

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FABRÍCIO DAMASCENO LEANDRO

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.**

ALFENAS/MG

2016

FABRÍCIO DAMASCENO LEANDRO

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva.

Coorientação: Prof. Dr<sup>a</sup> Jaqueline de Carvalho Oliveira

Professores colaboradores do projeto:

Prof<sup>a</sup> Dra. Amanda Tranches Dias

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

ALFENAS/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Alfenas

L437c Leandro, Fabrício Damasceno.  
Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg / Fabrício Damasceno Leandro. -- Alfenas/MG, 2016.  
104 f. : il. --

Orientador: Geraldo Alves da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Compostos Fitoquímicos. 3. Atividade antifúngica. 4. Analgésicos. 5. Agentes antiinflamatórios. I. Silva, Geraldo Alves da. II. Título.

CDD 615.321

**FABRÍCIO DAMASCENO LEANDRO**

**"Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg."**

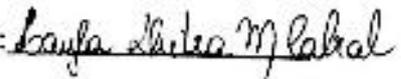
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 20/11/2016

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Layla Dutra Marinho Cabral  
Instituição: UFJF

Assinatura: 

Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

***A todos que me apoiaram***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me dar forças em todos os momentos para concluir este trabalho.

Aos meus pais José Natanael e Oneida pelo incentivo, preocupação, por me dar forças nos piores momentos, pelo amor, carinho e por ser meu alicerce nesta jornada.

Ao meu irmão Felipe pelo incentivo e as risadas nos momentos de descontração.

Ao professor Dr. Geraldo pela oportunidade, pela confiança, por toda paciência, orientação e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Alexandre Giusti Paiva pela sua disponibilidade, pelo apoio, paciência e conhecimentos transmitidos.

Aos professores colaboradores professor Dr. Marcelo Aparecido Silva e professora Amanda Tranches Dias pelo apoio e disponibilidade de realização dos experimentos.

À professora Dr<sup>a</sup> Clarice Veloso por sua dedicação e conhecimentos transmitidos.

Às pessoas que amo muito, Jéssica Ferreira Costa, Letícia Lobão e Marina Ortega, por fazer essa etapa mais leve e por estar presente sempre que possível.

À aluna de graduação Izabela Contini por sua ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do laboratório Marilda e Ana Flávia Silva por toda amizade.

Ao Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que forneceu condições para que o trabalho pudesse ser realizado.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota.”*

*(Theodore Rossevelt)*

## RESUMO

Durante muito tempo, o uso de plantas medicinais foi o principal recurso terapêutico utilizado para tratar enfermidades. Há vários relatos a respeito das propriedades farmacológicas de *Campomanesia xanthocarpa*, popularmente conhecida como gabioba. Com base nessas informações, a espécie vegetal em questão, já usada (popularmente) como planta medicinal para o tratamento de doenças inflamatórias, de úlceras, antidiarreico, dentre outros usos, é uma candidata promissora para tais estudos. Inicialmente, realizou-se uma triagem fitoquímica preliminar, por meio de testes qualitativos da droga vegetal oriunda das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, que detectaram compostos como flavonoides, taninos, catequinas, triterpenóides, esteróides e saponinas. Na análise por CCD foi utilizado diferentes reveladores, analisando os extratos hidroetanólico seco das folhas, raiz e caule de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. Foi detectado saponinas, ácido fenólicos, flavonoides, taninos condensados, catequinas, triterpenóides e antocianidinas. As análises químicas quantitativas demonstraram que o extrato seco do caule foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos ( $39,3 \pm 18^c$  mg EAG), enquanto o extrato da folha foi o que demonstrou conter a maior quantidade de flavonoides ( $23,3 \pm 2,1^b$  mg EQ). Nas análises de atividade antifúngica, o extrato do caule foi o que se mostrou mais ativo contra as leveduras testadas, sendo efetivo a quase todas, destacando *C. glabrata* (MIC<sub>50</sub> de 3,9) e *C. Krusei* (MIC<sub>50</sub> de 15,625) que apresentaram MIC inferior ao controle fluconazol. Nos ensaios antiinflamatórios e anticonceptivos evidenciou, através dos testes de formalina, peritonite induzida por LPS e Von Frey filamento, uma possível ação anti-inflamatória e antinoceptiva do extrato seco das folhas. No teste de Formalina, não ocorreu diminuição significativa do tempo de lambida apenas no extrato de 1000 mg/kg quando comparada ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ) e na fase II houve uma diminuição no tempo de lambida em todas concentrações quando comparada ao grupo controle Veículo. No teste de Peritonite induzida por LPS houve uma diminuição na contagem de leucócitos os extratos de 10 e 100 mg/Kg quando comparada ao grupo controle Veículo + LPS, com  $p < 0,05$ . No teste de Von Frey filamento, após a administração da carragenina houve aumento do limiar mecânico em todos as concentrações de extrato já na primeira hora.

