo	Xil	H
Quercetina-3-O-rhamnosídeo	Rha	H

*A posição de ligação da unidade galoil no glicosídeo não pode ser determinada pela técnica empregada

Figura 14 – Representação dos flavonóides identificados na fase em AcOEt do extrato metanólico.

Tabela 3. Dados de CLAE-EM da fração L4 fase em n-butanol proveniente do extrato metanólico das folhas de *Laguncularia racemosa*

t_R (min)	Substância	Íons de massa (m/z) ^a
12,3	Quercetina-3-O-(galoi)-glicosídeo	639 [M+Na ⁺], 617(pb) [M+H ⁺], 391; 617→599, 465 [M+H ⁺ -Gal], 447[M+H ⁺ -Gal-H ₂ O], 411, 345, 315, 303(pb) [Qrc+H ⁺], 275, 171
12,9-	Miricetina-3-O-xilosídeo +	487 [M _R +Na ⁺], 473 [M _X +Na ⁺], 465 [M _R +H ⁺], 451 [M _X +H ⁺], 319 [Mir+H ⁺]
13,3	Miricetina-3-O-rhamnosídeo	319→301, 290, 284, 273(pb), 263, 259, 255
13,9	Miricetina-3-O-(galoi)-xilosídeo	473 [M _X +Na ⁺]→443, 421, 399, 353, 341(pb); 487 [M _R +Na ⁺]→453, 408, 341(pb), 328, 177
14,7	Miricetina-3-O-(galoi)-rhamnosídeo	625 [M+Na ⁺], 603(pb) [M+H ⁺]→583, 567, 484, 433, 319 [Mir+H ⁺], 285(pb) [M+H ⁺ -Mir], 237, 195
15,3	Quercetina-3-O-xilosídeo	639(pb) [M+Na ⁺], 617 [M+H ⁺]→599(pb), 487, 447 [M+H ⁺ -Gal-H ₂ O], 411, 299 [M+H ⁺ -Mir], 223
15,6	Quercetina-3-O-rhamnosídeo	457 [M+Na ⁺], 435(pb) [M+H ⁺], 303 [M+H ⁺ -Xyl]→257(pb), 229, 223, 202, 165, 149, 137, 109
16,6	Quercetina-3-O-(galoi)-xilosídeo	471(pb) [M+Na ⁺], 449 [M+H ⁺], 303 [M+H ⁺ -Rha], 149; 449→303(pb) 609 [M+Na ⁺], 587 [M+H ⁺]→303 [M+H ⁺ -Xyl], 285(pb) [M+H ⁺ -Qrc]

^a Ionização realizada em modo positivo; M_R: Miricetina-3-O-rhamnosídeo; M_X: Miricetina-3-O-xilosídeo; Mir: Miricetina; Gal: Galoi; Qrc: Quercetina

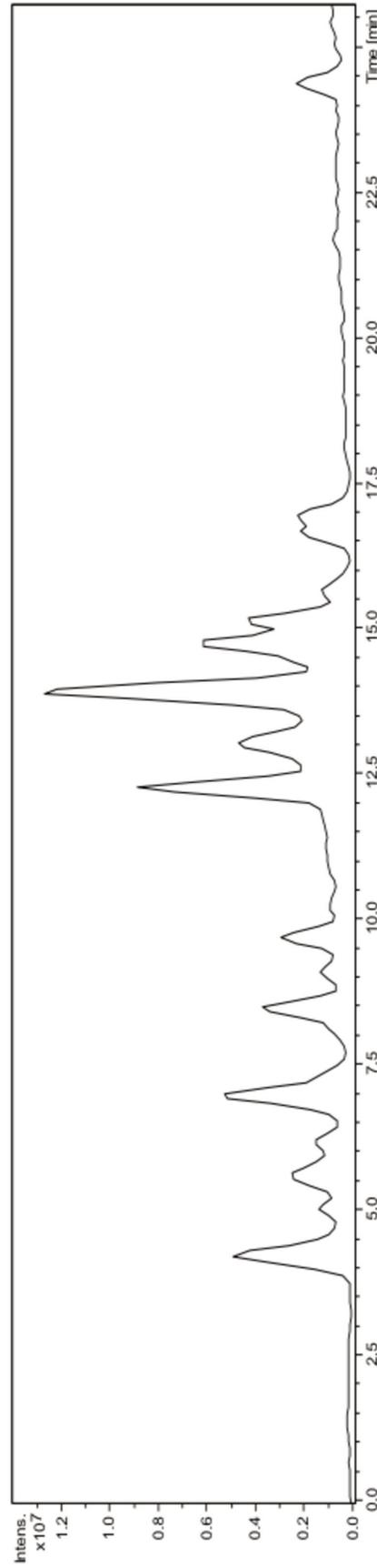


Figura 15 – Cromatograma realizado no IQ-USP em CLAE-EM do grupo L4 proveniente do fracionamento da fase em n-butanol oriunda do extrato metanólico das folhas de *L. racemosa*.

5.5 Efeito da administração intraperitoneal da fase em AcOEt do extrato metanólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

A Figura 16 demonstra que a fase em AcOEt oriunda do extrato metanólico, quando administrado via intraperitoneal, 30 minutos antes, foi capaz de inibir o efeito edematogênico da administração intraplantar de PLA2.

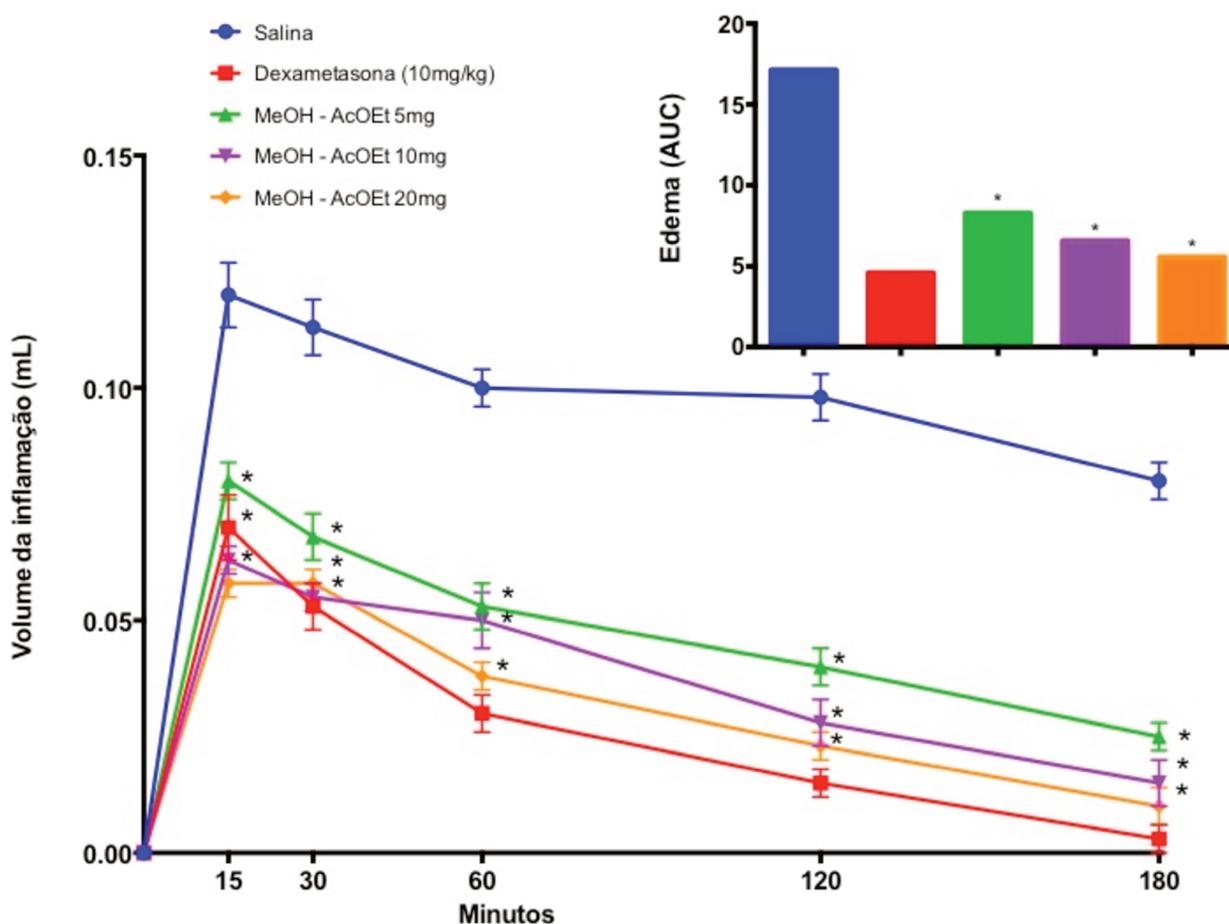


Figura 16 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em acetato de etila do extrato metanólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

Nos 15 minutos iniciais, as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg foram capazes de inibir $33 \pm 3,3$, $48 \pm 1,67$ e $52 \pm 1,67\%$ respectivamente. Já no tempo de 60 minutos, temos uma inibição de $50 \pm 4,17\%$ para a dose de 10mg/kg, observando um aumento de apenas 2% para o tempo de 15 minutos. Para as doses de 5mg/kg e 20mg/kg, temos inibição de 47

$\pm 3,3$ e $62 \pm 1,67\%$, o que nos mostra um aumento de 14 e 10% respectivamente. Esta inibição foi aumentando progressivamente até o tempo de 180 minutos, o qual temos inibição de $69 \pm 1,67\%$, $81 \pm 1,67\%$ e $88 \pm 1,67\%$ para as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg, respectivamente, sendo este último resultado, a inibição máxima obtida por esta fase. Também foi observado que no tempo de 180 minutos, a dexametasona, um conhecido anti-inflamatório esteroide, inibidor da sPLA2, na dose de 10mg/kg inibiu $96 \pm 1,67\%$ do edema causado pelo agente flogístico.

Avaliando a AUC (área sobre a curva), podemos ver que o efeito da fase em acetato de etila do extrato metanólico possui efeito dose resposta, resultando em valores de 17,1 para salina, 4,5 para dexametasona (10mg/kg), 8,2 para dose de 5mg/kg, 6,5 para dose de 10mg/kg e 5,5 para dose de 20mg/kg.

Todas as doses dessa fase obtiveram resultado estatisticamente significativo quando comparado a salina. Não houve diferença entre a dose de 20mg/kg e a dexametasona (10mg/kg).

5.6 Efeito da administração intraperitoneal da fase em n-BuOH do extrato metanólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

Representado pela Figura 17, o tratamento com a fase em n-BuOH proveniente do extrato metanólico, 30 minutos antes do agente flogístico causou uma importante redução no efeito edematogênico. Logo nos primeiros 15 minutos, a dose de 20mg/kg inibiu o edema de forma mais significativa do que a dexametasona 10mg/kg, onde temos $50 \pm 3,3\%$ contra $42 \pm 5\%$, respectivamente. A dose de 20mg/kg foi a que mais apresentou efeito inibitório sobre a ação edematogênica da sPLA2, inibindo $80 \pm 3,3\%$ e $94 \pm 2,5\%$ nos tempos de 120 e 180 minutos, dados comparáveis ao controle positivo (dexametasona 10mg/kg) com inibição de $85 \pm 2,5\%$ e $96 \pm 1,67\%$, respectivamente. A dose de 5mg/kg teve inibição mínima de $25 \pm 3,3\%$ para o tempo de 15 minutos e inibição máxima de $63 \pm 3,3\%$ para o tempo de 180 minutos, e a dose de 10mg/kg teve inibição de $39 \pm 3,3\%$ e $84 \pm 5\%$ para os tempos de 15 e 180 minutos, sendo a inibição mínima e máxima para essa dose respectivamente.

Ao analisar a AUC, podemos dizer que esta fase possui efeito dose resposta, pois os resultados da AUC para 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg foram de 9,0, 6,8 e 4,8 respectivamente.

Todos os resultados foram estatisticamente significativos quando comparados entre si, exceto entre a dose de 20mg/kg e a dexametasona (10mg/kg).

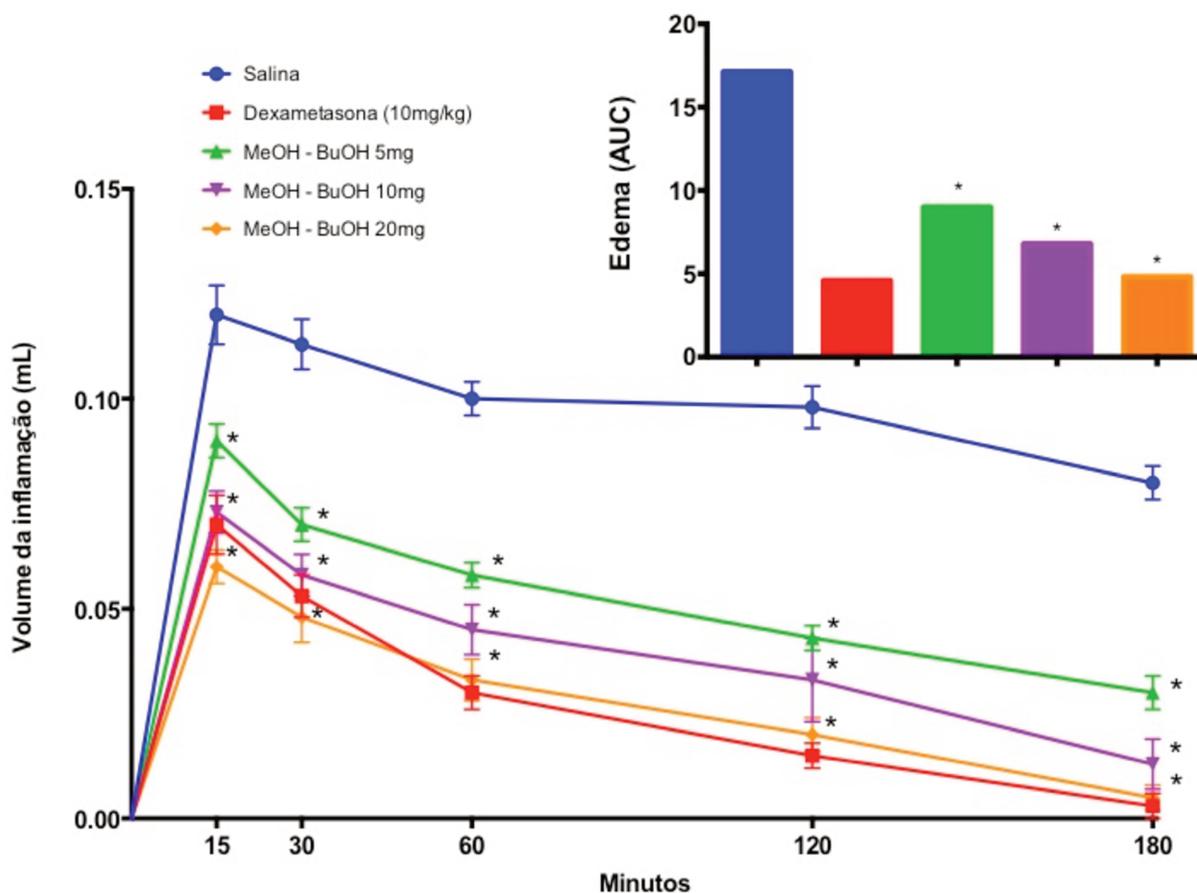


Figura 17 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em butanol do extrato metanólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

5.7 Efeito da administração intraperitoneal da fase aquosa, resultante dos procedimentos de partição com o extrato metanólico, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que o tratamento 30 minutos antes da sPLA2 intraplantar com a fase aquosa também teve efeito antiedematogênico, porém menos intenso do que as outras fases de partição obtidas do extrato metanólico. A inibição mínima da dose de 5mg/kg foi de 17% no tempo de 15 minutos e a inibição máxima foi de 29

$\pm 3,3\%$ no o tempo de 120 minutos. Na dose de 10mg/kg temos a maior inibição para esta fase que foi de $41 \pm 5,83\%$ no tempo de 120 minutos.

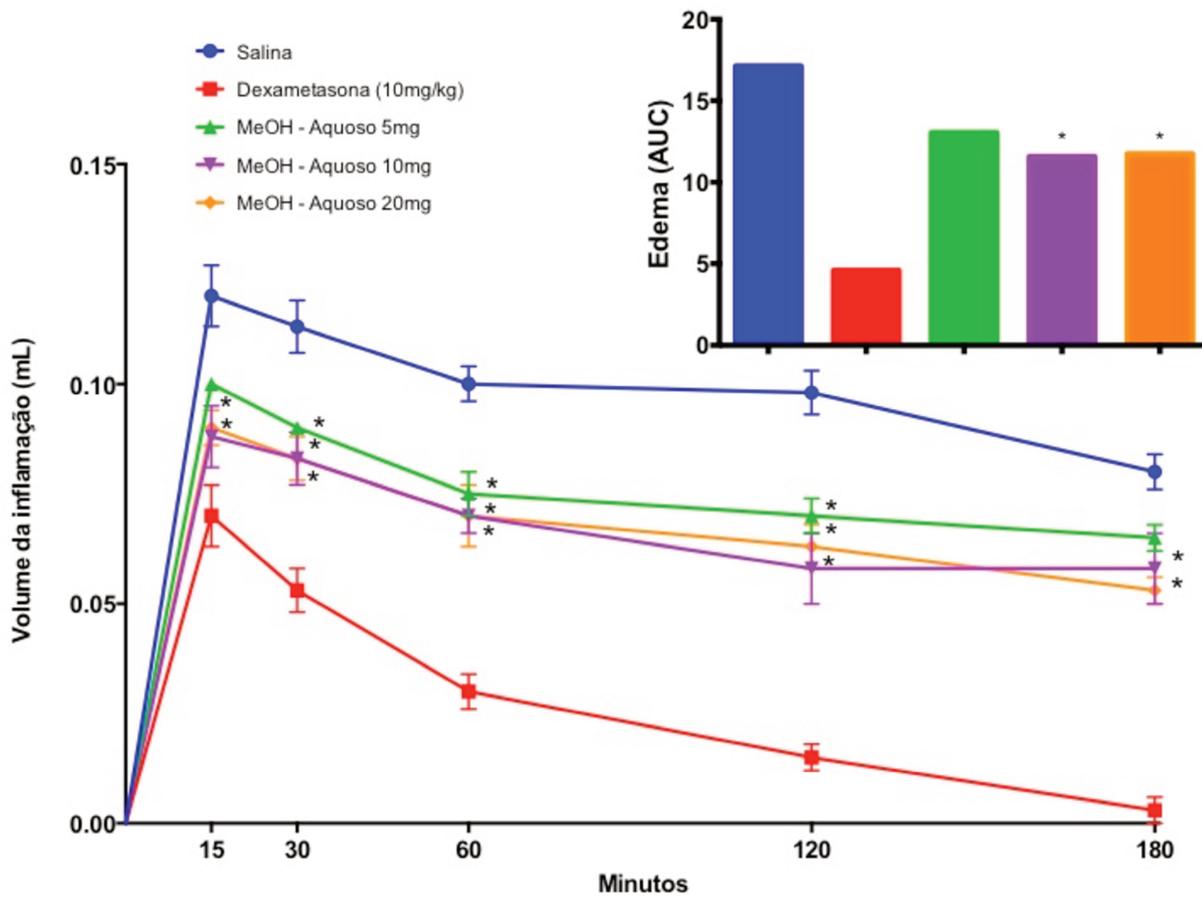


Figura 18 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25 μ g/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase aquosa do extrato metanólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

Já na maior dose (20mg/kg), a inibição máxima observada foi de $36 \pm 3,3\%$ e a mínima foi de $25 \pm 3,3\%$, mostrando menor variação entre os dados encontrados. Nenhuma das inibições nas doses utilizadas com a fase aquosa foram similares as inibições encontradas com o corticoide dexametasona (10mg/kg).

