UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

KATHERINE CESCHIN TAPXURE REIS

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ECOTOXICOLOGICA DE COMPOSTOS NATURAIS UTILIZADOS PARA TRATAMENTO DE ÚLCERA GÁSTRICA

SANTOS/SP
2019

KATHERINE CESCHIN TAPXURE REIS

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ECOTOXICOLOGICA DE COMPOSTOS NATURAIS UTILIZADOS PARA TRATAMENTO DE ÚLCERA GÁSTRICA

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação do Prof. Dr. Fabio Hermes Pusceddu.

SANTOS/SP

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

615.53 Reis, Katherine Ceschin Tapxure.
R31e Avaliação fitoquímica e ecotoxicologica de compostos naturais utilizados para tratamento de úlcera gástrica. / Katherine Ceschin Tapxure Reis - 2019
77 f.:il.

Orientador: Fabio Hermes Pusceddu.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2019.

1. *Bauhinia forficata*. 2. *Cocos nucifera*. 3. Espectrometria de massa. 4. Ecotoxicologia. I. Pusceddu, Fabio H. II. Avaliação fitoquímica e ecotoxicologica de compostos naturais utilizados para tratamento de úlcera gástrica.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido por tanto sacrifício e renúncia para que eu pudesse concluir mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar o sopro de vida ao meu coração, que possibilitou que eu pudesse chegar até aqui com êxito.

Agradeço também ao meu marido Leduar, por tamanho incentivo, esforço e renúncia. Conseguimos!

Ao meu querido Professor Fabio, que sem teus conhecimentos, estas páginas jamais estariam escritas. Eternamente grata!

Ao Professor Walber pelos ensinamentos e dedicação. Ensinou-me muito além do que estas páginas dizem, contribuindo significativamente para meu crescimento profissional.

A minha querida coordenadora e professora Ursulla, que não mediu esforços para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Aos Professores Augusto, Camilo e Fernando, agradeço pela luz que iluminou o novo caminho que desbravei. Ao encantador Professor Aldo que, além de me presentear com seus conhecimentos, tornou minha estadia no laboratório muito agradável.

Aos estagiários do laboratório de ecotoxicologia: Jonas, Helo, Larissa, Julia, Dani, Juan, Renata, Rebeca e outras pessoas que estiveram na linha de frente do trabalho prático colaborando e me ensinando muito.

Agradeço às queridas Sandra e Imaculada, que sempre muito prestativas, me auxiliaram neste trajeto acadêmico.

Por fim, e não menos importante, agradeço a Universidade Santa Cecília, não só por permitir que pudesse estar desenvolvendo este trabalho, mas por dar luz aos novos caminhos que serão seguidos deste ponto em diante.

RESUMO

Atualmente, diversos estudos em âmbito mundial têm relatado problemas ambientais causados pela presença de fármacos sintéticos, entretanto, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos ambientais ocasionados por substâncias naturais utilizadas na medicina farmacêutica. Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar estudos etnofarmacológicos e ecotoxicológicos das espécies vegetais *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* e comparar os problemas ambientais com fármacos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica. Para identificar os compostos, foram realizados ensaios fitoquímicos e tanto a fração aquosa de *Bauhinia forficata* quanto os extratos aquosos brutos de *Cocos nucifera* (mesocarpo e endosperma sólido) foram submetidos às análises, por meio de ensaios cromáticos e/ou precipitação. Para a espectrofotometria, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (CELM) a 750 nm. Posteriormente, também foi realizada para a fração aquosa de *Bauhinia forficata*, análise em espectrometria de massa através da identificação do íon precursor e íons provenientes da fragmentação, e comparados por paridade com dados de espectrometria de massas já existentes e descritos através da literatura de moléculas. Por fim, foram realizadas análises de toxicidade para avaliação de efeitos crônicos e agudos com *Echinometra lucunter* e *Daphnia similis,* respectivamente. Nos ensaios fitoquímicos foram detectadas a presença de flavonoides e taninos do tipo condensado. Na dosagem de compostos fenólicos, o endosperma sólido apresentou maior quantidade de fenólicos totais. Na análise de espectrometria de massas de *Bauhinia forficata,* foram encontrados os compostos Quercetina-3-O-ramnosídeo e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo. No que se refere aos testes de toxicidade, embora não tenham sido observados efeitos agudos, foi possível observar efeitos crônicos tanto dos compostos sintéticos quanto dos compostos naturais. O fármaco que apresentou maior toxicidade crônica foi o Lanzoprazol (8,06 $mg.L^{-1}$), seguido do Omeprazol (10,36 $mg.L^{-1}$), e do Mesocarpo (20,1 $mg.L^{-1}$), enquanto a Amoxicilina apresentou menor toxicidade (744,37 $mg.L^{-1}$). Além disso, foi possível aplicar uma classificação com relação a toxicidade dos compostos de acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE. O Lanzoprazol foi o composto que apresentou maior toxicidade e foi classificado como “tóxico”. O Omeprazol, mesocarpo, endosperma sólido e *B. forficata* foram classificados como “nocivos” enquanto a Amoxicilina foi classificada como “não tóxica” nos testes com *E. lucunter.* Já para os testes realizados com *D. similis* todos os compostos foram classificados como “não tóxicos”, de acordo com a diretiva europeia.

Palavras Chave: *Bauhinia forficata*. *Cocos nucifera*. Espectrometria de massa. Ecotoxicologia.

ABSTRACT

Currently, several studies worldwide have reported environmental problems caused by the presence of synthetic drugs, however, little is known about the possible environmental effects caused by natural substances used in pharmaceutical medicine. Given this context, the present study aimed to carry out ethnopharmacological and ecotoxicological studies of the plant species *Bauhinia forficata* and *Cocos nucifera* and to compare the environmental problems with drugs used for the treatment of gastric ulcer. To identify the compounds, phytochemical assays were performed and both the aqueous fraction of *Bauhinia forficata* and the crude aqueous extracts of *Cocos nucifera* (mesocarp and solid endosperm) were subjected to analysis by chromatic assays and / or precipitation. For spectrophotometry, absorbance was measured by spectrophotometer (CELM) at 750 nm. Subsequently, for the aqueous fraction of *Bauhinia forficata*, mass spectrometric analysis was performed through the identification of the precursor ion and fragmentation ions, and compared by parity with existing mass spectrometry data described by the molecular literature. Finally, toxicity analyzes were performed to evaluate chronic and acute effects with *Echinometra lucunter* and *Daphnia similis*, respectively. The phytochemical assays detected the presence of flavonoids and condensed tannins. In the dosage of phenolic compounds, solid endosperm presented higher amount of total phenolics. In *Bauhinia forficata* mass spectrometric analysis, Quercetin-3-O-ramnoside and Quercetin-3,7-O-diramnoside were found. Regarding toxicity tests, although no acute effects were observed, it was possible to observe chronic effects of both synthetic and natural compounds. The drug with the highest chronic toxicity was Lanzoprazole (8.06 mg.L-1), followed by Omeprazole (10.36 mg.L-1), and Mesocarp (20.1 mg.L-1). Amoxicillin had lower toxicity (744.37 mg.L-1). In addition, a classification on the toxicity of compounds could be applied according to European Directive 93/67 / EEC. Lanzoprazole was the compound with the highest toxicity and was classified as “toxic”. Omeprazole, mesocarp, solid endosperm and B. forficata were classified as “harmful” while Amoxicillin was classified as “non-toxic” in *E. lucunter* tests. For tests performed with *D. similis* all compounds were classified as “non-toxic” according to the European directive.

Keywords: *Bauhinia forficata. Cocos nucifera.* Mass spectrometry. Ecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Divisão anatômica gástrica 17
Figura 2 – Divisão histológica do estômago..... 18
Figura 3 – Ativação da secreção 21
Figura 4 – Bomba de prótons 22
Figura 5 – Mosaico do gene vacA 24
Figura 6 – Cascata da inflamação 27
Figura 7 – Fatores que influenciam a produção de metabólitos..... 35
Figura 8 – Mesocarpo *C. nucifera* utilizada 37
Figura 9 – *Bauhinia forficata*..... 38
Figura 10 – Flavan-3-ol 40
Figura 11 – Flavan-3,4-diol..... 40
Figura 12 – Estrutura genérica dos flavonoides 41
Figura 13 – Via biosintética dos metabólitos pertencentes a classe dos flavonoides 42
Figura 14 – Principais constituintes da classe dos flavonoides..... 42
Figura 15 – Flavonol..... 43
Figura 16 – Estrutura molecular da Amoxicilina 44
Figura 17 – Estrutura molecular do Omeprazol 45
Figura 18 – Estrutura molecular do Lanzoprazol 45
Figura 19 – Processos de transformação que ocorrem no ambiente..... 47
Figura 20 – Exsicata de *Bauhinia forficata* 50
Figura 21 – Remoção das cascas de *Cocos nucifera* 51
Figura 22 – Mesocarpo de *Cocos nucifera* removido..... 51
Figura 23 - Determinação de compostos fenólicos totais 53
Figura 24 – Tanque onde ficam alojados os ouriços 55
Figura 25 – Liberação de gameta masculino 56
Figura 26 – Coleta de gameta feminino 57
Figura 27 – Liberação de gameta feminino 57
Figura 28 – Resultados das análises de sais de chumbo e sais de ferro (*Bauhinia forficata*) 62
Figura 29 – Resultados das análises de sais de chumbo e sais de ferro (mesocarpo – *Cocos nucifera*) 63
Figura 30 – Resultados das análises de sais de chumbo e sais de ferro

(endosperma sólido – *Cocos nucifera*)..... 63
Figura 31 – Resultados das análises de cloreto férrico (*Bauhinia forficata*) 65
Figura 32 – Resultados das análises de hidróxido de sódio e cloreto férrico (mesocarpo - *Cocos nucifera*) 66
Figura 33 – Resultados das análises de cloreto férrico (endosperma sólido – *Cocos nucifera*) 66
Figura 34 – Núcleo quercetina aglicona 69
Figura 35 – Molécula identificada como Quercetina-3-O-ramnosídeo 70
Figura 36 – Molécula identificada como Quercetina-3,7-diramnosídeo 70
Figura 37 – Quercetina-3-O-ramnosídeo 71
Figura 38 – Quercetina-3,7-diramnosídeo..... 71
Figura 39 – Formação de radicais hidroxilos..... 74

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Etapas para validação etnofarrmacológica 35
Fluxograma 2 – Extração para a obtenção da fração aquosa seca (FrAq) de *Bauhinia forficata*..... 50
Fluxograma 3 – Extração para a obtenção do extrato aquoso bruto seco de *Cocos nucifera* 52
Fluxograma 4 – Ensaio crônico ecotoxicológico..... 59
Fluxograma 3 – Ensaio agudo ecotoxicológico 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais usos tradicionais de *Cocos nucifera* 38
Tabela 2 – Características físicas e químicas da Amoxicilina 44
Tabela 3 – Características físicas e químicas do Omeprazol e Lanzoprazol ... 45
Tabela 4 – Resultado para taninos presentes na FrAq de *Bauhinia forficata* e nos extratos brutos do mesocarpo e endosperma sólido de *Cocos nucifera* 62
Tabela 5 – Resultado para flavonoides presentes na FrAq de *Bauhinia forficata* e nos extratos brutos do mesocarpo e endosperma sólido de *Cocos nucifera*. 65
Tabela 6 – Quantidade de fenólicos totais presentes na FrAq de *Bauhinia forficata* e no extrato bruto do mesocarpo e do endosperma sólido de *Cocos*

nucifera..... 68
Tabela 7 – Compostos identifcados na FrAq de *Bauhinia forficata* 69
Tabela 8 – Valores de $CI_{50,}$ CE_{50} e Kow para *Echinometra lucunter e Daphnia similis*..... 76
Tabela 9 – Estudos de efeitos tóxicos de amoxicilina em outras espécies 78
Tabela 10 – Estudos de efeitos tóxicos de omeprazol em outras espécies 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Agência Brasileira de Normas Técnicas

ACh - Acetilcolina

AG/g - Ácido gálico por grama

ANR - Antocianidina redutase

ANS - Antocianidina sintase

CAGE - Citotoxina Associada ao Gene E

CAG-PAI - Cytotoxin Associated Gene Pathogenicity Island

CAT - Catalase

CE50 - Concentração Efetiva Média

CHI - Chalcona isomerase

CHS - Chalcona sintase

CI50 - Concentração Inibitória Média

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COX - Cicloxigenase

CV - Coeficiente de Variação

DFR - Di-hidroflavonol-4-redutase

DP - Desvio Padrão

DPPH - Radical Livre (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila)

ECL - Enterocromafins

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

ETE - Efluentes de Tratamento de Esgotos

F3H - Flavanona 3-hidroxilase

FLS - Flavonol sintase

FrAq - Fração Aquosa

g - grama

GPCR - Receptor acoplado a proteína G

GRP - Peptídeo liberador de gastrina

GSH - Glutationa na forma reduzida

GST – Glutationa s transferase

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio

***H. pylori* -** *Helicobacter pylori*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HUSC - Herbário da Universidade Santa Cecília

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBP – Inibidores de bomba protônica

ICp - The innibition concentration

iNOS - Óxido Nítrico Sintetase Induzível

KCl - Cloreto de Potássio

Kow - Coeficiente de partição octanol-água

LAR - Leucoantocianidina redutase

µg - micrograma

µg/mL - micrograma por mililitro

µL - microlitro

µm - micrometro

$mg.L^{-1}$ - miligrama por litro

mL - mililitro

mM/H_2O - milímetros de água

MPO – Mieloperoxidase

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

m/z - razão massa sobre a carga

NBR - Norma Brasileira Regulamentadora

ng/L - nanograma por litro

PAL - Fenilalanina Amoníaco-Líase

PGE_2 - Prostaglandina das classes E2

PGI_2 - Prostaciclina

pH - Potencial hidrogeniônico

Q.S.P. - Quantidade Suficiente Para

SOD - Superóxido Dismutase

Torr - Torricelli (unidade de pressão)

USEPA - Agência de Proteção Ambiental

v/v/v - volume por volume por volume

vacA - vacuolating cytotoxin A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 Fundamentações Teórica 17
1.1.1 Aspecto gástrico geral 17
1.1.1.1 Divisão anatômica 17
1.1.1.2 Divisão histológica 17
1.1.1.3 Distribuição citológica 18
1.1.1.4 Inervação do Trato gastrointestinal 18
1.1.1.4.1 Sistema nervoso autônomo intrínseco 18
1.1.1.4.2 Sistema nervoso extrínseco 19
1.1.1.5 Peptídeo gastrointestinal 19
1.1.1.6 Controle da secreção gástrica 19
1.1.1.6.1 Reflexos curtos e longos 20
1.1.1.6.2 Controle humoral 20
1.1.1.7 Bomba de prótons 21
1.1.1.8 Proteção gástrica 22
1.1.1.9 Fisiopatologia da úlcera gástrica 22
1.1.1.10 Tratamento para úlcera gástrica 28
1.1.2 Fármacos no meio ambiente 29
1.1.3 Etnofarmacologia 34
1.1.4 *Cocos nucifera* 37
1.1.5 *Bauhinia forficata* 38
1.1.6 Compostos avaliados 39
1.1.6.1 Taninos 39
1.1.6.2 Flavonóides 41
1.1.6.3 Amoxicilina 43
1.1.6.4 Omeprazol e Lansoprazol 44
1.1.7 Ecotoxicologia 46
1.1.7.1 Testes de ecotoxicidade 48
2. MATERIAIS E MÉTODOS 49
2.1. Coleta e extração 49
2.1.1 *Bauhinia forficata* 49

2.1.2 *Cocos nucifera* 50
2.2. Análises fitoquímicas preliminares 52
2.3 Dosagem de compostos fenólicos totais 52
2.4 Análises fitoquímicas por espectrometria de massas 53
2.5 Análises ecotoxicológica 54
2.5.1 Ensaio de toxicidade crônica 54
2.5.1.1 Preparo da água de diluição 55
2.5.1.2 Estimulação e liberação dos gametas 56
2.5.1.3 Fecundação 57
2.5.1.4 Leitura e interpretação dos resultados 59
2.5.2 Ensaio de toxicidade aguda 60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
3.1 Análises fitoquímicas preliminares 61
3.1.1 Análises de taninos 61
3.1.2 Análises de flavonoides 64
3.2 Dosagens de fenólicos totais 67
3.3 Análises em espectrometria de massas (MS) 68
3.3.1 Análises da FrAq de *Bauhinia forficata* por MS 68
3.4 Análises ecotoxicológicas 75
4. CONCLUSÃO 82
5. VERSÃO COMPACTA 82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa constante para descoberta e obtenção de novas drogas a partir da flora objetivando a terapêutica pode ser realizada por intermédio de vários métodos. Estes podem se dar através de pesquisa baseada na evolução botânica e quimiossistemática micromolecular, observação de insetos aposemáticos e através da etnobotânica e etnofarmacologia (FERRO, 2006).

É neste estudo constante de plantas medicinais, que a etnofarmacologia associa as informações sobre utilização dos fitoterápicos pela comunidade com pesquisas fitoquímicas e farmacológicas. Estas informações podem funcionar como ponto de partida para pesquisadores estabelecerem métodos de extrações adequados e, por conseguinte, desenvolver e conjecturar quanto aos componentes químicos presentes na planta, assim como propor hipóteses no que concernem as atividades farmacológicas (ELISABETSKY, 2003). Considerando que o Brasil possui grande índice de biodiversidade e grau de miscigenação elevada da sua população, isto culmina em um conhecimento rico e vasto sobre a sua natureza tornando próspera a busca por novas drogas (RODRIGUES; CARLINI, 2003).

A humanidade, ao longo dos séculos, se utiliza de extratos vegetais para o tratamento de diversas doenças e, devido aos bons resultados, a medicina tradicional vem sendo sistematicamente estudada. Vários medicamentos utilizados na atualidade como alcaloides, antibióticos, vitaminas e hormônios são produtos finais dos processos de purificação, isolamento e identificação destes extratos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 2008).

Embora remédios naturais sejam de suma importância farmacológica, até o momento não foram reportados na literatura dados sobre o comportamento e os riscos associados a presença dessas substâncias no ambiente.

Por outro lado, já existe certo conhecimento sobre a toxicidade dos compostos sintéticos, por exemplo, os efeitos tóxicos da Amoxicilina frente a cianobactérias provavelmente atribuída a sua natureza procariótica (GONZÁLEZ-PLEITER et al., 2013). Dellagreca et al. (2006), a respeito do Omeprazol e Lanzoprazol no meio aquático, analisaram o comportamento químico e fotoquímico e observaram que estes fármacos, em meio ácido fraco e luz solar, podem sofrer degradação química e, atualmente, já é sabido que os

metabólitos podem ser ainda mais tóxicos do que a própria molécula original.

Assim, compostos tóxicos têm sido um grande problema com relação a contaminação de corpos aquáticos. A ecotoxicologia aquática é uma ciência que dá suporte, sinalizando de forma preventiva a toxicidade de compostos químicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, assim podendo avaliar o impacto ambiental de substâncias químicas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Dentre tantas patologias que as comunidades tratam de forma tradicional, escolheu-se a úlcera péptica. Esta é classificada como uma doença heterogênea, com muitos fatores envolvidos na sua gênese (CARVALHO, 2000). Mesmo com a incidência, que vem sendo constantemente reduzida nos últimos anos, a doença ulcerosa péptica ainda se encontra com uma alta prevalência em todo mundo, sendo o sangramento e a perfuração complicações importantes de morbimortalidade (TONETO et al., 2011).

Com relação as espécies vegetais, uma tradicionalmente utilizada, é *Cocos nucifera* Linn também conhecido como coco, coco-da-bahia, coqueiro-da-bahia e coqueiro-da-praia e é comumente encontrado na costa Atlântica, mais na região do Nordeste brasileiro (LORENZI; MATOS, 2008). É largamente utilizado para diversas indicações terapêuticas, dentre elas podemos citar como repositor de eletrólitos, antídoto, antioxidante, cardioproteção, antitrombótico, contra aterosclerose, cálculos renais e biliares, anticárie, hepatoproteção, hipolipemiantes, antibiótico, imuno-estimulador, antiprotozoário, anticarcinogênico, antidiabético entre outros (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Estudos pretéritos identificaram em sua composição compostos como taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis e xantonas (SILVA et al, 2008).

Outra espécie muito utilizada é *Bauhinia forficata* Link*,* também conhecida como pata-de-vaca, que se destaca como uma planta amplamente empregada em tratamentos medicinais e tradicionalmente é utilizada como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (PIZZOLATTI et al., 2003). Os flavonoides contidos nessa planta são polifenóis que a constituem quimicamente, e possui a Kaempferitrina como principal marcador farmacológico e químico com atividade anti-ulcerogênica (MARMITT; REMPEL 2016).

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar

estudos fitoquímicos e ecotoxicológicos das espécies vegetais *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* e comparar os problemas ambientais com fármacos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica.

1.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1 Aspecto gástrico geral

1.1.1.1 Divisão anatômica

O sistema digestório é disposto no seguinte sequenciamento linear: boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus. O trato gastrointestinal também conta com glândulas anexas como salivares, pâncreas, fígado, vesícula biliar e estômago, objeto deste estudo, sendo este dividido em fundo, corpo e antro (FIGURA 1) (CONSTANZO, 2010).

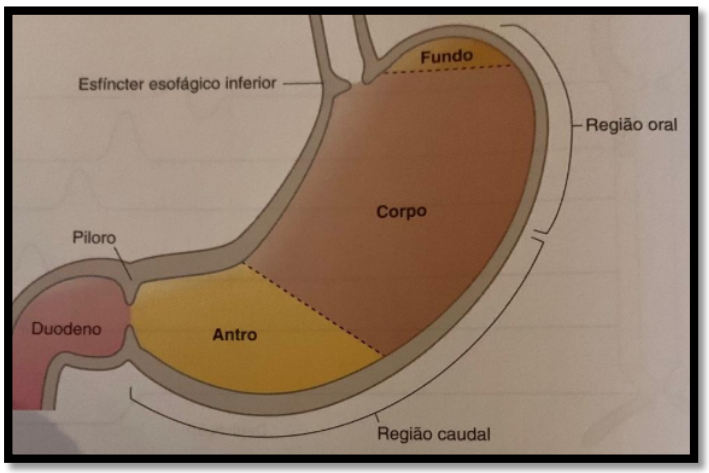


Figura 1. Divisão anatômica gástrica.
Fonte: Silverthorn (2003)

1.1.1.2 Divisão histológica

A parede do trato gastrointestinal possui duas superfícies: a mucosa, que é voltada para o lúmen contando com células epiteliais (com funções absortivas e secretórias), lâmina própria (contendo tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos) e muscular da mucosa (compreendendo as células musculares lisa). E, adjacente a mucosa, tem-se a camada submucosa (rica em colágeno, elastina, glândulas e vasos sanguíneos). A motilidade do trato gastrointestinal é assegurada pelo músculo circular e músculo longitudinal, localizados entre as camadas da mucosa e a serosa. Entre as camadas submucosa e de músculo

circular, tem-se o plexo submucoso ou Meissner e o plexo mioentérico ou Auerbach que fica entre o músculo circular e o músculo longitudinal (FIGURA 2) (SILVERTHORN, 2003).

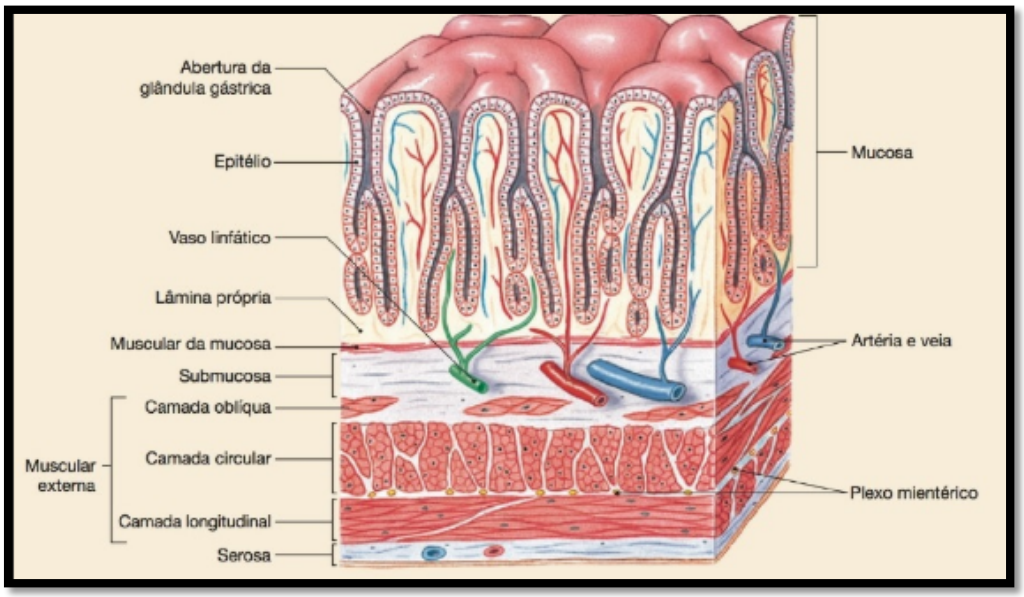


Figura 2. Divisão histológica do estômago.
Fonte: Silverthorn (2003)

1.1.1.3 Distribuição citológica

As glândulas oxínticas ou parietais são encontradas no fundo e no corpo do estômago e possuem uma gama de células específicas: as células parietais secretam ácido e fator intrínseco, as células principais armazenam pepsinogênio em grânulos e as células semelhantes às enterocromafins (ECL) sintetizam histamina. Na mucosa da parte antral não existem células parietais ou principais, mas encontra-se células produtoras de muco e nas glândulas pilóricas, desta porção, encontramos as células G, responsáveis por sintetizar e liberar gastrina e as células D que secretam somatostatina (RAFF; LEVITZKY, 2012).