**Palavras-chave:** plantas medicinais; compostos fitoquímicos; atividade antifúngica; antinociceptiva; antiinflamatória.

## ABSTRACT

For a long time, the use of medicinal plants was the main therapeutic resource used to treat diseases. There are several reports on the pharmacological properties of *Campomanesia xanthocarpa*, popularly known as gabioba. Based on this information, the plant species in question, already used (popularly) as a medicinal plant for the treatment of inflammatory diseases, ulcers, antidiarrheal, among other uses, is a promising candidate for such studies. Initially, a preliminary phytochemical screening was carried out by means of qualitative tests of the vegetal drug from the leaves of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, which detected compounds such as flavonoids, tannins, catechins, triterpenoids, steroids and saponins. In the analysis by CCD was used different developers, analyzing the dry hydroethanolic extracts of the leaves, root and stem of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. Saponins, phenolic acids, flavonoids, condensed tannins, catechins, triterpenoids and anthocyanidins were detected. The quantitative chemical analysis showed that the dry extract of the stem had the highest content of phenolic compounds ( $39.3 \pm 18c$  mg EAG), while the leaf extract was the one that showed the highest amount of flavonoids ( $23.3 \pm 2.1$  mg EQ). In the analysis of antifungal activity, the stem extract was the most active against the tested yeasts, being effective to almost all of them, highlighting *C. glabrata* (MIC<sub>50</sub> of 3.9) and *C. Krusei* (MIC<sub>50</sub> of 15,625) that presented MIC lower than the fluconazole control. In the antiinflammatory and contraceptive tests, through formalin tests, peritonitis induced by LPS and von Frey filament, showed a possible anti-inflammatory and antinociceptive action of the dry leaf extract. In the Formalin test, there was no significant decrease in lick time only in the extract of 1000 mg / kg when compared to the vehicle group ( $p < 0.05$ ) and in phase II there was a decrease in lick time in all concentrations when compared to the Control group Vehicle. In the LPS-induced peritonitis test, there was a decrease in the leukocyte count of the extracts of 10 and 100 mg / kg when compared to the vehicle + LPS control group, with  $p < 0.05$ . In the Von Frey filament test, after carrageenan administration there was an increase in the mechanical threshold at all concentrations of extract already in the first hour.

**Keywords:** medicinal plants; phytochemicals compounds; antifungal activity; antinociceptive; anti-inflammatory.

## LISTA DE ABREVIações

<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>Ac.Gal.</b>	Ácido Gálico
<b>Atrq.</b>	Antraquinona
<b>AT</b>	Atividade total
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>COX</b>	Ciclo oxigenase
<b>Ctq.</b>	Catequina
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>Dgx.</b>	Digoxina
<b>EC</b>	Extrato do caule
<b>EAG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>EF</b>	Extrato da folha
<b>EHCx</b>	Extrato hidroetanólico de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg
<b>EQ</b>	Equivalente de quercetina
<b>ER</b>	Extrato da raiz
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>IC50</b>	Concentração inibitória de 50%
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Indo</b>	Indometacina
<b>ISM%</b>	Índice de susceptibilidade
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LOX</b>	Lipooxigenase
<b>M</b>	Morfina
<b>MIC50</b>	Concentração inibitória mínima