Os resultados de AUC foram de 13,0, 11,5 e 11,7 para as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg respectivamente.

Quando comparados a salina, todas as doses da fase do extrato obtiveram resultados significativos, porém nenhuma dose obteve um resultado significativo quando comparadas entre si.

5.8. Efeito da administração intraperitoneal da fase em AcOEt oriunda do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

O efeito da administração intraperitoneal da fase em AcOEt do extrato hidroalcoólico sobre o edema produzido pela injeção intraplantar de sPLA2 está representado na Figura 19. Para o tempo de 15 minutos, as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg causaram inibição de $17 \pm 3,3\%$, $27 \pm 5,83\%$ e $18 \pm 5,83\%$ respectivamente. A inibição máxima para cada dose não está muito acima desses valores, correspondendo, no tempo de 120 minutos, a $31 \pm 1,67\%$, $44 \pm 3,3\%$ e $46 \pm 3,3\%$ nas doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg respectivamente.

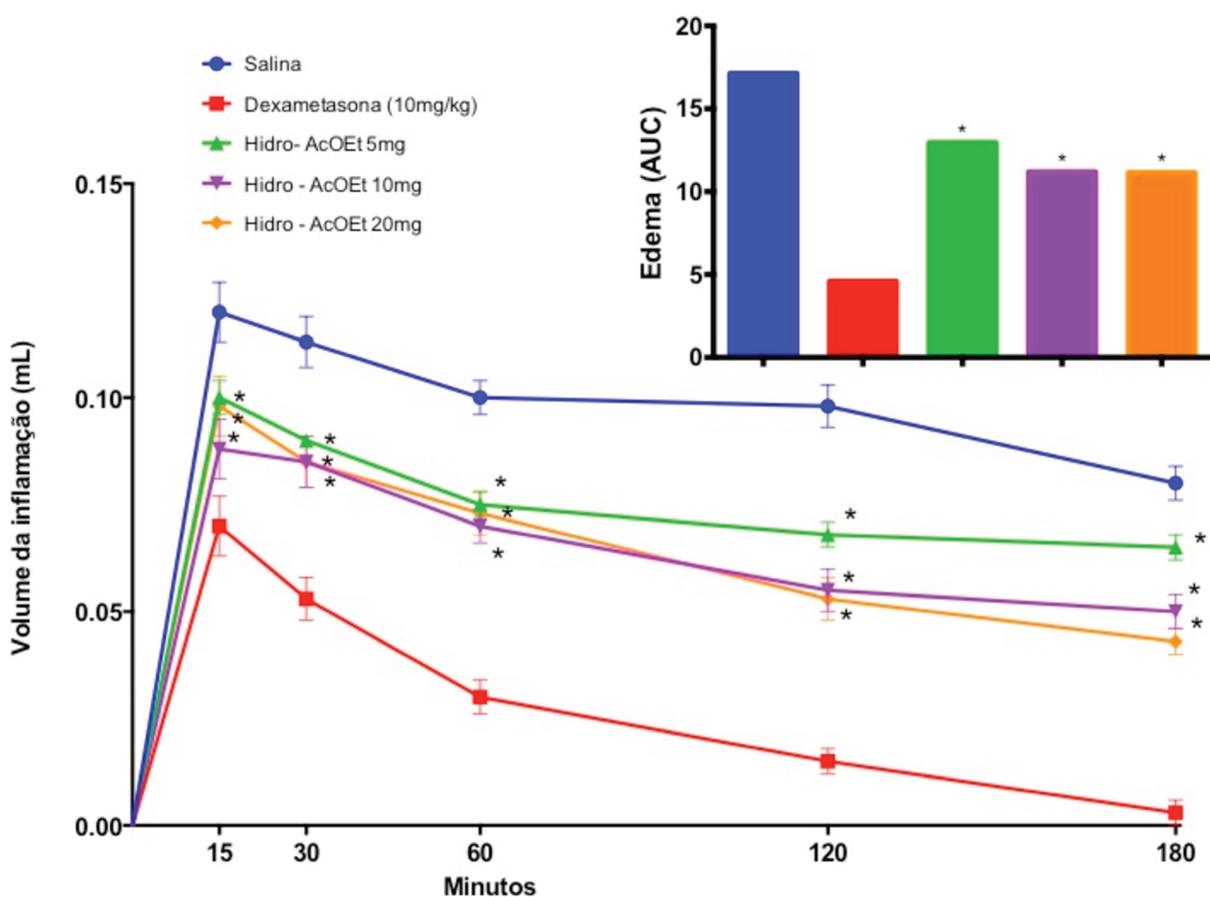


Figura 19 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em acetato de etila do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

No tempo de 180 minutos, as doses de 5mg/kg e 10mg/kg tiveram uma diminuição na inibição correspondendo a $19 \pm 2,5\%$ e $38 \pm 3,3\%$ respectivamente, já a dose de 20mg/kg se manteve com os $46 \pm 3,3\%$ encontrados anteriormente no tempo de 120 minutos. Esse extrato é muito inferior do que a dexametasona 10mg/kg que em sua menor atividade teve uma inibição de $42 \pm 5\%$ no tempo de 15 minutos. A AUC nos dá os resultados de 12,9, 11,2 e 11,1 para as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg respectivamente.

Todos os resultados se mostraram estatisticamente significante entre si, exceto entre as doses de 10mg/kg e 20mg/kg da fase analisada.

5.9. Efeito da administração intraperitoneal da fase em n-BuOH do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

O tratamento via intraperitoneal 30 minutos antes com a fase n-BuOH do extrato hidroalcoólico sobre o efeito edematogênico causado pela sPLA2 via intraplantar está expresso na Figura 20. O maior efeito antiedematogênico pôde ser observado na ultima medição (180 minutos) da dose de 20mg/kg que foi de $50 \pm 5,83\%$, muito inferior quando comparado a dexametasona (10mg/kg) que teve a sua segunda menor inibição em $53 \pm 3,3\%$ no tempo de 30 minutos.

Para as outras doses temos inibição mínima de $17 \pm 3,3\%$ e $21 \pm 2,5\%$ no tempo de 15 minutos em doses de 5mg/kg e 10mg/kg respectivamente e inibição máxima no tempo de 120 minutos de $31 \pm 1,67\%$ e $46 \pm 1,67\%$ nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, respectivamente.

Para a AUC, temos resultados de 12,8, 10,8 e 10,6 para as doses de 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg respectivamente.

Quando aplicado o teste estatístico, apenas a comparação entre as doses de 10mg/kg e 20mg/kg da fase analisada não obteve significância estatística.

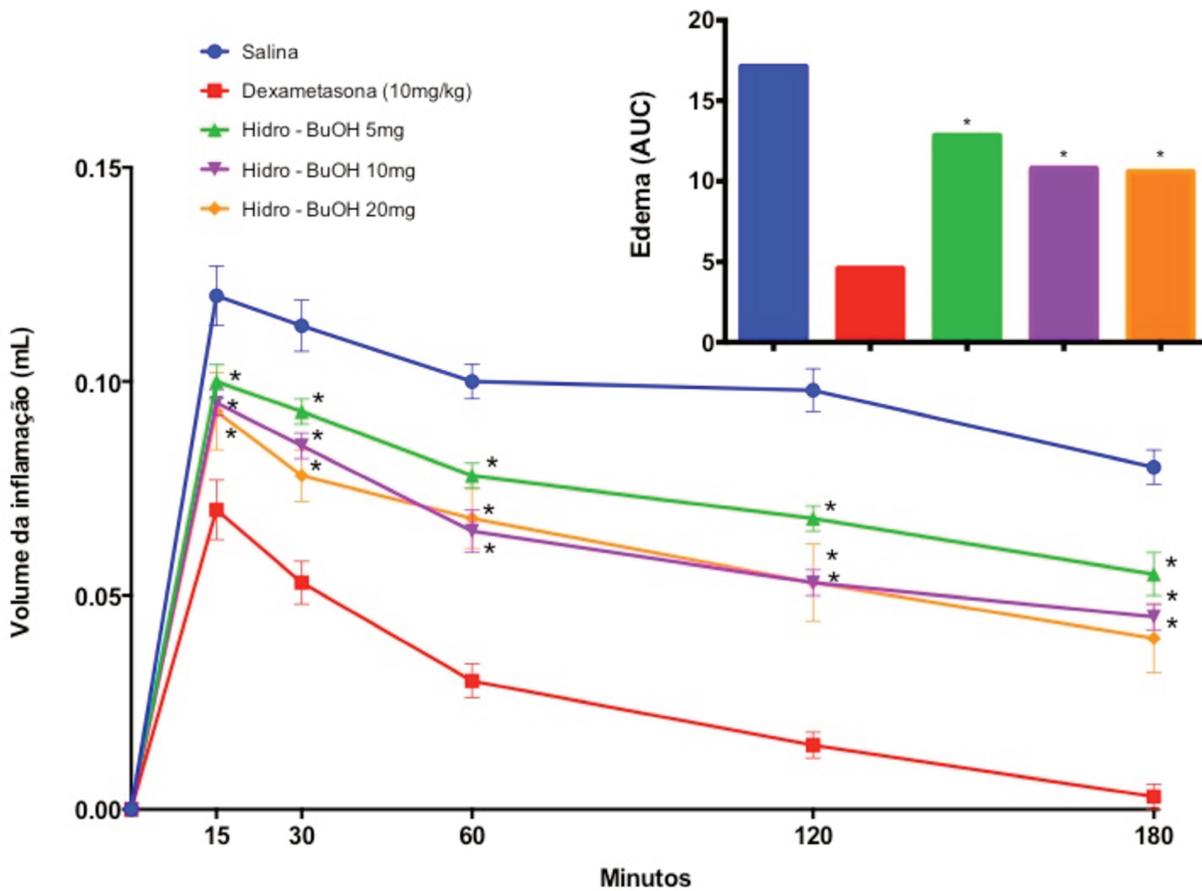


Figura 20 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase em n-butanol do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

5.10. Efeito da administração intraperitoneal da fase aquosa resultante dos procedimentos de partição do extrato hidroalcoólico sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de sPLA2 em camundongos

A influência da fase aquosa resultante dos procedimentos de partição do extrato hidroalcoólico sobre o efeito edematogênico causado pela administração intraplantar de sPLA2 em camundongos está representada na Figura 21. Esse extrato foi o que demonstrou ter a menor atividade inibitória sobre o edema causado pela sPLA2 que foi de $9 \pm 3,3\%$ no tempo de 180 minutos para a dosagem de 5mg/kg. Em contraste, nesse mesmo tempo, as outras doses demonstraram inibir $31 \pm 6,6\%$ e $38 \pm 4,17\%$ para 10mg/kg e 20mg/kg respectivamente.

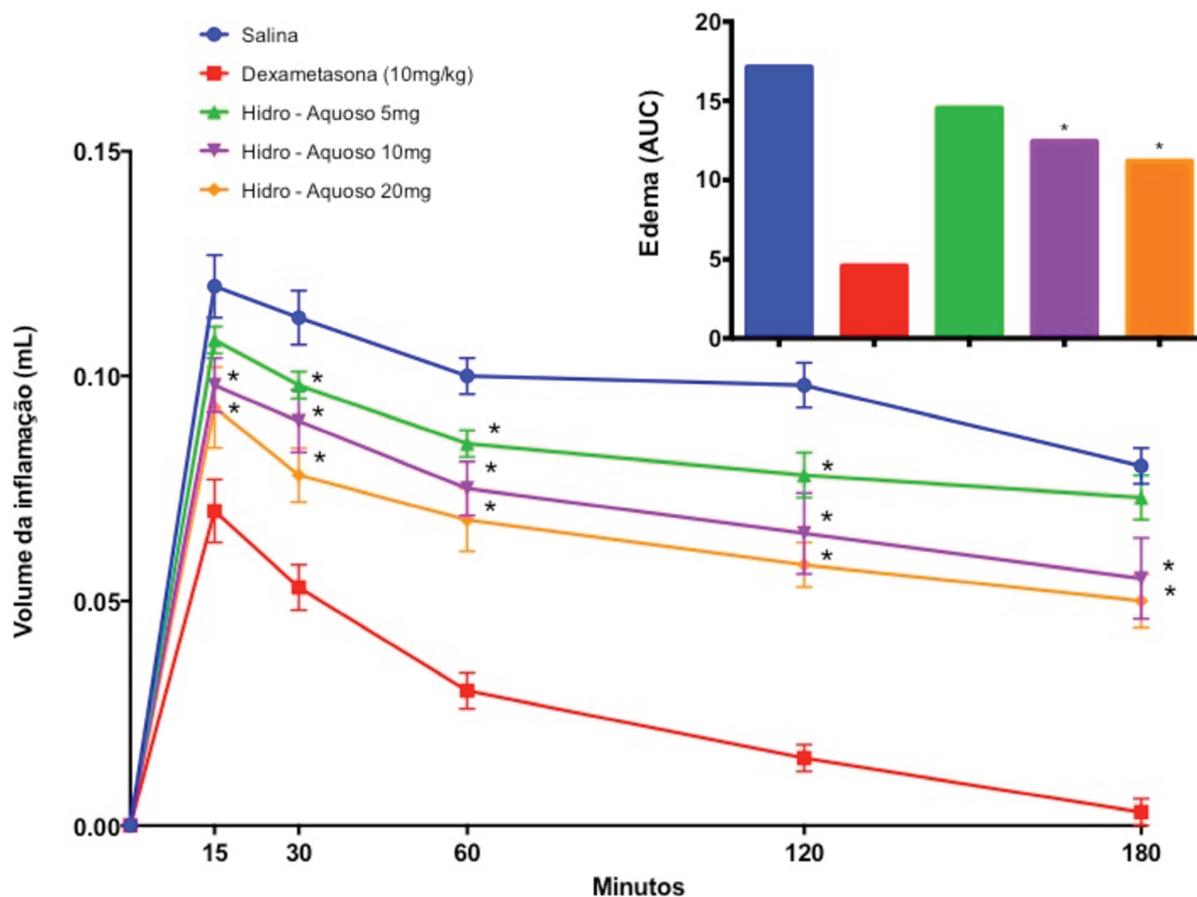


Figura 21 – Edema de pata induzido por sPLA2 (25µg/pata) em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) previamente tratados com Salina, Dexametasona (10mg/mL) e com a fase aquosa resultante da partição do extrato hidroalcoólico de *L. racemosa* (5, 10 e 20 mg/Kg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

A inibição máxima desse extrato foi observada na dose de 20mg/kg resultando em inibição de $41 \pm 3,3\%$ no tempo de 120 minutos. O efeito desse extrato não pode ser comparado ao da dexametasona 10mg/kg que apresentou como menor inibição $42 \pm 5\%$ no tempo de 15 minutos.

Nessa fase, a AUC foi de 14,5 para a dose de 5mg/kg, 12,4 para a dose de 10mg/kg e 11,2 para a dose de 20mg/kg.

5.11. Influência da incubação entre as fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico, ambas com a sPLA2 no edema de pata induzido pela injeção intraplantar do incubado em camundongos:

Analisando a figura 22, inicialmente vemos pouca expressividade da incubação das fases com a sPLA2, resultando em inibição, no tempo de 15 minutos, de $10 \pm 8\%$ para o incubado AcOEt:PLA2 e de $3,33 \pm 8\%$ para o incubado n-BuOH:PLA2.

Já podemos ver algum efeito significativo quando analisamos o tempo de 30 minutos, o qual o incubado AcOEt:PLA2 inibiu $42,86 \pm 5\%$, mas o incubado n-BuOH:PLA2 obteve uma inibição de apenas $22,86 \pm 15\%$ sobre a atividade inflamatória total. No tempo de 60 minutos, estas inibições quase se igualam, resultando na inibição de $51,43 \pm 3\%$ e $45,71 \pm 15\%$ para os incubados AcOEt:PLA2 e n-BuOH:PLA2 respectivamente.

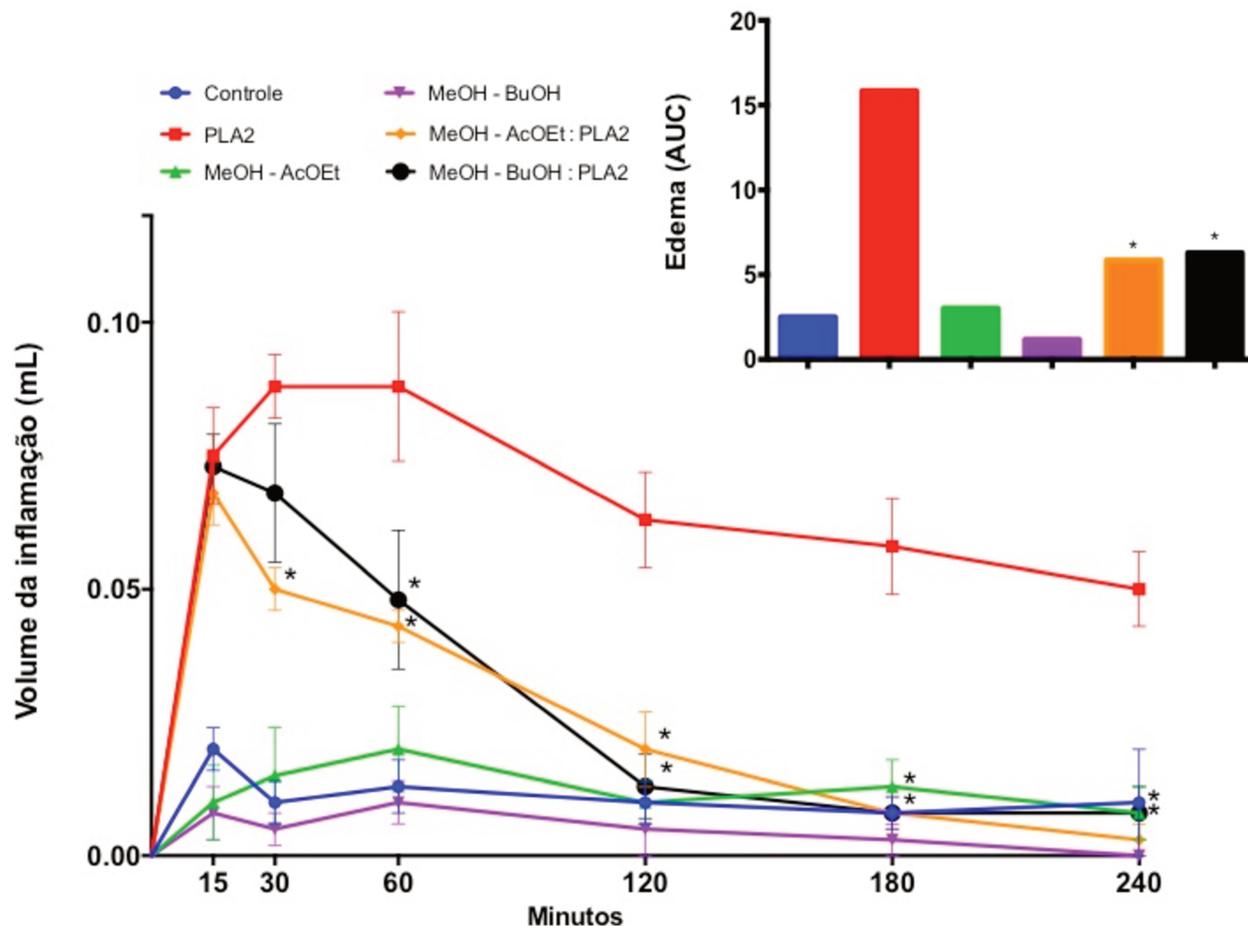


Figura 22 – Edema de pata em camundongos Swiss fêmeas (25-35g) utilizando como agente flogístico a substância controle (tampão PBS), sPLA2 (12,5µg/pata), as fases em acetato de etila e em butanol do extrato metanólico (12,5µg/pata) e os incubados das fases em acetato de etila e em

butanol do extrato metanólico com a sPLA₂ (1:1 12,5 + 12,5µg/pata). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Tukey, *P<0,05

Entretanto, uma hora depois, aos 120 minutos, o incubado n-BuOH:PLA₂ inibiu 12% a mais a inflamação do que o incubado AcOEt:PLA₂, com inibição de 80 ± 10% e 68 ± 11% respectivamente. Ao final das 4 horas de experimento, no minuto 240, o incubado AcOEt:PLA₂ volta a inibir mais a inflamação com uma porcentagem de inibição de 95 ± 5% comparados a 85 ± 10% obtidos com o incubado n-BuOH:PLA₂.