1.1.1.4 Inervação do trato gastrointestinal

1.1.1.4.1 Sistema nervoso autônomo intrínseco ou entérico

O sistema nervoso intrínseco encontra-se localizado no trato gastrointestinal por completo. É subdividido em dois plexos: mioentérico ou Auerbach, responsável por controlar os movimentos do trato gastrointestinal e submucoso ou Meissner responsável pelo fluxo sanguíneo e secreção (GUYTON & HALL, 1998).

1.1.1.4.2 Sistema nervoso extrínseco

A inervação extrínseca compreende os sistemas simpático e parassimpático que se conectam tanto com o plexo de Auerbach quanto com o plexo de Meissner, intensificando as ações destes plexos.

A inervação do sistema nervoso autônomo parassimpático tem característica estimulatória no trato gastrointestinal e é feita principalmente através do nervo vago. Anatomicamente, o sistema parassimpático possui longas fibras pré-ganglionares, que fazem sinapses em gânglios com fibras mais curtas no alvo ou perto dele. No caso do trato gastrointestinal, esses gânglios se localizam na parede dos órgãos nos plexos mioentérico e submucoso. Quando ocorre a informação, esta passa pelas fibras parassimpáticas e chegam até esses plexos e são retransmitidas para o músculo liso e células endócrinas e secretoras (CONSTANZO, 2010).

Já o sistema nervoso simpático, com caráter mais inibitório, tem suas fibras pós-ganglionares mais presentes perto da cavidade oral e do ânus. Seus efeitos principais são a inibição do músculo liso pela secreção de noradrenalina e em maior grau, sua ação se dá pelo efeito inibitório sobre os neurônios do sistema nervoso entérico (GUYTON & HALL, 2002).

1.1.1.5 Peptídeos gastrointestinal

Os peptídeos gastrointestinais são classificados em hormônios, parácrinos ou neurócrinos e regulam as funções do trato gastrointestinal.

A gastrina é o principal hormônio sintetizado pelas células G no antro gástrico. Liberada pela ECL, a histamina é um mediador parácrino, ou seja, liberado por células endócrinas e por difusão chegam ao local de ação: a célula parietal. Já acetilcolina (ACh) faz parte do controle neurócrino, realizado através do nervo vago e estimula diretamente a célula parietal além de estimular as ECLs. O nervo vago também libera o peptídeo liberador de gastrina (GRP), que estimula, diretamente, a célula G a liberar gastrina (RANG & DALE, 2007).

1.1.1.6 Controle da secreção gástrica

As células que compõe a mucosa gástrica secretam o suco gástrico que é composto por ácido clorídrico, pepsinogênio, muco e fator intrínseco, este último determinante para a absorção de vitamina B_{12}. A medida que o alimento

passa pelo trato gastrointestinal, a secreção é modulada através de mecanismos reguladores (CONSTANZO, 2010).

1.1.1.6.1 Reflexos curtos e longos

Os reflexos podem tanto induzir a estimulação quanto a inibição da liberação de secreção gástrica. Por exemplo, os reflexos curtos são aqueles que envolvem somente o sistema nervoso entérico e quando há distensão da parede do estômago pela presença do alimento, esses reflexos estimulam a secreção ácida (BARRET, 2014).

Já os reflexos longos ou reflexos vagovagais envolvem a ativação aferente do nervo vago, que são interpretados no complexo dorsal do vago e através da via eferente desencadeiam impulsos vagais, ativando as células parietais de forma direta ou indireta. O neurotransmissor responsável tanto no reflexo curto, quanto no longo é a ACh (RAFF; LEVITZKY, 2012).

A estimulação colinérgica atinge, de forma geral, as células da glândula secretora, inclusive as células parietais e as células secretoras de muco (MOREIRA; CHAVES, 2002).

1.1.1.6.2 Controle humoral

A ACh estimula, através do nervo vago, tanto as células parietais a secretarem ácido de forma direta quanto as ECL´s a secretarem histamina, esta que vai estimular a célula parietal a secretar ácido também. Ainda tratando sobre o nervo vago, este libera GRP com a finalidade de estimular a célula G a secretar gastrina, que por sua vez, atinge a circulação e retorna ao estômago, sinalizando as células parietais para secretarem ácido. Além do estímulo do nervo vago via GRP, a gastrina é liberada através da distensão do estômago e pela presença de peptídeos e aminoácidos em seu interior, além estimular as ECL´s também. Portanto, a ACh e a gastrina estimulam a liberação de ácido não somente pela estimulação da célula parietal cada qual com seu receptor, mas também, através da estimulação das ECLs a liberarem histamina e esta estimular a célula parietal potencializando a secreção de ácido (CONSTANZO, 2010).

A histamina interage com receptor H2, receptor acoplado a proteína G (GPCR), (estimulando subunidade Gs, adenilato ciclase, AMPc, PKA). Já a ACh age em receptor M3, e a gastrina atua em receptor CCK2. Estes receptores M3

e CCK2, são sinalizados por meio de receptores GPCR, estimulando subunidade Gq, PLC, IP3, Ca^{2+}, nas células parietais. Nestas células, tanto o AMPc quanto as vias dependentes de Ca^{2+} ativam a bomba de prótons que efetua a troca de H^+ e K^+ através da membrana da célula parietal (FIGURA 3) (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A somatostatina liberada pelas células D da mucosa da porção antral gástrica, inibe a liberação de gastrina a partir da célula G quando o pH luminal fica abaixo de 3 (RAFF; LEVITZKY, 2012)

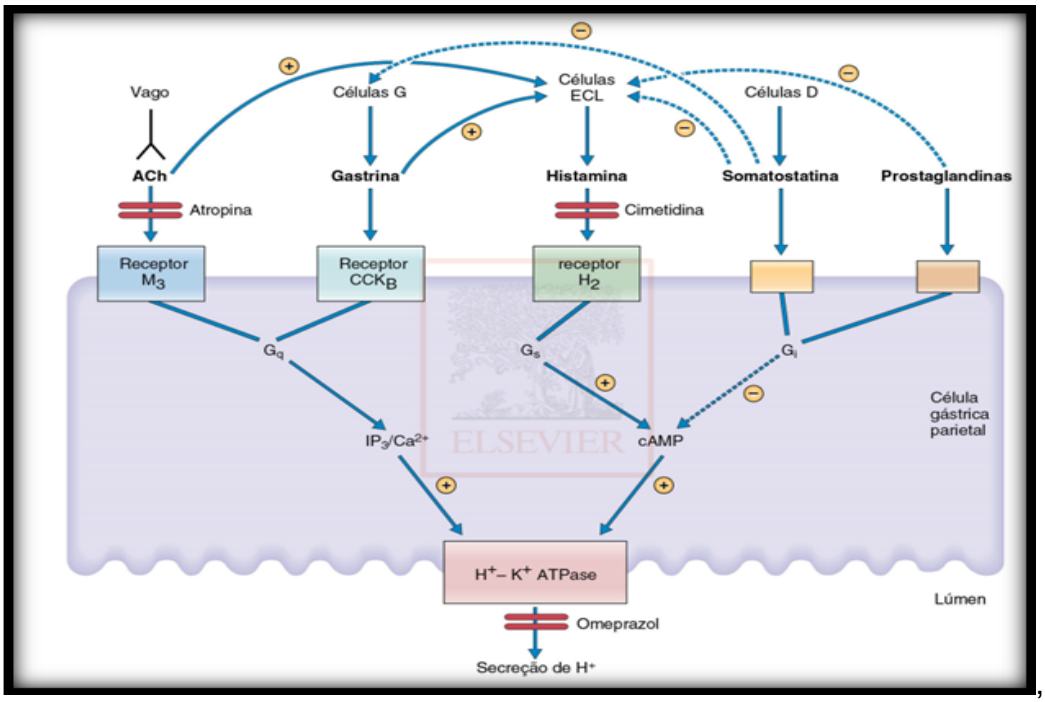


Figura 3. Ativação da secreção.
Fonte: Constanzo (2010)

1.1.1.7 Bomba de prótons

A célula parietal secreta uma solução isotônica de HCl com pH abaixo de 1 e o transporte de Cl^- se faz ativamente para os canalículos da célula que comunicam-se com a luz da mucosa gástrica. Essa secreção contendo o Cl^- é acompanhada por K^+ e este é trocado por H^+ de dentro da célula por uma enzima chamada K^+ / H^+ - ATPase. A combinação de água e dióxido de carbono é catalisada pela anidrase carbônica para gerar ácido carbônico que se dissocia em bicarbonato e H^+. O bicarbonato é trocado, na membrana basal da célula parietal, por Cl^- (FIGURA 4) (RANG & DALE, 2007).

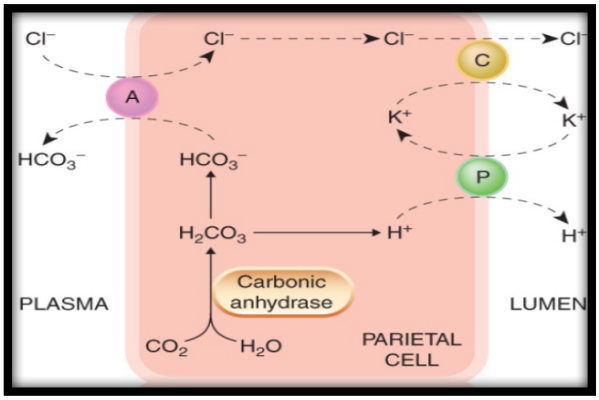


Figura 4. Bomba de prótons.

Fonte: Rang & Dale (2007)

1.1.1.8 Proteção gástrica

A proteção gástrica ocorre através de vários fatores, entre eles a produção de muco gelatinoso e bicarbonato, secretados pelas células epiteliais superficiais, que recobrem a superfície luminal do estômago protegendo-a. A secreção de bicarbonato é estimulada pela prostaglandina das classes E2 (PGE2) e prostaciclina (PGI2) (BERNE; LEVY, 2000).

1.1.1.9 Fisiopatologia da úlcera gástrica

Como mencionado, a função básica do suco gástrico é esterilizar os alimentos que podem, supostamente, estarem contaminados por patógenos de diversas naturezas e converter pepsinogênio em pespina para dar início a digestão proteica (BARRET, 2014). O excesso de suco gástrico, bem como a redução da citoproteção gástrica e alterações na integridade da mucosa do estômago, contribuem significativamente para a patogênese da úlcera péptica (BIGHETTI et al., 2002).

A úlcera péptica é causada pela ação do suco gástrico levando a escoriação da mucosa e isso ocorre pelo desequilíbrio da secreção deste suco e da proteção da mucosa (GUYTON & HALL, 1998). Segundo a Federação Brasileira de Gastroenterologia (2016), as causas da úlcera podem ser a bactéria *Helicobacter pylori (H. pylori)* e drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES). O estresse e alimentos não causam úlceras, mas pioram a sintomatologia quando esta já está presente.

Úlcera induzida por *H. pylori*

A infecção por *H. pylori* acomete metade da população mundial, com prevalência de 60% de casos no Brasil, sendo a infecção que mais ocorre em seres humano. É uma bactéria do tipo gram-negativa, flagelada, com capacidade de sobreviver em pH baixo no estômago, apresentando tropismo pelo epitélio gástrico, provocando reações inflamatórias e imunológicas que podem durar por toda a vida, a menos que a bactéria seja eliminada (MAZZOLENI; MAZZOLENI, 2010).

A patogênese da *H. pylori* é garantida por diversos mecanismos e um deles é a capacidade da bactéria em conseguir resistir ao meio ácido. A hidrólise da uréia, presente fisiologicamente no suco gástrico, é promovida pela enzima urease contida no microrganismo em questão, e esta enzima é responsável pela produção de amônia, pois atua como receptor de H^+ gerando pH neutro dentro da bactéria, assim garantindo sua colonização e sobrevivência ao meio ácido (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).

Ainda segundo Ladeira, Salvadori e Rodrigues (2003), grande parte da enzima urease é sintetizada pelo próprio microrganismo e situada na região do citoplasma. Para que a amônia seja de fato produzida, é necessário que ocorra entrada de ureia dentro da bactéria, e este evento é controlado por uma proteína transmembranal sensível ao pH. Esta é codificada pelo gene pertencente à família da urease denominado de ureI e importante mencionar que cepas de *H. pylori* com deleção de ureI não possuem capacidade de sobrevivência ao ácido.

Na fase primária da infecção, a colonização é essencial para a sobrevivência da bactéria e para isso, é necessário que esta atravesse a camada de muco visco elástico que reveste o epitélio com função de proteção química e mecânica. Porém, enzimas como lipases e proteases são produzidas pela *H. pylori* para esta finalidade, além da própria morfologia da bactéria em espiral e dos flagelos, para facilitar sua translocação e se estabelecer nos tecidos epiteliais gástricos (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).

Dois genes ganham destaques quando se trata de fator de virulência nas cepas de *H. pylori.*

O primeiro é o gene vacA (vacuolating cytotoxin A) importante na patogênese da ulceração péptica, sendo responsável pelo fator de virulência. Este fator pode induzir a célula a diversas atividades como a vacuolização,

interrupção de funções endossomais e lisossomais, apoptose, imunomodulação e a formação de canais na membrana. Encontra-se presente em todas as cepas e possuem duas partes diferentes: *s* que codifica o peptídeo sinal, localizada na extremidade 5' e possui os alelos variantes *s*1 e *s*2 onde o alelo *s*1 possui 3 subtipos: *s*1a, *s*1b e *s*1c e os alelos *m*1 e *m*2 que se encontram na região média (*m*). A combinação entre os alelos *s* e *m* é o que garante a produção de citotoxinas e que vai determinar o grau de virulência da bactéria. Por exemplo, as cepas que possuem o genótipo vacA do tipo *s*1a parecem ser mais virulentas que as cepas dos subtipos *s*1b, *s*1c ou *s*2, sendo altamente relacionadas à úlcera péptica. As cepas que contém o subtipo *m*1 parecem causar maior dano as células epiteliais do que as cepas do tipo *m*2 (FIGURA 5) (LIMA; RABENHORST, 2009).

Figura 5. Mosaico do gene vacA.
Fonte: Ladeira; Salvadori; Rodrigues (2003) (adaptado)

O segundo fator de virulência é a ilha de patogenicidade cag-PAI (cytotoxin associated gene pathogenicity island), de prevalência em 60% a 90% das cepas mundiais. A ocorrência de cag-PAI está ligada ao aumento da produção de interleucinas, contando ainda com muitos genes presentes na ilha que interferem na resposta inflamatória do hospedeiro. Cepas com fator de virulência do tipo cagA parecem estimular a produção de interleucina do tipo 8 (responsável pela quimiotaxia de neutrófilo), assim tendo importância significativa na resposta inflamatória (LIMA; RABENHORST, 2009; SIQUEIRA et

al., 2007).

Porém, cepas com fator de virulência cagA negativo ainda são capazes de estimular interleucina do tipo 8 e assim, a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos (QUEIROZ et al., 1998). Este fato é explicado pela presença da proteína do tipo CagE (citotoxina associada ao gene E), também fator de virulência, que é fundamental para a estimulação da resposta inflamatória do tecido gástrico e que está ligada, de forma íntima, ao desenvolvimento de câncer estomacal (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

Ainda Siqueira et al. (2007), dizem que já é bem conhecido o papel importante da secreção ácida na patogênese da doença ulcerosa onde a infecção diminui a liberação de somatostatina e aumenta a liberação de gastrina pela região do antro gástrico. Essas alterações voltam as condições fisiológicas normais com a erradicação da *H. pylori.*

Tratando de espécies reativas do oxigênio (ERO), estes são oriundos do metabolismo celular normal e, em quantidades fisiológicas, estes possuem efeitos benéficos, dentre eles a morte de agentes patológicos, cicatrização de feridas e nos processos de restauração tecidual. Porém, quando este mecanismo tem sua função exacerbada, temos o que chamamos de estresse oxidativo, gerando uma problemática no estabelecimento de diversas patologias como câncer, doenças neurológicas, hipertensão, aterosclerose e doenças gastrointestinais. A instauração da lesão gástrica se dá pelo crescimento da bactéria, pela resposta imune e pela formação de ERO, que levam às inflamações crônicas (NUNES, 2016).

A formação e liberação das ERO, principalmente de neutrófilos, tem por objetivo eliminar a bactéria, mas esta possui mecanismo de driblar os efeitos nocivos destas ERO, através da utilização de enzimas. Com isso, a infecção por *H. pylori*, estimula uma maior formação de ERO no âmbito gástrico, mas mesmo assim, estas não são capazes de eliminar a bactéria. Essas constantes tentativas de eliminar a *H. pylori* por este mecanismo, favorecem os processos inflamatórios e assim os danos ao epitélio gástrico (NUNES, 2016).

É importante salientar que, no decorrer da infecção pela *H. pylori*, a concentração de ERO na mucosa e a capacidade antioxidante, podem culminar em morte celular e até mesmo alteração em nível de DNA favorecendo a patogenicidade (NUNES, 2016). O resultado final do excesso de ERO é a

peroxidação dos lipídeos de membrana, agressão a proteína das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Úlcera induzida por AINES

A fisiologia celular da cascata da inflamação é dependente do ácido araquidônico. Este é constituído por uma molécula de ácido graxo contendo 20 carbonos, tem como seu precursor fosfolipídios de membrana e sua síntese se dá através de reação catalítica proporcionada pela enzima fosfolipase A_2 (PLA2). Quando ocorre um estímulo, seja ele físico, químico ou mecânico, a PLA2 interage com os fosfolipídeos de membrana, liberando o ácido araquidônico (KUMMER; COELHO, 2002).

Segundo os mesmos autores, o ácido araquidônico interage com a cicloxigenase (COX) dando origem a dois compostos intermediários denominados prostaglandina G2 (PGG2) e prostaglandina (PGH2). A COX possui dois sítios catalíticos: os sítios COX e peroxidase. O primeiro tem a função de converter o ácido araquidônico em PGG2 que, posteriormente, é reduzido ao seu intermediário instável PGH2 através do sítio peroxidase, que não é afetado pelo pelos AINES. Esta PGH2 é transformada em diversos prostanóides como prostaglandina e tromboxanos (TX) (FIGURA 6). As prostaglandinas atuam de maneira autócrina ou parácrina mediada pela ação de receptores acoplados a proteína G e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e, graças a ação nestes receptores, tem-se diversas respostas regulatórias que justificam as ações fisiológicas e é neste ponto que mencionamos a importância da interferência dos anti-inflamatórios em cicatrização de feridas como efeito colateral dos AINES.

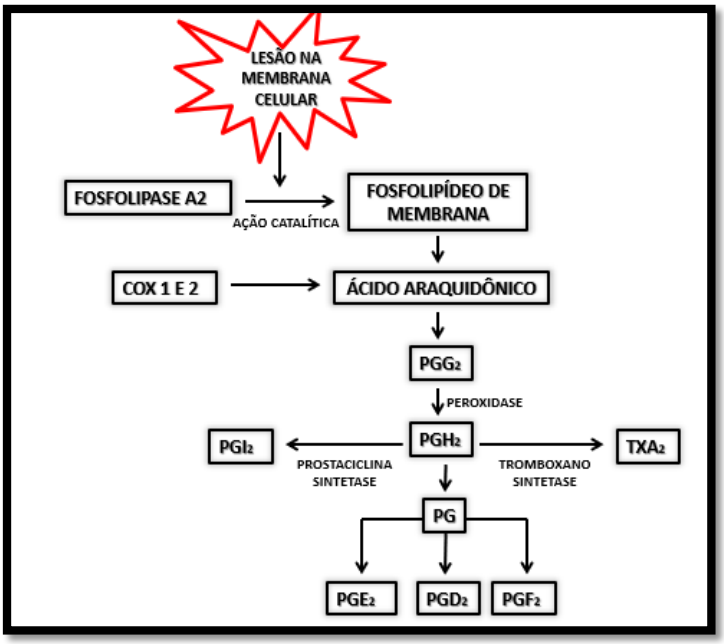


Figura 6 – Cascata da inflamação.

As prostaglandinas possuem ação vasodilatadora e especificamente, a PGD2 tem sua liberação mediada por mastócitos e iniciada por processos alérgicos. Já a PGE2 tem a função de inibir células linfocitárias e outros componentes que atuam em respostas alérgicas e inflamatórias. Possuem sua ação de vasodilatação, estimulação de nociceptores e também influenciam na termorregulação. Já a PGI2 ocorre em maior grau no endotélio vascular promovendo vasodilatação e possui o efeito de inibir a adesividade plaquetária. O TX, ocorre com maior frequência nas plaquetas e promove vasoconstrição e agregação plaquetária (MONTEIRO et al., 2008).

Esses efeitos, como mencionados, ocorrem por ação da enzima COX sobre o ácido araquidônico. Contudo, existem isoformas desta enzima que possuem diferenças significativas quanto a sua regulação e expressão e estas duas isoformas são inibidas pelos AINES, porém em níveis de inibição diferentes (MONTEIRO et al., 2008).

Segundo Kummer e Coelho (2002), a enzima COX 1 e 2 possuem sequenciamento genético diferenciado e independente, mesmo seu produto catalítico final sendo o mesmo. A COX 1 é uma enzima dita como constitutiva pois está sempre presente, ocorre na maioria dos tecidos e diante de estados inflamatórios, esta enzima parece não ter suas atividades alteradas e apresenta um aumento discreto de sua expressão de somente 2 a 4 vezes. Já a COX 2,

conhecida como COX induzida, fora de quadro inflamatório, possui presença discreta em alguns tecido como intestinos e na presença de quadro inflamatório, a expressão desta chega a ser maior que 20 vezes que o estado fisiológico normal.

As enfermidades gástricas causadas pelos AINES podem ser ocasionadas por dois mecanismos diferentes. A administração via oral pode levar a irritação localmente por permitir uma maior penetração do ácido na mucosa gástrica culminando em lesão tecidual. Diversos AINES, quimicamente são derivados do ácido carboxílico não ionizados e quando chegam ao lúmem gástrico podem ser absorvidos pela mucosa. Com o aumento do pH ácido até a neutralidade ainda no interior da mucosa, o fármaco ionizado é armazenado dentro das células epiteliais causando lesões as estas. Outro mecanismo é relacionado com a inibição da cascata do ácido araquidônico e, consequentemente, com a inibição da síntese de prostaglandinas. Pela inibição da COX constitutiva, a produção de prostanóides gástricos como a PGI2 e PGE2, que atuam como citoprotetores da mucosa, também ficam inibidos. A função destes eicosanoides é de reduzir a secreção gástrica, aumentar o fluxo sanguíneo nesta região, e promover a citoproteção levando a menor suceptibilidade à lesões. A redução de prostaglandinas também reduz a secreção de muco e bicarbonato no estômago e diminui a inibição da liberação de gastrina e ácido clorídrico. Como agravante ainda tem a redução da adesividade plaquetária o que aumenta a possibilidade de sangramentos (BRENOL; XAVIER; MARASCA, 2000; MONTEIRO et al., 2008; GUÉRIOS et al., 2002).

1.1.1.10 Tratamento para úlcera gástrica

O tratamento pode ser realizado através de diversos mecanismos entre os quais antagonista de receptor H_2, neutralizadores, citoprotetores e inibidores da bomba de prótons (IBPs), sendo esta última classe pertencente ao objeto deste estudo.

Com relação a *H. pylori*, a erradicação da bactéria é imprescindível para a melhora de pacientes ulcerosos e é necessário a combinação de agentes antimicrobianos, como amoxicilina, com agentes não antimicrobianos como

IBPs, e estes podem ter algum efeito sobre a *H. pylori,* uma vez que a hipocloridria pode ser letal para a bactéria (MAZZOLENI; MAZZOLENI, 2010).

1.1.2 Fármacos no meio ambiente

Os fármacos são componentes fundamentais para melhora da qualidade de vida e longevidade da população. O avanço da tecnologia e da ciência tem contribuído na busca de alternativas terapêuticas através do descobrimento de novas moléculas. Aliados as políticas públicas, há redução do custo e a garantia do acesso aos medicamentos (BARATA-SILVA et al., 2017).