<b>MIC90</b>	para inibir 50% de crescimento Concentração inibitória mínima para inibir 90% de crescimento
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>iNOS</b>	Inibidora de Óxido Nítrico Sintetase
<b>NF-KB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NP/PEG</b>	Difenilboriloxietilamina em polietilenoglicol
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P%</b>	Percentual de atividade
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>Piloc.</b>	Pilocarpina
<b>Qct.</b>	Quercetina
<b>S</b>	Salina
<b>SEER</b>	Surveillance, Epidemiology, and End Results
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>V</b>	Veículo
<b>VeicL</b>	Veículo + LPS
<b>VeicS</b>	Veículo + salina
<b>v.i.</b>	Via intraperitoneal
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>V+C</b>	Veículo + carragenina
<b>V+S</b>	Veículo + salina
<b>UNIFAL-MG</b>	Universidade Federal de Alfenas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.....	16
Figura 2 –	Estrutura básica dos flavonoides.....	17
Figura 3 –	Complexo formado entre o flavonoide (quercetina) e alumínio.....	19
Figura 4 –	Estrutura básica das sapogeninas.....	23
Figura 5 –	Espécie <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	27
Figura 6 –	Fluxograma representativo dos procedimentos utilizados no estudo.....	52
Figura 7 –	Distribuição da porcentagem do pó das folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O Berg retido em cada tamis...	54
Figura 8 –	Perfis cromatográficos dos extratos secos obtidos das folhas, caule e raiz de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.	58
Figura 9 –	Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg), indometacina ou morfina no tempo de lambida durante a primeira fase do teste da formalina.....	67
Figura 10 –	Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg), indometacina ou morfina no tempo de lambida durante a segunda fase do teste da formalina.....	68
Figura 11 –	Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) e indometacina no número de leucócitos na cavidade peritoneal.....	70
Figura 12 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos, detectada pelo Von Frey filamento.....	71
Figura 13 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de	

	carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 30 minutos, detectada pelo Von Frey filamento.....	72
Figura 14 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 1 hora, detectada pelo Von Frey filamento.....	73
Figura 15 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 2 horas, detectada pelo Von Frey filamento.....	74
Figura 16 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 3 horas, detectada pelo Von Frey filamento.....	75
Figura 17 –	Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 4 horas, detectada pelo Von Frey filamento.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas moleculares dos 4 principais grupos dos flavonoides.....	18
Tabela 2 –	Estrutura de tanino condensado e hidrolisável.....	21
Tabela 3 –	Metodologia para identificação e quantificação de taninos	22
Tabela 4 –	Exemplos de estrutura de saponinas.....	24
Tabela 5 –	Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	55
Tabela 6 –	Resultado da análise fitoquímica preliminar do extrato seco das folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	56
Tabela 7 –	Teores de polifenóis totais e flavonoides nos extratos de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	60
Tabela 8 –	Avaliação do perfil de sensibilidade de leveduras do gênero <i>Candida</i> sp frente aos extratos das folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	63
Tabela 9 –	– Atividade antimicrobiana total dos extratos provenientes dos extratos de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> com valores de MIC50 inferiores a 100 µg/mL.....	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	11
2.2	METABOLISMO SECUNDÁRIO .....	12
<b>2.2.1</b>	<b>Compostos Fenólicos</b> .....	14
2.2.1.1	Flavonoides .....	16
2.2.1.2	Taninos.....	19
2.3	SAPONINAS .....	22
2.4	ASPECTOS BOTÂNICOS.....	25
<b>2.4.1</b>	<b>Família Myrtaceae</b> .....	25
2.4.2	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg.....	26
2.5	ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS.....	29
<b>2.5.1</b>	<b>Processo inflamatório</b> .....	30
<b>2.5.2</b>	<b>Dor e nocicepção</b> .....	34
2.5.3	Atividade antimicrobiana .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	38
4.2	DEPÓSITO DA EXICATA .....	38
4.3	SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL.....	38
4.4	DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM .....	39
4.5	DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA .....	39
4.6	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS .....	40
4.7	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	40
<b>4.7.1</b>	<b>Taninos</b> .....	40
<b>4.7.2</b>	<b>Catequinas</b> .....	41
<b>4.7.3</b>	<b>Flavonoides</b> .....	41
<b>4.7.4</b>	<b>Glicosídeos cardioativos</b> .....	42