Nesta análise, a AUC nos mostra que as fases de extrato testadas não influenciam no edema de pata causado pelas soluções incubadas, mostrando que o edema é proveniente exclusivamente da PLA₂.

Para o grupo controle obtivemos AUC de 2,5, e para a PLA₂ AUC de 15,8; para a fase em acetato de etila do extrato metanólico, obtivemos AUC de 3,0 e para a fase em n-butanol do extrato metanólico, obtivemos AUC de 1,1. Já para os grupos experimentais, obtivemos AUC de 5,8 para o incubado da fase em acetato de etila do extrato metanólico com a PLA₂ e 6.2 para o incubado da fase em n-butanol do extrato metanólico com a PLA₂.

A análise estatística comprova que não existe diferença entre as fases utilizadas isoladamente, ou seja, sem a PLA₂, e o grupo controle. Já os incubados, possuem resultados significativos comparados a PLA₂, mas não entre si, mostrando que são equivalentes.

5.12. Efeito inibitório das fases de extratos de *L. racemosa* sobre a atividade fosfolipásica da sPLA₂:

O ensaio da atividade antifosfolipásica nos mostrou que todas as fases possuem propriedades inibitórias sobre a atividade catalítica da sPLA₂. Essa inibição está representada na Figura 23. Para o tempo de 60 minutos (Figura 24), a fase que apresentou menor efeito foi a aquosa do extrato hidroalcoólico, inibindo 34 ± 1,9% da atividade enzimática. Por outro lado, a fase em n-BuOH do extrato hidroalcoólico teve a maior inibição com 68 ± 1,2% seguido do extrato metanólico bruto e da fase em n-BuOH do extrato metanólico com inibições de 64 ± 0,89% e 64 ± 1,0%, respectivamente. A fase em AcOEt do extrato metanólico teve inibição de 58 ± 1,7%. Os outros extratos inibiram entre 38% e 52% a atividade enzimática da enzima PLA₂. Todos os resultados foram estatisticamente significativos quando comparado a PLA₂.

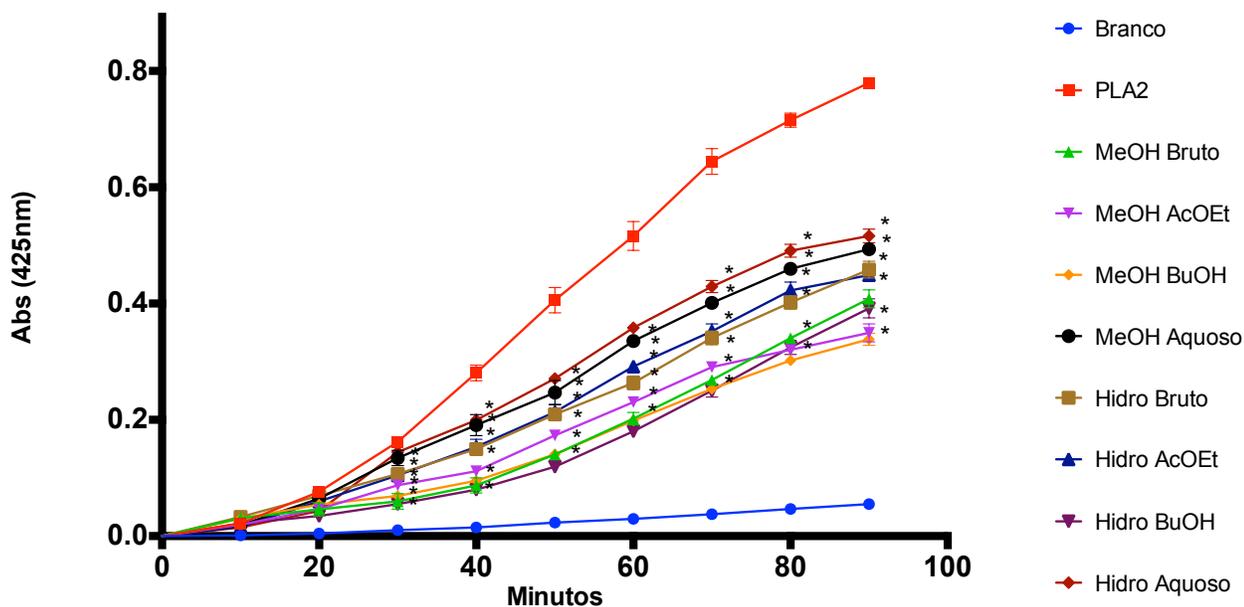


Figura 23 – Efeito das fases em acetato de etila, n-butanol e aquosa dos extratos metanólico e hidroalcoólico e dos respectivos extratos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

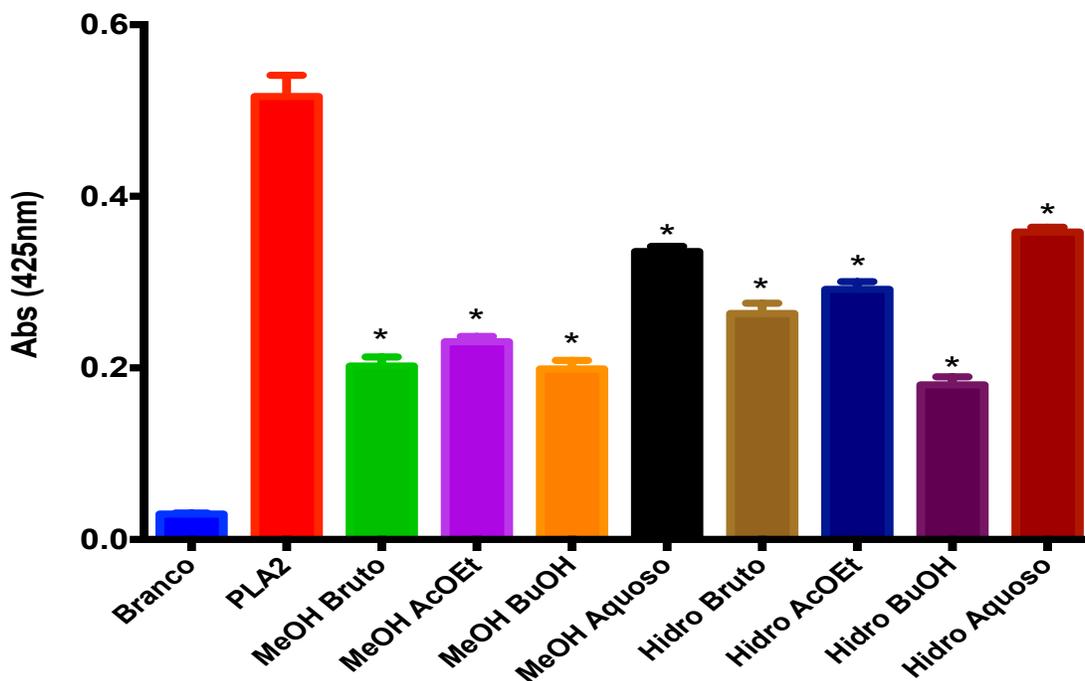


Figura 24 – Efeito das fases em acetato de etila, n-butanol e aquosa dos extratos metanólico e hidroalcoólico e dos respectivos extratos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato com tempo de incubação de 60 minutos. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

5.13. Efeito inibitório dos grupos obtidos no fracionamento da fase em n-butanol do extrato metanólico de *L. racemosa* sobre a atividade fosfolipásica da sPLA2:

O fracionamento da fase em n-BuOH do extrato metanólico estratificou a sua importante inibição apresentada no ensaio de inibição enzimática representada na figura 25. No tempo de 60 minutos (Figura 26), os grupos que apresentaram maior inibição foram o L7 e o L12, inibindo a atividade fosfolipásica em $74 \pm 1\%$ e $74 \pm 4\%$ respectivamente, com o qual obtivemos um valor maior do que a própria fase do extrato, que inibiu $66 \pm 1\%$. A menor atividade inibitória foi do grupo L6 que corresponde a $1 \pm 1\%$, assim consideramos que não houve inibição significativa. Observando a atividade conforme o tempo, o grupo L6 teve um comportamento diferente dos outros. Inicialmente, esse grupo aumentou a atividade enzimática, esse aumento foi de $194 \pm 27\%$ no minuto 20 e foi decaindo até um aumento de $11 \pm 1\%$ no minuto 50. No minuto 70 já observamos inibição de $13 \pm 4\%$ na atividade fosfolipásica. Todos as fases, exceto a L1 e L6, obtiveram resultados significantes quando comparados a PLA2.

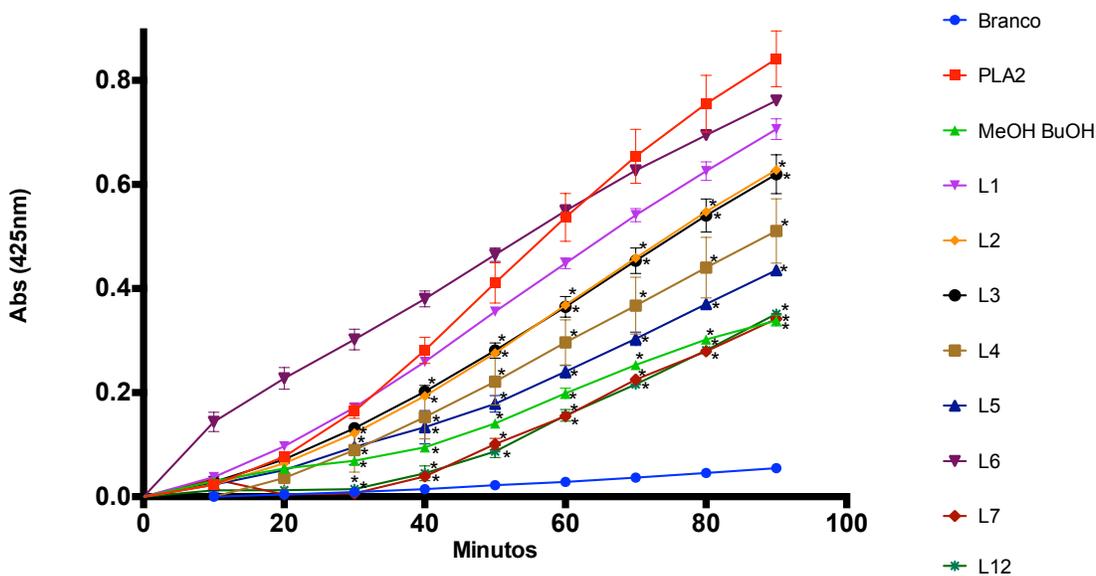


Figura 25 – Efeito da fase em butanol do extrato metanólico e de seus grupos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

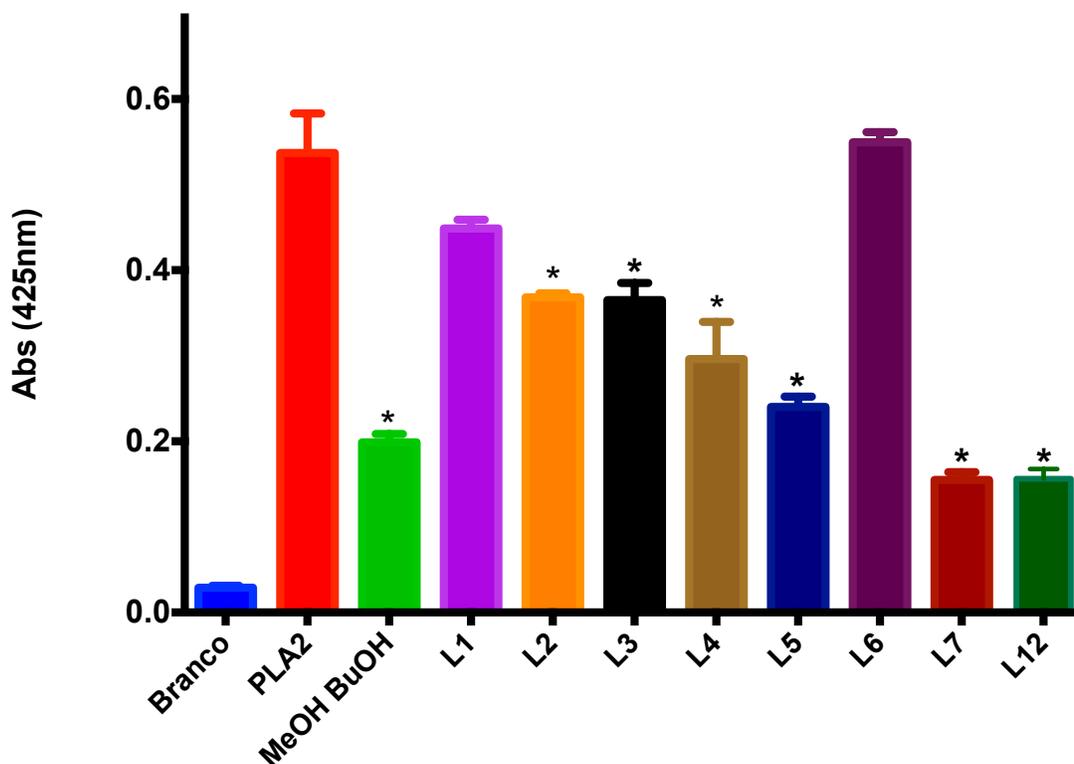


Figura 26 – Efeito da fase em butanol do extrato metanólico e de seus grupos sobre a atividade catalítica da sPLA2 utilizando o 4N3OBA como substrato com tempo de incubação de 60 minutos. Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

5.14. Inibição da atividade mitotóxica da sPLA2 resultante da incubação com as fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico:

A incubação da enzima PLA2 com os extratos de *L. racemosa* não apresentaram uma atividade inibitória significativa sobre o efeito mitotóxico dessa enzima. A fase em AcOEt do extrato metanólico (Figura 27) apresentou inibição da atividade mitotóxica de $18 \pm 8\%$, enquanto a fase em n-BuOH do mesmo extrato (Figura 28) não apresentou nenhuma inibição significativa comparado a injeção da enzima pura. Essa pequena inibição apresentada pela fase em AcOEt do extrato metanólico não foi estatisticamente significativa, nos levando a um resultado negativo.

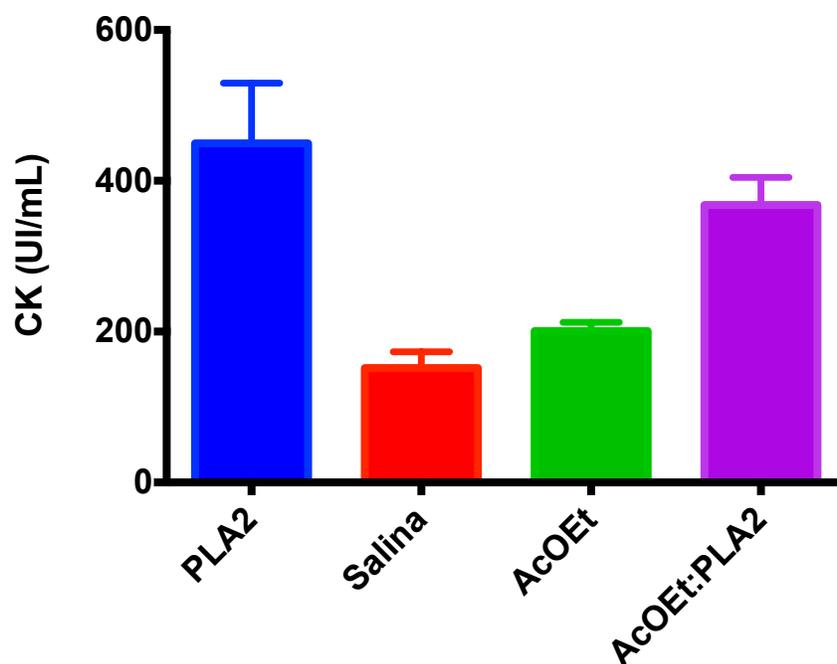


Figura 27 – Atividade da enzima Creatina Quinase de camundongos tratados com sPLA2 (50µL, 25µg), solução salina, fase em AcOEt do extrato em MeOH (50µL, 25µg) e incubado entre sPLA2 e fase em AcOEt do extrato em MeOH (50µL, 25µg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

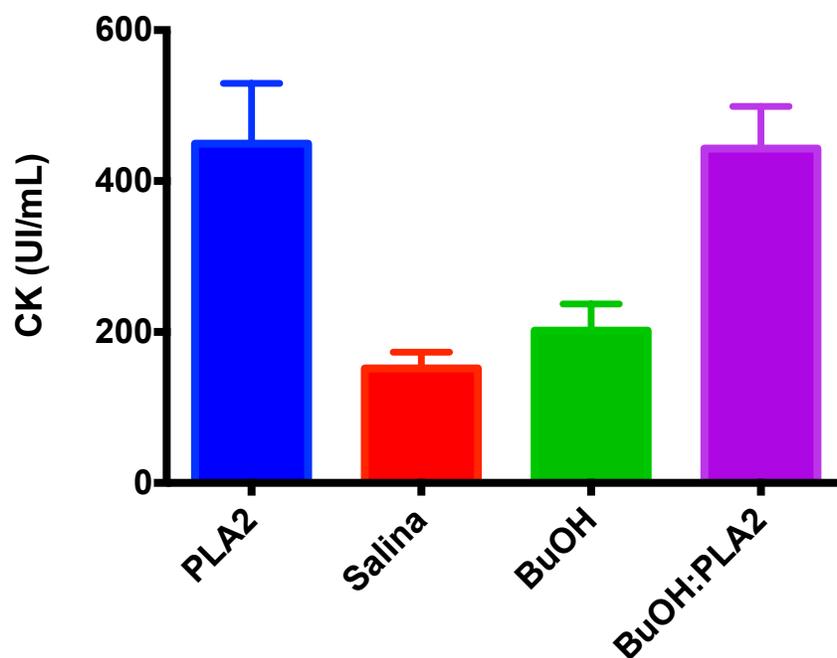


Figura 28 – Atividade da enzima Creatina Quinase de camundongos tratados com sPLA2 (50µL, 25µg), solução salina, fase em n-BuOH do extrato em MeOH (50µL, 25µg) e incubado entre sPLA2 e a fase em n-BuOH do extrato em MeOH (50µL, 25µg). Análise estatística feita conforme ANOVA seguido do teste de Dunnett, *P<0,05

6. DISCUSSÃO

Os produtos naturais extraídos de plantas são de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. Essas moléculas, quando isoladas, podem servir como futuros fármacos ou como protótipo para criação de outros. (Barreiro e Bolzani, 2009) O ensaio bioassistido é uma ferramenta chave para a busca das moléculas mais ativas em uma planta. (Filho e Yunes, 1997) Neste estudo, utilizamos os ensaios de edema de pata em camundongos, quantificação da creatina quinase sérica e de inibição enzimática para guiar a tarefa de isolamento das substâncias químicas com maior potencial antiinflamatório e antifosfolipásico.