O aumento da expectativa de vida é diretamente proporcional ao maior uso de medicamentos com o objetivo de diminuir a morbimortalidade. O consumo farmacêutico é elevado em função do envelhecimento da população, aumento de doenças crônicas e pela demanda de terapêuticas mais eficazes. As transações financeiras mundiais são estimadas de US$ 1 trilhão em 2015 para US$ 1,3 trilhão até 2020 (USA, 2017).

Já em relação ao Brasil, a comercialização de fármacos em 2017, atingiu aproximadamente 69,5 bilhões de reais representando um crescimento de 9,4% em comparação com o ano anterior. Totalizam 214 empresas que comercializaram 6.587 produtos, atingindo 1.794 princípios ativos ou associações destes. E, apesar dessa notável evolução no poder de compra, o uso de fármacos traz consequências ambientais tornando-se uma questão de saúde pública. Quando surge a necessidade de tratamento seja em caráter emergencial ou rotineiro, há aquisição de medicamentos que, muitas vezes, não são utilizados em sua totalidade (ANVISA, 2018).

E mesmo quando a terapêutica medicamentosa é realizada por completo, alguns componentes são eliminados pelas fezes e urina. Entre 50% e 90% de uma dosagem são eliminados de forma inalterada, sendo fonte de dano ao meio ambiente (UEDA et al*.,* 2009).

Uma vez que estes atingem o ambiente, há o interesse em monitorar os fármacos residuais. Estes compostos podem ser encontrados com alta frequência em Efluentes de Tratamento de Esgotos (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de µg/L e ng/L (BILA; DEZOTTI, 2003).

Estes resíduos medicamentosos são de importância social e econômica,

levando a impactos negativos ao ambiente quando depositados de forma inadequada independente da sua via de entrada (PROENÇA; MOURA; AZEITEIRO, 2014). Porém, a forma majoritária de entrada de fármacos residuais no ambiente é através do lançamento de esgoto doméstico em efluentes, sejam eles tratados ou não. Merecem também serem levados em consideração os fármacos liberados em efluentes pela indústria farmacêutica, efluentes rurais e o descarte inadequado de fármacos (MELO et al., 2009).

Grande parte dos compostos farmacêuticos presentes nos efluentes é oriunda da medicina veterinária e humana. Os resíduos seguem o trajeto juntamente com o esgoto bruto até as ETEs onde são realizados processos convencionais de tratamento como a biodegradação. No entanto, tais processos não são suficientes para a remoção completa destes resíduos, pois estes podem possuir ação biocida ou estrutura molecular complexa que não são suscetíveis à biodegradação (MELO et al., 2009).

Quanto ao potencial tóxico dos compostos deve-se levar em consideração: a) Persistência. Mesmo que possua meia-vida curta podem gerar exposições crônicas pelo seu despejo contínuo no ambiente; b) O propósito da elaboração dos fármacos é desencadear efeitos fisiológicos que, por consequência, torna os organismos não alvos mais suscetíveis; c) Mesmo que a concentração dos compostos sejam baixas, pode haver interação e seus mecanismos sofrerem ação sinérgica (REIS FILHO et al., 2006).

O monitoramento ambiental destes compostos possui interesse crescente e vem ganhando destaque na comunidade científica devido ao reconhecimento dos seus efeitos como toxicidade aquática, genotoxicidade, alterações endócrinas e bactérias potencialmente patogênicas e resistentes (BRANDT, 2012).

Ocasionados pela presença de fármacos residuais, os efeitos nos organismos aquáticos podem ocorrer em diferentes níveis de organização biológica sendo células, órgãos, organismo, população e ecossistema (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000).

Existem diversas classes de fármacos contaminantes que abrangem analgésicos, antimicrobianos, agentes reguladores de lipídios, anti-inflamatórios, hormônios sintéticos, dentre outros (BRANDT, 2012).

A exemplo de fármacos residuais nocivos a biota aquática, podemos

citar os antibióticos. Esta classe tem o potencial de desenvolver bactérias resistentes, por ter sua utilização em larga escala e também pela habilidade que as bactérias possuem em mutar seu material genético se tornando não sensível a determinado antibiótico (UEDA et al*.,* 2009).

Aliado a intervenção humana, a possibilidade de resistência já acontece de forma natural em populações de bactérias existentes no meio ambiente. Contudo, ainda existe o agravante da utilização de centenas de milhares de toneladas de antimicrobianos por ano. Consequentemente, o despejo destes resíduos no meio ambiente leva a alteração radical na magnitude das pressões, culminando em um número maior de bactérias resistentes aos antimicrobianos. O contato humano com bactérias ambientais bem como os genes de resistência, pode ocorrer através da água potável tendo como consumidor final a população humana (GAZE; DEPLEDGE, 2017).

Kolpin et al. (2002) identificaram compostos antimicrobianos das classes farmacológicas como fluoroquinolona (Ciprofloxacino, Norfloxacino), sulfonamidas (Sulfadimetoxina, Sulfametazina e Sulfametoxazol), macrolídeos (Roxitromicina, Claritromicina), tetraciclinas (Oxitetraciclina, Tetraciclina e Clorotetraciclina) e ainda Lincomicina e Trimetoprima em amostras de águas em recursos hídricos suscetíveis a contaminação nos Estados Unidos.

Em um estudo que trata sobre o perfil de resistência de *E. coli* em ambientes aquáticos, mostra que tanto em águas superficiais como em subterrâneas, foram identificadas 205 isolados desta bactéria. Foi observado que o Cefaclor foi o fármaco que evidenciou maior percentual de resistência tanto nas cepas isoladas de águas subterrâneas quanto nas águas superficiais (SCHNEIDER; NADVORNY; SCHMIDT, 2009).

Foram testados também o Ácido Nalidíxico, Amicacina, Amoxicilina e Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Estreptomicina, Gentamicina, Neomicina, Sulfonamida, Tetraciclina, Tobramicina e Trimetoprima. Foi observado que 26,73% das amostras isoladas provenientes de águas subterrâneas foram resistentes a quatro ou mais antimicrobianos, enquanto 25,96% das amostras originárias de águas superficiais apresentaram multirresistência a todos os antibióticos testados (SCHNEIDER; NADVORNY; SCHMIDT, 2009).

Neste mesmo estudo observou-se que 86,14% das linhagens de *E. coli*

isoladas e provenientes de águas subterrâneas, mostraram resistência a pelo menos um antibiótico. O perfil aquático superficial já mostrou variabilidade maior dependendo da origem da água. Isto explica a influência da emissão de efluentes em águas, juntamente com a veiculação de microrganismos já resistentes contribuindo para um risco maior à saúde (SCHNEIDER; NADVORNY; SCHMIDT, 2009).

Em pesquisa anterior com a Amoxicilina, esta não apresentou toxicidade para algas eucarióticas, porém o diferente foi observado com relação a cianobactéria *Synechococcus leopolensis.* Tais dados indicam a importância de ressaltar que o estudo de uma única espécie para analisar toxicidade de um composto não é realista (ANDREOZZI et al., 2004).

Além disso, antimicrobianos como Amoxicilina, Lincomicina, Sulfadiazina e Trimetoprina são exemplos de moléculas que possuem elevado potencial de disseminação no meio ambiente. Este fato ocorre pela elevada utilização em criações de animais, aquicultura e rotas de administração, por exemplo (REGITANO; LEAL, 2010; BOXALL et al., 2003).

Alygizakis et al. (2016), realizaram estudo sobre a ocorrência e distribuição de 158 fármacos e drogas de abuso em águas do Mar Mediterrâneo Oriental, área que sofre forte pressão antrópica e onde foram encontrados vários fármacos em ambiente marinho, inclusive valores amoxicilina que apresentou maior concentração.

Os hormônios constituem outra classe de fármacos prevalente no meio ambiente. Estrogênios como 17β-estradiol, o estrogênio sintético 17α-etinilestradiol e o xenoestrogênio 4-nonilfenol merecem destaque, pois são desreguladores endócrinos (disruptores). Altamente se destacam na questão da qualidade da água e saúde pública devida alta estrogenicidade, diversas fontes de contaminação, concentrações e alta frequência encontradas no meio aquático. Tais compostos são liberados de forma contínua e diária no esgoto e não são removidos em sua plenitude na ETE, sendo lançados em corpos aquáticos e detectados em águas superficiais ou até mesmo em água potável (PERES, 2011).

Estes disruptores são denominados estrogênios ambientais, estrogênios exógenos e xenoestrogênio e possuem a capacidade de alterar os processos fisiológicos controlados pelo estrogênio. Não apresentam obrigatoriamente, uma

semelhança com a molécula 17β-estradiol, mas que geram resposta antagonistas ou agonistas. A atividade agonista é caracterizada pela ligação de uma substância ao seu receptor, com a capacidade de gerar efeito positivo na mesma direção do hormônio. Já a atividade do antagonista consiste em haver afinidade do ligante ao receptor, contudo sem ativação deste (MENDES, 2015).

Alterações endócrinas já foram descritas através de disruptores. Estes incluem a feminização de peixes machos, redução na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, alterações no sistema reprodutor de peixes, répteis, pássaros e mamíferos, além das alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos (MAIA; DEZOTTI, 2007).

De acordo com Mimeault et al., (2005) a retirada do Genfibrosil da água por peixes dourados (*Carassius auratus),* é realizada através das brânquias. Foi observado que a testosterona plasmática foi diminuída em mais de 50% e um possível mecanismo de ação é dado através da transcrição de proteína esteroide aguda. Após a exposição pelo período de 96 horas, foi observada uma redução de mais de 50% dos níveis desta proteína levando a desregulação endócrina dos peixes.

Existem outras classes de fármacos que também são danosas ao meio ambiente. O Acetaminofeno possui ação anti-inflamatória e analgésica e inibe a enzima COX. Peixes-zebra (*Danio rerio*) que foram expostos ao Acetaminofeno em concentração na ordem de 10–100 μg L^{-1}, apresentaram diversos efeitos biológicos adversos como taxa de eclosão e crescimento diminuídos, aumento de deformações da coluna vertebral e aumento da taxa de mortalidade (DAVID; PANCHARATNA, 2009).

Em outro estudo realizado com o fármaco Omeprazol e os efeitos nocivos sobre o peixe Dourada (*Sparus aurata*), observou-se o efeito de seu metabólito e foi sugerido que este seria o responsável por alterações enzimáticas e fisiológicas, ocasionando distúrbios histológicos e de atividade de enzimas. Foi verificada acentuada redução de Glutationa S-transferase (GST) nos tecidos estudados (fígado e brânquias) e redução da catalase (CAT) hepática. Tais resultados sugerem que o metabólito do Omeprazol elevou a produção de ERO, superando a capacidade antioxidante das enzimas GST e CAT, ocasionando danos que culminaram na redução enzimática (COSTA, 2018).

Com relação a ocorrência, o omeprazol embora seja amplamente

consumido, a molécula original é pouco detectada em águas residuais urbanas e águas superficiais. Este fato pode ser atribuído pela sua capacidade de degradação em meio aquático e em gerar metabólitos como o sulfeto de omeprazol (BOIX et al., 2013).

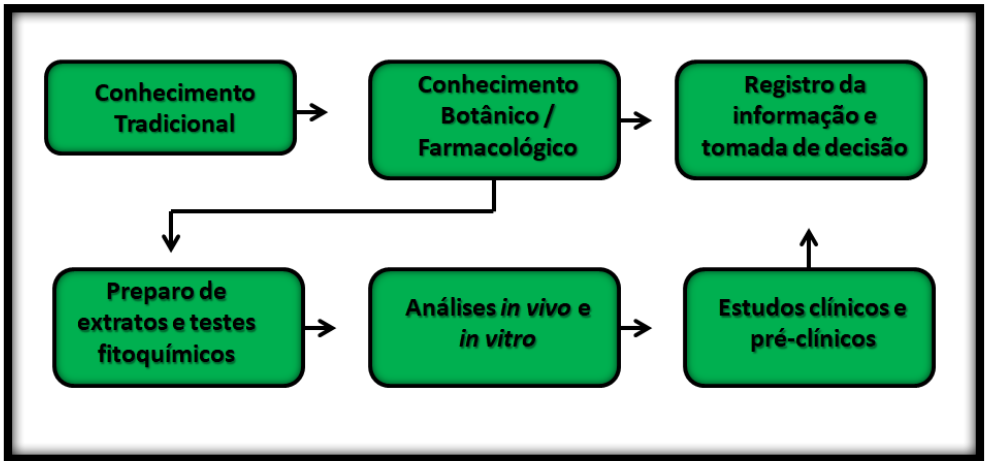
1.1.3 Etnofarmacologia

A etnofarmacologia é a ciência derivada da etnobiologia, que trata do estudo da complexa relação de plantas e animais com as comunidades humanas de forma atemporal. Esta ciência dedica-se a estudar o conhecimento de usuários sobre plantas medicinais com pesquisas químicas e farmacológicas e, por intermédio destes estudos, é possível explorar e formular no que tange a atividade farmacológica e quais substâncias são responsáveis pelos efeitos terapêuticos (ELISABETSKY, 2003).

A medicina tradicional vem sofrendo grandes mudanças nos últimos 30 anos, onde este tipo de prática tem desempenhado papel fundamental nos cuidados com a saúde em nível primário em países que estão em desenvolvimento (WHO, 2009).

A prática vem sendo crescente desde a década de 1990. E, além de manter o papel nos cuidados primários nos países em desenvolvimento, esta expandiu para os países desenvolvidos, podendo ser referida como medicina complementar ou alternativa. Com relação aos países em desenvolvimento, 70% a 80% da população dos países da Etiópia e Índia respectivamente, dependem desta medicina e, nos países desenvolvidos, 70% da população do Canadá e 80% da Alemanha usam a medicina alternativa, por exemplo (WHO, 2009).

A etnofarmacologia tem como vertentes de estudo a observação, identificação e a análise de efeitos farmacológicos de produtos que são utilizados para tratar diversas patologias por sistemas tradicionais, bem como estipular a posologia e as reações adversas. Grande parte dos produtos biológicos utilizados pela população mundial é proveniente de vegetais como um todo ou de parte deles. Neste ponto é analisado os metabólitos secundários que são responsáveis pela atividade farmacológica (FLUXOGRAMA 1).



Fluxograma 1 – Etapas para validação etnofarmacológica.
Fonte: Araújo; Melo; Albuquerque (2014)

Essa produção de metabólito secundário é controlada geneticamente, mas a manifestação da expressão destes genes pode ser influenciada por fatores externos que alteram processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (FIGURA 7). Os metabólitos secundários vegetais são o resultado químico da interação do vegetal como seu meio, contudo, estes fatores de interferência associados às condições de coleta, estabilização e armazenamento podem causar alterações no teor final destes metabólitos, alterando o valor terapêutico da planta medicinal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)

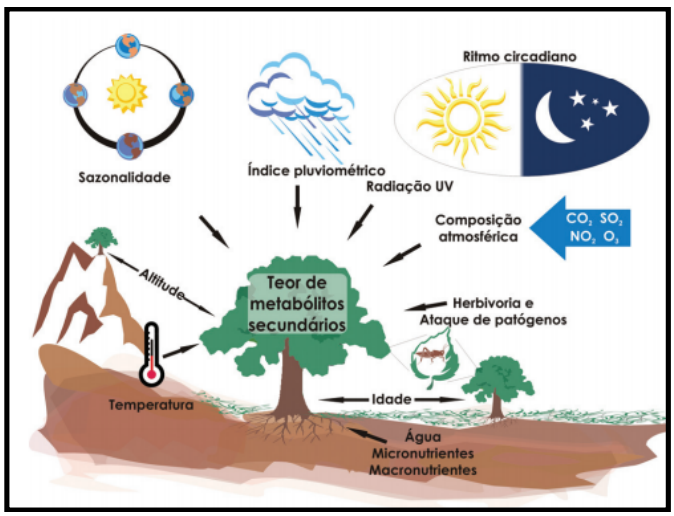


Figura 7 - Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários vegetais.
Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007)

O Brasil é detentor da maior biodiversidade mundial e esta é estimada por volta de 20% do valor total de espécies. Este valor é um enorme patrimônio genômico, escasso em muitos países desenvolvidos, e com valor econômico e

estratégico imensuráveis, mas é no campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos que está seu grande potencial. O mercado global de pesquisas de produtos naturais atinge o patamar de bilhões de dólares e calcula-se que 40% dos fármacos disponíveis para a terapêutica sejam provenientes de produtos naturais, onde 25% seriam de plantas, 13% seriam de microrganismos e ainda conta-se com 3% oriundo de produtos animais (CALIXTO, 2003).

Mesmo que, somente 10% da biodiversidade do planeta tenha sido estudada, 140 mil metabólitos intermediários foram isolados e caracterizados, provenientes, principalmente, das plantas superiores e de microrganismos, porém ainda não estudados biologicamente. Indo além, vale salientar que, com o traçado completo do genoma humano, o foco na biodiversidade e fitofármacos aumentou pois os alvos farmacológicos saltariam de 500 para 6 mil (CALIXTO, 2003).

Grandes indústrias farmacêuticas possuem laboratório de pesquisa com produtos naturais tendo as seguintes vantagens: aumentar a gama de estruturas químicas e formação de banco de moléculas otimizando tempo e custo nas pesquisas com ensaios de alta velocidade (CALIXTO, 2003).

Sabidamente, a forma de preparo pelas populações tradicionais é, em grande parte, na forma de chás e garrafadas, o que remete a importância do solvente extrator e a forma de extração escolhida, já que o foco deste estudo é correlacionar o uso tradicional com detecção de classes químicas oriundas do metabolismo secundário vegetal.

Tresvenzol et al. (2006) em estudo realizado com raizeiros no município de Goiânia e cidades vizinhas, mostraram que das 28 plantas citadas, todas tinham seu modo de preparo dado através de chás ou maceração (em água ou aguardente e vinho). Outro estudo com plantas medicinais com espectro de 600 moradores no município de Araguaína, no que tange sobre a forma de preparo, traz que a maioria faz o tratamento através de chás (60%), seguido pelas garrafadas (9,63%) (SILVA; RORIZ; SANTOS, 2012).

Na natureza, grande parte dos compostos de origem fenólica são encontrados na configuração de ésteres ou heterosídeos e não em sua forma livre, sendo assim, solúveis em água e em solventes orgânicos com características mais polares (MONTEIRO et al., 2005). Tais características químicas justificam a escolha da água como solvente quimicamente adequado

para *Cocos nucifera*.

1.1.4 *Cocos nucifera*

Cocos nucifera (FIGURA 8) é pertencente à família Arecaceae (família das palmeiras), sendo uma planta nativa do Sudeste Asiático como Malásia, Indonésia e Filipinas e as ilhas que compreendem entre os oceanos Índico e Pacífico (LIMA et al., 2015).

O coco é classificado como o fruto de palmeira, sendo uma drupa de característica ovoide ou elipsoide, podendo atingir até 30 cm de diâmetro. Sua distribuição morfológica contém cinco camadas diferentes: epicarpo liso, mesocarpo, endocarpo, endosperma sólido e líquido. O mesocarpo e o endosperma sólido, objetos deste trabalho, possuem característica fibrosa contendo de dois a quatro centímetros e de um a três centímetros de espessura, respectivamente (LORENZI; MATOS, 2008; SANTANA, 2012).

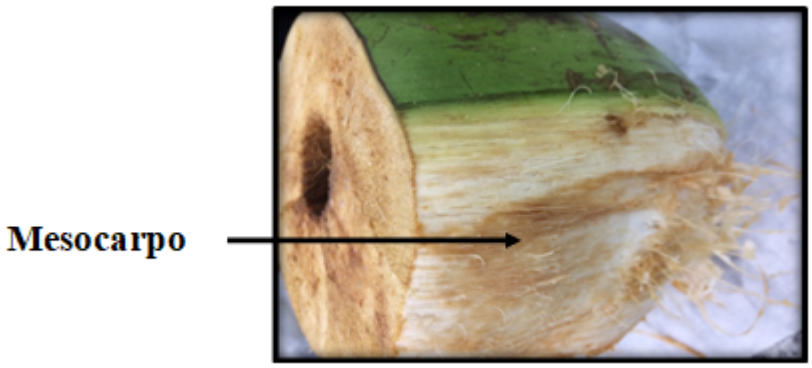


Figura 8. Mesocarpo de *C. nucifera* que foi utilizada.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimou a produção do coco em 1,8 bilhões para 2015 (IBGE, 2015). E este fruto como o todo é largamente utilizado para diversas indicações terapêuticas.

Atualmente, a água do coco está ganhando maior valorização. A fibra é utilizada pela indústria como fonte de matéria-prima para tapetes, estofamentos e fertilizantes. O centro mais duro é utilizado na confecção de artesanato e, a parte do talo e a folhagem, são úteis na construção e na produção de açúcar, vinagre e álcool que são extraídos de sua inflorescência. Porém, existem muitas outras formas de utilização tradicional medicinal, como a porção do mesocarpo para diarreia, folhas e raízes também para diarreia e estômago e endosperma

sólido para diarreia e ferida (TABELA 1) (LIMA et al., 2015).

Tabela 1- Principais usos tradicionais do *C. nucifera* em diversos países.

Local	Parte utilizada	Preparo/forma	Indicação
Brasil	mesocarpo	chá	diarreia
Papua Nova Guiné	folhas e raízes	chá	diarreia e estômago
Gana	endosperma sólido	leite de coco	diarreia
Indonésia	endosperma sólido	pomada	ferida
Indonésia	raiz	extrato	febre e diarreia

Adaptado de LIMA et al. (2015)

1.1.5 *Bauhinia forficata*

O gênero *Bauhinia* abriga mais de 300 espécies. Possui uma árvore de porte mediano, encontrada desde o Estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, contendo folhas uncinadas, com formato que remete a uma pata de vaca (FIGURA 9). Também possui flores brancas e frutos do tipo vagem linear. As plantas deste gênero são conhecidas pela concentração de flavonoides livres e glicosilados (PIZZOLATTI et al., 2003).

Em 1929 foi realizado o primeiro ensaio clínico com *Bauhinia forficata,* relacionado com sua atividade hipoglicemiante. As folhas, cascas e flores são as partes principais utilizadas na medicina tradicional especialmente na região sudeste (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 9. *Bauhinia forficata.*
Fonte: Flora Digital (Fotógrafo: João Augusto Bagatini).

Esta espécie é largamente utilizada pela população em diversas partes

do mundo como África, Ásia e América Central e do Sul. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos contemplados graças a essas plantas, mostram que são constituídas de compostos como glicosídeos esteroídicos, triterpenos, lactonas e flavonoides (SILVA; CECHINEL-FILHO, 2002).

É utilizada na medicina tradicional como diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, contra elefantíase e na diminuição da glicosúria, hipertricolesterolemia, parasitose intestinal, constipação intestinal, cálculo renal, crise do sistema nervoso, cistite, expectorante, úlceras, infecções e processos inflamatórios (PIZZOLATTI et al., 2003; UGGIONI, 2012; SILVA-LÓPEZ; SANTOS, 2015).

1.1.6 Compostos avaliados

1.1.6.1 Taninos

Os taninos, oriundos do metabolismo secundário, pertencem à classe dos compostos fenólicos e de intenso interesse tanto econômico quanto ecológico. Possuem solubilidade em meio aquoso e alto peso molecular: entre 500 e 3000 Dalton. A grande capacidade deste composto é em formar complexos com proteínas, gelatinas e alcaloides, porém insolúveis em água. A ligação entre taninos e moléculas de caráter proteico, acontece supostamente por pontes de hidrogênio (MONTEIRO et al., 2005).

Sua classificação é feita de acordo com sua estrutura química: taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis compreendem monômeros de ácido gálico e elágico glicosilados, provenientes da via metabólica do chiquimato (MONTEIRO et al., 2005; PAIVA et al., 2002).

Já os taninos do tipo condensado, são oligômeros e polímeros sintetizados pela condensação de unidades de flavan-3-ol (catequinas) e flavan-3,4-diol (leucoantocianidinas) (FIGURA 10 E 11). Também são denominados como proantocianidinas, graças a sua capacidade de produzir pigmentos de coloração avermelhada. Os taninos condensados são a união de dois ou mais flavonoides (SIMÕES et al., 2017; UETA et al., 2014).

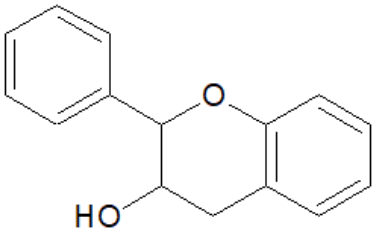


Figura 10 - Flavan-3-ol.
Fonte: Chemspider (2018)

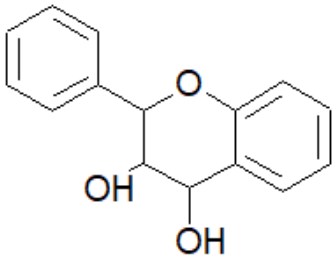


Figura 11 - Flavan-3,4-diol.
Fonte: Chemspider (2018)

As atividades farmacológicas dos taninos são asseguradas por três características comuns tanto aos taninos hidrolisáveis quanto aos taninos condensados e são elas: a) a capacidade de se complexar com íons metálicos, b) sua ação antioxidante agindo contra radicais livres e c) capacidade de formar complexos principalmente com proteínas e polissacarídeos (SIMÕES et al., 2017).