<b>4.7.5</b>	<b>Esteróides e triterpenóides</b> .....	43
<b>4.7.6</b>	<b>Derivados da cumarinas</b> .....	43
<b>4.7.7</b>	<b>Saponinas</b> .....	433
<b>4.7.8</b>	<b>Alcalóides</b> .....	44
<b>4.7.9</b>	<b>Antraquinonas</b> .....	44
4.8	TRIAGEM FITOQUÍMICA POR CCD .....	45
4.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	46
4.10	DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES .....	46
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	47
4.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCEPTIVA.....	48
<b>4.12.1</b>	<b>Modelo Animal</b> .....	48
<b>4.12.2</b>	<b>Atividade antiinflamatória e antinoceptiva</b> .....	49
4.12.2.1	Teste da formalina .....	49
4.12.2.2	Teste de Von Frey .....	49
4.12.2.3	Peritonite induzida por LPS .....	50
4.12.2.4	Análise estatística.....	51
5	FLUXOGRAMA DOS TESTES ENVOLVIDOS .....	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6.1	DETERMINAÇÃO POR PERDA DE SECAGEM .....	53
6.2	DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA .....	54
6.3	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	56
6.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA POR CCD .....	58
6.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES.....	59
6.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	62
6.6.1	Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs) para leveduras do gênero Candida .....	62
6.6.2	Quantificação da atividade antifúngica dos extratos com MIC50 menor ou igual a 100 µg/ml .....	65
6.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCEPTIVA.....	67
7	CONCLUSÕES .....	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

A atividade farmacológica de extratos vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma prática antiga, sendo que, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a maioria da população de países em desenvolvimento recorre ao uso de plantas medicinais como forma alternativa de tratamento (DUARTE et al., 2004; GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005).

Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham princípios ativos que eram utilizados no combate às doenças devido ao seu poder curativo. Durante muito tempo, o uso de plantas medicinais foi o principal recurso terapêutico utilizado para tratar enfermidades. Atualmente, com os avanços tecnológicos, sobretudo no âmbito das ciências da saúde, novas maneiras de tratar e curar as doenças foram surgindo (BADKE et al, 2011).

A fitoterapia é vista como opção alternativa na busca de soluções terapêuticas, utilizada principalmente pela população carente, pois se trata de uma alternativa eficiente, barata e culturalmente difundida (FRANZON et al., 2009).

No Brasil, mesmo com o incentivo da indústria farmacêutica para a utilização de medicamentos industrializados, grande parte da população ainda se utiliza de práticas complementares para cuidar da saúde, como o uso das plantas medicinais, empregada para aliviar ou mesmo curar algumas enfermidades. Atualmente, as mudanças econômicas, políticas e sociais que eclodiram no mundo influenciaram não só na saúde das pessoas como também nos modelos de cuidado (BADKE et al, 2011).