Dentre muitos metabólitos especiais destacam-se os flavonóides por apresentarem diversos efeitos terapêuticos como antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outros. Devido a esse amplo espectro terapêutico, essa classe é de especial interesse para a farmacologia. (Harbone e Williams, 2000)

A sPLA₂, enzima extraída do veneno de várias serpentes e outros animais, exerce efeitos inflamatórios e miotóxicos advindos da clivagem dos fosfolipídeos de membrana em eicosanóides pró-inflamatórios como o ácido araquidônico. Já é sabido que sua atividade pode ser inibida por flavonóides e seus similares, prevenindo a formação de ácido araquidônico e, conseqüentemente, suas ações deletérias como a inflamação e a miotoxicidade (Lättig et. al.; 2007).

Os ensaios iniciais de edema de pata com as fases dos extratos foram realizados com o intuito de obter uma triagem farmacológica das amostras, e assim, poder selecionar as melhores fases para dar continuidade ao trabalho químico de isolamento e elucidação estrutural. Tal avaliação preliminar permitiu a escolha das fases em acetato de etila e em n-butanol do extrato metanólico.

A fase em acetato de etila do extrato metanólico (figura 16) foi a primeira selecionada, tanto por possuir boa atividade farmacológica no ensaio de edema de pata, ou seja, atividade antiedematogênica considerável, tendo como inibição máxima a dose de 20 mg/kg no tempo de 180 minutos e AUC de 5.5 para esta dose, quanto por apresentar considerável atividade de inibição enzimática para a enzima sPLA₂, ou seja, atividade antifosfolipásica, com inibição de $58 \pm 1,7\%$ da atividade enzimática no tempo de 60 minutos. Ambos os testes são significativos quando comparado aos controles, e para o ensaio de edema de pata, essa dose apresentou AUC de 17,1 para salina, 4,5 para dexametasona (10mg/kg).

A fase em n-butanol do extrato metanólico (figura 17) também foi selecionada por exibir significativo efeito antiedematogênico quando comparado às outras fases, exibindo valores de inibição de $50 \pm 3,3\%$ para a dose de 20 mg/kg aos 15 minutos, efeito este que foi mais pronunciado que o fármaco de referência (dexametasona 10 mg/kg), que inibiu $42 \pm 5\%$ no mesmo tempo. Para a dose de 20 mg/kg, a atividade antiedematogênica mostrou-se ligeiramente inferior a dexametasona 10 mg/kg com a diferença menor que 5% de inibição durante todo o ensaio. Entretanto, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a dose de 20 mg/kg e a dexametasona 10 mg/kg no qual obtivemos valores de AUC de 4.8 para a dose de 20 mg/kg e 4.5 para a dexametasona 10 mg/kg.

O efeito antifosfolipásico observado no minuto 60 do ensaio com a fase em n-butanol do extrato metanólico (figura 24) foi o segundo maior com inibição de $64 \pm 1,0\%$ da atividade fosfolipásica, ficando atrás apenas da fase em n-butanol do extrato hidroalcoólico. Essa última fase não foi selecionada para a continuidade do trabalho químico por não possuir atividade antiedematogênica significativa.

Em contraponto ao apresentado na fase em acetato de etila do extrato metanólico, a fase n-butanólica do extrato metanólico está enriquecida com uma substância majoritária presente no tempo de retenção de 3,7 minutos, o que nos sugere que a atividade antiinflamatória possa ter origem na substância contida neste pico. A fase em acetato de etila do extrato metanólico também apresenta este pico, porém também possui outros compostos em quantidades significativas.

Os outros 4 picos apresentados no cromatograma da fase em n-butanol do extrato metanólico entre os tempos de 5 minutos e 17 minutos são minoritários e pouco relevantes em relação a intensidade, quando comparados ao pico majoritário.

Em ambas as curvas do efeito antiedematogênico podemos observar um perfil de efeito dose resposta, tendo menores inibições para as doses de 5 mg/kg e maiores inibições para as doses de 20 mg/kg. Também podemos observar o perfil de efeito dose resposta para a fase aquosa do extrato hidroalcoólico. Estes fatos podem ser confirmados pela AUC obtida nesses ensaios para cada dose. Entretanto, comparando as outras fases, as curvas de inflamação das doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg estão sobrepostas nos sugerindo uma saturação no efeito antiedematogênico.

Como já esperado, em todos os ensaios de edema de pata a menor atividade foi observada na dose de 5 mg/kg.

Para realizar a elucidação estrutural dos compostos presentes nas fases e frações provenientes de *Laguncularia racemosa*, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas.

O espectro e as fragmentações de massas obtidas no ensaio de espectrometria de massas, adicionado aos espectros em ultravioleta dos componentes da amostra, nos dão pistas sobre a estrutura química da molécula, nos permitindo em muitas vezes a completa elucidação estrutural.

A primeira fase escolhida para o ensaio de espectrometria de massas foi a fase em acetato de etila do extrato metanólico, pois, como descrito nas figuras 6 e 7, essa fase possui 4 picos com espectros que absorvem na região de 227-228 nm, 260-265 nm e 355-357 nm, representando um fragmento de cinamofila que é característico de alguns flavonóides. (Simões et al, 2007)

Os espectros e a fragmentação de massas obtidos no ensaio de espectrometria de massas nos permitiu identificar 10 flavonóides O-glicosilados presentes na fase em acetato de etila do extrato metanólico. De acordo com as fragmentações de massa no modo positivo, pudemos identificar um flavonóide, elucidado como Miricetina-3-O-rhamnosídeo. Todos os outros 9 flavonóides foram elucidados no modo negativo, resultando na elucidação da Miricetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, Miricetina-3-O-glicosídeo, Miricetina-3-O-xilosídeo, Quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, Miricetina-3-O-arabinosídeo, Quercetina-3-O-glicosídeo, Quercetina-3-O-xilosídeo, Quercetina-3-O-arabinosídeo e Quercetina-3-O-rhamnosídeo.

Lembrando que para os flavonóides ligados a fragmentos de xilose e arabinose, com a técnica empregada, não podemos afirmar com exatidão qual é o glicosídeo ligado a aglicona. Apenas sabemos que quem pela ordem de eluição.

De acordo com um trabalho neozelandês de 1996, foi observado que a quercetina-3-O-xilosídeo possui tempo de retenção menor do que a quercetina-3-O-arabinosídeo. Assim, inferimos que de acordo com a tabela 2, a substância que foi eluída no tempo de retenção 12,6 é a quercetina-3-O-xilosídeo e no tempo de retenção 13,5 é a quercetina-3-O-arabinosídeo. O mesmo é válido para a aglicona miricetina. (Lu e Foo, 1997)

Na atualidade, já é bem estabelecido por inúmeros trabalhos publicados (Gil et al, 1994, Hault, et al., 1994, Cotelli et al., 1996, Rotelli et al., 2003, Laupattarakasem et al., 2004), que os flavonóides possuem atividades antioxidante e antiinflamatória, explicando em parte os efeitos da fase em acetato de etila do extrato metanólico. Entretanto, nesse momento do estudo, podíamos apenas sugerir que a origem do efeito antiedematogênico

exercido pela fase n-butanólica do extrato metanólico deva estar relacionada ao constituinte químico majoritário presente nesta fase.

Conforme preconizam os comitês de ética de uso de animais em pesquisa, o teste de atividade miotóxica utilizou um pequeno número de animais e, portanto, foi realizado apenas com as fases em acetato de etila e n-butanol do extrato metanólico. Esse teste quantifica a enzima creatina quinase liberada pelo tecido muscular, no qual é injetado a sPLA2, que cliva fosfolipídeos de membrana causando lise nas células musculares liberando seu conteúdo citoplasmático que é rico em creatina quinase (Cintra-Francischinelli et al., 2010).

Os ensaios nos mostram que ambas as fases não exercem efeito miotóxico, assim não aumentam significativamente a liberação de creatina quinase quando comparado a diferença entre a injeção de sPLA2 e a injeção de solução salina.

Para verificar se as fases em questão possuem efeito inibitório sobre a sPLA2, foi feita a incubação prévia da amostra com a enzima sPLA2 visando uma possível interação molecular, e após isso, esse incubado é injetado no músculo. Nesse ensaio não obtivemos resultados positivos com a fase em n-butanol do extrato metanólico a qual não inibiu a liberação de creatina quinase quando comparada a injeção de sPLA2 pura. Para a fase em acetato de etila do extrato metanólico houve uma pequena inibição de $18 \pm 8\%$, nos mostrando um resultado estatisticamente negativo quando comparada a injeção de sPLA2 pura.

Segundo Lättig et. al., 2007, esses resultados nos permitem inferir que a mínima inibição da fase em acetato de etila do extrato metanólico, pode estar correlacionada a presença de flavonóides enquanto que a fase em n-butanol do extrato metanólico por apresentar reduzida concentração de flavonoides, não apresenta tal efeito. Associando os resultados de atividade biológica com os resultados provenientes da análise por espectrometria de massas da fase em acetato de etila do extrato metanólico, na qual foram identificados dez flavonóides glicosilados, temos evidências de que são esses constituintes químicos que exercem a inibição dos efeitos edematogênico e catalítico, característicos da ação da sPLA2.

A partir desses resultados, foi realizado o teste de edema de pata utilizando o incubado fase:enzima como agente flogístico, com o objetivo de traçar a sua curva de inibição inflamatória e, assim, obter alguma correlação entre a atividade antiinflamatória e o potencial de inibição enzimática destas fases. Neste ensaio, foram utilizadas as fases em

acetato de etila e n-butanol do extrato metanólico, selecionadas para o prosseguimento do estudo.

As duas fases quando injetadas isoladamente apresentaram um comportamento semelhante a injeção de PBS, mostrando que elas não exercem efeitos flogísticos. Logo, quando injetado, via intraplantar, o incubado da fase em acetato de etila do extrato metanólico com a sPLA2, no 15^o minuto temos uma pequena inibição de $10 \pm 8\%$ do efeito edematogênico seguido de inibição significativa de $42,86 \pm 5\%$ no minuto 30. Já para o incubado fase em n-butanol do extrato metanólico com a sPLA2, as inibições foram de $3,33 \pm 8\%$ e $22,86 \pm 15\%$ para os minutos 15 e 30, respectivamente.

Essa primeira fase do experimento é de suma importância já que o agente flogístico é a sPLA2, pois por ser uma enzima que catalisa rapidamente os fosfolipídeos de membrana em agentes pró-inflamatórios, seu pico de inflamação ocorre até os 30 primeiros minutos, ao contrário da carragenina, substância largamente utilizada no teste de edema de pata, que é um agente irritante, depende da ação do sistema imunológico, convocação de células de defesa como mastócitos e, conseqüente liberação de histamina, caracterizando um pico de inflamação após a primeira hora do experimento (Di Rosa et al., 1971, Gil et al., 1997, Toyama et al., 2003, Toyama et al., 2009).

Com os resultados de inibição do edema de pata dos incubados, podemos inferir que para esse ensaio, a fase em acetato de etila do extrato metanólico possui efeito antifosfolipásico equivalente ao da fase em n-butanol do extrato metanólico, fato também observado quando temos um efeito sistêmico dessas fases.

Mesmo apresentando ligeiras diferenças na inibição do edema nos tempos 15 e 120 minutos, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparadas as curvas entre si.

Comparando a AUC obtida nas duas fases, a fase em acetato de etila do extrato metanólico apresenta um valor um pouco menor do que a fase em n-butanol do extrato metanólico, mostrando uma ligeira vantagem no efeito antiedematogênico para a fase em acetato de etila. Esses resultados corroboram com a possibilidade da fase em acetato de etila do extrato metanólico possuir maiores concentrações de flavonóides e conseqüentemente inibirem de forma mais acentuada a PLA2 e, ao mesmo tempo, indicam uma possível atividade antiinflamatória proveniente de outras vias como inibição de COX-1/2 ou atividade antioxidante de algum composto contido na fase em n-butanol do extrato metanólico (William et al., 1995, Rotelli et al., 2003, Lättig et al.; 2007).

Diante dos resultados expostos e devido a maior massa da fase em n-butanol do extrato metanólico (372 mg) em comparação com a fase em acetato de etila do extrato metanólico (194 mg), optou-se pela realização do fracionamento dessa fase em uma coluna cromatográfica utilizando filtração em gel de Sephadex LH-20 para separação e possível purificação dos compostos ali contidos.

Assim, a partir do fracionamento cromatográfico da fase em n-butanol do extrato metanólico foram obtidas 195 frações, que após análises por CCDC, foram reunidas em 12 grupos de frações nomeados L1 a L12 os quais foram submetidos a cromatografia líquida.

Através da análise dos cromatogramas obtidos dos grupos resultantes do fracionamento foi possível verificar que todos os grupos estavam impregnados com a substância majoritária da fase que possui tempo de retenção de 3,7 minutos. No entanto, apenas o grupo L7 e o grupo L12 apresentaram tal componente ($t_R = 3,7\text{min}$) com maior abundância quando comparado aos demais grupos (Figura 13).

Também foi possível verificar que o grupo L4 possuía em seu cromatograma 5 picos com as mesmas bandas de absorção em UV correspondentes ao fragmento cinamoila já visto na fase em acetato de etila do extrato metanólico, novamente sendo sugestiva a presença de flavonóides neste grupo.

A posterior análise do grupo L4 por espectrometria de massas permitiu a identificação de oito flavonóides glicosilados pertencentes as mesmas agliconas, miricetina e quercetina, presentes na fase em acetato de etila do extrato metanólico. No entanto, metade dos flavonoides (quatro) do grupo L4 possuem o grupamento galoil, derivado do ácido gálico, esterificado a unidade de açúcar. Os flavonóides foram elucidados como: Quercetina-3-O-(galoil)-glicosídeo, Quercetina-3-O-(galoil)-xilósídeo, Miricetina-3-O-(galoil)-xilósídeo, Miricetina-3-O-(galoil)-rhamnosídeo, Miricetina-3-O-xilosídeo, Miricetina-3-O-rhamnosídeo, Quercetina-3-O-xilosídeo e Quercetina-3-O-rhamnosídeo.

A *Laguncularia racemosa* é uma espécie que possui altas concentrações de taninos (De-Godoy et al. 1997, Shi *et al.*, 2010, Ebrahim et al., 2012), e em particular, os taninos hidrolisáveis, que são poliésteres de ácido gálico. Em 2009, Mendonça e colaboradores revelaram uma associação entre o número de galhas da planta e sua quantidade de fenóis.

Descobriu-se assim que os insetos evitavam as plantas galhadas, possivelmente pela quantidade de metabólitos especiais ali contidos. Esse estudo também mostrou que o principal composto fenólico contido em *L. racemosa* era o ácido gálico, justificando assim a formação de metabólitos especiais com esse grupamento.

Unindo os fatos publicados por Shi e colaboradores (2010), Mendonça e colaboradores (2009) e a definição descrita por Lekha e Lonsane (1997), podemos considerar esperada a presença do grupamento galoil ligado a metabólitos especiais, tais como os flavonoides glicosilados presentes na espécie *L. racemosa*.

Os flavonóides intrinsecamente podem ser considerados compostos fenólicos, que quando polimerizados, dão origem as proantocianidinas, que nada mais são que os taninos condensados (Lekha e Lonsane, 1997).

Sabemos que os taninos são capazes de precipitar proteínas, e assim, poderia abolir a atividade da PLA2. Nos ensaios antifosfolipásicos, obtivemos melhores resultados com os grupos L7 e L12, que continham como substância majoritária um pico com $T_r = 3,7$. Para os taninos, por serem moléculas polifenólicas, é esperado que esse tenha um tempo de retenção baixo quando aplicado numa coluna cromatográfica C18, assim, levantamos a suspeita de que essa substância seja um tanino. Resultados parciais de RMN já confirmaram que a substância contida em L7 é um tanino, porém sua estrutura ainda não está totalmente elucidada.

Lembrando que esse é o segundo estudo que identificou flavonóides em *L. racemosa*. Shi e colaboradores, 2010, isolaram 4 flavonóides nomeados narigenina, apigenina, crisina e luteolina.

Este é o primeiro estudo que identificou 13 flavonóides glicosilados, (citados anteriormente nas figuras 9 e 14), e alguns deles, como os flavonóides ligados ao fragmento galoil foram raramente isolados na fitoquímica atual.

Este fato reforça as evidências de que o mangue é um ambiente rico, não apenas no sentido ecológico como também pode contribuir com a química de produtos naturais atual.

7. CONCLUSÃO

Sumário:

- A análise da fase em AcOEt do extrato MeOH por CLAE-EM identificou 10 flavonóides glicosilados e a análise do grupo L4, resultante do fracionamento da fase em n-BuOH do extrato MeOH por CLAE-EM identificou 8 flavonóides glicosilados.
- A atividade antiedematogênica foi acentuada nas fases que continham flavonóides, com perfil dose resposta.
- A atividade antifosfolipásica também foi acentuada nas fases que continham flavonóides e principalmente no grupo L7 e L12, que possuem uma substância isolada.
- A atividade antimiotóxica foi negativa para as fases AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico.

Conclusões:

É sabido que os flavonóides possuem a capacidade de inibir a PLA2 e outras vias da cascata da inflamação. Possivelmente, a atividade antiedematogênica das fases em AcOEt e n-BuOH do extrato metanólico são provenientes dos flavonóides identificados nas respectivas fases. Entretanto, existe uma substância em todas as fases com $T_r = 3,7$ que não foi elucidada.

Foi observado que para a atividade antifosfolipásica, os melhores resultados foram observados nos grupos L7 e L12, grupos esses que estão enriquecidos com a substância isolada não identificada.