O mecanismo de ação antimicrobiano dos taninos se baseia em três hipóteses. Dentre elas temos: a inibição das enzimas bacterianas e fúngicas ou até mesmo pela complexação dos taninos com estes substratos, atuação direta na membrana celular dos micro-organismos, ou a complexação com íons metálicos reduzindo o aporte de íons fundamentais para a sobrevivência destes (SIMÕES, 2010).

Plantas que contém taninos em sua composição são amplamente utilizadas para tratar úlcera gástrica. De acordo com estudo realizado, o efeito farmacológico dos taninos deve estar associado ao fato desta classe possuir capacidade de precipitação proteica, indicando uma inibição de forma direta da bomba protônica (MURAKAMI; MURAMATSU; OTOMO, 1992).

Alanko et al. (1999), afirma que compostos fenólicos possuem efeito sobre a cascata do ácido araquidônico, onde concentrações menores estimulam e concentrações maiores inibem a cascata, modulando a citoproteção.

Além do efeito bactericida, os taninos protegem as camadas mais expostas da pele e mucosas lesionadas, graças a sua propriedade de se complexar tanino com proteína ou com polissacarídeos, auxiliando o processo de cura de forma natural (MONTEIRO et al., 2005). Assim, somando a ação antibacteriana, inibição da bomba protônica, a modulação da cascata do araquidônico e a capacidade de auxiliar na recuperação do tecido lesado, têm-se diversos mecanismos atuando de forma sinérgica para favorecer a proteção e cura de lesão gástrica.

Processos ulcerosos estão intimamente correlacionados com a formação de radicais livres e presença de *H. pylori* como mencionado, sendo os taninos capazes de neutralizar tais radicais, reduzindo assim os efeitos deletérios destes e também agir contra a bactéria diretamente.

1.1.6.2. Flavonoides

Os flavonoides são constituintes em abundância do grupo de compostos fenólicos das plantas, e representam mais da metade destes dentro de um universo de oito mil substâncias fenólicas. Diferentemente dos taninos, seu peso molecular é baixo, compondo quinze átomos de carbono em sua configuração. Estes se apresentam dispostos na conformação C6-C3-C6, onde sua estrutura fundamental é baseada em dois anéis aromáticos (A e B) conectados através de uma ponte constituída de três carbonos que, na maioria dos casos, apresenta-se na forma de anel heterocíclico (C) (FIGURA 12) (ROSS; KASUM, 2002).

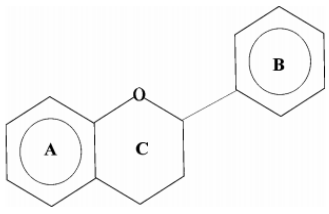


Figura 12. Estrutura genérica dos flavonoides.
Fonte: Ross; Kasum (2002)

O anel A é oriundo da via biosintética do acetato / malonato enquanto o anel B é proveniente da via da fenilalanina / chiquimato (FIGURA 13). Os diversos substituintes do anel heterocíclico C, constituem diversas classes de flavonoides como os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonóis e antocianidinas (FIGURA 14) (BALASUNDRAM; SUNDRAM;

SAMMAN, 2006).

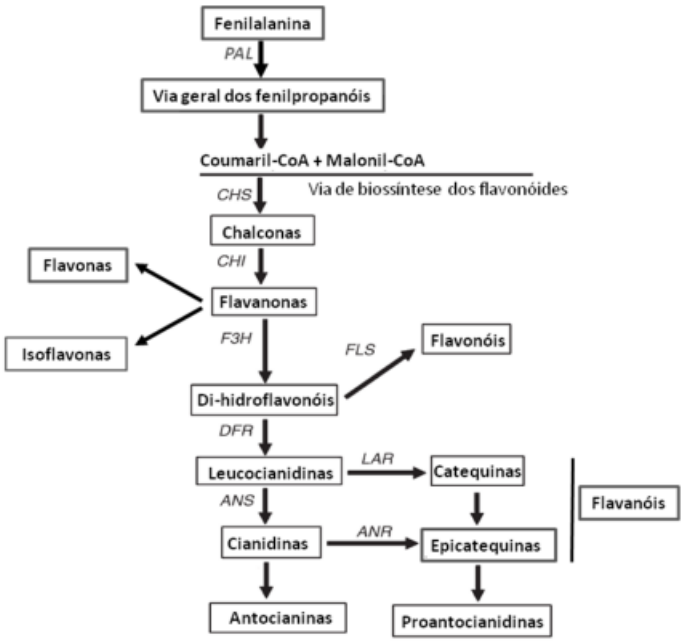


Figura 13. Esquema que representa a via biosintética dos metabólitos pertencentes a classe dos flavonoides. As enzimas essenciais representadas desta via biosintética são: fenilalanina amoníaco- líase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), di-hidroflavonol-4-redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina redutase (LAR)
Fonte: Pimpão (2009)

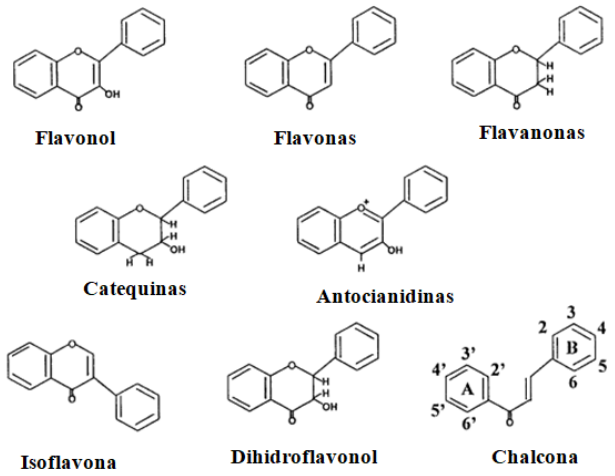


Figura 14. Principais constituintes da classe dos flavonoides.
Fonte: Cook; Saaman (1996)

Já as substituições que ocorrem nos anéis A e B, formam diferentes compostos pertencentes a cada classe de flavonoides (FIGURA 15). Tais substituições podem ser oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação. Já as reações como a glicosilação atribuem aos flavonoides maior

solubilidade em água, tornando possível o armazenamento no vacúolo celular, onde normalmente são encontrados (PIMPÃO, 2009).

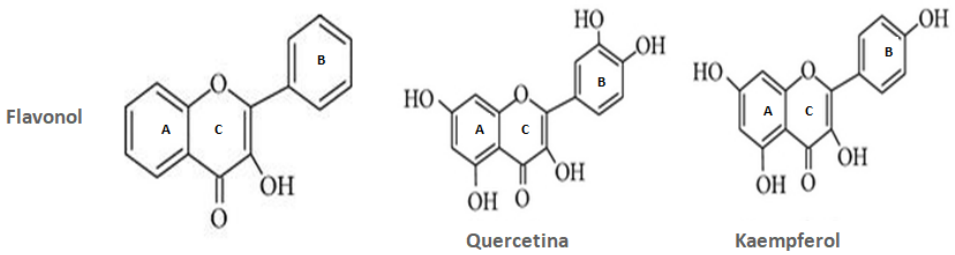


Figura 15. Flavonol.
Fonte: Kumar; Pandey (2013) (adaptado)

Ainda segundo Pimpão (2009), os compostos do tipo flavonóis estão largamente distribuídos nas plantas superiores, ocorrendo principalmente na forma de glicosídeos e são encontrados em folhas e outras partes que compõe a parte aérea das plantas. O kaempferol, miricetina e a quercetina fazem parte deste grupo.

Muitos setores da indústria, como a área cosmética e farmacêutica, vêm sucessivamente apresentando interesse relacionado aos efeitos benéficos desta classe, estimulando o fomento a pesquisa. Esse reflexo é notado através do número de compostos flavonoides mencionados entre 2007-2009 que teve um aumento de 30% quando comparados com o ano anterior, o que notadamente percebe-se o forte interesse que este grupo tem despertado (VEITCH; GRAYES, 2011; SANTOS, 2013).

1.1.6.3 Amoxicilina

A Amoxicilina (FIGURA 16) é um antibiótico da classe das penicilinas. Possui em sua estrutura o anel β-lactâmico, alvo das β-lactamases, enzimas produzidas pelas bactérias que atuam como mecanismo de resistência. O mecanismo de ação da Amoxicilina se baseia na inibição da etapa final da síntese de peptidoglicanos e este confere maior rigidez mecânica à parede bacteriana. Possui ação de largo espectro atingindo gram-positivos e gram-negativos, inclusive contra a *H. pylori* (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Estão apresentadas na tabela 2 características físico-químicas da Amoxicilina.

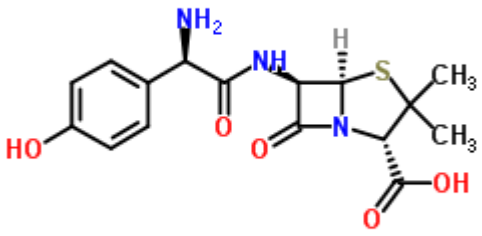


Figura 16. Estrutura molecular da Amoxicilina.
Fonte: Chemspider (2018)

Tabela 2 - Características físicas e químicas da Amoxicilina

Características	
CAS number	61336-70-7
Fórmula Molecular	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Peso Molecular	365,404
Forma e cor	Pó cristalino, branco ou quase branco.
Solubilidade em água	3433 mg/L
log Kow	0,87

Fonte: Chemspider, 2018; USEPA, 2012; ANVISA (2010)

1.1.6.4. Omeprazol e Lansoprazol

Os fármacos denominados IBPs como o Omeprazol (FIGURA 17) e Lanzoprazol (FIGURA 18), são responsáveis pelo aumento do pH no lúmen gástrico através do bloqueio da bomba de prótons. Normalmente são fármacos de primeira escolha, pois inibem a etapa final da liberação de ácido. Esta inibição acontece, porque esta classe de fármacos se funde ao receptor da bomba de prótons de forma irreversível através de ligações covalentes. Com isso a enzima não se regenera e a produção de ácido só volta a ser realizada quando uma nova bomba for sintetizada (MORSCHEL; MAFRA; EDUARDO, 2018).

Na tabela 3 estão apresentadas características físico-químicas do Omeprazol e Lanzoprazol.

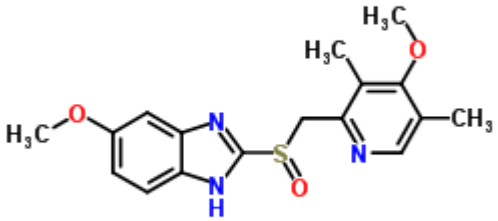


Figura 17. Estrutura molecular do Omeprazol.
Fonte: Chemspider (2018)

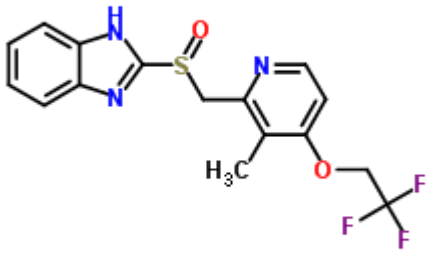


Figura 18. Estrutura molecular do Lanzoprazol.
Fonte: Chemspider (2018)

Tabela 3 - Características físicas e químicas do Omeprazol e Lanzoprazol

Características	Omeprazol	Lanzoprazol
CAS number	73590-58-6	103577-45-3
Fórmula Molecular	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$	$C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$
Peso Molecular	345,416	369,362
Forma e cor	Pó branco ou quase brando. Apresenta polimorfismo	Pó cristalino branco a branco acastanhado
Solubilidade em água	82,28 mg/L	0,97 mg/L
log Kow	2,23	3,68

Fonte: Chemspider, 2018; USEPA, 2012; Pubchem (2018).

1.1.7 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é uma ciência voltada para o estudo da toxicologia ambiental, onde o foco é a pesquisa dos efeitos causados por produtos químicos e físicos no meio natural. Neste campo, são avaliados os efeitos destes agentes sobre os organismos que compõem populações e comunidades pertencentes a ecossistemas específicos (PRÓSPERI, 2002; COSTA et al., 2008).

Foi o toxicologista Rene Truhaut quem trouxe a luz o termo ecotoxicologia no ano de 1969. Rene descreveu esta ciência que “estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticas, que constituem a biosfera”. E devido ao surgimento desta, foi possível desenvolver protocolos metodológicos padronizados, análises laboratoriais com espécies determinadas e métodos de avaliação de risco (FLYNN; PEREIRA, 2011).

Também se torna viável avaliar a resposta crônica e aguda, impactos ambientais estimando seus efeitos tóxicos, sendo possível determinar o grau de contaminação do ambiente, o destino das substâncias, o nível de periculosidade no organismo, apontar valores máximos permitidos pelas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) ou pela diretiva europeia 93/67, diagnosticar e estimar a consequência do contaminante no meio ambiente, quais medidas devem ser adotadas como método preventivo, monitorar a emissão de efluentes e analisar os riscos ambientais (COSTA et al., 2008; PRÓSPERI, 2002).

No Brasil, a resolução CONAMA nº 357/05 dispõe sobre as diretrizes ambientais bem como a classificação para o enquadramento de corpos hídricos superficiais. Também determina os testes ecotoxicológicos para avaliar efeitos deletérios de contaminantes físicos e químicos em variados organismos aquáticos, levando em consideração o risco à saúde humana. Posteriormente, a CONAMA nº 430/2011 veio em caráter complementar, tratando sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Contudo, não existem políticas específicas que englobe a indústria farmacêutica e o ônus ambiental que este setor traz como a questão de poluentes emergentes. Esta negligencia deixa susceptível para que resíduos oriundos de fármacos não sejam identificados, monitorados e tratados nas ETEs

e, mesmo que fármacos residuais sofram tratamento indireto, como a remoção de matéria orgânica, o impacto da toxicidade ambiental não é levada em consideração (WANDERLEY; NASCIMENTO, 2017).

A ecotoxicologia também busca estudar o comportamento das substâncias químicas sobre organismos representantes do ambiente aquático. Os estudos neste campo envolvem desde os efeitos tóxicos manifestados sobre um organismo quanto transporte, distribuição, biotransformação bem como o destino final das substancias contaminantes no meio hidrológico (COSTA et al., 2008).

A estabilidade molecular também deve ser observada. Por exemplo, no meio ambiente, moléculas podem ser degradadas de diversas formas, entre elas podemos mencionar processos químicos como hidrólise e fotoxidação, além de processos bioquímicos. Essa estrutura pode ser alterada pelo próprio meio através da temperatura, pH, concentração de matéria orgânica e velocidade de degradação da substância no meio ambiente (PEDROZO; KUNO, 2008). Como mencionado, para se conhecer o comportamento e a interação das substancias no meio ambiente é necessária a realização de testes de ecotoxicidade (FIGURA 19).

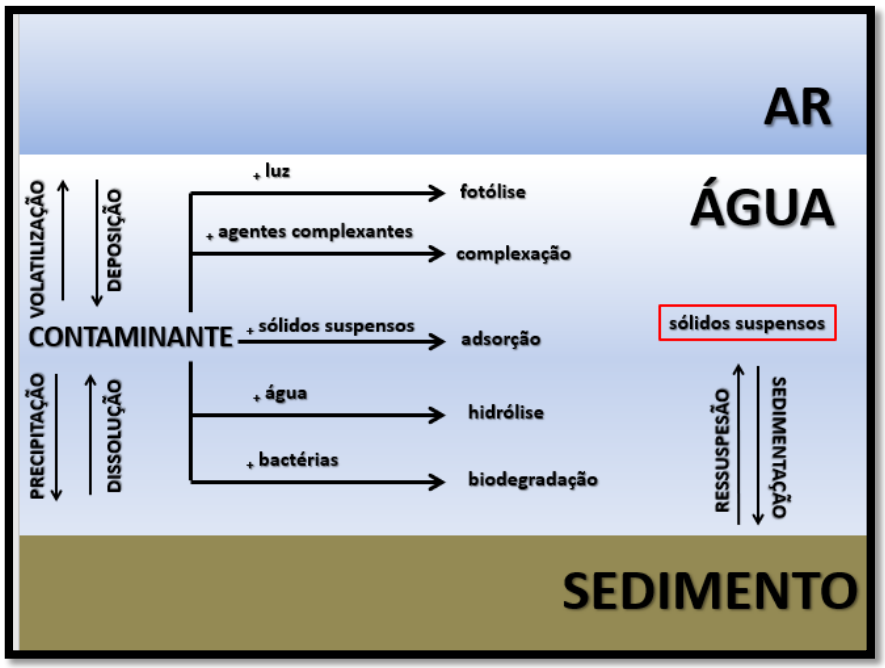


Figura 19. Alguns processos de transformação que ocorrem no ambiente - adaptado.
Fonte: Costa et al., (2008)

1.1.7.1 Testes de ecotoxicidade

Com a demanda crescente no descobrimento de novas drogas e a degradação contínua dos recursos naturais devido as ações antrópicas, diversos xenobióticos têm sido integrados ao meio ambiente por via direta ou indireta (SILVA et al., 2015).

Análises químicas de compostos tóxicos apenas norteiam a pesquisa sobre impacto ambiental, pois estas não mostram os efeitos dos poluentes sobre o ecossistema. Somente é possível mensurar tais danos através de pesquisas com sistemas biológicos ou suas partes, para melhor definir os efeitos tóxicos de um composto. Essas análises químicas isoladas não respondem sobre que agente pode causar toxicidade, possíveis interações de forma aditiva, antagônica ou sinérgica e tampouco sua biodisponibilidade (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Ao passo que as análises químicas identificam e quantificam os compostos, os testes de toxicidade analisam o efeito destes compostos no organismo, sendo assim, os dois estudos têm caráter complementar (COSTA et al., 2008).

Para realizar os testes padronizados, existem diversas organizações e agencias de normatização como United States Environmental Protection Agency (USEPA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e International Organization for Standardization (ISO) dentre outras tanto nacionais quanto internacionais. No Brasil, o órgão responsável pela elaboração de normas para os testes ecotoxicológicos é a ABNT (NOVELLI, 2005).

Os testes de toxicidade podem ter caráter agudo ou crônico e cada teste tem o objetivo de analisar condições e parâmetros diferentes, mas com resultados que podem se complementar (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

O ensaio de toxicidade aguda tem por objetivo avaliar efeitos que ocorrem em menor espaço de tempo e, em geral, acontecem de forma mais severa. Neste caso, avalia-se a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste, ou seja, uma resposta rápida do organismo em relação ao composto ao qual foi exposto. Um exemplo a ser citado é o ensaio agudo com *Daphnia similis* com duração de 48 horas (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Pode-se dizer que os efeitos nem sempre são letais e são verificados em momentos em que o organismo está exposto as concentrações do composto.

Contudo, mesmo permitindo a sobrevivência do indivíduo, estes podem afetar diversas funções biológicas como reprodução, desenvolvimento, crescimento, entre outros (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Outro teste utilizado é de toxicidade para avaliação de efeito crônico. Neste, avalia-se a ação dos compostos sobre partes ou o ciclo de vida completo do organismo selecionado. No ambiente aquático deve-se levar em consideração os fatores de diluição, pois geralmente a concentração dos compostos que entram em contato com os organismos são em doses subletais. Desta forma, é possível estudar a resposta fisiológica e comportamental em longo prazo podendo ser percebido alterações mais sutis. Este tipo de ensaio utiliza *E. lucunter,* por exemplo, como organismo-teste para avaliação de efeitos tóxicos baseados na verificação do desenvolvimento larval (SILVA, POMPÊO, PAIVA, 2015; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Assim, a mortalidade e imobilidade de adultos (teste agudo) e a natalidade (teste crônico) são os parâmetros mais analisados para mensurar o quão uma substância pode ser agressora ao meio ambiente (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

É importante ressaltar que, para testes ecotoxicológicos, há necessidade de se trabalhar com organismos indicadores. Estes possuem um estreito limite de tolerabilidade a determinados compostos e, consequentemente, apresentam alterações de caráter fisiológico, morfológico ou até comportamental depois de expostos a poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

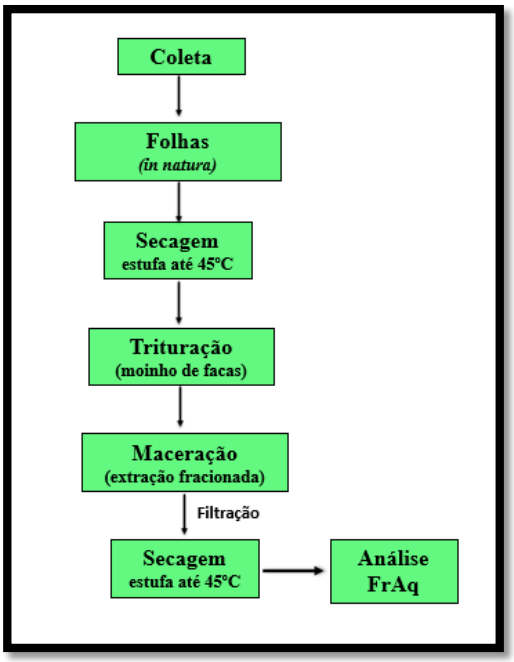
2.1 Coleta e extração

2.1.1 *Bauhinia forficata*

A coleta de exemplares de *Bauhinia forficata* Link foi realizada no município de Peruíbe, SP-Brasil (24º 26' 79.48"S 46º 95' 92.76"O). As amostras foram comparadas pelo Prof. Paulo Salles Penteado com a Exsicata elaborada sob o número do voucher 4651 e depositada no Herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC) (FIGURA 20). Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa a 50ºC durante 06 dias consecutivos e trituradas posteriormente (REY, 2016).

Figura 20. Exsicata de *Bauhinia forficata.*
Fonte: Husc 4651; Rey (2016)

Para obtenção da fração aquosa de *Bauhinia forficata* (FrAq) foi realizada extração pelo método fracionado com os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, n-butanol e água, sucessivamente, na proporção de 50g do material vegetal/500 mL de solvente e após a extração, o extrato aquoso foi seco em estufa, com temperatura inferior a 45°C, obtendo-se a FrAq seca (FLUXOGRAMA 2).



Fluxograma 2. Extração para a obtenção da fração aquosa seca (FrAq) de *B. forficata.*

2.1.2 *Cocos nucifera*

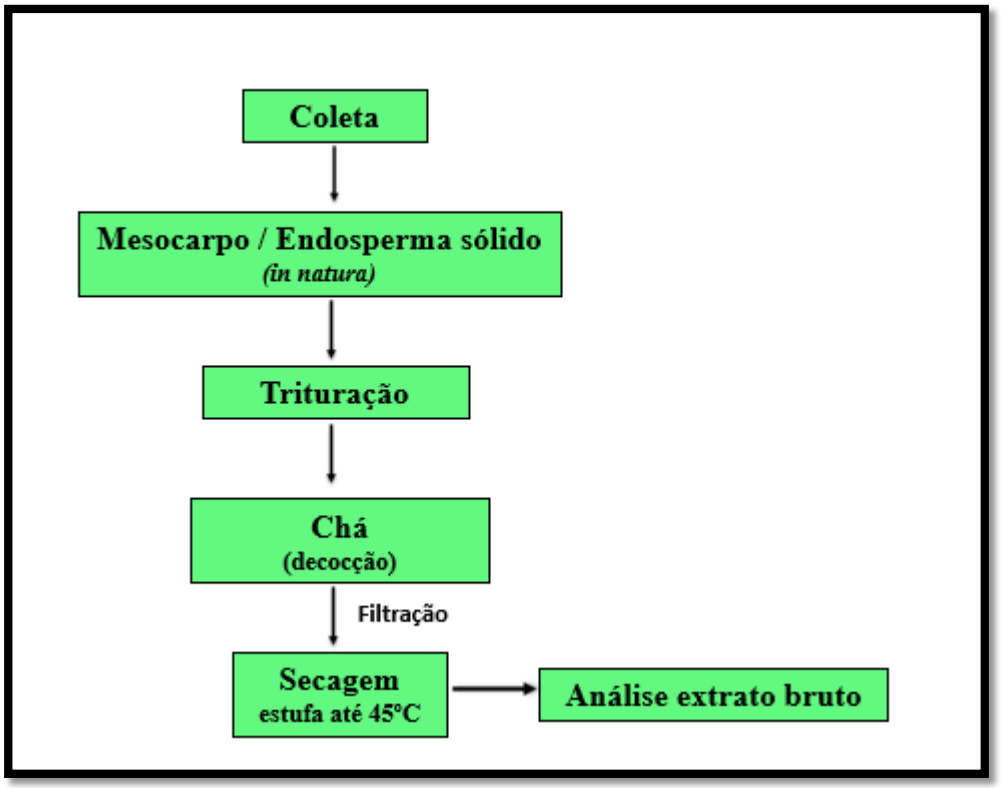
A coleta de exemplares de *Cocos nucifera* Linn realizou-se no município

de Praia Grande, SP-Brasil (24º 00' 53.76"S 46º 24' 14.34"O). O mesocarpo (FIGURAS 21 e 22) e o endosperma sólido foram retirados *in natura* e triturados utilizando liquidificador de copo de alumínio e, em seguida, submetidos a extração.