O uso de plantas medicinais, especialmente na América do Sul, contribui de maneira significativa para cuidados básicos com a saúde da população, além da sua importância como fonte de recursos econômicos (RIBEIRO et al., 2007; GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005). Devido à grande diversidade da flora brasileira, muitas espécies vêm sendo utilizadas como objetos de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos (ALVARENGA et al, 2007).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutos devido à sua extensão territorial, posição geográfica, solo e condições climáticas adequadas, sendo possível a produção de frutos praticamente o ano todo com auxílio tecnológico (LAGO; SILVA 2006). Grande parte dos frutos produzidos possui

alguma ação farmacológica, sendo objetos de estudos na busca de novos medicamentos.

O bioma do cerrado abrange a boa parte da região central do país, onde há grande concentração populacional, apresentando uma grande demanda de plantas medicinais, passíveis de serem exploradas cientificamente (ZUCCHI et al, 2013).

No Brasil, a planta comestível *Campomanesia xanthocarpa* O.Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecido como "guavirova", "gabiropa" ou "guabiroba" é uma espécie nativa do Brasil, mas não endêmica, com ocorrência na mata Atlântica e no cerrado. (KLAFKE et al,2010).

Estudos têm demonstrado que *C. xanthocarpa* possui vários efeitos farmacológicos: as folhas desta planta são usadas como infusão na medicina popular para tratar doenças gastrointestinais e anti-inflamatórias, hipercolesterolemia, antiplaquetários e relaxante muscular (ALICE et al, 1995; BARTH; PROCHNOW, 2013).

Baseado neste contexto torna-se de grande importância à realização deste estudo, para a avaliação da atividade farmacológica e citotóxica desta planta, possibilitando, talvez, a descoberta de um novo fitoterápico, de baixo custo e, portanto, acessível a toda população.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Em termos teóricos, planta medicinal é aquele vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, princípios ativos que podem ser empregados para fins terapêuticos ou precursores de substâncias utilizadas para tais fins, sendo amplamente aplicadas pela medicina popular (AMOROZO, 2002).

A utilização da fitoterapia (que significa o tratamento pelas plantas) vem desde a antiguidade. Na China, em 3.000 a.C., já existiam farmacopeias que compilavam as ervas e as suas indicações terapêuticas. A utilização das plantas medicinais faz parte da história da humanidade, tendo grande importância tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como culturais (DORTAS, 1998). Os primeiros relatos escritos sobre o uso de plantas como remédios é encontrada na obra chinesa Pen Ts'ao ("A Grande Fitoterapia"), de Shen Nung, que remonta a 2800 a.C. (ELDIN; DUNFORD, 2001). No final do século XIX, o uso dos produtos naturais era limitado principalmente ao uso de extratos e preparados a partir de plantas, baseado na observação do efeito causado após sua administração. Pouco era conhecido a respeito da química de plantas medicinais (AJAO; AKINDELE, 2013).

A descoberta das propriedades úteis ou nocivas dos vegetais pelo homem tem suas raízes no conhecimento empírico. A observação do comportamento dos animais e a verificação empírica dos efeitos da ingestão de algum vegetal no organismo humano teve um importante papel na utilização destes como tratamento de alguma patologia (TOMAZZONE et al, 2006).

Há relatos descritos inerentes a descobertas das propriedades das plantas medicinais, em que muitas vezes eram atribuídas a uma intervenção divina, pois seu uso fazia parte de rituais religiosos, em que lhes eram atribuídos poderes de colocar os homens em contato direto com os deuses (GOFF, 1997).

No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas, deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus. A construção desta terapia alternativa de cura surgiu da articulação dos conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros. Este processo de miscigenação gerou uma

diversificada bagagem de usos para as plantas e seus aspectos medicinais, que sobreviveram de modo marginal até a atualidade (LORENZI; MATOS, 2002).