Entretanto, no ensaio antimiotóxico não foi observada interação entre as fases em AcOEt e n-BuOH do extrato MeOH e a sPLA2, o que nos sugere que essas fases possivelmente não inibem a sPLA2 *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeysinghe PD, Wanigatunge RP. Evaluation of antibacterial activity of different mangrove plant extracts. *Ruhuna Journal of Science* 2006; 1:104–12.

Ache. Bula em texto do medicamento Acheflan creme. 2011 Disponível em: http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/4/BU_ACHEFLAN_CREME_AGO2011.pdf Acesso em: 12 de março de 2012.

Alongi DM, Trott L, Wattayakorn G, Clough BF. Below-ground nitrogen cycling in relation to net canopy production in mangrove forests of southern Thailand. *Marine Biology* 2002; 140:855–64.

Alves LF. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. *Revista Virtual de Química* 2013; 5(3), 450-513.

Amorim ELC, Lima CSA, Higino JS, Silva LRS, Albuquerque UP. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. *Infarma*. 2003; 15(1-3):66-9.

Arruda FVF, Gusmão NB, Silva MRO. Atividade antibacteriana dos extratos pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. UFPE, Departamento de antibióticos. 2010.

Bandaranayake WM. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*. 1998; 2:133–48.

Bandaranayake W.M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*. 2002; 10:421–52.

Barreiro EJ, Bolzani VS. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. *Química Nova* 2009; 32(3):679-88.

Berenguer B, Sánchez LM, Quíleza A, López-barreiro M, Haro O, Gálvez J *et al*. Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID-induced gastric ulcers. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 103(2):194-200.

Bhalla TN, Saxena RC, Nigam SK, Misra G, Bhargava K P. Calophyllolide: a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Indian Journal of Medical Research*. 1980; 72(5): 762–65.

Boopathy NS, Kathiresan K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *Journal of Oncology*. vol. 2010, Article ID 214186, 18 pages, 2010. doi:10.1155/2010/214186

Braun LT, Davidson MH. Lp-PLA2: A New Target for Statin Therapy: Current Atherosclerosis Reports. 2010; 12(1):29-33.

Bryant JK, Bidgood MJ, Lei P, Taberner M, Salom C, Kumar V. A Bifunctional Role for Group IIA Secreted Phospholipase A2 in Human Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocyte Arachidonic Acid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286:2492-503.

Calixto JB. Twenty five years of research on medicinal plants in Latin América a Personal Review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100:131-4.

Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel AP, João PS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(2):314-9.

Cintra-Francischinelli M, Caccin P, Chiavegato A. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(32):14140–5.

Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hidroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20:35-43.

Chika A, Bello SO. Antihyperglycaemic activity of aqueous leaf extract of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 129:34–7.

Cushman M, Nagarathnam, D, Burg DL, Geahlen RL. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoids analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1991; 34:798-806.

de Faria FM., Almeida AC, Luiz-Ferreira A, Dunder RJ, Takayama C, da Silva MS, da Silva MA, Vilegas W, Rozza AL, Pellizzon CH, Toma W, Souza-Brito AR, Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the rhizophora mangle l. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 139:234-43.

De-Godoy SAP, Mayworm MAS, Lo VK, Salatino A, Yara SN. Contents of lignins, nitrogen and tannins in leaves of typical species of Mangroves. *Revista Brasileira de Botânica* 1997; 20:35–40.

Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*. 1971; 104(1):15-29.

Ebrahim W, Aly AH, Mándi A, Totzke F, Kubbutat MHG, Wray V *et al.* Decalactone Derivatives from *Corynespora cassicola*, an Endophytic Fungus of the Mangrove Plant *Laguncularia racemosa*. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012; 3476–84.

Eloff JN, Katerere DR, Mcgaw LJ. The biological activity and chemistry of the Southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 119:686–99.

Emerenciano VP, Militão JSLT, Campos CC, Romofe P, Kaplan MAC, Zambon, M. Biochemical Systematics and Ecology. 2001; 29:947.

Lista de espécies da flora brasileira. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 15 Set. 2014

Food and Agriculture Organization of the United States (FAO). Integrated management of coastal zones, FAO Fisheries Technical Paper. Washington; FAO. 1992; p.327.

Food and Agriculture Organization of the United States (FAO). The world's mangroves 1980-2005. A thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment. FAO Forestry Paper, Washington; FAO, 2007; p.153.

Fonteh AN, Atsumi G, LaPorte T, Chilton FH. Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells. *Journal of Immunology*. 2000; 165(5):2773-82.

Filho CV, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 1997; 1(21):99-105.

Ganapaty S, Josaphine JS, Thomas PS. Anti-inflammatory activity of *Derris scandens*, *Journal of Natural Remedies*. 2006; 6(1):73-6.

Garcez FR, Garcez WS, Santana ALBD, Alves MM, Matos MFC, Scaliante AM. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2006; 17(7):1223-28.

Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Ferradiz ML, Bustos G, Paya M *et al*. Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Science*. 1994; 54:333-38.

Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, Masek K, Duke N. Status and distribution of mangrove forests of the world using Earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*. 2010; 20(1):154-9.

Godoy SAP, Mayworm MAS, Lo VK, Salatinol A, Novelli YS. Teores de ligninas, nitrogênio e taninos em folhas de espécies típicas do mangue. *Revista brasileira de Botânica*. 1997; 20(1).

Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Naz-imudeen SK. Anti inflammatory and central nervous system depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua férrera*. *Indian Journal of Pharmacology*. 1980; 12(3):181-92.

Guleria S, Tiku AK, Rana S. Antioxidant activity of acetone extract/fractions of *Terminalia bellerica* Roxb. *Fruit*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2010; 47:110-16.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicines*. 2006 Feb;27(1):1-93.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxidant in biological systems. *Free Radic. Biol. Med*. 1995; 18:125-26.

Harbone, JB. Flavonoids and evolution of the angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1977; 5:7-22.

Harbone JB. *Introducción a la Bioquímica Ecológica*. Alambra: Spain; 1985. 355p. 1 ed.

Harbone JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55:481-504.

Hoult JRS, Moroney MA, Paya M. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods in Enzymology*. 1994; 234:443-45.

IBD - Bases de dados tropicais. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas em fitoterápicos. Disponível em <<http://www.bdt.fat.org.br/publicações/padct/bio/cap10/eloint.html>>. Acesso em: 31 março 2011.

Joly CA, Haddad CFB, Verdade LM, Oliveira MC, Bolzani VS, Berlinck RGS. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Rev. USP*. 2011; (89): 114-133.

Kapil A, Sharma S, Wahidulla S. Leishmanicidal activity of 2-benzoxazolinone from *Acanthus illicifolius* in vitro. *Planta Medica*. 1994; 60(2):187-88.

Krogh R, Kroth R, Bertietal C. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) *Pharmazie*. 1999; 54(6):464-66.

Kuete V, Tabopda TK, Ngameni B, Nana F, Tshikalange TE, Ngadjui BT. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (Combretaceae). *South African Journal of Botany*. 2010; 76:125-31.

Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual Review of Biochemistry*. 2008; 77:495-520.

Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JRS. Anti-inflammatory isoflavonoids from the stems of *Derris scandens*. *Planta Medica*. 2004; 70(6):496-501.

Lättig J, Böhl M, Fischer P, Tischer S, Tietböhl C, Menschikowski M, Gutzeit HO *et al.* Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *Journal of computer-aided molecular design*. 2007; 21(8):473-83.

Lee SY. Mangrove outwelling: a review. *Hydrobiologia*. 1995; 295:203-12.

Leka PK, Lonsane BK. Production application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advanced Applied Microbiology*. 1997; 44:215-60.

Li L, Li X, Shi C, Deng Z, Fu H, Proksch P, Lin W. Pongamone A-E, five flavonoids from the stems of a mangrove plant, *Pongamia pinnata*. *Phytochemistry*. 2006; 67:1347-52.

- Li MY, Xiao Q, Pan JY, Wu J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Natural Product Reports*. 2009; 26:281-98.
- Li Y, Yu S, Liu D, Proksch P, Lin W. Inhibitory effects of polyphenols toward HCV from the mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012; 22(2):1099-102.
- Li Y, Liu J, Yu S, Proksch P, Gu J, Lin W. TNF- α inhibitory diterpenoids from the Chinese mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Phytochemistry*. 2010; 71(17-18):2124-31.
- Loder JW, Russel GB. Tumour inhibitory plants. The alkaloids of *Bruguiera sexangula* and *Bruguiera exaristata* (Rhizophoraceae). *Australian Journal of Chemistry*. 1969; 22(6):1271-75.
- Lu Y, Foo Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*. 1997; 59(2):187-94
- Marcussi S, Sant'ana CD, Oliveira CZ, Quintero RA, Menaldo DL, Beleboni, R.O *et al.* Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2007; 7(14):743-56.
- Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 93:207-12.
- Masoko P, Eloff JN. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia species* (Combretaceae) determined by bioautography. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4(12):1425-31.
- Masoko P, Picard J, Howard RL, Mampuru LJ, Eloff JN. In vivo antifungal effect of *Combretum* and *Terminalia* species extracts on cutaneous wound healing in immunosuppressed rats. *Pharmaceutical Biology*. 2010; 48(6):621-32.
- Matsuzawa A, Murakami M, Atsumi G, Imai K, Prados P, Inoue K, Kudo I. Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion. *Biochemical Journal*. 1996; 1; 318(2): 701-09.
- Melchor G, Armenteros M, Fernández O, Linares E, Fragas I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 2001; 72(6):689-91.
- Mendonça IVS, Monteiro JM, Souza JRB, Cortez JSA. Are *Laguncularia racemosa* galled leaves less attractive to chewing herbivores? *Neotropical Biology and Conservation*. 2009; 4(2):77-82.
- Middleton E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: Chapman and Hall. *The Flavonoids: Advances in Research*. London, p. 619-652, 1993.
- Miles DH, Kokpol U, Chittawong V, Tip-Pyang S, Tunsuwan Km Nguyen C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a

source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. *Pure Applied Chemical*. 1999; 70:23-7.

Mors WB, Nascimento MC, Pereira BM, Pereira NA. Plant natural products active against snake bite: the molecular approach. *Phytochemistry*. 2000; 55(6):627-42.

Moulisha B, Kumar GA, Kanti HP. Anti-leishmanial and anti-cancer activities of a pentacyclic triterpenoid isolated from the leaves of *Terminalia arjuna* Combretaceae. *Tropical Journal of Pharmaceutical*. 2010; 9(2):135-40.

Muller-Kuhrt L. Pitting nature back into drug discovery. *Nature Biotechnology*, 2003; 21(6):602.

Murakami M, Kudo I, Suwa Y, Inoue K. Release of 14-kDa group-II phospholipase A2 from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process. *European Journal of Biochemistry*, 1992; 209(1):257-65.

Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *The Journal of Biochemistry*. 2002; 131(3):285-92.

Murakami M. Hot topics in phospholipase A2 field. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 27(8):1179-82.

Nisbet L J, Moore M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Current Opinion in Biotechnology*. 1997; 8: 708-12.

Nogueira TC, Ferreira F, Toyama MH, Stoppiglia LF, Marangoni S, Boschero AC, Carneiro EM. Characterization of the insulinotropic action of a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. *Toxicon*. 2005; 45(2):243-8.

de Oliveira LG, Pupo MT, Vieira PC. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. *Química Nova*. 2013; 36(10):1577-86.

Oliveira DPC, Borrás MRL, Ferreira LCL, Lozano JLL. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2009; 19:2b.

Oliveira SCB, Fonseca FV, Antunes E, Camargo EA, Morganti RP, Aparício R, Toyama DO, Beriam LOS, Nunes EV, Cavada BS, Nagano CS, Sampaio AH, Nascimento KS, Toyama MH. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA2 by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. *BMC Biochemistry*. 2008; 9:16.

Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry*. 2010; 71:1132-48.

- Pietta PG, Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000; 63(7):1035-42
- Pongprayoon U, Baeckstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*. 1991; 57(6): 515–18.
- Pinto GL, Nava M, Martínez M, Rivas C. Gum Polysaccharides of Nine Specimens of *Laguncularia racemosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1993; 21(4):463-66.
- Queiroz MS. O paradigma mecanista da medicina ocidental moderna: uma perspectiva antropológica. *Revista de Saúde Pública*. 1986; 20:309-17.
- Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation: Structural-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 1988; 39:69-79.
- Ravikumar S, Muthuraja M, Sivaperumaland P, Gnanadesigan M. Antibacterial activity of the mangrove leaves *Exoecaria agallocha* against selected fish pathogens. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2010; 2(5):211– 13.
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, De la Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological research*, 2003; 48(6):601-06.
- Rotimi VO, Laughon BE, Bartlett G, Mosadomi HA. Activities of Nigerian Chewing Stick extracts against *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988; 32(4):598-600.
- Rump AF, Schussler M, Acar D, Cordes A, Ratke R, Theisohn M *et al.* Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen. Pharmacol.* 1995; 26: 603-11.
- Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81:327-36.
- Sánchez J, Melchora G, Martinez G, Escobar A, Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 2006; 77(2):141-43.
- Sánchez J, Faure R, Martinez G, Veja E, Fernández O. Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Revista de Salud Animal*. 2009; 31(3):170-75.
- Santos PG, Siani AC. Consolidação dos Grupos de Pesquisa em Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Brasil. *Revista Virtual de Química* 2013; 5(3): 438-449.
- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. New flavonoids from *Avicennia marina*. *Fitoterapia*. 2000; 71:274-77.

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammation response. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*. 2004; 18: 385-405.

Shi C, Xu MJ, Bayer M, Deng ZW, Kubbutat MHG, Waejen W *et al*. Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. *Phytochemistry*. 2010; 71:435-42.

Shilpi JA, Islam ME, Billah M, Islam KMD, Sabrin F, Uddin SJ *et al*. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic activity of mangrove plants: a mini review. *Advances in pharmacological sciences*. 2012; 1-7.

Siess MH, Leclerc J, Canivenc-Lavier MC, Rat P, Suschetet M. Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicology Applied Pharmacology*. 1995; 130:73-8.

Silva GIM, Gondim SPA, Nunes SFI, Sousa SCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 16(4):455- 62.

Silva MRO, Almeida AC, Arruda FVF, Gusmão N. Endophytic fungi from brazilian mangrove plant *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Combretaceae): their antimicrobial potential. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011; 2:1260-66.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovic PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora UFSC; 2007. 1101p. 6ed.

Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An importante scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 84:206-39

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). *V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2013. 22p.

Soejarto DD. Biodiversity prospecting and benefit haring: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 51:1-15.

Spalding M, Blasco F, Field C. *World mangrove atlas*. Okinawa: ISME;1997. 178p.

Suleiman MM, Bagla V, Naidoo V, Eloff JN. Evaluation of selected South African plant species for antioxidant, antiplatelet, and cytotoxic activity. *Pharmaceutical Biology*. 2010; 48(6):643-50.

Teixeira VL. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. *Revista Virtual de Química*. 2013; 5(3):343-362.

- Tewtrakul S, Tansakul P, Daengrot C, Ponglimanont C, Karalai C. Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. *Phytomedicine*. 2010; 17(11):851–55.
- Tomlinson, PB. *The Botany of Mangroves*. Cambridge:Cambridge University Press; 1986. 413p.
- Toyama MH, Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 2003; 41:1033–38.
- Toyama, DO, Marangoni S, Diz-Filho EBS, Oliveira SCB, Toyama MH. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon*. 2009; 53:417-26.
- Tzeng SH, Ko WC, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*. 1991; 64:91-100.
- Verheij HM, Slotboom AJ, De Haas GH. Structure and function of phospholipase A₂. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 1981; 91:91.
- Viegas Jr C, Bolzani VS, Barreiro EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. 2006; 29(2):326-37.
- Ximenes RM, Rabello MM, Araújo RM, Silveira ER, Fagundes FHR, Diz-Filho EBS, Buzzo SC, Soares VCG, Toyama DO, Gaeta HH, Hernandez MZ, Monteiro HSA, Toyama MH. Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A2 Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliensis* Benth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; Article ID 987517, 9 pages, doi:10.1155/2012/987517
- Xue D, Wang J, Guo Y. A new sulphated nor-sesquiterpene from mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F. *Journal of Asian natural products research*. 2008; 10(3-4):367-71.
- Williams CN, Honet JRS, Harbone JB, Greenham J, Eeagles J. A biologically active lipophilic flavonols from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 1995;38:267–70.
- Wu J, Xiao Q, Xu J, Li MY, Pan JY, Yang MH. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Natural Products Reports*. 2008; 25:955-81.
- Yamanaka K, Miyatani H, Yoshida Y, Yoshida T, Nakano M, Obara S, Endo H. Hemorrhagic gastric and duodenal ulcers after the Great East Japan Earthquake Disaster. *World J Gastroenterol* 2013 November 14; 19(42): 7426-7432
- Yodsaoué O, Karalai C, Ponglimanont C, Tewtrakul S, Chantrapromma S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*. 2010; 71(14-15): 1756–64.

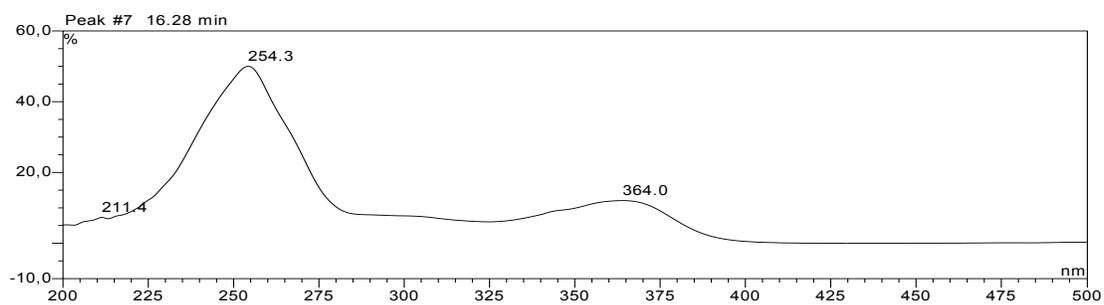
Yunes RA, Pedrosa RC, Filho, VC. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*. 2001; 24(1):147-52.

Zhu F, Chen X, Yuan Y, Huang M, Sun H, Xiang W. The Chemical Investigations of the Mangrove Plant *Avicennia marina* and its Endophytes. *The Open Natural Products Journal*, 2009; 2:24-32

Zuanazzi JAS, Mayorga P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química Nova*, 2010; 33(6):1421-9.