Figura 21. Remoção das cascas de *C. nucifera.*

Figura 22. Mesocarpo de *C. nucifera* removido.

A obtenção do extrato aquoso bruto foi realizada pelo método de decocção por sete minutos, na proporção de 50g do material vegetal/500 mL de água. Após a extração, o líquido extrator foi seco em estufa, com temperatura inferior a 45°C, obtendo-se o extrato aquoso bruto seco do mesocarpo e do endosperma sólido (FLUXOGRAMA 3).



Fluxograma 3. Extração para a obtenção do extrato aquoso bruto seco de *C. nucifera*.

2.2 Análises fitoquímicas preliminares

Tanto a fração aquosa de *Bauhinia forficata* quanto os extratos aquosos brutos de *Cocos nucifera,* foram submetidos às análises fitoquímicas através do emprego de ensaios cromáticos e/ou precipitação.

A pesquisa de Flavonoides foi realizada através do emprego das reações: Shinoda; reação com hidróxido de sódio; reação com cloreto férrico (COSTA, 2002). A pesquisa de Taninos foi realizada através da realização dos ensaios: reação com sais de chumbo (e ácido acético); reação com sais de ferro (cloreto férrico); reação com acetato de chumbo (COSTA, 2002).

2.3 Dosagem de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais, os extratos secos foram ressuspensos em metanol, na proporção de amostra: solvente de 0,1:20 (m/v) (FIGURA 23).

Foram adicionados às amostras 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteau. Após aguardar 3 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. As amostras foram incubadas a 37º C durante o período de 30 minutos em banho-

maria (para o desenvolvimento da cor) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (CELM) a 750 nm.

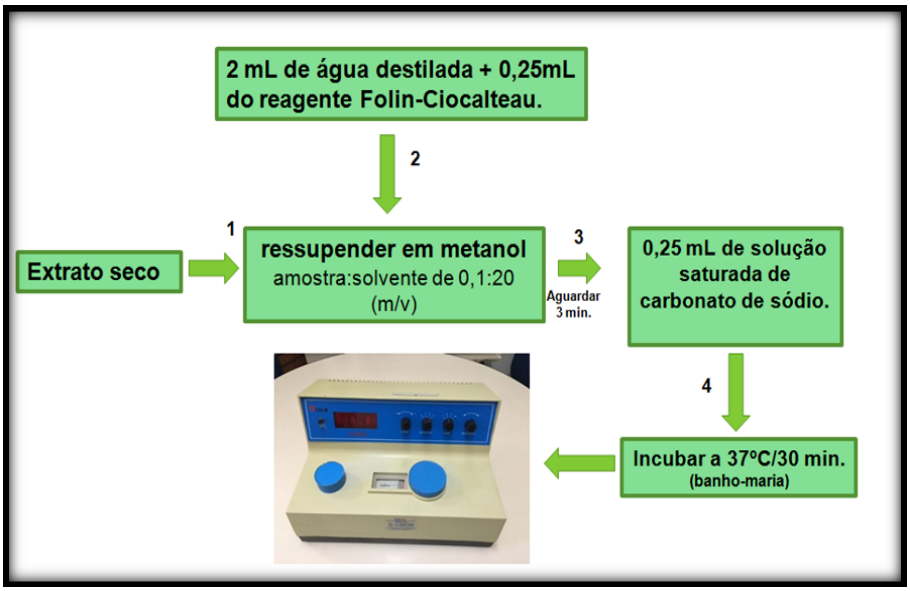


Figura 23. Determinação de compostos fenólicos totais.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva padrão construída com concentrações que variam de 5 a 100 µg/mL (GENOVESE, 2003).

2.4 Análises fitoquímicas por espectrometria de massas

A fração aquosa de *Bauhinia forficata* foi seca em fluxo de nitrogênio, ressuspensa em metanol 50% e logo após purificada por uma combinação de filtragens sucessivas em filtro 0,45µm e 0,20 µm (Millipore) e centrifugação (1800 r.p.m., 10 minutos).

Subsequentemente, 2µL do sobrenadante das amostras foram secas e ressuspensas em 1 mL de substância de metanol/formiato de amônio 100mM/H_2O (1,6: 0,1: 0,3; v/v/v) e posteriormente analisadas pelo método espectrometria de massa em equipamento Varian 310-MS.

Estas análises foram realizadas em modo positivo e negativo com tensão de agulha variável dependente do composto de interesse. O intervalo de varredura para aquisição das massas totais variou de 50-2000 *m/z*. Cada fragmentação de íons em MS2 foi otimizada em relação à energia do capilar e

de colisão com a finalidade de reduzir as variações na abundância relativa de íons devido a diferenças nas taxas de dissociação, todos os experimentos de dissociação foram realizados usando 2mTorr de Argônio.

Diversos componentes da fração aquosa foram identificados pelos seus respectivos espectros de massas, através da identificação do íon precursor e íons provenientes de fragmentação e comparados por paridade com dados de espectrometria de massas já existentes, e descritos através da literatura de moléculas (FERRERES et al., 2012; FARIAS; MENDEZ, 2014).

2.5 Análises ecotoxicológicas

Foram realizados testes de toxicidade para avaliação de efeito crônico e efeito agudo com *Echinometra lucunter* e *Daphnia similis,* respectivamente.

Considerando a utilização etnofarmacológica *de Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* como antiulcerogênicos, foram realizadas análises ecotoxicológicas comparativas dos extratos vegetais com os seguintes fármacos: Amoxicilina, Omeprazol e Lanzoprazol.

2.5.1 Ensaio de toxicidade crônica

Os procedimentos foram realizados de acordo com a norma ABNT/NBR 15350/2012, que estabelece parâmetros para a execução dos testes de toxicidade crônica em ouriço-do-mar.

Os exemplares de *Echinometra lucunter* utilizados nos testes deste trabalho, foram coletados através de mergulho livre, na Ilha das Palmas, situada no município do Guarujá, SP.

Após a coleta, os ouriços foram acondicionados em caixas térmicas, cobertos com algas *Ulvas sp.* e transportados para o laboratório. Em seguida, os organismos foram colocados em um tanque com água do mar coletada na própria Ilha das Palmas e mantida sob aeração até a realização dos testes (FIGURA 24). Vale ressaltar que, antes de introduzir os ouriços no tanque, é observado se não houve liberação de gametas no decorrer do transporte. Se houver a liberação, o indivíduo deve ser colocado em um tanque à parte, separado dos demais.

Figura 24. Tanque onde ficam alojados os ouriços.

As manutenções dos organismos e do tanque foram realizadas diariamente com a verificação de parâmetros físico-químicos como temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e pH, seguindo os critérios estabelecidos pela norma ABNT NBR 15350/2012.

2.5.1.1 Preparo da água de diluição

O preparo da água de diluição foi realizado de maneira que se assemelhe às condições naturais para *E. lucunter.* Esta foi preparada utilizando sal marinho comercial da marca Red Sea Salt® diluído em água processada e submetida a homogeneização com o auxílio do agitador magnético. A água de diluição deve possuir o pH entre 7,8 e 8,4, salinidade entre 30 e 37 e oxigênio dissolvido acima de 4,0 $mg.L^{-1}$. Após este procedimento, essa água foi filtrada em um sistema com porosidade de 0,45µm e aerada por um período mínimo de 24 horas para garantir a estabilização do pH e solubilização completa dos sais e, assim, reproduzir as condições ideais do organismo-teste. Essa água foi utilizada para a dissolução dos fármacos, dos extratos a serem avaliados e também para o controle. O controle e cada amostra (cada qual com suas concentrações respectivas) são acomodadas e identificadas na grade, em tubos de ensaio em ordem crescente. O tubo-controle continha somente a água reconstituída e o organismo, enquanto os demais tubos continham suas concentrações respectivas com q.s.p. 10 mL dessa mesma água.

2.5.1.2 Estimulação e liberação dos gametas

Os ouriços-do-mar foram lavados previamente com a própria água de diluição, a fim de retirar impurezas que poderiam vir a interferir nos testes.

Estes foram estimulados por injeção de 2,5 mL de KCl (cloreto de potássio) (0,5M) na parte perioral em dois pontos opostos. Foi necessário agitar levemente o organismo para que o KCl se distribua por toda a cavidade celômica. Após esta estimulação, os gametas foram liberados por meio dos gonóporos, situados na região aboral do ouriço.

Os gametas masculinos (espermatozoides) foram liberados e recolhidos com uma Pipeta de Pasteur e colocados em um béquer, dentro de uma placa de petri com gelo ao redor com a finalidade de evitar a desnaturação proteica. Os espermatozoides possuem aspecto visco-elástico e esbranquiçado (FIGURA 25).

Figura 25. Liberação de gameta masculino.

Os gametas femininos (ovócitos) foram liberados e coletados em um béquer com diâmetro menor que o diâmetro do ouriço, para que a região aboral ficasse voltada para baixo e, assim, para que os gonóporos ficassem em contato com a água reconstituída (FIGURA 26).

Figura 26. Coleta de gameta feminino.

Posteriormente, aguardou-se a sedimentação dos ovócitos, desprezou o sobrenadante e filtrou-se em uma malha de 350 µm, com a finalidade de retirar impurezas. O volume foi elevado para 600 mL, aguardado a sedimentação e repetiu-se o processo de lavagem totalizando três vezes. Os ovócitos possuem característica viscosa e alaranjada (FIGURA 27).

Figura 27. Liberação de gameta feminino.

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi retirado uma alíquota dos ovócitos e observado ao microscópio se estes estavam arrendondados, lisos e de tamanho uniforme, para garantir que não estivessem envelhecidos e então preservar a qualidade do ensaio.

2.5.1.3 Fecundação

Para realizar a fecundação, acrecentou-se de 1mL a 2mL de solução

espermática ao recipiente preparado contendo 400mL de solução de ovócitos, aguardou 5 minutos sob leve agitação para obter a solução contendo os ovos.

Com o objetivo de realizar o cálculo da porcentagem de fertilização, foi necessário homogeneizar e coletar três alíquotas de 10 µL para a contagem do número de ovos através da identificação da membrana de fecundação ao seu redor, devendo haver um mínimo de 80% da taxa de fecundação. A partir da média das três alíquotas, foi possível calcular a quantidade aproximada de 500 embriões em um volume máximo de 100 µL necessário para o experimento.

Caso não haja quantidade suficiente, acrecentar mais solução espermática e realizar novo procedimento de contagem após 5 minutos. Se mesmo assim não atingir a quantidade de 80%, o lote de gametas deve ser descartado.

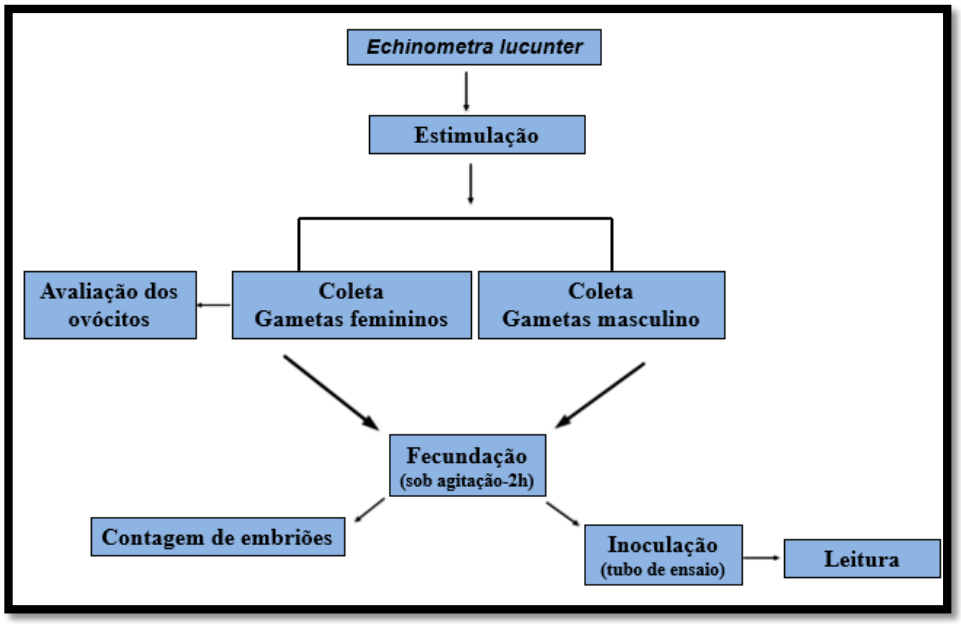
Agitou-se por 2 horas. Após, inoculou-se os embriões nos tubos de ensaio já previamente preparados e aclimatados (FLUXOGRAMA 4), em suas respectivas concentrações:

- Omeprazol e Lansoprazol: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 $mg.L^{-1}$;

- Amoxicilina: 2000; 1000; 500; 250; 125 $mg.L^{-1}$;

- *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* (endosperma sólido e mesocarpo): 100; 50; 25; 12,5; 6,25 $mg.L^{-1}$ - a partir da fração aquosa seca e do extrato aquoso bruto seco, respectivamente.

A grade com teste pronto foi mantida em câmara de germinação e fotoperíodo por 36 horas e na temperatura entre 24ºC a 28ºC, após este período, foi verificado se houve, no mínimo, 80% de larvas em estágio *pluteus* nos tubos controle. Isso ocorre realizando a leitura dos 100 primeiros organismos. Caso não tenha atingido o desenvolvimento satisfatório, realiza-se nova análise após 1 hora e assim por diante até atingir o prazo máximo de 42 horas. Estando satisfatório, o ensaio é encerrado sendo fixado com 0,5 mL de formol tamponado. Após este procedimento, o teste está liberado para a leitura.



Fluxograma 4. Ensaio crônico ecotoxicológico.

2.5.1.4 Leitura e interpretação dos resultados

A análise dos resultados foi feita por microscopia em objetiva de 40x, em microscópio Meiji®, com o auxílio da câmara de Sedgwick-Rafter para a análise do estágio larval dos 100 primeiros indivíduos contados em cada réplica. Os estágios anormais são aqueles anteriores ao estágio de desenvolvimento da larva *pluteus* (ovo, mórula, blástula e gástrula) ou até mesmo larvas *pluteus* com atraso em seu desenvolvimento com relação ao controle. A leitura se iniciou pelo controle.

O ensaio é válido quando, ao término, 80% das larvas atingem o estágio *pluteus* bem desenvolvidos nos tubos controle.

Os resultados apresentados em todas as réplicas dos testes foram anotados, a fim de encontrar os valores de toxicidade seguindo o protocolo da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2002) e para todos os testes foram calculados a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

As concentrações que causaram inibição no desenvolvimento embrio-larval de *E. lucunter* em 50% dos organismos, CI_{50} (concentração inibitória média), e os intervalos de confiança foram obtidas através do método de Interpolação Linear (USEPA, 1988), através do software The Inhibition Concentration (ICp) (Versão 2.0).

2.5.2 Ensaio de toxicidade aguda

Os procedimentos foram realizados de acordo com a norma ABNT/NBR 12713/2016, que estabelece parâmetros para a execução dos testes de toxicidade aguda em *Daphnia* sp.

O teste foi feito com a água reconstituída em laboratório que se assemelha as suas condições naturais de vida. A água foi utilizada para o cultivo dessas, bem como para a realização dos testes. Deve ter a dureza entre 40 e 48 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$ e o pH entre 7,0 a 7,6. Isto se aplicou tanto para o controle quanto para diluição dos fármacos e extratos a serem avaliados. O controle e cada amostra (cada qual com suas concentrações respectivas) foram:

- Omeprazol e Lansoprazol: 1000; 500; 250; 125; 62,5 $mg.L^{-1}$;

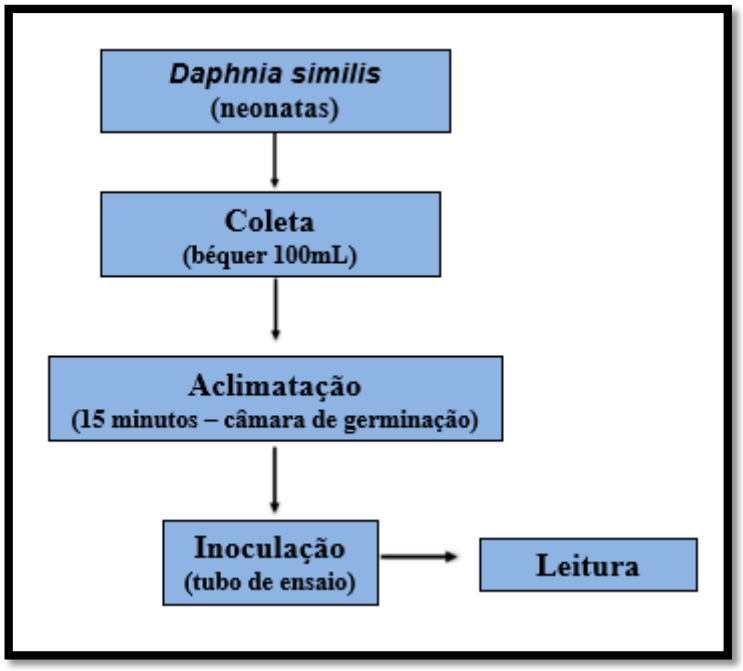
- Amoxicilina: 2000; 1000; 500; 250; 125 $mg.L^{-1}$;

- *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* (endosperma sólido): 1600; 800; 400; 200 $mg.L^{-1}$ - a partir do da fração aquosa seca.

- *Cocos nucifera* (mesocarpo): 400; 200; 100; 50 $mg.L^{-1}$ – a partir do extrato aquoso bruto seco.

As amostras foram acomodadas e identificadas na grade, em tubos de ensaio e em ordem crescente. O tubo-controle continha somente a água preparada, enquanto os demais tubos continham suas concentrações respectivas com q.s.p. 10 mL. Logo após o preparo dos tubos, a grade foi para a câmara para aclimatação, evitando assim, que as neonatas ficassem estressadas com a diferença de temperatura e que isto interferisse na qualidade do ensaio.

Após 15 minutos, foram inoculadas cinco neonatas em cada tubo com o auxílio da pipeta de Pasteur e lâmpada fluorescente. As neonatas devem possuir idade entre 6 e 24h. Após este processo, transferiu-se as grades para a câmara de germinação, que possui temperatura controlada em aproximadamente 20ºC ± 2ºC (FLUXOGRAMA 5). Após 48 horas, a grade foi retirada e contra a luz fluorescente é avaliada a mortalidade ou imobilidade das neonatas submetidas ao teste. Esta leitura se realiza a olho nu.



Fluxograma 4. Ensaio agudo ecotoxicológico.

Com a finalidade de calcular os valores de CE_{50} (concentração efetiva mediana) para os testes com *D. similis*, utilizou-se o método estatístico Trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al*., 1977), através da utilização do *Software* Trimmed Spearman-Karber (versão 1.5), o qual tem capacidade de calcular o valor pontual e preciso da CE_{50} e os intervalos de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises fitoquímicas preliminares

3.1.1 Análises de taninos

Os resultados dos testes para a identificação de taninos, tanto da FrAq de *Bauhinia forficata*, quanto do extrato aquoso bruto do mesocarpo e endosperma sólido de *Cocos nucifera*, apresentaram o mesmo perfil fitoquímico para esta classe, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4 - Resultado das reações para taninos presentes na FrAq de *B. forficata* e nos extratos brutos do mesocarpo e endosperma sólido de *C. nucifera*.

	Sais de chumbo	Sais de ferro	Acetato de chumbo
B. forficata	(+)	(+)	(-)
C. nucifera **(mesocarpo)**	(+)	(+)	(-)
C. nucifera **(endosperma sólido)**	(+)	(+)	(-)

Legenda: (+) indica a presença de taninos; (-) indica a ausência de taninos.

Pela sua estrutura fenólica, a conformação dos taninos garante grande reatividade química devido à formação de pontes de hidrogênio intra e intermolecular. Dessarte, apenas um mol de taninos interage com doze moles de proteínas, o que assegura a possibilidade destes de serem identificados por precipitação. E, por serem altamente oxidáveis, ocorre o escurecimento da solução teste quando influenciado pela presença de metais (MONTEIRO et al., 2005). Observa-se este fenômeno nos testes realizados para a FrAq de *Bauhinia forficata* (FIGURA 28), para o extrato aquoso bruto do mesocarpo (FIGURA 29) e do endosperma sólido (FIGURA 30) de *Cocos nucifera*.

Para os três compostos, as reações com sais de chumbo apresentaram um precipitado denso indicando a presença de taninos. Em concordância, as reações com sais de ferro também deram resultado positivo com coloração esverdeada, sendo indicativo da presença de taninos do tipo condensados e resultado negativo para a reação de acetato de chumbo (e ácido acético) confirmando a ausência de galhotaninos (COSTA, 2002).

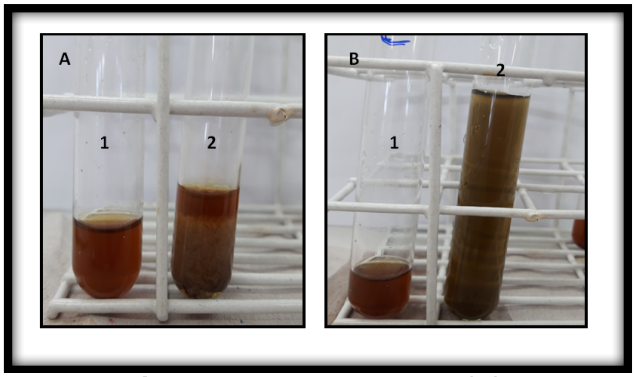


Figura 28. Resultados das análises de sais de chumbo (A) e sais de ferro (B) (FrAq – *B. forficata*) Painel A, tubo 1 – controle; tubo 2 – resultado positivo para o teste com sais de chumbo (formação de precipitado – presença de tanino). Painel B, tubo 1 – controle; tubo 2 - resultado positivo para o teste com sais de ferro (coloração esverdeada – tanino condensado).

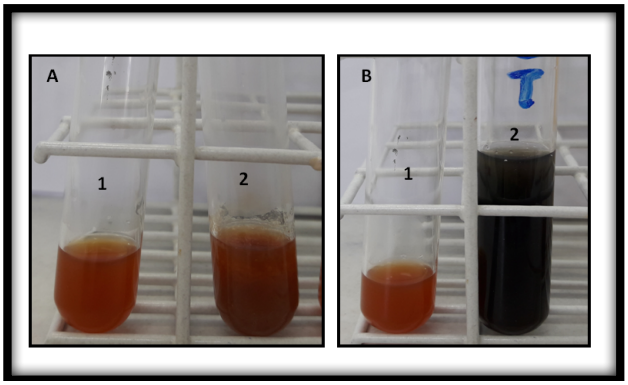


Figura 29. Resultados das análises de sais de chumbo (A) e sais de ferro (B) (mesocarpo – *C. nucifera*) Painel A, tubo 1 – controle; tubo 2 – resultado positivo para o teste com sais de chumbo (formação de precipitado - presença de tanino). Painel B, tubo 1 – controle; tubo 2 - resultado positivo para o teste com sais de ferro (coloração esverdeada – tanino condensado).

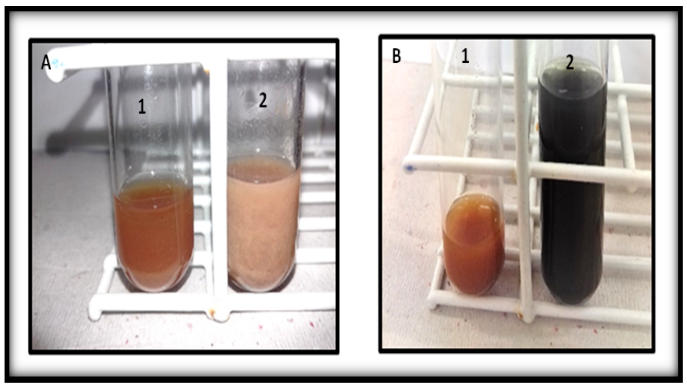


Figura 30. Resultados das análises de sais de chumbo (A) e sais de ferro (B) (endosperma sólido – *C. nucifera*) Painel A, tubo 1 – controle; tubo 2 – resultado positivo para o teste com sais de chumbo (formação de precipitado - presença de tanino). Painel B, tubo 1 – controle; tubo 2 - resultado positivo para o teste com sais de ferro (coloração esverdeada – tanino condensado).