O conflito entre as formas de cura alternativa e o saber científico ocorre a partir do momento em que os leigos aplicam formas alternativas de cura, e este conhecimento era, em geral, não vinculado ao saber acadêmico, sendo então considerado ilegítimo. A utilização das práticas alternativas aplicadas à saúde tem persistido, entre outros motivos, pela dificuldade no acesso à assistência de saúde por parte da população, que não tem suas demandas e necessidades atendidas e são parcialmente supridas pelo uso das terapias alternativas e também por opção pessoal (REZENDE; COCCO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) já reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e muito importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é reduzido. Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram e estudaram diversas espécies vegetais, o que permite uma grande variedade de possível uso para fins medicinais. No Brasil há mais de cem mil espécies catalogadas, sendo apenas dois mil com uso científico comprovado (REZENDE; COCCO, 2002).

A medicina popular utiliza-se das diversas partes das plantas, tais como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes, de acordo com a espécie em questão. Há diversas formas na preparação destas plantas, sendo o chá a mais utilizada, preparado por meio da decocção ou infusão (LAINETTI; BRITO, 1980).

A fitoterapia é vista como uma opção alternativa terapêutica, utilizada principalmente pela população de baixa renda, pois se trata de uma alternativa eficiente, barata e culturalmente difundida (FRANZON et al, 2009).

## 2.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO

A ação farmacológica é resultado da atividade metabólica secundária de vegetais superiores, como meio de proteção contra a ação de insetos, herbívoros e microrganismos, por exemplo (GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005; PEREIRA et al., 2009). Os produtos da síntese de compostos essenciais necessários à existência das espécies vegetais são denominados de metabólitos

primários, que incluem macromoléculas como lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas com funções vitais bem definidas. Através de várias rotas biossintéticas, esses produtos originam um segundo grupo de compostos químicos conhecidos como metabólitos secundários (SIMÕES et al, 2010).

O metabolismo das plantas superiores produz compostos de estrutura complexa, de baixo peso molecular e apresentam atividades biológicas definidas que, ao contrário dos produtos oriundos do metabolismo primário, são encontrados em concentrações baixas e em apenas alguns grupos de plantas. A utilização de rotas biossintéticas elaboradas pelo vegetal, na síntese de metabólitos secundários, necessita-se grande gasto de energia, o que explica a hipótese de que essa energia é consumida para a produção de compostos necessários à sobrevivência e preservação da planta (TOSCAN, 2010).

Os compostos do metabolismo das plantas originam-se de três rotas metabólicas derivadas da glicose, que são a rota do ácido chiquímico, a rota do acetato e a rota mista, que envolve o ácido chiquímico e o acetato. Da rota do ácido chiquímico originam-se os protoalcalóides, alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos, taninos hidrolisáveis, cumarinas e fenilpropanoides. O acetato é precursor da formação de alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos e esteroidais, terpenóides, esteroides, óleos essenciais, saponinas, heterosídeos cardioativos, ácidos graxos e triacilgliceróis. A rota mista dá origem às antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (ROWAN, 2011)

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Assim sendo, a síntese é afetada por condições ambientais, que podem coordenar ou alterar a taxa de produção. Algumas dessas condições apresentam correlações entre si e não atuam de forma isolada, podendo interferir em conjunto. Exemplos incluem: latitude, época do ano, tipo do solo, índice pluviométrico, temperatura e altitude, dentre outros. É importante ressaltar, também, que os estudos de influência destes fatores na produção de metabólitos secundários geralmente são limitados a grupos restritos de espécies vegetais e devem ser realizados com cautela (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, atuando de forma direta ou indireta no organismo ou sobre microrganismos patogênicos. Geralmente, estes efeitos estão associados à

inibição ou ativação de importantes alvos celulares e moleculares, como mediadores inflamatórios, segundos mensageiros, fatores de transcrição, moléculas, canais iônicos e enzimas (CALIXTO, 2005).

### **2.2.1 Compostos Fenólicos**

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Estes se formam, geralmente, em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). Estes são caracterizadas por possuir um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais (MORAES-DE-SOUZA, 2007).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre. Estes são encontradas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, possuindo grande solubilidade em água e em solventes orgânicos polares. Pelo fato de serem fenólicos, estes são muito reativos quimicamente, possuem geralmente características ácidas, podendo ser isolados por meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas, além disso, podem formar ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (SIMÕES et al, 2010).