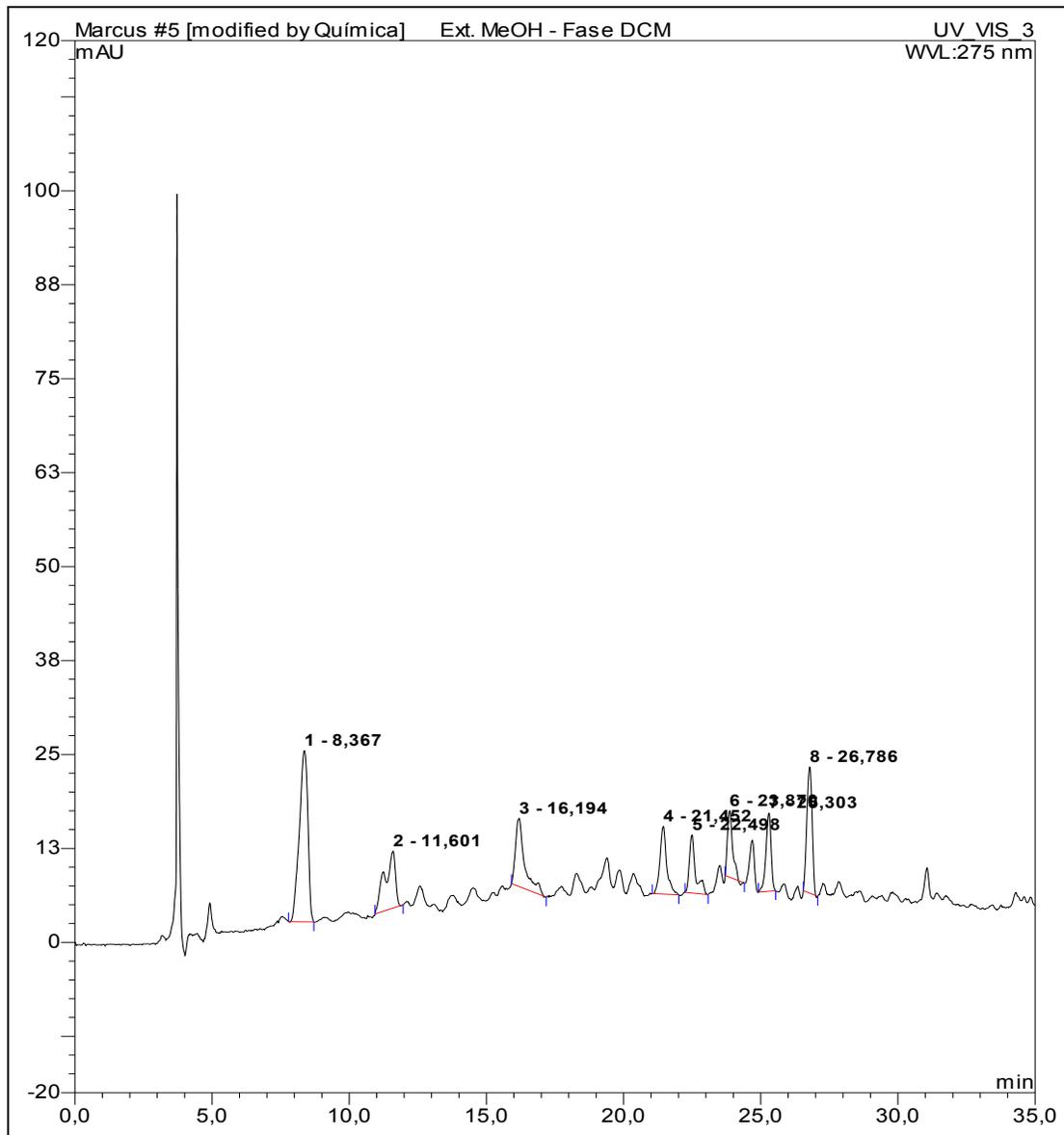
ANEXOS

Anexo I – Espectro em UV do pico 7 do cromatograma da fase em Acetato de Etila do extrato metanólico de *L. racemosa*.

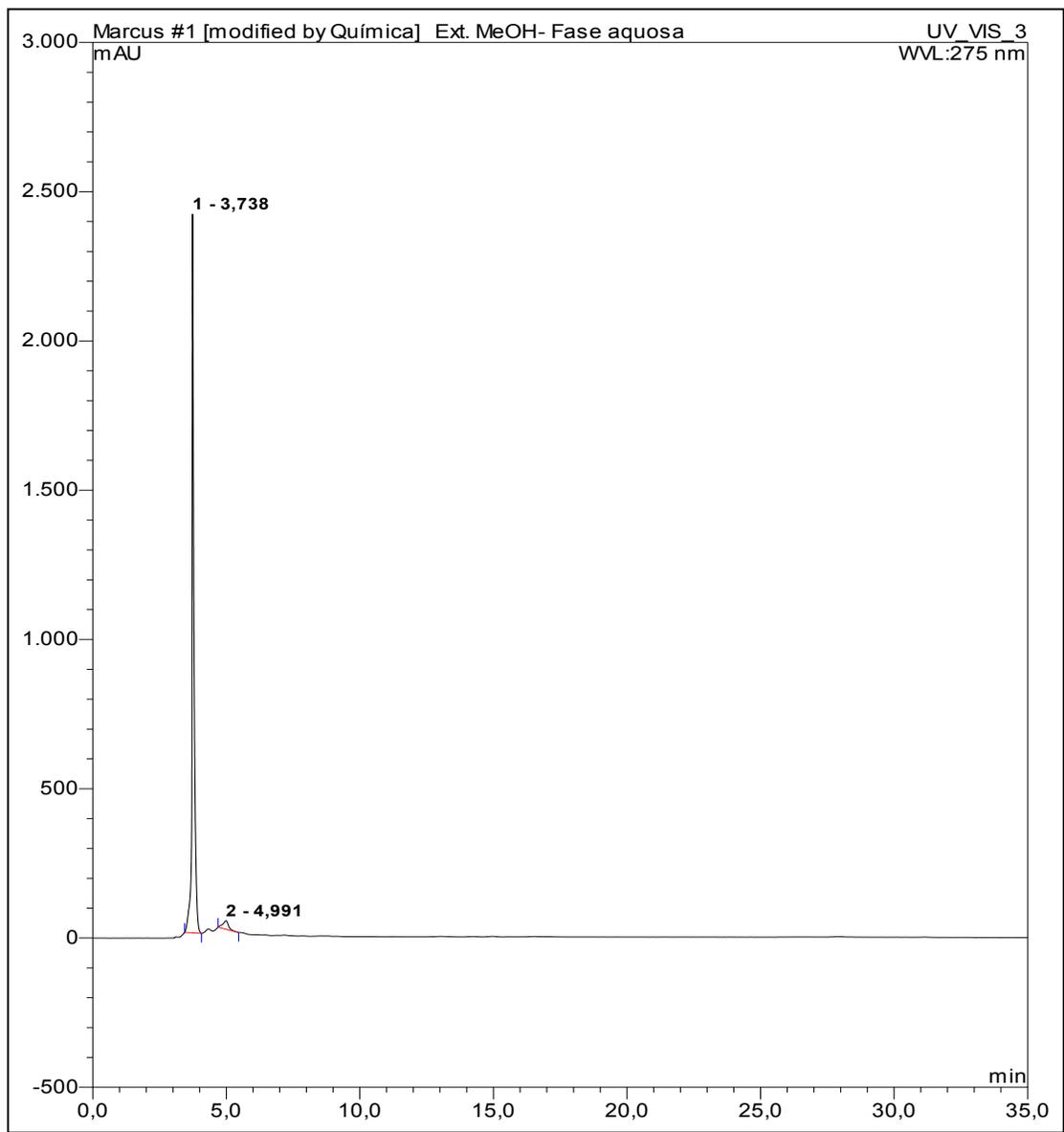


Anexo II – Cromatogramas das fases resultantes do particionamento dos extratos metanólico e hidroalcoólico oriundo de *L. racemosa* e suas respectivas massas (Exceto das fases em acetato de etila e n-butanol do extrato metanólico representados nas figuras 6 e 8 respectivamente).

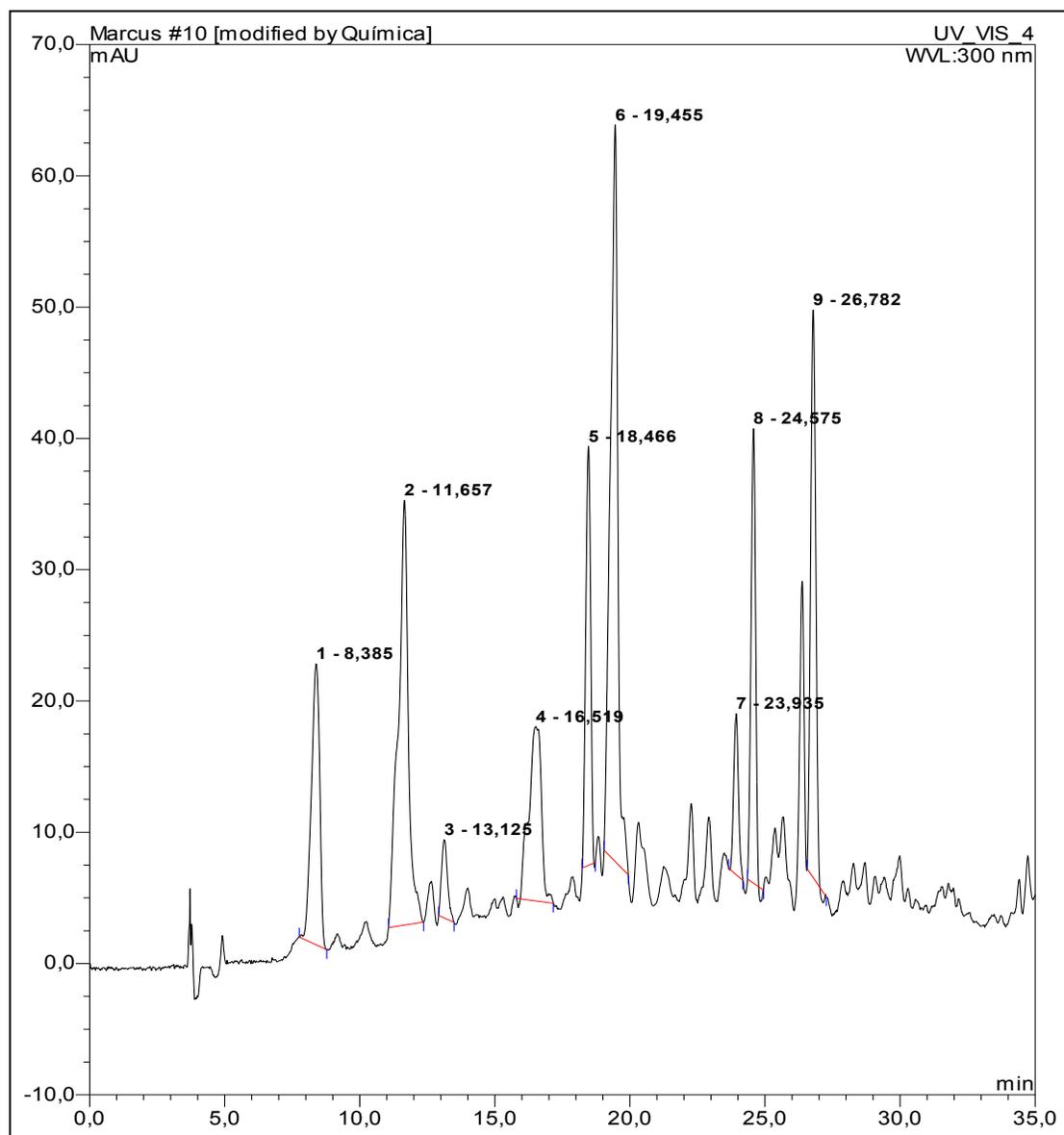
Fase em diclorometano do extrato metanólico (22 mg)



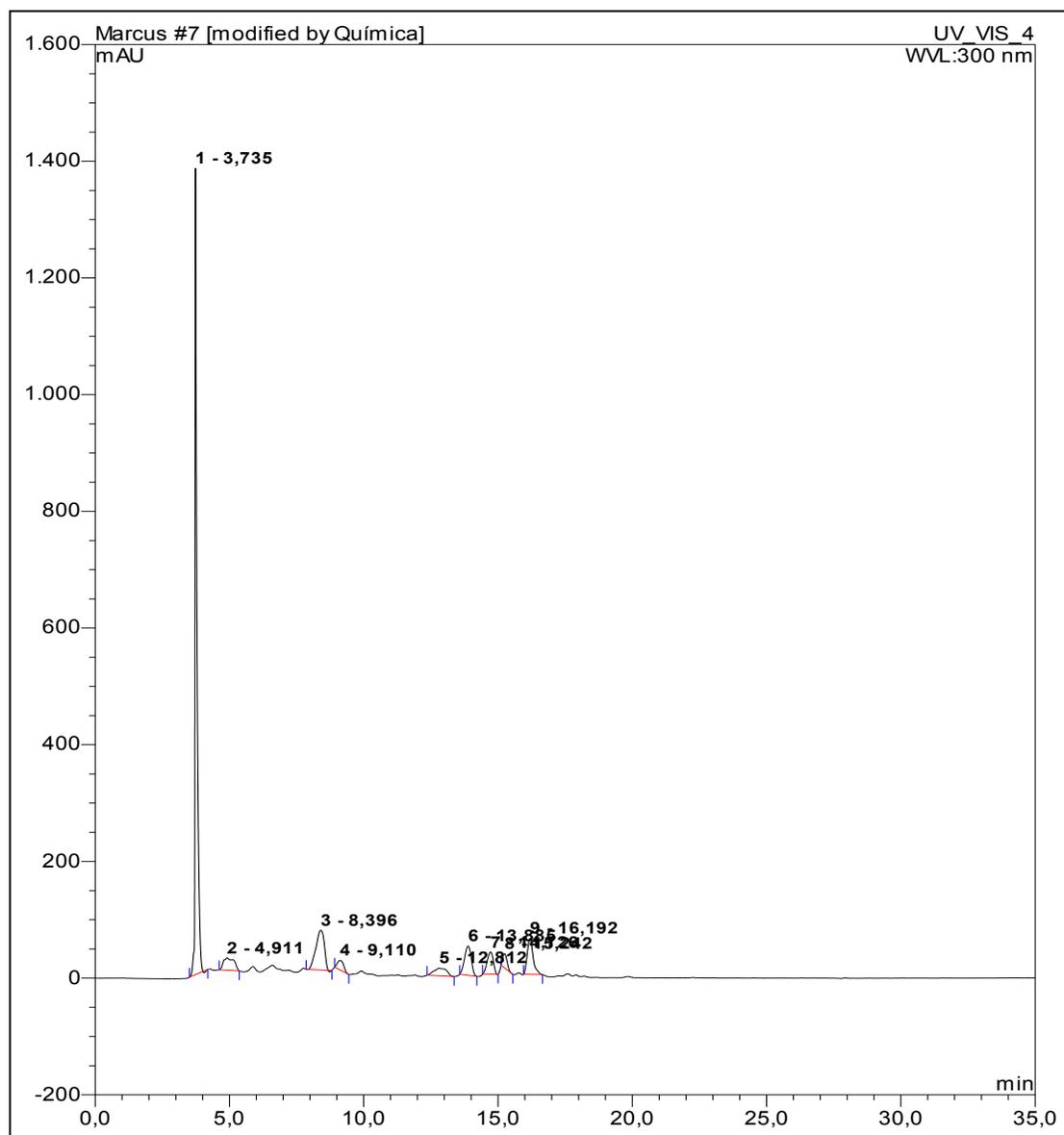
Fase aquosa do extrato metanólico (1,221 g)



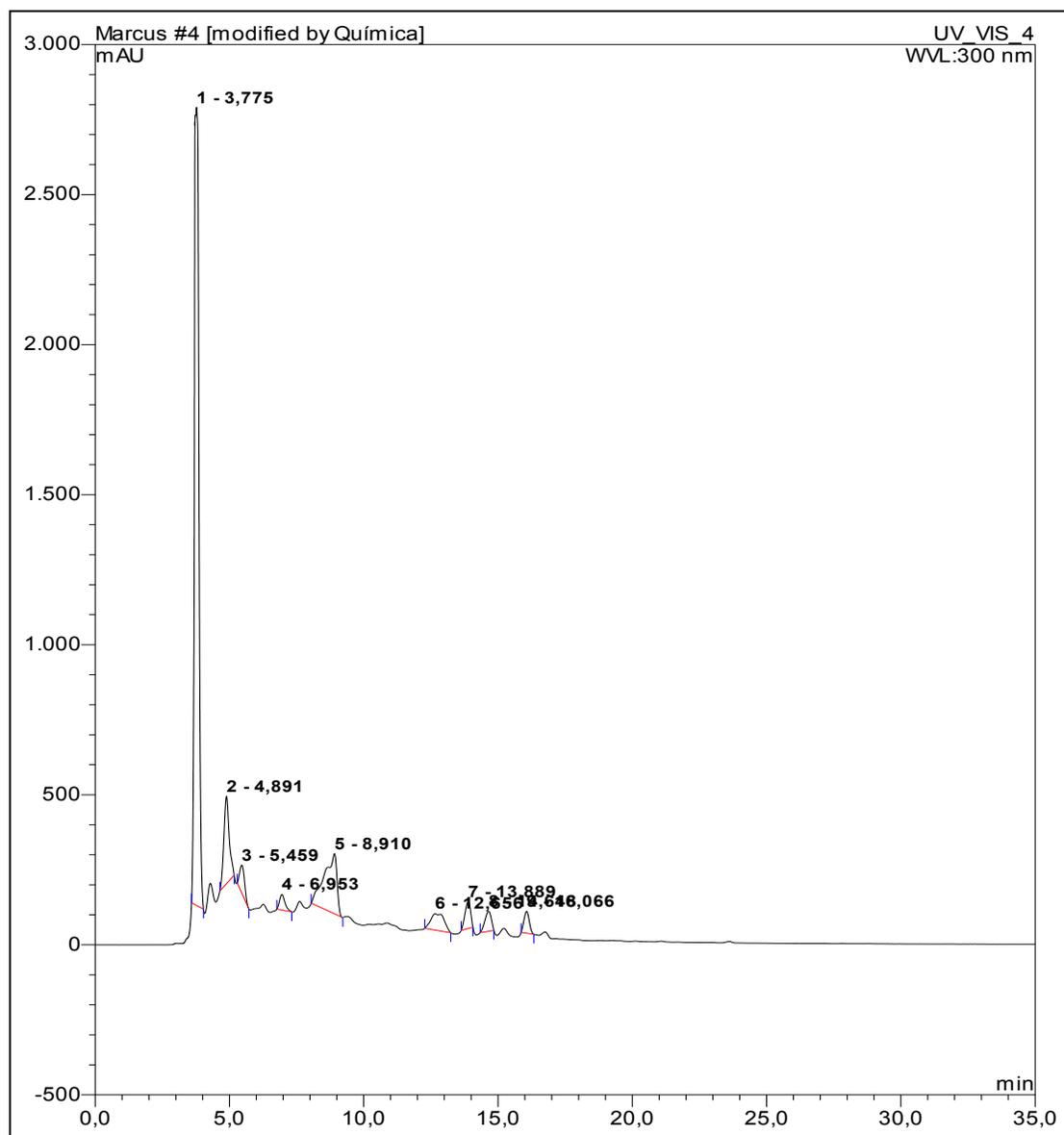
Fase em diclorometano do extrato hidroalcoólico (6,5 mg)