Um estudo correlaciona atividades analgésicas e a eliminação de radicais livres com o extrato aquoso da fibra do coco. Neste caso, os testes foram *in vivo* e *in vitro.* O extrato aquoso de *Cocos nucifera* foi administrado via oral nas dosagens de 200 e 400 mg/kg, reduzindo a resposta de contorção que foi promovida pela administração de ácido acético. No mesmo estudo, o ensaio de "tail flick" e "hot plate" mostraram que 200 mg/kg do mesmo extrato induziu a redução na resposta frente ao estimulo de calor. A analgesia central também foi avaliada e revertida pela naloxona, sendo indicativo que a analgesia promovida pelo extrato é mediada por receptores opióides. Ensaios fotométricos de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato (DPPH) também foram realizados e mostrou-se que este extrato também possui ação antioxidante (ALVIANO et al., 2004). Em situação de injúria gástrica, ocorre a formação do prostanóide do tipo PGE_2

responsável por estimular os nociceptores aumentando a algesia presente em processos inflamatórios. Assim nota-se a importância do extrato do coco no tratamento de doenças gástricas, além de promover a ação antioxidante largamente mencionada neste trabalho.

O coco possui ácido graxo de cadeia média em abundância (65%) e dentre eles pode-se destacar o ácido láurico que é responsável por 50% do teor gorduroso do coco. Estes ácidos graxos e suas derivações, possuem papel importante na eliminação das bactérias através da desintegração da membrana lipídica bacteriana, assim, sendo eficaz contra ulceras ocasionadas pela presença da *H. pylori* (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). Também justificando o uso popular.

As atividades biológicas dos taninos estão relacionadas, especialmente, com suas características adstringentes. Através do uso interno, possuem atividades como antidiarréico e antisséptico por possuírem capacidade de precipitação de proteínas, garantindo assim seu efeito bactericida e antifúngico e através do uso externo, protegem as camadas mais expostas da pele e mucosas lesionadas, graças a sua propriedade de se complexar tanino com proteína ou com polissacarídeos, auxiliando o processo de cura de forma natural (MONTEIRO et al., 2005). Sendo assim, a presença de taninos poderia justificar a indicação popular da planta no tratamento de úlceras.

Em outro estudo, o extrato aquoso bruto reduziu o tempo que os animais levaram lambendo as patas com formalina e reduziu também a resposta inflamatória, inibindo a migração celular, extravazamento de proteínas e a produção de TNF-a. Já *in vitro*, o extrato foi um potente antioxidante e foi efetivo contra *S. Aureus* e MRSA. O extrato atuou de forma sinérgica com a meticilina e teve resultado indiferente quando combinado com vancomicina, abrindo espaço para nova terapêutica (SILVA et al., 2013).

3.1.2 Análises de flavonoides

Nos testes para a identificação de flavonoides, a FrAq de *Bauhinia forficata*, o extrato aquoso bruto do mesocarpo e do endosperma sólido de *Cocos nucifera*, apresentaram perfil fitoquímico distinto para esta classe, como se pode observar na tabela 5.

Tabela 5. Resultado das reações para flavonoides presentes na FrAq de *B. forficata* e nos extratos brutos do mesocarpo e endosperma sólido de *C. nucifera.*

	Shinoda	Hidróxido de sódio	Cloreto férrico
B. forficata	(-)	(-)	(+)
***C. nucifera* (mesocarpo)**	(i)	(+)	(+)
***C. nucifera* (endosperma sólido)**	(-)	(i)	(+)

Legenda: (+) indica a presença de flavonoide; (-) indica a ausência de flavonoide; (i) indica resultado inconclusivo.

Na investigação de flavonoides para *Bauhinia forficata*, somente a reação de cloreto férrico apresentou resultado positivo, evidenciando coloração esverdeada, como se pode observar na figura 31:

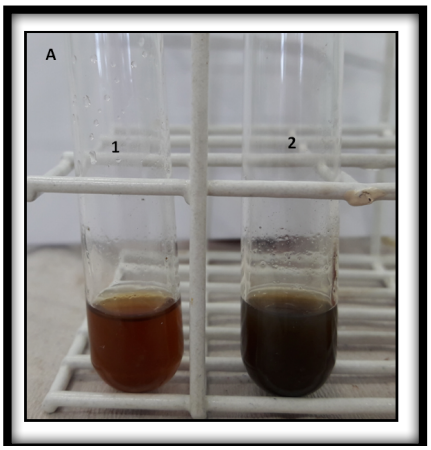


Figura 31. Resultados das análises de cloreto férrico (A) (FrAq – *B. forficata*) Painel A, tubo 1 – controle; tubo 2 – resultado positivo para o teste com cloreto férrico (coloração esverdeada).

A coloração esverdeada obtida através da reação com cloreto férrico, associada aos resultados negativos para os testes de Shinoda e hidróxido de sódio, são indicativos da presença de isoflavona. Contudo, o cloreto férrico também identifica taninos e levando em consideração a extração fracionada, realizada para as folhas *Bauhinia forficata,* torna-se difícil cravar o resultado como isoflavona, sendo apenas um indicativo.

Já na pesquisa de flavonoides da porção do mesocarpo, a reação com hidróxido de sódio apresentou-se positiva, podendo-se observar o desenvolvimento da coloração amarelada e na reação com cloreto férrico, se verifica a coloração verde-castanho (FIGURA 32) também apresentando

resultado positivo.

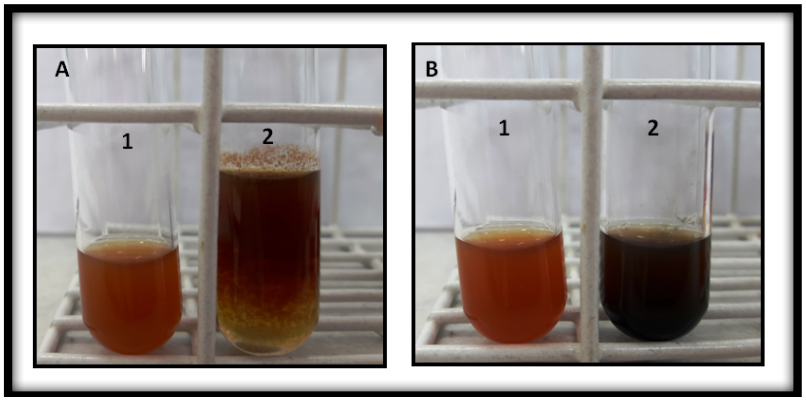


Figura 32. Resultados das análises de hidróxido de sódio (A) e cloreto férrico (B) (mesocarpo - *C. nucifera*) Painel A, tubo 1 – controle; tubo 2 – resultado positivo para o teste com hidróxido de sódio (cor amarela – presença de chalconas). Painel B, tubo 1 – controle; tubo 2 - resultado positivo para o teste com cloreto férrico (verde-castanho).

A coloração amarela é indicativa da presença de flavonoide dos tipos chalconas.

Na pesquisa também de flavonoides, porém do endosperma sólido, a única reação que apresentou resultado positivo foi a de cloreto férrico, evidenciada pela coloração verde-castanho (FIGURA 33).

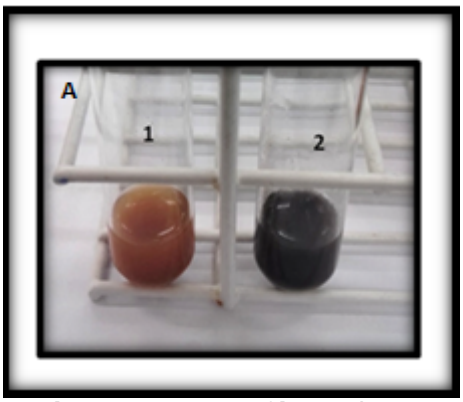


Figura 33. Resultados das análises de cloreto férrico (endosperma sólido - *C. nucifera*) Tubo 1 – controle; tubo 2 - resultado positivo para o teste com cloreto férrico (verde-castanho).

A coloração verde-castanho resultado das reações de cloreto férrico, presente nas duas porções de *Cocos nucifera*, sugere a presença de compostos fenólicos gerais. Isto inclui a classe dos taninos, já discutido anteriormente, tornando difícil sua identificação através desta metodologia. Segundo Simões (2010), solventes com maior polaridade como a água extraem de forma eficiente agliconas poli-hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares, auronas e

chalconas.

Os resultados inconclusivos para os testes de Shinoda (mesocarpo) e hidróxido de sódio (endosperma sólido) se deu pelo fato do próprio composto a ser testado já apresentar forte coloração, ficando difícil a identificação através dos métodos colorimétricos.

Em estudo realizado com *Bauhinia forficata* coletadas em duas diferentes cidades, com a fração metanólica e pelo método de cromatografia em camada delgada, foram detectadas a presença de flavonoides e de taninos condensados (leucoantocianidinas), coincidindo com os dados obtidos no presente estudo (MARQUES et al., 2012).

Já no estudo de caracterização de *Bauhinia forficata* também foram encontrados compostos do tipo tanino e flavonoide (MIYAKE; AKISUE; AKISUE, 1986). Compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados também foram encontrados em outro estudo com *Bauhinia forficata* (MICELI et al., 2015). Esquenazi et al. (2002) analisaram o extrato da fibra do coco e identificaram os compostos catequinas e epicatequinas, sendo estes considerados como taninos condensados, consoante aos resultados obtidos neste trabalho.

No estudo realizado por Lima et al., (2015) foram realizadas análises fitoquímicas do extrato etanólico do mesocarpo que apresentaram fenóis, taninos, leucoantocianidinas e flavonoides, também em acordo com este trabalho. Obidoa et al., (2009) realizaram um estudo com a identificação de compostos químicos do endosperma de *Cocos nucifera* e encontraram a presença de taninos com a extração realizada utilizando solvente polar e apolar. Contudo, não encontraram flavonoides em nenhuma destas frações.

3.2 Dosagem de compostos fenólicos totais

Os resultados obtidos nas análises de compostos fenólicos totais para os extratos e fração estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Quantidade de fenólicos totais presentes na FrAq de *B. forficata* e no extrato bruto do mesocarpo e do endosperma sólido de *C. nucifera*.

	Compostos fenólicos totais (mg/g)
B. forficata	9,39
C. nucifera **(mesocarpo)**	22,49
C. nucifera **(endosperma sólido)**	16,52

As quantidades de compostos fenólicos apresentaram determinada discrepância e isso pode ser atribuído, primordialmente, por se tratar de plantas de espécies diferentes. Este fato por si só já caracteriza um perfil químico diferenciado. Entretanto, o método de extração distinto também pode ter contribuído para isto. Enquanto as folhas de *Bauhinia forficata* foram submetidas aos testes após a extração fracionada, as porções do mesocarpo e endosperma sólido foram submetidas aos testes após a obtenção do extrato bruto.

A extração fracionada, como supracitada, foi feita na seguinte ordem: hexano, clorofórmio, n-butanol e água. A fração majoritária para a extração de flavonoides é a n-butanólica, contudo, a fração utilizada foi a aquosa, subsequente a n-butanólica. Tal fato pode explicar a quantidade de compostos fenólicos totais reduzidos de *Bauhinia forficata* em comparação aos extratos brutos com *Cocos nucifera*.

3.3 Análise em espectrometria de massas (MS)

Com o objetivo de compreender as atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides da FrAq de *Bauhinia forficata*, além das análises fitoquímicas preliminares, também foram realizadas análises por espectrometria de massas. Assim, é possível que haja maior lucidez na sugestão de quais moléculas possam exercer ação biológica e assim correlacionar com o uso tradicional.

3.3.1 Análises da FrAq de *Bauhinia forficata* por MS

Os componentes identificados na FrAq de *Bauhinia forficata* estão listados na tabela 7.

Tabela 7 - Compostos identificados na FrAq de *B. forficata.*

Componentes	$[M-H]^+$, *m/z*
Quercetina-3-O-ramnosídeo	449,0
Quercetina-3,7-O- diramnosídeo	594,8

Em um estudo realizado com extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* através do método de HPLC-DAD-ESI/MS, foram encontrados 13 compostos pertencentes à classe dos flavonoides. O aparecimento no MS^2 e/ou no MS^3 na forma desprotonada das agliconas em *m/z* 284/285 e 300/301 são indicativos que tais compostos sejam derivados do kaempferol-3-O- e quercetina-3-O- (FIGURA 34) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970 apud FERRERES, 2012).

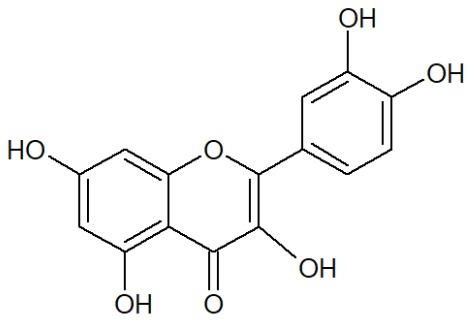


Figura 34. Núcleo quercetina (aglicona) ($C_{15}H_{10}O7$ - 302u).
Fonte: Chemspider (2018)

Estas análises revelaram a presença de flavonoides na FrAq estudada, em especial a quercetina como núcleos de agliconas, corroborando com os resultados encontrados por Pizzolatti et al. (2003).

Os compostos encontrados nas análises de espectrometria de massas foram a Quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) (FIGURA 35) e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo (FIGURA 36) apresentando o seguinte padrão de clivagem (FIGURAS 37 e 38) nas energias aplicadas (5V e 15V) e analisadas por ESI-MS em modo positivo.

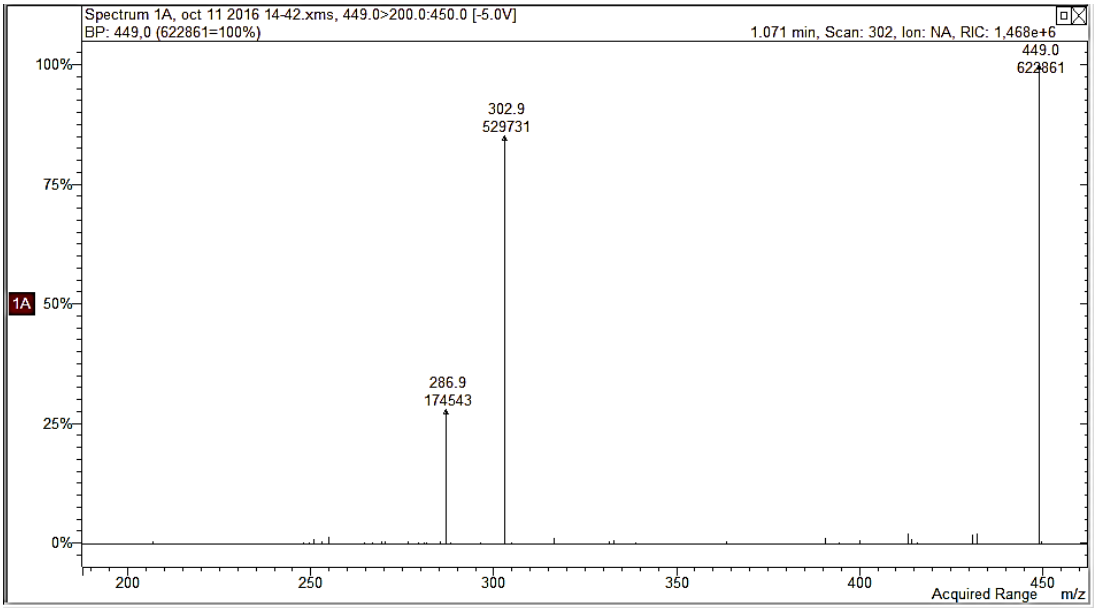


Figura 35. Molécula identificada como Quercetina-3-O-ramnosídeo apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 449,0 *m/z*. O fragmento de *m/z* 302,9 sugere a perda do resíduo de ramnosil (146u). O fragmento de *m/z* 302,9 indica a presença da quercetina como núcleo flavonoide (aglicona), conforme mencionado anteriormente por Ferreres et al. (2012), e o fragmento de 286,9 surge a partir da perda de 16 u.m.a. (ânion do oxigênio atômico (O−)) a partir da molécula da quercetina, conforme Scigelova et al. (2011).

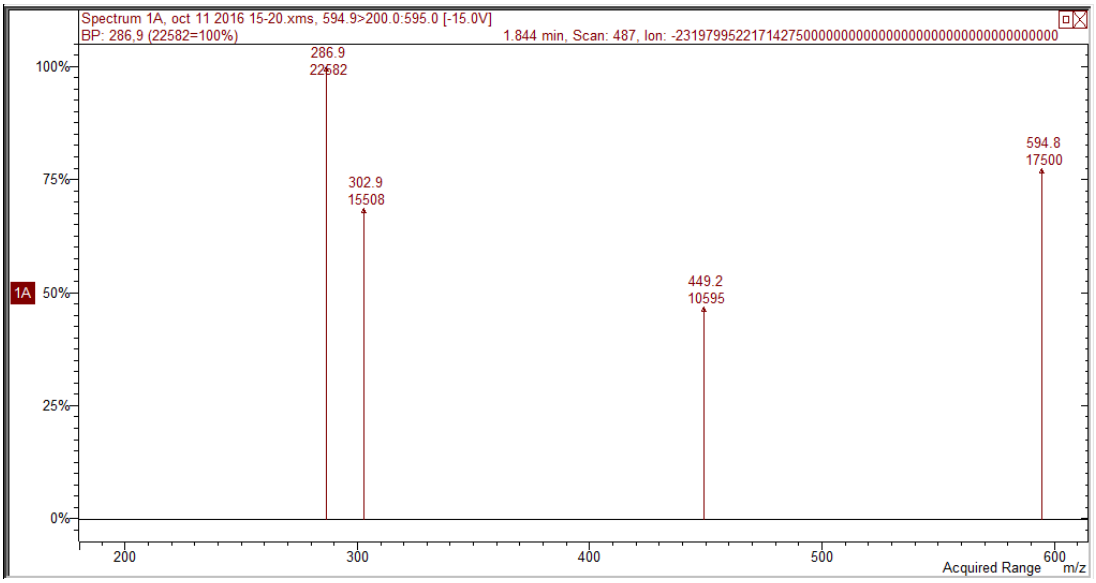


Figura 36. Molécula identificada como Quercetina-3,7-O- diramnosídeo apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 594,8 *m/z*. O fragmento de 449,2 sugere a perda de um resíduo ramnosil (146 u.m.a). O fragmento de *m/z* 302,9 sugere a perda do segundo resíduo de ramnosil (146u). O fragmento de *m/z* 302,9 indica a presença da quercetina como núcleo flavonoide (aglicona), conforme mencionado anteriormente por Ferreres et al. (2012), e o fragmento de 286,9 surge a partir da perda de 16 u.m.a. (ânion do oxigênio atômico (O−)) a partir da molécula da quercetina, conforme Scigelova et al. (2011).

A identificação destas moléculas foi baseada no fragmento residual de *m/z* 302,9 da quercetina (aglicona), como supracitado e também é evidenciado o resíduo ramnosil (146u).

Miceli et al. (2015) realizaram um estudo com *Bauhinia forficata* com acetato de etila, onde também encontrou Quercetina-3-O-ramnosídeo nas análises realizadas em HPLC-PDA-ESI-MS em modo negativo.

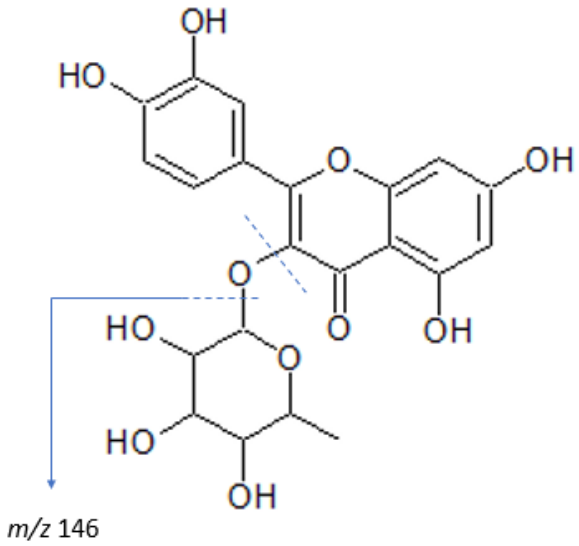


Figura 37. Quercetina-3-O-ramnosídeo.

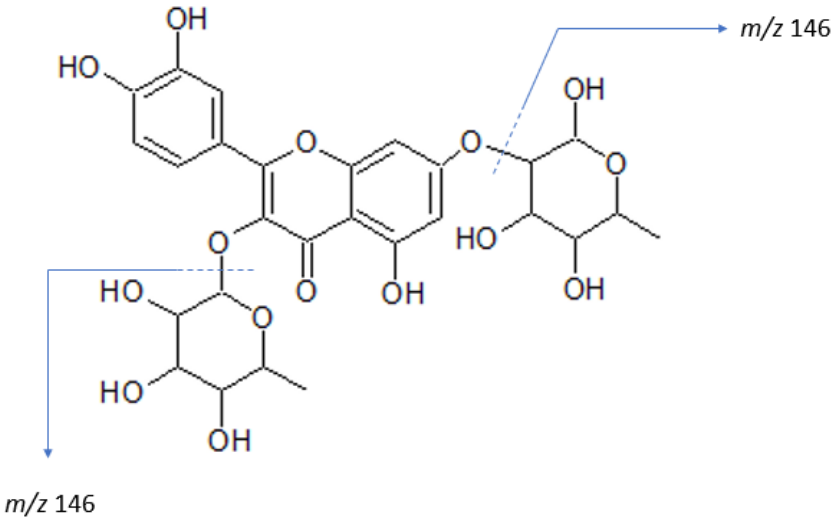


Figura 38. Quercetina-3,7-diramnosídeo.

Segundo a Embrapa (2010), *Bauhinia forficata* contém compostos como os flavonoides (kaempferol, rutina e quercetina) e taninos, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Pizzolatti et al., (2003), em um estudo realizado com as folhas de *Bauhinia forficata* com a finalidade de descrever o isolamento e identificação de kaempferol e de mais cinco compostos glicosilados, também encontrou compostos que possuem kaempferol e quercetina como agliconas.

Outro estudo que atribui as características químicas à *Bauhinia forficata,* identifica compostos glicosídicos contendo agliconas de quercetina também em sintonia com os resultados aqui presentes (SALGUEIRO et al., 2013).

Flavonoides como a quercetina e o kaempferol são compostos pertencentes à classe dos flavonoides tipo flavonóis. Esta tem grande peso quanto a ação anti-inflamatória, pois possui a capacidade de inibição da enzima PLA2, lipoxigenase, COX e reduz a síntese de óxido nítrico por modular a enzima NO sintetase (iNOS). No que pertine acerca da ação de redução da liberação de citocinas, encontra-se também os flavonóis mircetina, quercetina, rutina e as flavonas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Como supramencionado, os radicais livres são altamente reativos e ávidos por elétrons, pois se encontram instáveis e desemparelhados. A ação antioxidante dos flavonoides se dá pelo fato desta classe ser doadoras de elétrons, estabilizando estes compostos. A composição dos flavonoides é rica em hidroxilas que reagem e inativam os ânions superóxidos e radicais de peróxido de lipídios (MACHADO et al., 2008).

Inicialmente a quercetina foi classificada como vitamina P e foi comprovada a sua ação na manutenção da resistência e integridade dos capilares. (ALVES et al., 2010; SIMÕES et al., 2010).

Porém, López-Posadas et al. (2008) mostraram em seu trabalho que, em condições normais, as enzimas iNOS e COX-2 não foram alteradas quando submetidas a exposição com flavonoides. Quando estimuladas as células dos esplenócitos de ratos com concavalina, houve aumento de ambas enzimas. Quando testada, a quercetina impediu totalmente a indução de iNOS e reduziu a COX-2. Já quando se compara isoramnetina com a quercetina, sobre as atividades das mesmas enzimas, notou-se que a aglicona possui um efeito muito maior de inibição do que a versão glicosilada. Isso se deve, provavelmente, as características mais lipofílicas das agliconas.

É de suma importância salientar que, em condições fisiológicas normais, os prostanóides possuem função de proteção gástrica e que é necessário avaliar

a especificidade enzimática.

Já Friesenecker, Tsai, Intagliatta, (1995) afirmam que flavonoides como a quercetina também podem diminuir a ativação do sistema complemento, reduzindo então a adesão ao endotélio de células inflamatórias, diminuindo assim esta resposta.

Em um estudo que avaliou os efeitos da quercetina no estômago, notou-se que esta na dose de 200 mg/kg, teve atividade protetora e também reduziu o índice de úlcera e tendo aumento dos níveis de muco e glicoproteína (LA LASTRA; MARTIN; MOTILVA, 1994).

Neste mesmo estudo, o autor sugere que a quercetina possui função de citoproteção através da estimulação de prostaglandina, inibição da síntese de leucotrienos (favorece o aumento da permeabilidade vascular), estimulação da secreção de muco e que ainda possui atividades antioxidantes.