Uma característica importante dos compostos fenólicos é sua capacidade de complexação com os metais devido ao fato a formação de quelatos metálicos, que são importantes em diversos sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, também apresentam intensa absorção na região do ultravioleta. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, de luz, de calor ou em meio alcalino, levando ao escurecimento de soluções ou compostos isolados (SIMÕES et al, 2010).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais tanto na forma livre, quanto ligado a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

Ribéreau-Gayon classificou estes compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza (RIBÉREAU-GAYON, 1968 *apud* ANGELO; JORGE, 2007).

A família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza encontra-se um número bem reduzido de estruturas, embora com certa periodicidade. Neste grupo estão os fenóis simples, como o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (SOARES, 2002).

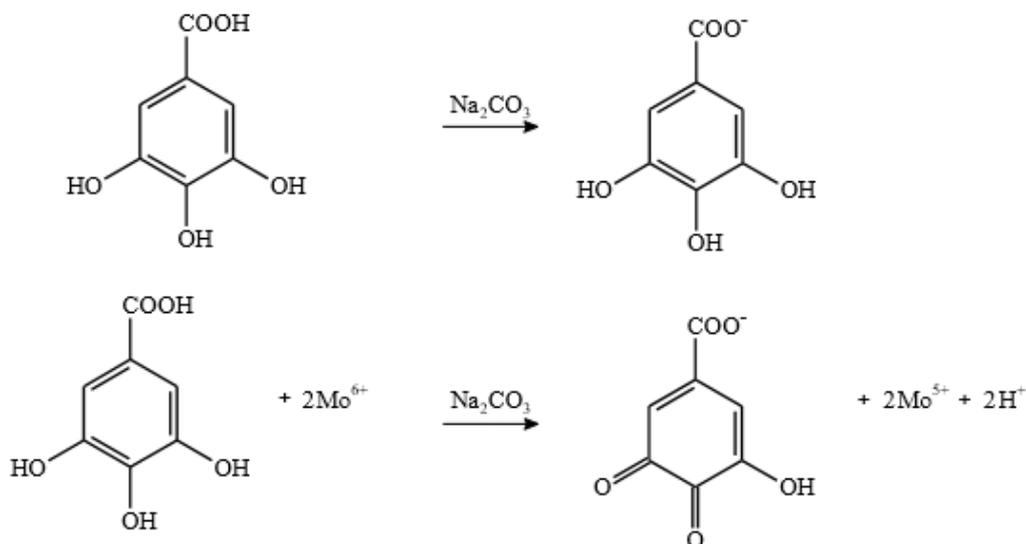
Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas (ANGELO; JORGE, 2007).

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão as substâncias fenólicas geralmente encontradas em todo reino vegetal, mas que por vezes podem estar localizados em uma só planta. Este grupo pode-se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácido benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999).

Portanto, os compostos fenólicos podem ser divididos de diversas maneiras, como os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmico), as cumarinas, os flavonoides, os estilbenos, os taninos condensados e hidrolisáveis, as lignanas e as ligninas. São responsáveis pela cor, pelo sabor amargo, pelo odor e pelas propriedades antioxidantes (KHANAM et al, 2012).

A quantificação espectrofotométrica de substâncias fenólicas é realizada por várias técnicas, entretanto uma das mais utilizadas é a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Este reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstênico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação VI, com coloração amarela. Na presença de compostos fenólicos e solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ocorre uma reação de oxirredução e formam-se os ânions fenolatos; estes, na presença do reagente de Folin-Ciocalteu, geram complexos de molibdênio e tungstênio, de coloração azul, cuja intensidade de cor determina um valor de absorvância específico, conforme a Figura 1 (OLIVEIRA et al, 2009).

Figura 1. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu.