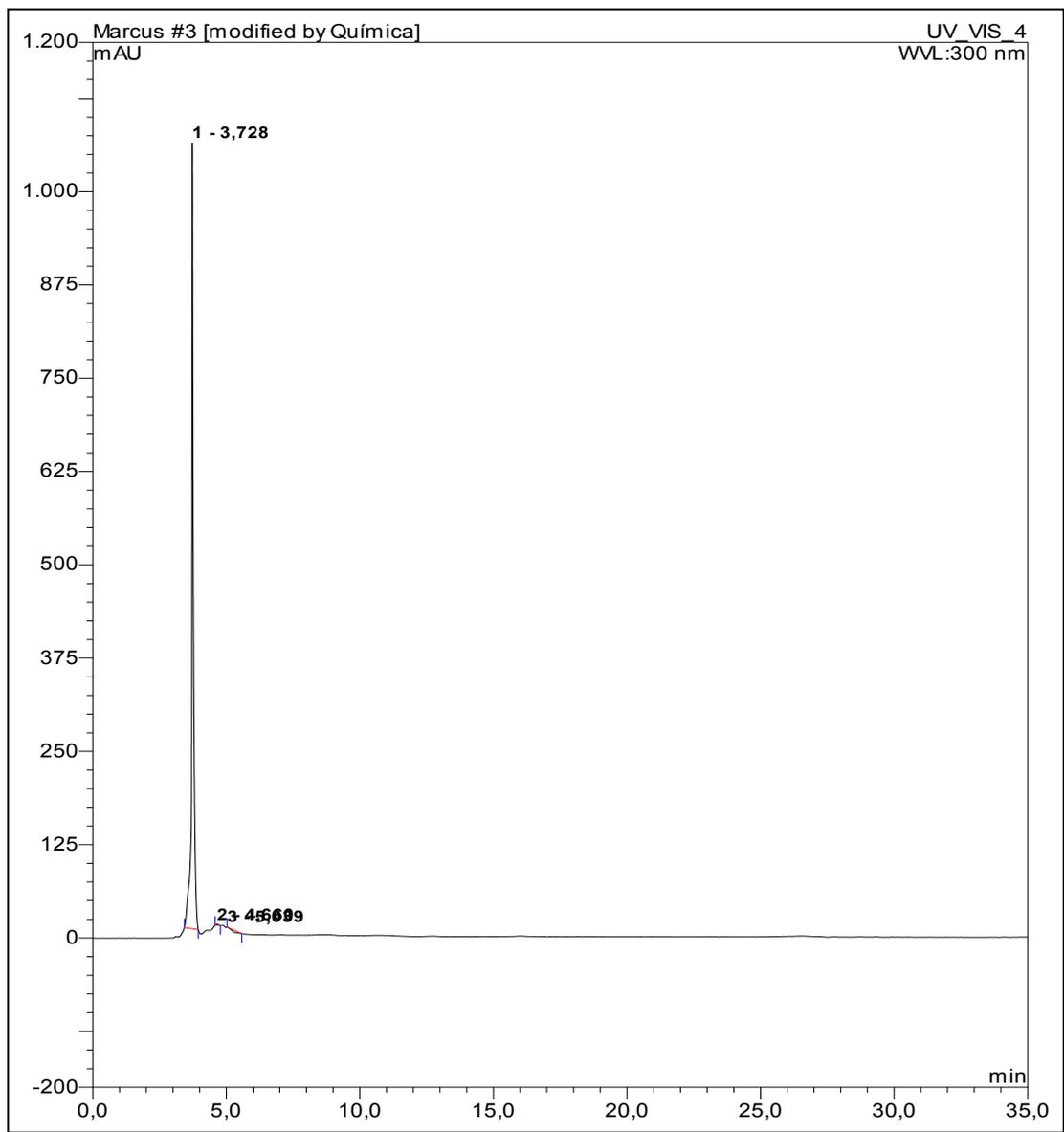
Fase em acetato de etila do extrato hidroalcoólico (330 mg)



Fase em n-butanol do extrato hidroalcoólico (456 mg)

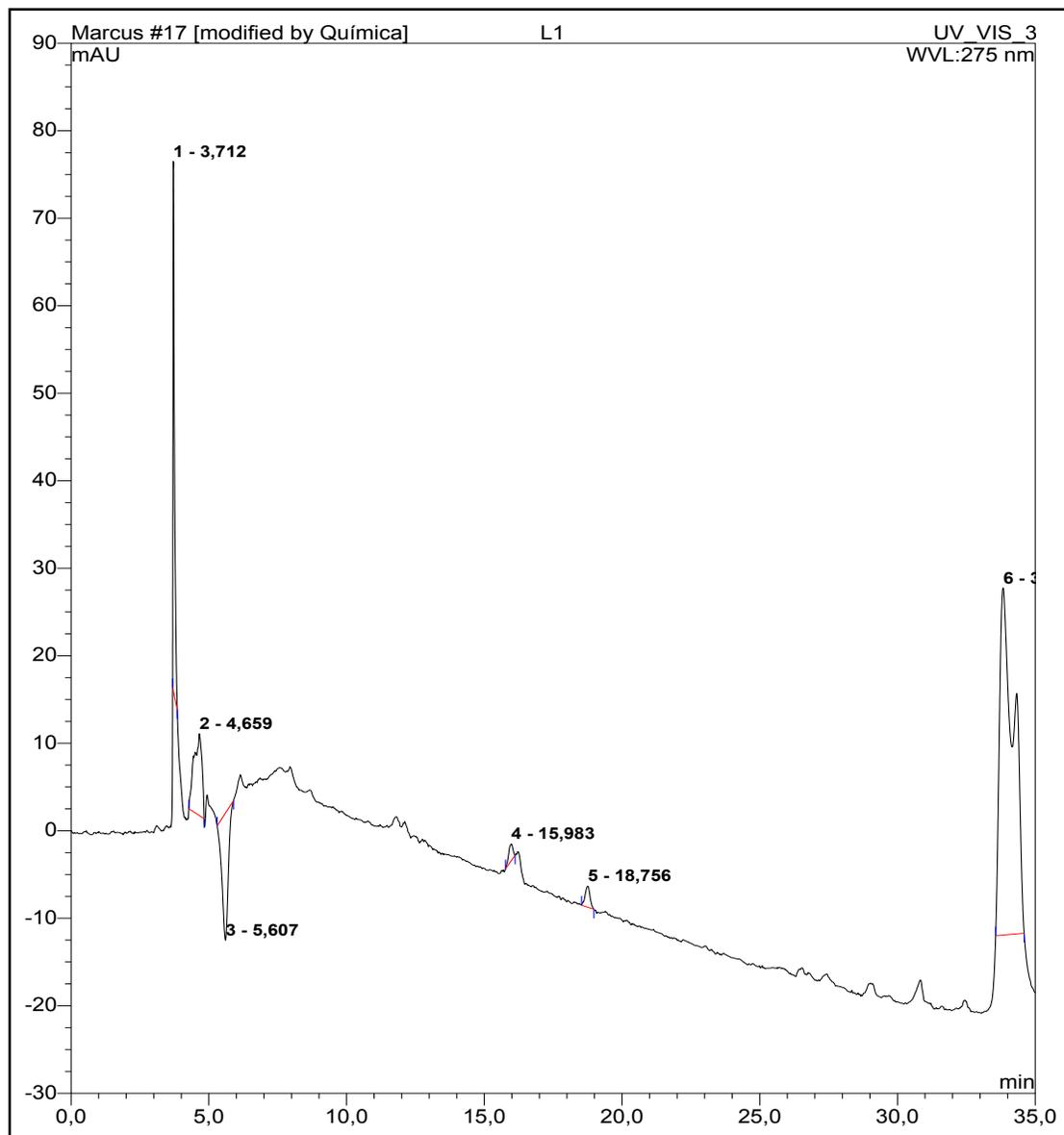


Fase aquosa do extrato hidroalcoólico (1,112 g)

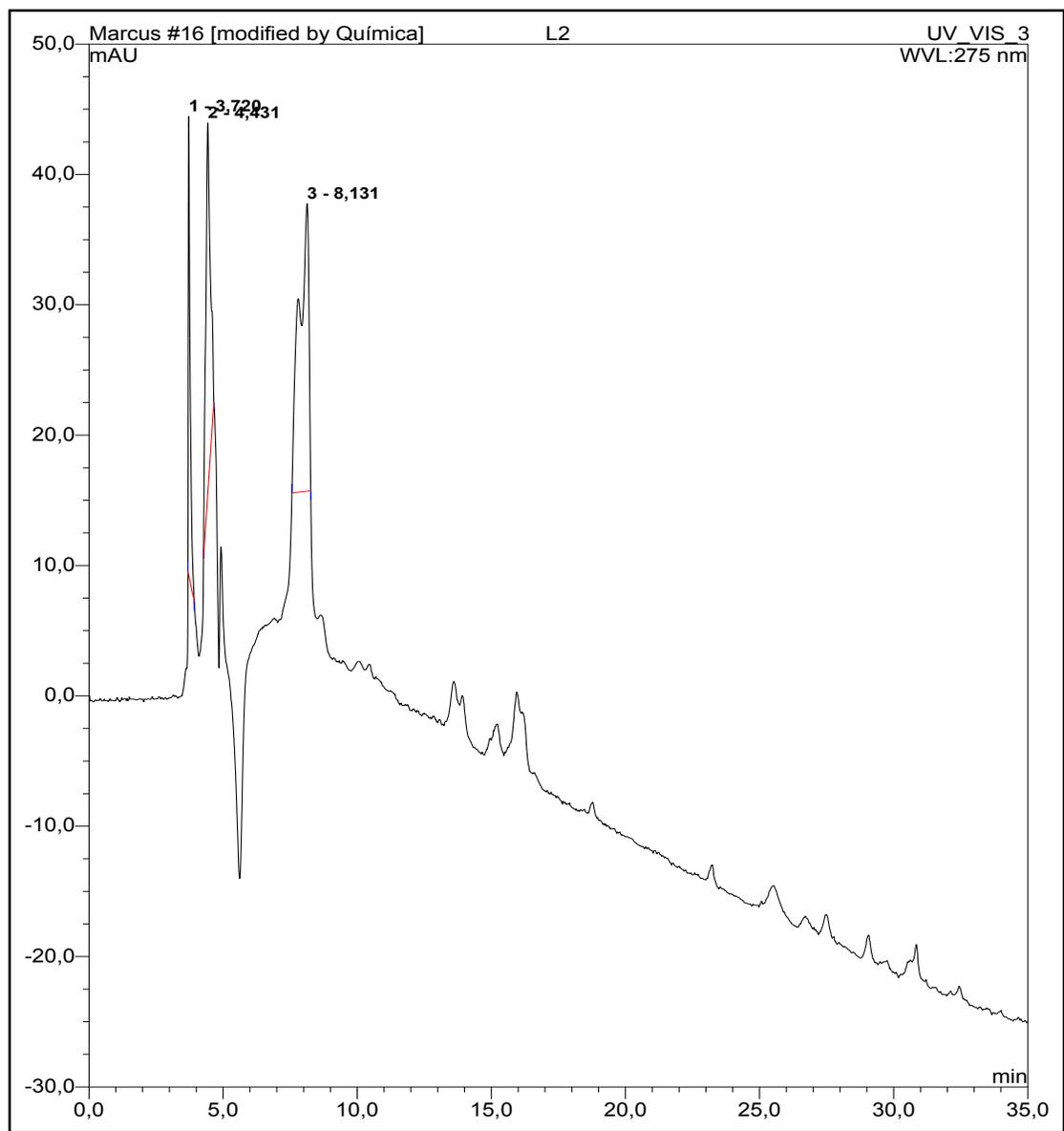


Anexo III – Cromatogramas resultantes do fracionamento da fase em n-butanol do extrato metanólico oriundo de *Laguncularia racemosa*, exceto as frações L4 e L7, representadas nas figuras 11 e 13 respectivamente.