Modulando a prostaglandina e COX e reduzindo a lipoxigenase, há uma redução na formação de prostanóides e consequentemente da inflamação. Inibindo a iNOS ocorre menor permeabilidade capilar e com isso menor migração leucocitária ao local inflamado. A redução das citocinas significa menor recrutamento de células pró-inflamatórias. Com a ação antioxidante e a capacidade da quercetina de manter a integridade vascular, colabora e muito, para a manutenção de um tecido gástrico saudável.

A Kaempferitrina é considerada um bom marcador químico para esta espécie, uma vez que só é encontrada nas folhas de *Bauhinia forficata* (ENGEL et al., 2008). Contudo, esta não foi encontrada neste estudo.

Tal fato pode ser atribuído pelo processo extrativo administrado, onde a fração n-butanólica seria a mais eficiente para extrair flavonoides (REY, 2016). Porém, neste estudo, foi realizada a extração fracionada e utilizada a fração aquosa, com isso é importante considerar que, no caso de métodos extrativos, a extração fracionada utilizando a fração aquosa não seria a mais indicada para a extração de flavonoides, tendo quantidades significativamente reduzidas.

Se tratando de um estudo com o chá das folhas de *Bauhinia forficata* (infusão das folhas em água quente) se atribuiu os benefícios oferecidos a esta planta aos altos índices de polifenóis e flavonoides. Também foi mostrado que o chá resultou em atividade de quelação do Fe^{+2} de forma bem significativa e, além disso, o chá ainda mostrou atividade de eliminação de DPPH (SALGUEIRO et

al., 2013).

O ferro desempenha uma função crucial na formação de ERO. O mecanismo de quelação do Fe^{+2} possui papel fundamental, pois assim reduz a sua disponibilidade para reagir com H_2O_2, reduzindo então, a formação de radicais hidroxilos, que são altamente reativos e induzem a sérios danos a nível molecular (FIGURA 39). A diminuição deste mecanismo pode ser entendida como ação antioxidante (SALGUEIRO et al., 2013; SAKANAKA; TACHIBANA; OKADA, 2005).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$

Figura 39. Formação de radicais hidroxilos
Fonte: NOGUEIRA et al., 2007.

Já em outro estudo com *Bauhinia forficata*, não houve relação entre a quelação de metais com fenóis e flavonoides encontrados. Dessarte supõe-se que os flavonoides não sejam os responsáveis pelas ações antioxidantes do extrato bruto e sim outras classes de metabólitos que formam o fitocomplexo (MICELI et al., 2015).

Em uma pesquisa feita com a fração n-butanólica de *Bauhinia forficata*, a atividade antiulcerogênica foi evidenciada além da atividade antioxidante. Isso se deu pelo aumento de enzimas antioxidantes, redução da peroxidação lipídica e dos níveis de mieloperoxidase (MPO) que são naturalmente encontrados em processos ulcerosos (REY, 2016).

A divergência quanto a ação antioxidante dos dois estudos pode ser atribuída aos métodos extrativos. Embora os solventes utilizados por Miceli (acetato de etila) e por Rey (n-butanol), sejam majoritários para a obtenção de compostos da classe dos flavonoides, a metodologia tanto de extração quanto do teste de antioxidante de ambos foi distinta.

Em outro trabalho, ratas fêmeas foram induzidas a diabetes por streptozotocin e tiveram a redução da atividade de superóxido dismutase (SOD). Tal fato pode ser atribuído pela hipoinsulinemia, que aumenta a oxidação de gordura com a finalidade de obtenção energética. Contudo, este processo gera H_2O_2 que é responsável por inativar a SOD. Quando submetidas ao tratamento com o extrato de *Bauhinia forficata*, houve uma equiparação dos níveis de

glutationa na forma reduzida (GSH) para grupos diabéticos e não-diabéticos, mostrando assim, que o extrato possui ação efetiva para o aumento de GSH (VOLPATO et al., 2008). Mesmo que seja uma patologia diversa, o extrato se mostrou efetivo no aumento das enzimas antioxidantes em comum com o sistema gástrico.

Consoante a estes estudos, pode-se dizer que *Bauhinia forficata* é eficiente no tratamento de problemas gástricos, através de mecanismos antioxidantes e de modulação da cascata inflamatória.

3.4 Análises ecotoxicológicas

Quando o xenobiótico alcança o ambiente aquático, este possui uma distribuição complexa delimitada pela performance do composto no meio ambiente. Assim, leva-se em consideração as propriedades físico-químicas do composto, bem como sua concentração, além das características físico-químicas dos ecossistemas, para assim avaliar de forma adequada os efeitos à biota (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Segundo os mesmos autores, a absorção e a retenção de um determinado composto tóxico, podem levar a um aumento da concentração deste no indivíduo exposto, elevando o risco de causar efeitos deletérios ao organismo.

Neste ponto é necessário mencionar a importância da bioacumulação. Este termo trata da absorção do contaminante pelo organismo e se relaciona de forma direta com a natureza química e biodisponibilidade do composto (OLIVEIRA; MARTINEZ, 2011).

O processo de bioacumulação é dependente da biodisponibilidade do contaminante associado a processos cinéticos como a absorção e eliminação, característicos de cada espécie. A toxicidade é baseada na relação entre a exposição de um organismo, levando em consideração sua sensibilidade, frente a contaminantes biodisponíveis. Também pode estar relacionada a natureza lipídica do organismo e a competência em metabolizar um composto (USEPA, 2000).

Tratando fármacos como contaminantes de ambientes aquáticos, vários fatores devem ser considerados. Inicialmente deve-se levar em conta a polaridade, pois substâncias com polaridade elevada possuem maior facilidade

de se dissipar no meio hidrológico. Outro fator que deve ser levado em consideração é o coeficiente de partição n-octanol-água (Kow). Este dado traduz que quanto maior o valor de Kow, menor é a polaridade do fármaco, ou seja, mais lipossolúvel este é. Assim, se pode estimar a distribuição ambiental bem como a bioconcentração desses fármacos (PEDROZO; KUNO, 2008).

No decorrer das últimas décadas, se tem utilizado como parâmetro os valores de Kow para estimar o destino, comportamento e os efeitos dos compostos químicos nos ambientes aquáticos. O octanol é um solvente considerado modelo, pois é semelhante aos tecidos lipídicos dos organismos, assim, esse solvente é largamente utilizado para a partição de compostos químicos de meios aquosos para matrizes orgânicas (ECETOC, 2017).

Considerando os fatos apresentados sobre o Kow e sua influência sobre a toxicidade, foi elaborada uma tabela (Tabela 8), apresentando uma relação diretamente proporcional entre os valores de Kow e os dados de efeito sobre os organismos *E. lucunter* e *D. similis,* respectivamente.

Tabela 8 - Valores de CI_{50}, CE_{50} e Kow para *E. lucunter* e *D. similis*.

	CI_{50} ($mg.L^{-1}$)	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Kow
Amoxicilina	744,37	> 2000	0,97
B. forficata (Quercetina)	62,38	822,1	1,48
Endosperma sólido (Quercetina)	27,82	1057	1,48
Mesocarpo (Proantocianidina)	20,1	158,55	2,67
Omeprazol	10,36	341,21	2,23
Lanzoprazol	8,06	173,35	3,68

> que 2000 $mg.L^{-1}$: Não é possível observar efeito.

Quanto maior valor de Kow, menor valor de CI_{50}, ou seja, mais tóxico. Dos compostos apresentados, o Lanzoprazol lidera o ranking, sendo o que apresentou menor valor de CI_{50} e maior valor de Kow, o que remonta a importância deste parâmetro físico-químico para avaliar toxicidade ao meio ambiente através de estudos em organismos-teste.

Em consoante, a Amoxicilina apresenta menor valor de Kow, e com isso, maior valor de CI_{50}, sendo a que, supostamente, causaria menor efeito ao meio ambiente dentro dos compostos avaliados. *Bauhinia forficata* foi o composto natural que apresentou menor toxicidade e isso pode ser atribuído ao tipo de extração. Esta foi submetida a extração fracionada e assim, outros compostos

ficaram retidos em fases anteriores. Diferentemente, com *Cocos nucifera,* foi feito um extrato bruto, carreando maior parte de compostos como um todo.

Sendo largamente conceituada, a diretiva europeia 93/67 é utilizada para notificar e classificar compostos com potencial risco ambiental. Com resultados obtidos por pesquisas realizadas em laboratório, é possível traçar o perfil ecotoxicológico do composto de interesse. Estes resultados são expressos através da CI_{50} e CE_{50}, sendo assim, os compostos são classificados como extremamente tóxicos (CI_{50} e CE_{50} < 0,1 $mg.L^{-1}$); muito tóxicos (CI_{50} e CE_{50} entre 0,1 e1 $mg.L^{-1}$); tóxicos (CI_{50} e CE_{50} entre 1 e 10 $mg.L^{-1}$); nocivos (CI_{50} e CE_{50} entre 10 e 100 $mg.L^{-1}$) e não tóxicos (CI_{50} e CE_{50} maior que 100 $mg.L^{-1}$) (CEC, 1996).

De acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE o Lanzoprazol pode ser classificado como “tóxico”. O Omeprazol, mesocarpo, endosperma sólido e *Bauhinia forficata* podem ser classificados como “nocivos” e a Amoxicilina pode ser classificada como “não tóxico”, considerando os dados dos testes com *E. lucunter.*

Já para os testes realizados com *D. similis,* nenhum composto foi considerado “tóxico”, de acordo com a diretiva europeia. Mas como mencionado, a grande problemática são os valores de Kow mais altos e que possuem alta eficiência em bioacumulação e assim, um suposto esgotamento do sistema de metabolização do organismo, quando passível deste.

Nestes testes também pôde se observar que os valores de Kow e CE_{50} são inversamente proporcionais, mais uma vez justificadas pelo coeficiente de partição.

Outros estudos também apontam a importância de testes de ecotoxicidade com os mesmos fármacos aqui trabalhados, porém, com outras espécies (TABELAS 9 e 10).

Tabela 9 – Estudos de efeitos tóxicos de Amoxicilina em outras espécies.

Organismo-teste	Efeito tóxico	Concentração	Referência
Microcystis aeruginosa **(alga)**	Crescimento CE_{50}	0,0037 $mg.L^{-1}$	LÜTZHØFT; HALLING-SØRENSEN; JØRGENSEN, 1999.
Microcystis aeruginosa **(alga)**	Aumento Superóxido dismutase, catalase e peroxidade.	50 $ng.L^{-1}$ a 1 $mg.L^{-1}$	LIU et al., 2015
Rhodomonas salina **(alga)**	Crescimento CE_{50}	3.108 $mg.L^{-1}$	LÜTZHØFT; HALLING-SØRENSEN; JØRGENSEN, 1999.
Synechococcus leopolensis **(alga)**	Crescimento CE_{50}	0,002 $mg.L^{-1}$	ANDREOZZI et al., 2004.
Synechocystis sp. **(alga)**	Comprometimento das etapas da fotossíntese	50 $mg.L^{-1}$	PAN et al., 2008.
Danio rerio **(peixe zebra)**	Eclosão prematura CE_{50}	132,4 $mg.L^{-1}$	OLIVEIRA et al., 2013.
Danio rerio **(peixe zebra)**	Edemas e deformidades na cauda	221 $mg.L^{-1}$; 380 $mg.L^{-1}$; 654 $mg.L^{-1}$; 1,125 $mg.L^{-1}$.	OLIVEIRA et al., 2013.
Danio rerio **(peixe zebra)**	Aumento de Glutationa S-transferase (brânquias)	1 $mg.L^{-1}$	OLIVEIRA et al., 2013.
Perna perna **(mexilhão)**	Desenvolvimento embrio-larval CI_{50} CEO	835 $mg.L^{-1}$ 1000 $mg.L^{-1}$	BENTO, 2015.

A toxicidade de algas frente a amoxicilina foi investigada, e esta mostrou efeito tóxico sobre as espécies *M. aeruginosa* e *R. salina,* interferindo na taxa de crescimento (LÜTZHØFT; HALLING-SØRENSEN; JØRGENSEN, 1999). Em

outro estudo também realizado com algas e amoxicilina, concentrações na faixa de 50 $ng.L^{-1}$ a 50 $mg.L^{-1}$ não foram tóxicas para organismos de natureza eucariótica, porém, apresenta valores de toxicidade para *Synechococcus leopolensis*. Métodos padronizados para avaliação de efeito tóxico de xenobióticos em água doce, se baseiam no estudo através de organismo-teste, que geralmente acrescentam pelo menos uma espécie de microalga, uma vez que estas fazem parte de um dos componentes mais vulneráveis do ecossistema (ANDREOZZI et al., 2004).

Outro estudo com cianobactérias *Microcystis aeruginosa,* mostrou que esta apresenta-se vulnerável a ação da amoxicilina. O antibiótico estimulou as atividades de superóxido dismutase, catalase e peroxidade durante todo o periodo de exposição (LIU et al., 2015). Estes dados mostram a importância do uso de mais de uma espécie para avaliar efeitos tóxicos para que estes resultados traduzam a realidade (ANDREOZZI et al., 2004).

Mais uma pesquisa com amoxicilina, mostra que esta possui efeito tóxico na fotossíntese de *Synechocystis* sp. Através de diversos testes de fluorescência de clorofila *in vivo,* houve efeito inibitório no fotossistema II e que tais efeitos são dependentes da concentração (PAN et al., 2008).

Já em estudo com peixes e amoxicilina, esta afetou a taxa de eclosão e também interferiu na atividade enzimática tanto em embriões quanto adultos. Também mostrou uma tendência de inibição da enzima catalase e indução de glutationa-S-transferases em adultos. Tais alterações podem ter impactos negativos para estes peixes expostos a contaminação (OLIVEIRA et al., 2013).

Tabela 10 – Estudos de efeitos tóxicos de Omeprazol em outras espécies.

Organismo-teste	Efeito tóxico	Concentração	Referência
Tetraselmis suecica (micro-alga marinha)	Crescimento Hiperpolarização de membrana plasmática Aumento ERO CE50	114.05 $mg.L^{-1}$	SEOANE; ESPERANZA; CID, 2017
Sparus aurata	Diminuição da atividade da Glutationa S-transferase (brânquias)	0,003 $mg.L^{-1}$	Costa, 2018.
Daphnia magna	CE_{50}	11,95 $mg.L^{-1}$	GARCIA et al., 2014.
Alga verde	CE_{50}	9,14 $mg.L^{-1}$	GARCIA et al., 2014.

Com relação ao Omeprazol, o estudo com *Tetraselmis suecica* mostrou que o fármaco causou redução no crescimento, hiperpolarização de membranas tanto citoplasmáticas quanto mitocondriais, além da formação grande quantidade de ERO. Assim, o Omeprazol pode alterar as bombas de prótons em organismo não alvos, modificar a homeostase do pH e acumular ERO causando efeitos deletérios no organismo (SEOANE; ESPERANZA; CID, 2017).

Segundo Costa (2018), o Omeprazol mostrou importante diminuição da atividade da Glutationa S-transferase em brânquias e fígado de *Sparus aurata*. Tal fato pode ser atribuído pela indução do stress oxidativo causado pelo metabólito omeprazol sulfito, superar a capacidade de enzimas antioxidantes como catalase e Glutationa S-transferase. Em estudo com *Daphnia magna* e alga verde, este fármaco também apresentou toxicidade CE50 (11,95 $mg.L^{-1}$ e 9,14 $mg.L^{-1}$) respectivamente (GARCIA et al., 2014).

Ainda tratando de compostos fitoterápicos, estes possuem o fitocomplexo, ou seja, diversas substâncias presentes na mesma planta, que

podem se comportar de forma mais tóxica ou menos tóxica quando apresentadas na forma de “complexo”. Em contrapartida, a versão isolada também pode ter um comportamento mais ou menos agressivo ao meio ambiente. De qualquer forma, neste estudo foi avaliado o composto de maior prevalência em cada espécie, e isso não significa que outros compostos pertencentes a mesma planta não apresentem comportamento diferente quanto a toxicidade ao meio aquático. É aqui que entra uma nova discussão e perspectiva quanto a diretriz europeia, que trata dos compostos de forma isolada, sendo que a própria planta não é encontrada neste modelo.

Diante deste cenário, é viável a elaboração de um novo documento, capaz de traduzir de forma mais fidedigna a toxicidade de medicamentos fitoterápicos como um complexo e não somente na sua forma isolada, como este é encontrado na forma natural.

Os fármacos nos ambientes aquáticos tornam-se mais complexos à medida que se tem a necessidade não só de avaliar o composto em si, mas como ele se comporta em ambientes e organismos diferentes. Lançando mão de mais um desafio acerca do estudo de fármacos no meio aquático, há de se levar em consideração não só a molécula em sua versão íntegra, mas também os metabólitos.

Como supracitado, os fármacos podem gerar metabólitos diversos. Para serem eliminados, esses metabólitos se tornam quimicamente mais hidrossolúveis, contudo, estes ainda podem ser mais ativos, menos ativos ou inativos.

Grande parte da literatura trata sobre a existência de drogas e os efeitos causados em organismos aquáticos modelo, no entanto há poucos dados sobre seus respectivos metabólitos (DELLAGRECA et al., 2006).

Por exemplo, tratando sobre o grau de metabolismo, este pode ser variável entre as classes químicas ou até mesmo variar dentro de uma mesma classe. Assim, é possível citar as tetraciclinas e os macrolídeos que possuem menor taxa metabólica, já as lincosamidas, fluoroquinolonas e as sulfonamidas possuem moderada a elevada taxa de metabolismo (BOXALL, 2004).

Para delimitar processos gerenciais de monitoramento ambiental de produtos farmacêuticos, é necessário conhecer o comportamento ambiental não só da molécula de origem, mas também dos seus metabólitos em ambientes

aquáticos.

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se a presença de taninos condensados e flavonoides nos extratos avaliados e maior concentração de compostos fenólicos para o mesocarpo de *C. nucifera*, fato que possivelmente resultou em maior toxicidade para este extrato em relação ao endosperma sólido de *C. nucifera*. Para análise de espectrometria de massas da fração aquosa de *Bauhinia forficata*, foram encontrados os compostos Quercetina-3-O-ramnosídeo e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo. No que se refere aos testes de toxicidade, embora não tenham sido observados efeitos agudos, foi possível observar efeitos crônicos tanto dos compostos sintéticos quanto dos compostos naturais. O composto que apresentou maior toxicidade crônica foi o Lanzoprazol, seguido do Omeprazol e do Mesocarpo (20,1 $mg.L^{-1}$), enquanto a Amoxicilina apresentou menor toxicidade (744,37 $mg.L^{-1}$). Além disso, foi possível aplicar uma classificação com relação a toxicidade dos compostos de acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE. O Lanzoprazol foi o composto que apresentou maior toxicidade e foi classificado como “tóxico”. O Omeprazol, mesocarpo, endosperma sólido e *B. forficata* foram classificados como “nocivos” enquanto a Amoxicilina foi classificada como “não tóxica” nos testes com *E. lucunter.* Já para os testes realizados com *D. similis* todos os compostos foram classificados como “não tóxicos”, de acordo com a diretiva europeia.

5. VERSÃO COMPACTA

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ECOTOXICOLOGICA DE COMPOSTOS NATURAIS UTILIZADOS PARA TRATAMENTO DE ÚLCERA GÁSTRICA.

Katherine Ceschin Tapxure Reis[1], Fabio Hermes Pusceddu[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Marinhos e Costeiros (PPG Ecomar– Universidade Santa Cecília (UNISANTA)), Santos, SP, Brasil

Email: katherine.reis@live.com

Resumo: Atualmente, diversos estudos em âmbito mundial têm relatado problemas ambientais causados pela presença de fármacos sintéticos, entretanto, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos ambientais ocasionados por substâncias naturais utilizadas na medicina farmacêutica. Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar estudos etnofarmacológicos e ecotoxicológicos das espécies vegetais *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* e comparar os problemas ambientais com fármacos utilizados para o tratamento de úlcera gástica. Para identificar os compostos, foram realizados ensaios fitoquímicos e tanto a fração aquosa de *Bauhinia forficata* quanto os extratos aquosos brutos de *Cocos nucifera* (mesocarpo e endosperma sólido) foram submetidos às análises, por meio de ensaios cromáticos e/ou precipitação. Para a espectrofotometria, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (CELM) a 750 nm. Posteriormente, também foi realizada para a fração aquosa de *Bauhinia forficata*, análise em espectrometria de massa através da identificação do íon precursor e íons provenientes da fragmentação, e comparados por paridade com dados de espectrometria de massas já existentes e descritos através da literatura de moléculas. Por fim, foram realizadas análises de toxicidade para avaliação de efeitos crônicos e agudos com *Echinometra lucunter* e *Daphnia similis,* respectivamente. Nos ensaios fitoquímicos foram detectadas a presença de flavonoides e taninos do tipo condensado. Na dosagem de compostos fenólicos, o endosperma sólido apresentou maior quantidade de fenólicos totais. Na análise de espectrometria de massas de *Bauhinia forficata,* foram encontrados os compostos Quercetina-3-O-ramnosídeo e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo. No que se refere aos testes de toxicidade, embora não tenham sido observados efeitos agudos, foi possível observar efeitos crônicos tanto dos compostos sintéticos quanto dos compostos naturais. O fármaco que apresentou maior toxicidade crônica foi o Lanzoprazol (8,06 $mg.L^{-1}$), seguido do Omeprazol (10,36 $mg.L^{-1}$), e do Mesocarpo (20,1 $mg.L^{-1}$), enquanto a Amoxicilina apresentou menor toxicidade (744,37 $mg.L^{-1}$). Além disso, foi possível aplicar uma classificação com relação a toxicidade dos compostos de acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE. O Lanzoprazol foi o composto que apresentou maior toxicidade e foi classificado como “tóxico”. O Omeprazol, mesocarpo, endosperma sólido e *B. forficata* foram classificados como “nocivos” enquanto a Amoxicilina foi classificada como “não tóxica” nos testes com *E. lucunter.* Já para os testes realizados com *D. similis* todos os compostos foram classificados como “não tóxicos”, de acordo com a diretiva europeia.

Palavras Chave: *Bauhinia forficata*. *Cocos nucifera*. Ecotoxicologia.

PHYTOCHEMICAL AND ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF NATURAL COMPOUNDS USED FOR TREATMENT OF GASTRIC ULCERA

Abstract: Currently, several studies worldwide have reported environmental problems caused by the presence of synthetic drugs, however, little is known about the possible environmental effects caused by natural substances used in pharmaceutical medicine. Given this context, the present study aimed to carry

out ethnopharmacological and ecotoxicological studies of the plant species *Bauhinia forficata* and *Cocos nucifera* and to compare the environmental problems with drugs used for the treatment of gastric ulcer. To identify the compounds, phytochemical assays were performed and both the aqueous fraction of *Bauhinia forficata* and the crude aqueous extracts of *Cocos nucifera* (mesocarp and solid endosperm) were subjected to analysis by chromatic assays and / or precipitation. For spectrophotometry, absorbance was measured by spectrophotometer (CELM) at 750 nm. Subsequently, for the aqueous fraction of *Bauhinia forficata*, mass spectrometric analysis was performed through the identification of the precursor ion and fragmentation ions, and compared by parity with existing mass spectrometry data described by the molecular literature. Finally, toxicity analyzes were performed to evaluate chronic and acute effects with *Echinometra lucunter* and *Daphnia similis*, respectively. The phytochemical assays detected the presence of flavonoids and condensed tannins. In the dosage of phenolic compounds, solid endosperm presented higher amount of total phenolics. In *Bauhinia forficata* mass spectrometric analysis, Quercetin-3-O-ramnoside and Quercetin-3,7-O-diramnoside were found. Regarding toxicity tests, although no acute effects were observed, it was possible to observe chronic effects of both synthetic and natural compounds. The drug with the highest chronic toxicity was Lanzoprazole (8.06 mg.L-1), followed by Omeprazole (10.36 mg.L-1), and Mesocarp (20.1 mg.L-1). Amoxicillin had lower toxicity (744.37 mg.L-1). In addition, a classification on the toxicity of compounds could be applied according to European Directive 93/67 / EEC. Lanzoprazole was the compound with the highest toxicity and was classified as “toxic”. Omeprazole, mesocarp, solid endosperm and B. forficata were classified as “harmful” while Amoxicillin was classified as “non-toxic” in *E. lucunter* tests. For tests performed with *D. similis* all compounds were classified as “non-toxic” according to the European directive
Keywords: *Bauhinia forficata. Cocos nucifera*. Ecotoxicology.

Introdução

É no estudo constante de plantas medicinais, que a etnofarmacologia associa as informações sobre utilização dos fitoterápicos pela comunidade com pesquisas fitoquímicas e farmacológicas [1].

Cocos nucifera Linn é comumente encontrado na costa Atlântica, mais na região do Nordeste brasileiro. É largamente utilizado para diversas indicações terapêuticas [2,3]. Há *Bauhinia forficata* Link*,* que se destaca como uma planta amplamente empregada em tratamentos medicinais [4]. Dada a ampla variedade de finalidades etnofarmacológica tanto de *Cocos* quanto de *Bauhinia*, escolheu-se a patologia da úlcera péptica para este estudo.