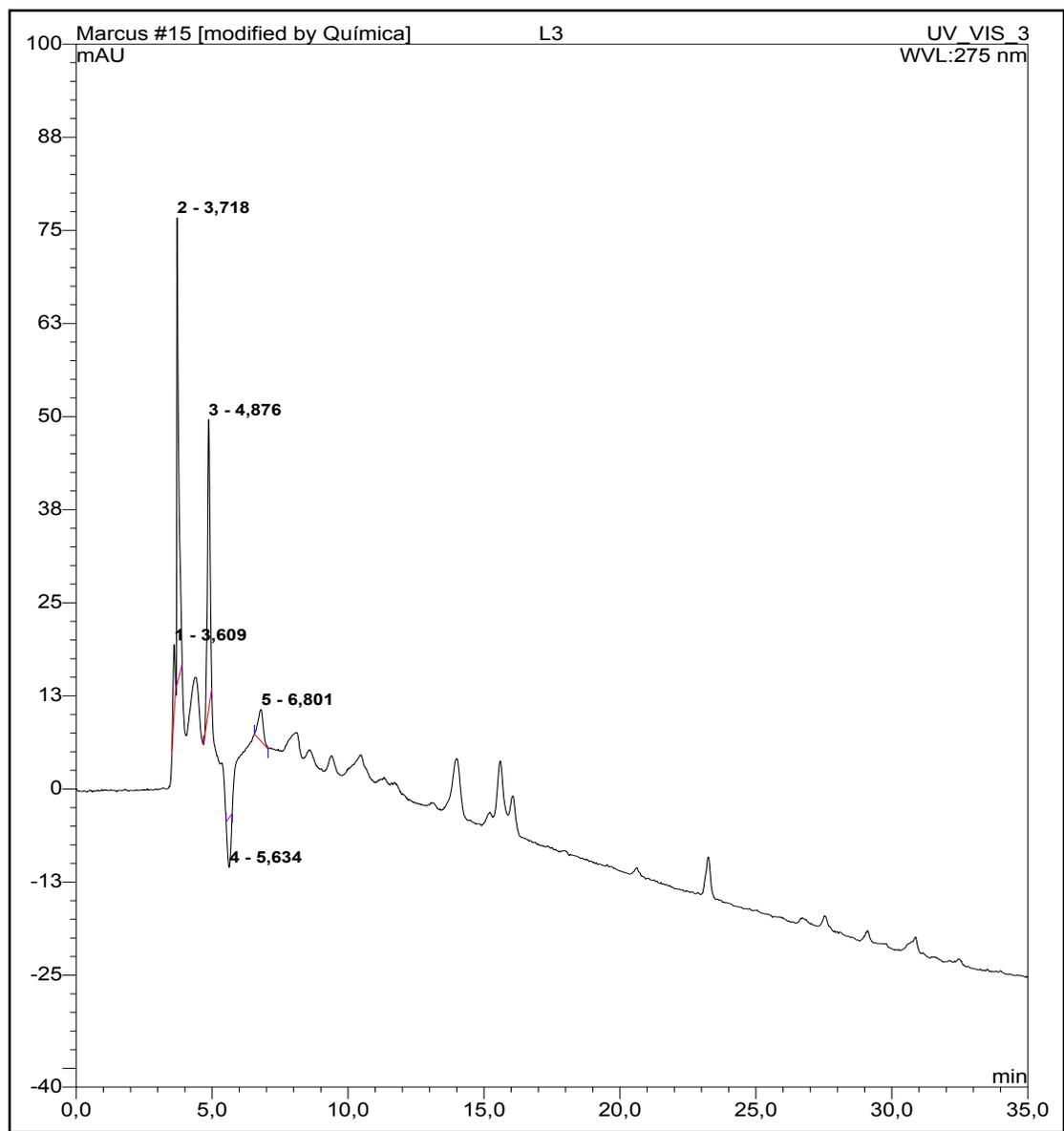
Fração L1



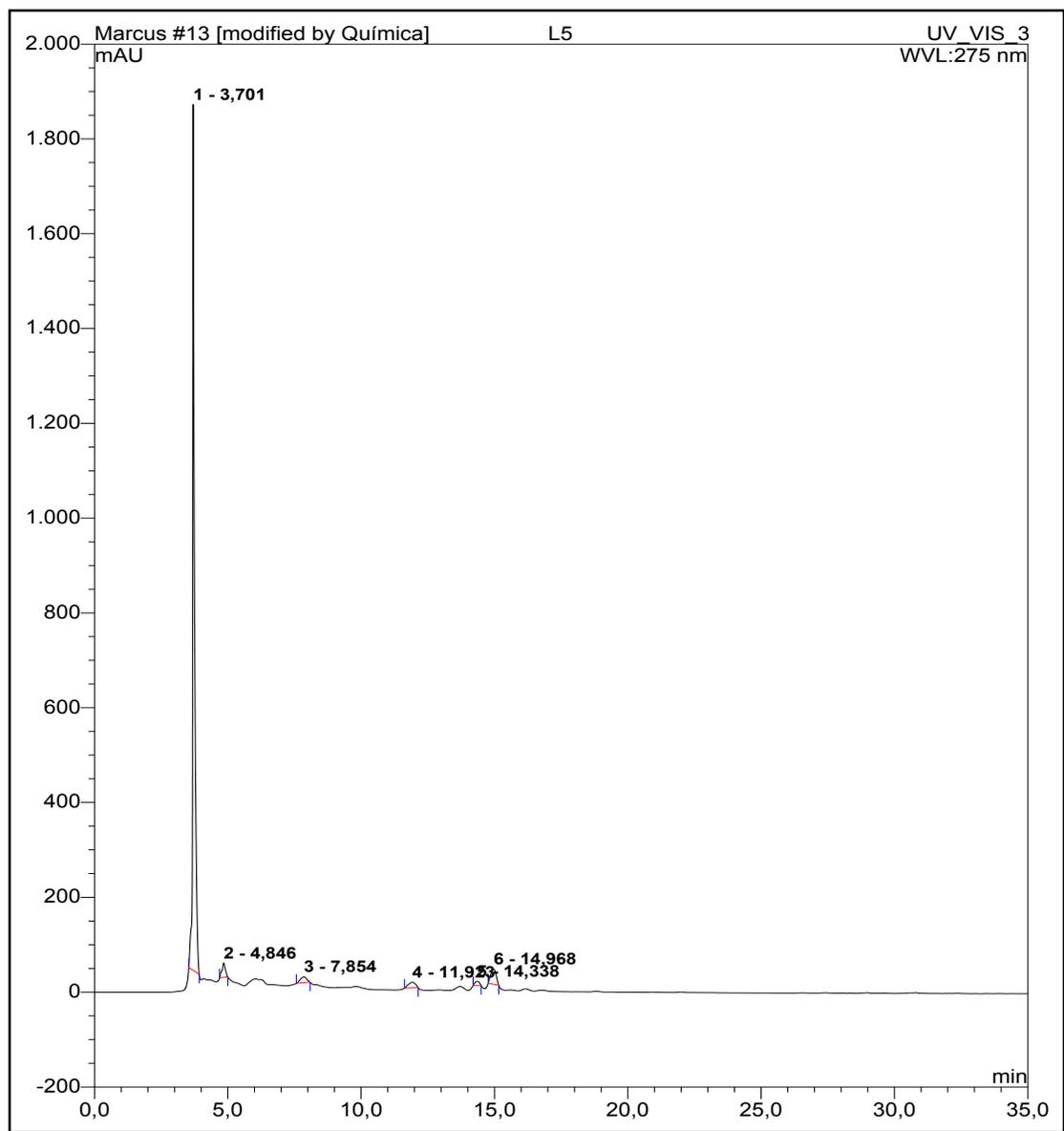
Fração L2



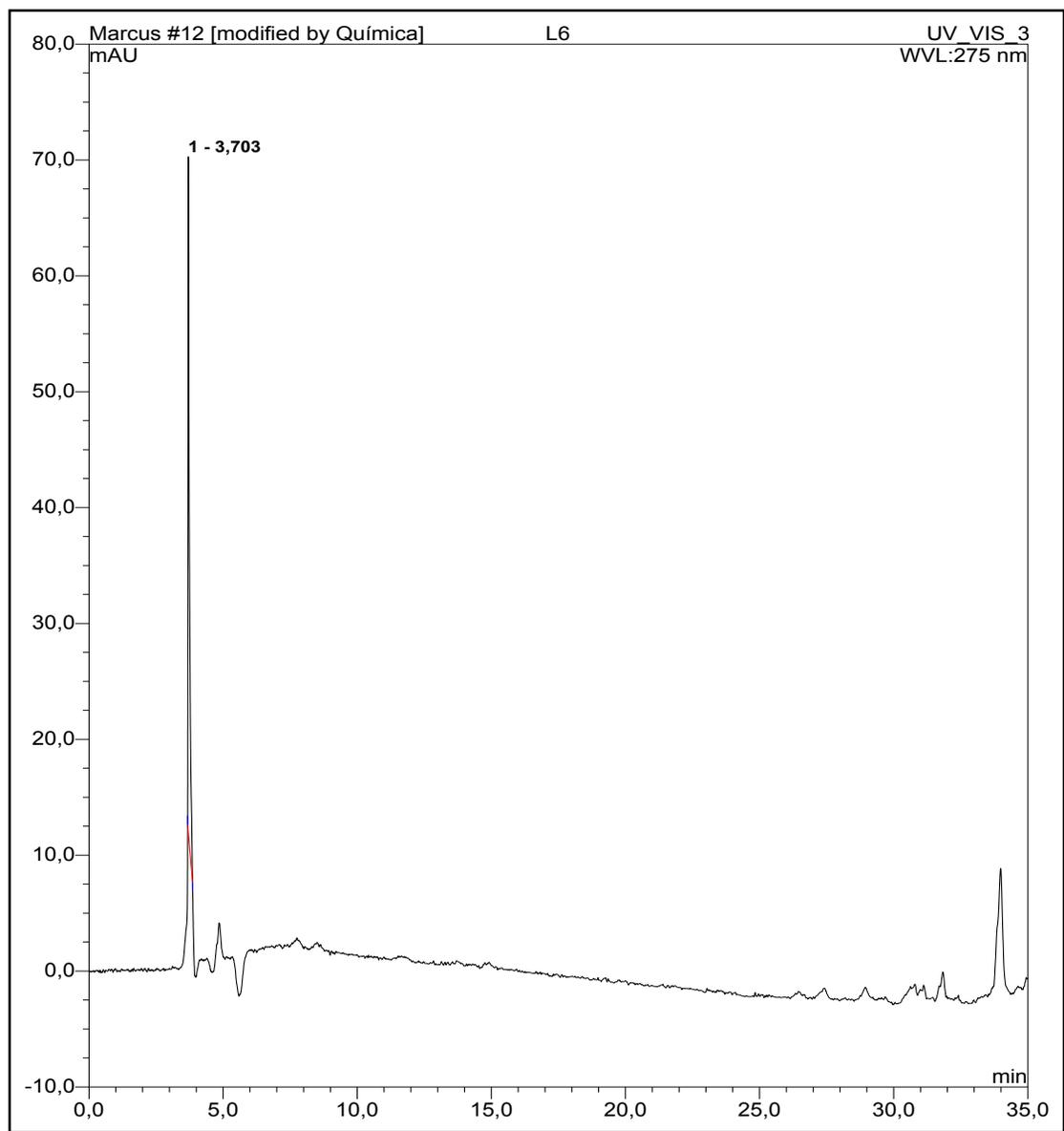
Fração L3



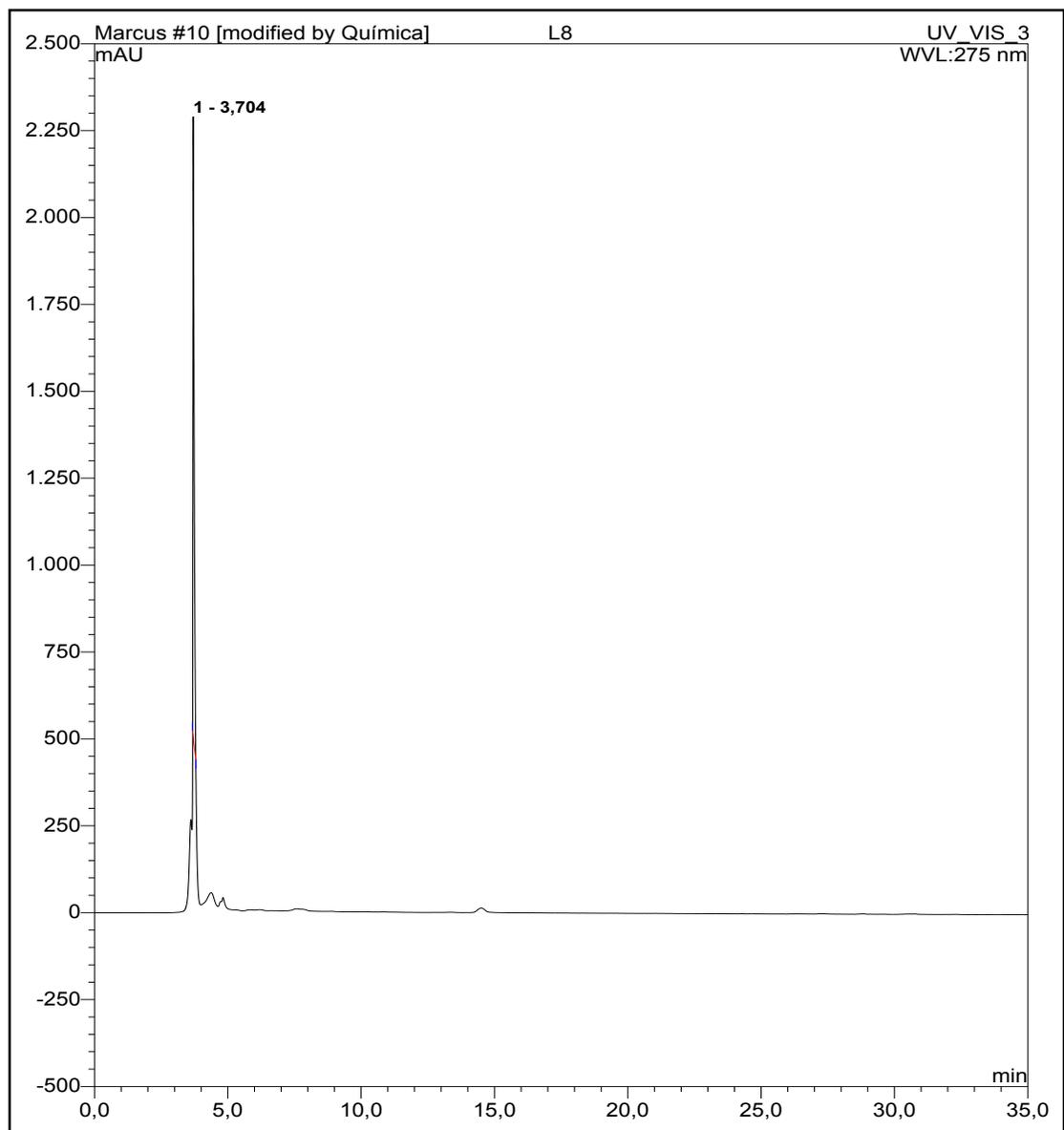
Fração L5



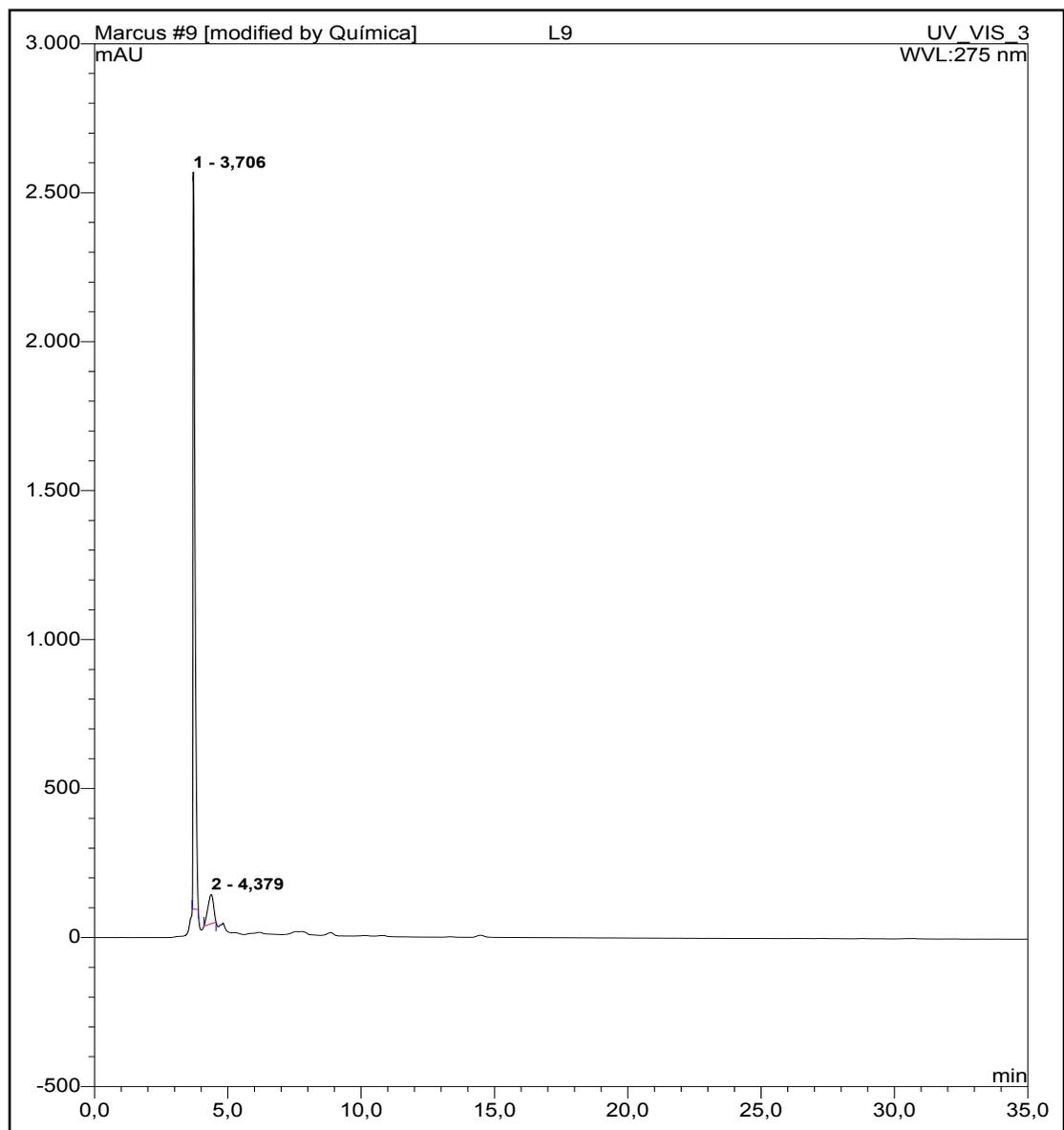
Fração L6



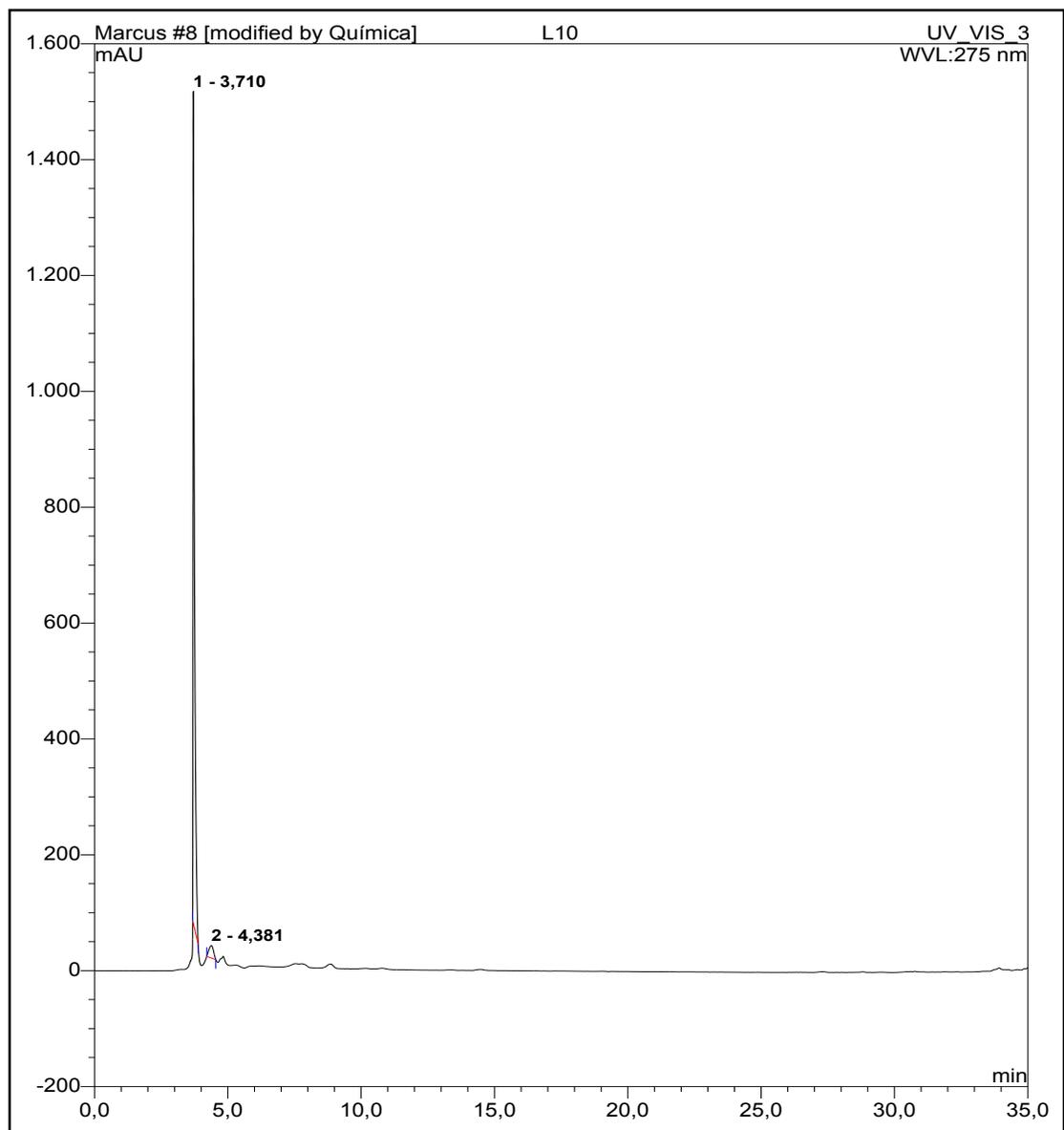
Fração L8



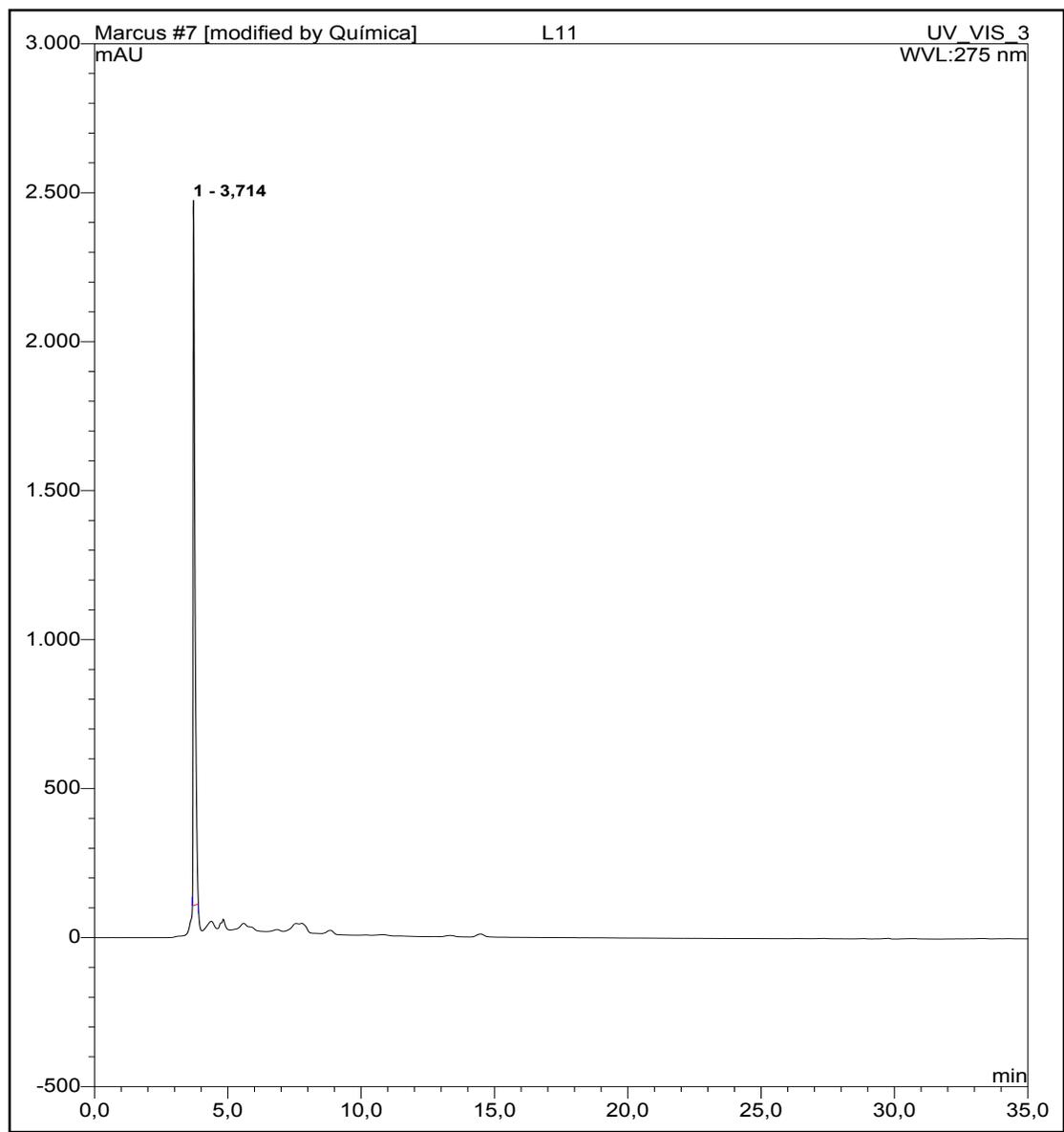
Fração L9



Fração L10



Fração L11



Fração L12