Embora estes compostos sejam de suma importância farmacológica, até o momento não foram reportados na literatura dados sobre o comportamento e os riscos associados a presença dessas substâncias, e de seus componentes,

no ambiente. Por outro lado, já existe certo conhecimento sobre a toxicidade dos compostos sintéticos empregados para o tratamento da úlcera como por exemplo, os efeitos tóxicos da amoxicilina frente a cianobactérias (GONZÁLEZ-PLEITER et al., 2013)[5].

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar estudos fitoquímicos e ecotoxicológicos das espécies vegetais *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* e comparar os problemas ambientais com fármacos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica.

Materiais e métodos

Coleta e extração: *Bauhinia forficata* - A coleta de exemplares de *Bauhinia forficata* Link foi realizada no município de Peruíbe, SP-Brasil (24º 26' 79.48"S 46º 95' 92.76"O). Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem e trituradas [6]. Para obtenção da fração aquosa de *B. forficata* (FrAq) a extração foi realizada pelo método de extração fracionada. ***Cocos nucifera*** - A coleta de exemplares de *Cocos nucifera* Linn realizou-se no município de Praia Grande, SP-Brasil (24º 00' 53.76"S 46º 24' 14.34"O). O mesocarpo e o endosperma sólido foram retirados *in natura* e triturados e, em seguida, submetidos a extração bruta. **Análises fitoquímicas preliminares:** A pesquisa de Flavonóides foi realizada através do emprego das reações: Shinoda; reação com hidróxido de sódio; reação com cloreto férrico [7]. A pesquisa de Taninos foi realizada através da realização dos ensaios: reação com sais de chumbo (e ácido acético); reação com sais de ferro (cloreto férrico); reação com acetato de chumbo [7]. **Dosagem de compostos fenólicos totais:** Para a determinação do teor de fenólicos totais, os extratos secos foram ressupensos em metanol, água destilada e Folin-Ciocalteau. Após aguardar 3 minutos, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. As amostras foram incubadas a 37º C durante o período de 30 minutos em banho-maria e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (CELM) a 750 nm [8]. **Análises fitoquímicas por espectrometria de massas:** A fração aquosa de *B. forficata* foi seca em fluxo de nitrogênio, ressupensos em metanol 50% e logo após purificados e centrifugados. Subsequentemente, 2µL do sobrenadante das amostras foram secas e ressuspensas em 1 mL de substância de metanol/formiato de amônio 100mM/H_2O e posteriormente analisadas pelo método espectrometria de massa

em equipamento Varian 310-MS. **Ensaio de toxicidade crônica:** Os procedimentos foram realizados de acordo com a norma ABNT/NBR 15350/2012 [9]. As concentrações estabelecidas foram: Omeprazol e Lansoprazol ($mg.L^{-1}$): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; Amoxicilina ($mg.L^{-1}$): 2000; 1000; 500; 250; 125; *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* (endosperma sólido e mesocarpo) ($mg.L^{-1}$): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; **Ensaio de toxicidade aguda:** Os procedimentos foram realizados de acordo com a norma ABNT/NBR 12713/2016 [10]. As concentrações estabelecidas foram: Omeprazol e Lansoprazol ($mg.L^{-1}$): 1000; 500; 250; 125; 62,5; Amoxicilina ($mg.L^{-1}$): 2000; 1000; 500; 250; 125; *Bauhinia forficata* e *Cocos nucifera* (endosperma sólido) ($mg.L^{-1}$): 1600; 800; 400; 200; *Cocos nucifera* (mesocarpo) ($mg.L^{-1}$): 400; 200; 100; 50;

Resultado e Discussão

Análises fitoquímicas preliminares: Para os três compostos, as reações com sais de chumbo apresentaram um precipitado denso indicando a presença de taninos. Em concordância, as reações com sais de ferro também deram resultado positivo com coloração esverdeada, sendo indicativo da presença de taninos do tipo condensados [7]. Na investigação de flavonoides para *B. forficata*, somente a reação de cloreto férrico apresentou resultado positivo. Já na pesquisa de flavonoides da porção do mesocarpo, a reação com hidróxido de sódio apresentou-se positiva, podendo observar o desenvolvimento da coloração amarelada e na reação com cloreto férrico, se pode observar a coloração verde-castanho também apresentando resultado positivo. Na pesquisa também de flavonoides, porém do endosperma sólido, a única reação que apresentou resultado positivo foi a de cloreto férrico. A coloração verde-castanho resultado das reações de cloreto férrico, presente nas duas porções de *C. nucifera*, sugere a presença de compostos fenólicos gerais. **Dosagem de compostos fenólicos totais (mg/g):** As quantidades de compostos fenólicos apresentaram determinada discrepância: *B. forficata* (9,39), mesocarpo (22,49) e endosperma sólido (16,52) e isso pode ser atribuído, primordialmente, por se tratar de plantas de espécies diferentes. **Análise em espectrometria de massas (MS):** Estas análises revelaram a presença de flavonoides na FrAq estudada, em especial a quercetina como núcleos de agliconas, corroborando com os resultados encontrados por Pizzolatti et al [4]. Os compostos encontrados nas análises de espectrometria de massas foram a Quercetina-3-O-ramnosídeo

(quercitrina) e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo analisadas por ESI-MS em modo positivo. Um estudo que atribui as características químicas à *B. forficata,* identifica compostos glicosídicos contendo agliconas de quercetina também em sintonia com os resultados aqui presentes [11]. **Ensaio de toxicidade crônica:** Dos compostos apresentados, o Lansoprazol lidera o ranking, sendo o que apresentou menor CI_{50} (8,06 $mg.L^{-1}$) e maior valor de Kow, o que remonta a importância deste parâmetro físico-químico para avaliar toxicidade. **Ensaio de toxicidade crônica:** Já para os testes realizados com *D. similis* nenhum composto apresentou toxicidade, de acordo com a diretiva europeia. Mas como mencionado, a grande problemática são os valores de Kow mais altos e que possuem alta eficiência em bioacumulação.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se a presença de taninos condensados e flavonoides nos extratos avaliados e maior concentração de compostos fenólicos para o mesocarpo de *C. nucifera*, fato que possivelmente resultou em maior toxicidade para este extrato em relação ao endosperma sólido de *C. nucifera*. Para análise de espectrometria de massas da fração aquosa de *Bauhinia forficata*, foram encontrados os compostos Quercetina-3-O-ramnosídeo e Quercetina-3,7-O- diramnosídeo. No que se refere aos testes de toxicidade, embora não tenham sido observados efeitos agudos, foi possível observar efeitos crônicos tanto dos compostos sintéticos quanto dos compostos naturais. O composto que apresentou maior toxicidade crônica foi o Lanzoprazol, seguido do Omeprazol e do Mesocarpo (20,1 $mg.L^{-1}$), enquanto a Amoxicilina apresentou menor toxicidade (744,37 $mg.L^{-1}$). Além disso, foi possível aplicar uma classificação com relação a toxicidade dos compostos de acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE. O Lanzoprazol foi o composto que apresentou maior toxicidade e foi classificado como “tóxico”. O Omeprazol, mesocarpo, endosperma sólido e *B. forficata* foram classificados como “nocivos” enquanto a Amoxicilina foi classificada como “não tóxica” nos testes com *E. lucunter.* Já para os testes realizados com *D. similis* todos os compostos foram classificados como “não tóxicos”, de acordo com a diretiva europeia.

Referências bibliográficas

1. Elisabetsky E (2003) Etnofarmacologia. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 55, n. 3, p.1-2, jul.
2. Lorenzi H, Matos FJ de A (2008) Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
3. Debmandal M, Mandal S. (2011) Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine. Kolkata, p. 241-247.
4. PIizzolatti MG, Cunha JRA, Szpoganicz B et al. (2003) Flavonóides glicosilados das folhas e flores de Bauhinia forficata. Quím. Nova, 26(4).
González-Pleiter, M. et al. (2003) Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**, [s.l.], v.47, n.6, p.2050-2064, abr. 2013.
5. Magalhães DP, Ferrão-Filho A da S (2008) A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. O Ecol. Bras, v. 12, n. 3. Rey BGDel (2016) Avaliação da atividade antiulcerogênica, fitoquímica e ecotoxicológica da fração butanólica obtida a partir das folhas de Bauhinia forficata Link. 64 f. Dissertação [Mestrado] - Universidade Santa Cecília, Santos.
6. Costa AF Farmacognosia (2002) Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
7. Genovese MI et al. (2003) Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 39, p. 167-169, 2003.
8. Associação Brasileira de Normas Técnicas (2012) 15350: Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica de curta duração - método de ensaio com ouriço-do-mar. 2 ed. Rio de Janeiro: 2012. 21 p.
9. Associação Brasileira de Normas Técnicas (2016) 12713: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera). 4 ed. Rio de Janeiro: 27 p.
10. Salgueiro ACF et al. (2013) Composição química e avaliação dos efeitos da infusão de Bauhinia forficata em um modelo experimental com eritrócitos humanos expostos a elevadas concentrações de glicose *in vitro*. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 5, n. 4, 2013.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANKO, J. et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. **Free Radical Biology And Medicine,** [s.l.], v.26, n.1-2, p.193-201, jan. 1999.

ALVES, A. M. P. et al. Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo. **Arquivo de Ciências da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v.14, n.2, p.179-186, maio/ago. 2010.

ALVIANO, D. S. et al. Antinociceptive and free radical scavenging activities of Cocos nucifera L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **Journal Of Ethnopharmacology**, Ireland, p. 269-273. mar. 2004.

ALYGIZAKIS, Nikiforos A. et al. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 541, p.1097-1105, jan. 2016. Elsevier BV.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico.** Brasília: 2018.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Bulário eletrônico:** Omeprazol. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8736882013&pIdAnexo=1828258>. Acesso em: 21 ago. 2017.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**, 5ª edição. Brasília: 2010.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2012. **NBR15350: Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica de curta duração - método de ensaio com ouriço-do-mar.** Rio de Janeiro.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2016. **NBR12713: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro.

ANDREOZZI, R. et al. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v.38, n.24, dez. 2004.

ARAÚJO, T. A. de S.; MELO, J. G. de; ALBUQUERQUE, U. P. Plantas Medicinais. **Introdução a etnobiologia.** Recife: Upeea, 2014.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry,** [s.l.], v.99, p.191-203, 2006.

BARATA-SILVA, C. et al. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, [s.l.], v.25, n.3, p.362-370, 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova,** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETT, K. E. **Fisiologia médica de ganong.** 24. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 456-460.

BENTO, N. R. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos Fluoxetina e Amoxicilina empregando o mexilhão marinho *Perna perna* (LINNAEUS 1758).** 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros, 2015.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BIGHETT et al., 2002. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, v.11, n.1. p. 55-60, jan/abr., 2002.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.523-530, 2003.

BOIX, C. et al. Investigating the presence of omeprazole in waters by liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry: degradation experiments. **Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 48, n. 10, p.1091-1100, 20 set. 2013.

BOXALL, A. B. et al. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environ. Sci. Technol.**, [s.l.], v.37, n.15, p.286A-294A, 2003.

BOXALL, A. B. A.. Fate of Veterinary Medicines Applied to Soils. **Pharmaceuticals In The Environment**, [s.l.], p.103-119, 2004

BRANDT, E. M. F. **Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (reatores UASB seguidos de pós-tratamento).** 2012. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais (AINHs) convencionais. **Rev Bras Med,** Sao Paulo, v. 57, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.,** São Paulo, v. 3, n. 55, p. 37-39, jul. 2003.

CARVALHO, A. S. T. Úlcera Péptica. **J Pediatria,** Rio de janeiro, v.76, n.2, p. 127-134, 2000.

CEC – Commission of the European Communities. **Technical guidance**

document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 1996.

CHEMSPIDER. **Chemical structure database.** Royal Society of Chemistry. Disponível em: http://www.chemspider.com. Acesso em 06 de abr. de 2018.

CONSTANZO, L. S. **Fisiologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry,** New York, v.7, p.66-76, 1996.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 3, 2002.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008.

COSTA, M. F. P. **Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada em biomarcadores.** 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química,** Rio de Janeiro, v.1, n.3, p.241-256, jun. 2009.

DAVID, A.; PANCHARATNA, K. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (Danio rerio). **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v.27, n.3, p.390-395, maio 2009.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In

health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine,** Kolkata, p.241-247, 2011.

DELLAGRECA, M. et al. Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. **Chemosphere,** [s.l.], v.63, n.7, p.1087-1093, mai. 2006.

ECETOC - European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. **Partition coefficient (Kow) and distribution ratio (DOW).** 2017. Disponível em <http://www.ecetoc.org/report/measured-partitioning-property-data/partition-coefficient-kow-and-distribution-ratio-dow/> Acesso em: 08 ago. 2017.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura,** São Paulo, v.55, n.3, p.1-2, jul. 2003.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Plantas medicinas nos biomas brasileiros:** pesquisas da Embrapa, Brasília: Cenargem, 2010. p. 16.

ENGEL, I. C. et al. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** [s.l.], v.18, n.2, p.258-264, jun. 2008.

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research In Microbiology,** [s.l.], v.153, n.2, p.647-652, fev. 2002.

FARIAS L. S.; MENDEZ A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in b. forficata subsp. pruinosa. **Química. Nova**, São Paulo, v.37, n.3, p.483-486, 2014.

FERRERES F. et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chem,** [s.l.], v.134, n.2, p.894-904, 2012.

FERRO, D. **Fitoterapia:** conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 2006.

FLYNN, M. N.; PEREIRA, W. R. L. Abordagem Populacional na Ecotoxicologia. RevInter Revista Intertox de Toxicologia. **Risco Ambiental e Sociedade**, v.4, n.3, p.79-91, out. 2011.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int. J. Microcirc. Clin.**, v.15, p.17-21, 1995.

GARCÍA, S. A. O. de et al. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.1517-1533, 27 jul. 2014.

GAZE, W.; DEPLEDGE, M. Antimicrobial Resistance: Investigating the environmental dimension. **Science Division**, p.12-22, 2017.

GENOVESE, M. I. et al. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, p.167-169, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P**.** Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, jan. 2007.

GONZÁLEZ-PLEITER, M. et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**, [s.l.], v.47, n.6, p.2050-2064, abr. 2013.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 12 ed. McGrallHill, 2012.

GUÉRIOS, S. D. et al. Gastroscopic examination after oral administration of non

steroids antiinflammatory in dogs. **Archives Of Veterinary Science,** Curitiba, v. 7, n. 2, p. 53-58, jan. 2002.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 10. ed. Elsevier, 2002. P. 670-691.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças.** 6. ed. Guanabara Koogan, 1998. p. 458.

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola:** pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, 2015. 123 p.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, [s.l.] v.40, n.7, p. 691-699, 2000.

KOLPIN, D. et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environ. Sci. Technol**, Lincoln, v.36, n.6, p.1202-1211, 2002.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal,** [s.l.], v.2013, p.1-16, 2013.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev Bras Anestesiol,** v. 52, n. 4, p.498-512, ago. 2002.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopathology of Helicobacter pylori. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LALASTRA, A. de; MARTIN, M. J.; MOTILVA, V. Antiulcer and Gastroprotective Effects of Quercetin: A Gross and Histologic Study. **Pharmacology,** [s.l.], v.48, n.1, p.56-62, 1994.

LIMA, E. B. C. et al. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): Uma revisão fitoquímica e farmacológica. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica,** Ribeirão Preto, v. 48, n. 11, p. 1-4, ago. 2015.

LIMA, V. P.; RABENHORST, S. H. B. Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.4, p. 389-396, 2009.

LIU, Ying et al. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in Microcystis aeruginosa at different nitrogen levels. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 111, p.138-145, jan. 2015. Elsevier BV.

LÓPEZ-POSADAS, Rocío et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology,** [s.l.], v. 76, n. 4, p.495-506, ago. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil:** Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LÜTZHØFT, H.-c. Holten; HALLING-SØRENSEN, B.; JØRGENSEN, S. E.. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.1-6, 1 jan. 1999.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MAGALHÃES, D. de P.; FERRÃO FILHO, A. da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **O Ecol. Bras,** [s.l.] v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAIA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quimica Nova**, v. 30, n.3, p.651–666, 2007.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C. Análise Fitoquímica das folhas de três espécimes de *Bauhinia forficata* Link comparando com um espécime de *Bauhinia variegata* L. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.14, n.2, p.229-237, 2016.

MARQUES, G. S. et al. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada,** v.33, n.1, p.57-62, 2012.

MAZZOLENI, L. E.; MAZZOLENI, F. Tratamento e retratamento do *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 5, p. 153-164, 2010.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, [s.l.], v.32, n.1, p.188-197, 2009.

MENDES, V. de S. **Avaliação do Impacto de Poluentes Estrogénicos em Peixes.** 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Marinha, Universidade do Algarve, Faro, 2015.

MICELI, N. et al. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. **Natural Product Research,** [s.l.], v.30, n.11, p.1229-1239, 29 jun. 2015.

MIMEAULT, C. et al. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, Carassius auratus. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v.73, n.1, p.44-54, jun. 2005.

MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link. **Rev. bras. farmacogn.**, São Paulo, v.1, n.1, p. 58-68, 1986.

MONTEIRO, E. C. A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais. **Temas de Reumatologia Clínica,** São Paulo, v. 9, n. 2, p. 53-63, maio 2008.

MONTEIRO J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova,** São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, A .L.; CHAVES, P. C. **Regulação neuroendócrina da motilidade e secreções gastrointestinais.** 2002.

MORSCHEL, C. F.; MAFRA, D.; EDUARDO, J. C. C. The relationship between proton pump inhibitors and renal disease. **Brazilian Journal Of Nephrology**, [s.l.], v.40, n.3, p.301-306, 10 jul. 2018.

MURAKAMI, S.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S. Inhibitory effect of tannic acido n gastric H^+, K^+-ATPase. **Journal of Natural Products,** [s.l.], v.55, n.4, p.513-516, abr. 1992.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 323-336, 2002.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e Foto-Fenton. **Quim. Nova,** v. 30, n. 2, p.400-408, 2007.

NOVELLI, A.; RIETZLER, A. C. **Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do rio Monjolinho - São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre**. 2005. 229 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

NUNES, O. C. **Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de extratos e frações de Baccharis trimera (Less.) DC.** 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória,

2016.

OBIDOA, O. et al. Phytochemical Analyses of *Cocos nucifera* L. **Arch Pharm Sci & Res**, Nigéria, v.1, n.1, p.86-96, jul. 2009.

OLIVEIRA, L. F. de; MARTINEZ, C. B. dos R. **Uso da biota no monitoramento da qualidade de ecossistemas aquáticos contaminados por metais.** In: Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, 2011, Londrina: IBEAS – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais, 2011. p.1 - 8.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.903-912, nov. 2013.

PAIVA, S. R. de et al. Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. **Floresta e Ambiente,** v.9, n.1, p.153-157, jan. 2002.

PAN, X et al. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of Synechocystis sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 89, n. 4, p. 207-213, 29 set. 2008.

PEDROZO, M. de F.; KUNO, R. Contaminantes da água e do solo. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. de A.; BATISTUZZO, J. A. de O. **Fundamentos de Toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 26. p. 200-223

PERES, M. R. **Remoção dos interferentes endócrinos 17 'alfa'-etinilestradiol, 17 'beta'-estradiol e 4-nonilfenol por adsorção em carvão ativado em pó em água de abastecimento público.** 2011. 150 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, SP.

PIMPÃO, R. C. S. **Compostos fenólicos e sua actividade antioxidante em espécies de Juniperus: análise da produção sazonal e sob condições de**

stress. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Biotecnologia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PIZZOLATTI M. G.; CUNHA JR. A.; SZPOGANICZ B. et al. **Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata*.** Química Nova, v.26, n.4, 2003.

PROENÇA, P.; MOURA, A. P.; AZEITEIRO, U. M. Resíduos de Medicamentos: Atitudes, Conhecimentos e Comportamentos Assumidos. **Revista Captar:** Ciência e Ambiente para Todos, v.3, n.1, 2014.

PRÓSPERI, V. A. **Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos estuarinos.** 2002. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

PUBCHEM. **Open chemistry database.** Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 06 de abr. de 2018.

QUEIROZ, D. M. et al. CagA-POSITIVE Helicobacter pylori and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int. J. Cancer,** v. 78, p.135-139, 1998.

RAFF, H.; LEVITZKY, M. **Fisiologia médica:** uma abordagem integrada. Porto Alegre: Amgh, 2012. p. 508-514.

RANG & DALE. **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REGITANO, J. B; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v.34, n.3, p.601-616, jun. 2010.

REIS FILHO, R. et al. Fármacos, ETEs, e corpos hídricos. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [s.l.], v.2, n.3, p.54-61, dez. 2006.

REY, B. G. del. **Avaliação da atividade antiulcerogênica, fitoquímica e ecotoxicológica da fração butanólica obtida a partir das folhas de *Bauhinia forficata* Link.** 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Universidade Santa Cecília, Santos, 2016.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. de A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, Basel, v.1, n.2, p. 80-87, 2003.

ROSS, J. A.; KASUM, Christine M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annu. Rev. Nutr,** Pensilvânia, v.29, p.29-34, 2002.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). **Food Chemistry,** [s.l.], v.89, n.4, p.569-575, mar. 2005.

SALGUEIRO, A. C. F. et al. **Composição química e avaliação dos efeitos da infusão de *Bauhinia forficata* em um modelo experimental com eritrócitos humanos expostos a elevadas concentrações de glicose *in vitro*.** In: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 5 n.4, 2013.

SANTANA, I. A. **Avaliação química e funcional de polpa de coco verde e aplicação em gelado comestível.** 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.

SANTOS, P. M. dos. **Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Bauhinia* (Fabaceae) da região amazônica.** 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

SCIGELOVA, M., HORNSHAW, M., GIANNAKOPULOS, A., MAKAROV, A.

Fourier transform mass spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics, [s.l.] v.10, n.7, 2011

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, Porto Alegre, v.3, n.22, p.11-17, set. 2009.

SEOANE, M; ESPERANZA, M; CID, Á. Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga Tetraselmis suecica. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 191, p.62-72, out. 2017

SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B . **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2015.

SILVA, J. dos S. et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.409-418, ago. 2015.

SILVA, K. L. da; CECHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova,** São Paulo, v.25, n.3, p.449-454, 2002.

SILVA, R. R. et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of Cocos nucifera var. typica. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-9, maio 2013.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; SANTOS, B. C. *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Fitos,** [s.l.], v.9, n.3, p.217-232, 2015.

SILVA, R. C.; RORIZ, B. C.; SANTOS, C. S. **Identificação das plantas medicinais utilizadas pela população de araguaína, TO.** Seminário de iniciação científica, s**eminário.** Palmas, UFT, 2012.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana:** uma abordagem integrada. 5. ed. Manole, 2010. p. 687-701.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. ed. São Carlos: UFRGS, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIQUEIRA, J. S. et al. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*: Revisão. **RBAC**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.

TONETO, M. et al. Evolução histórica da úlcera péptica: da etiologia ao tratamento. **Scientia Medica**, [s.l.], v.21, n.1, 2011.

TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiania, v. 3, n. 2, p. 23-28, jul. 2006.

UEDA, J. et al. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente**, [s.l.], v.5, n.1, 2009.

UETA, B. et al. **Atividade antioxidante da catequina e análise comparativa com as vitaminas A e C.** In: Simpósio de ciências farmacêuticas, 2014, São Paulo. **Simpósio.** São Paulo: 2014. p. 1 - 3.

UGGIONI, D. C. Estudo etnobotânico de ***Bauhinia forficata*** **Link e** ***Hovenia dulcis Thunb*****:** Plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional. 2012. 42 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2012.

U.S.A. - UNITED STATES OF AMERICA. Department of Commerce. **2016 top markets report pharmaceuticals.** Washington: ITA, 2017.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **An interpolation estimate for chronic toxicity: The lcp approach**. Norberg-King, T. J. Technical Report 05-88, National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN 55804. 1988.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **EPI Suite® v.4.11**. The Estimation Programs Interface. (2002).

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **EPA-823-R-00-001**: Bioaccumulation Testing And Interpretation For The Purpose Of Sediment Quality Assessment Status. Washington, 2000.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Nat. Prod. Rep.**, [s.l.], v.28, p.1626-1695, 2011.

VOLPATO, G.T. et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Of Ethnopharmacology,** [s.l.], v.116, n.1, p.131-137, fev. 2008.

WANDERLEY, Matheus Cereja; NASCIMENTO, Rômulo Freitas. **Estudo sobre os desafios no tratamento de efluentes da indústria farmacêutica** 2017. 109 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

WHO - World Health Organization. **Drug Information**. V. 23, n. 1, 2009.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática:** princípios e aplicações. 2. ed. São Paulo: Rima, 2008.