Fonte: OLIVEIRA et al, 2009.

Apesar do método de Folin-Ciocalteu ser muito utilizado para estimar conteúdo de compostos fenólicos em diversos extratos vegetais, ressalta-se que este é capaz de interagir também com compostos não fenólicos, como açúcares e metais, podendo resultar em falsos positivos e superestimados de fenóis totais. Sendo assim, alguns autores sugerem que os resultados obtidos através desta metodologia devem ser interpretados como uma estimativa da capacidade redutora total das amostras analisadas (IKAWA et al., 2003).

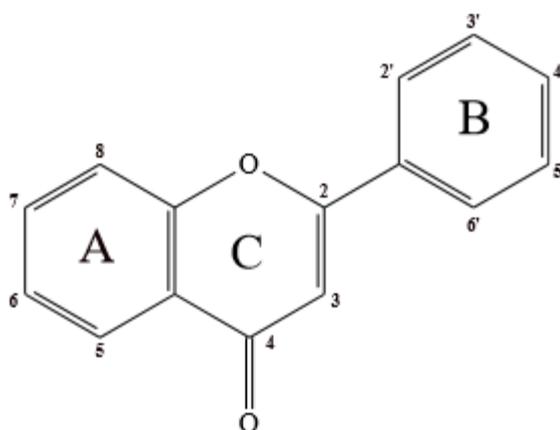
Dentre os compostos fenólicos mais comuns nas espécies do gênero *Campomanesia* sp, podem destacar-se os flavonoides e os taninos.

#### 2.2.1.1 Flavonoides

Flavonoides é um grupo de substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis, muito encontrados em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho (MIDDLETON, 1998). Estes produtos naturais eram conhecidos pelos seus efeitos benéficos sobre a saúde muito antes de serem

isolados. Mais de 4000 variedades de flavonoides foram identificadas, muitos dos quais são responsáveis pelas cores atraentes das flores, frutos, e as folhas (DE GROOT; RAUEN, 1998 *apud* NIJVELDT et al, 2001). São substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos C6-C3-C6, constituídos por dois anéis aromáticos C6 (A e B) e um anel intermediário C3 (anel C) que geralmente contém um átomo de oxigênio conforme a Figura 2 abaixo (LOPES et al, 2000).

Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides

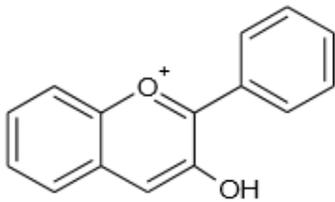
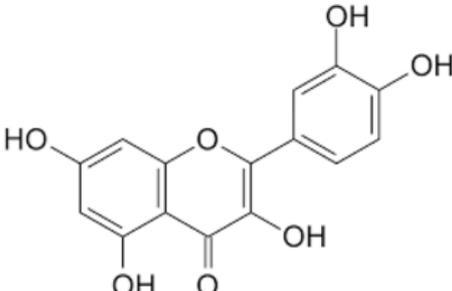
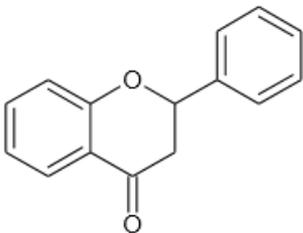
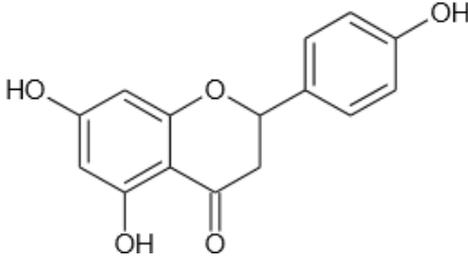
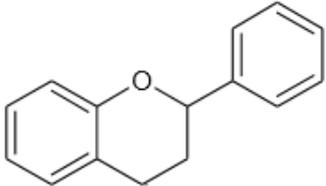
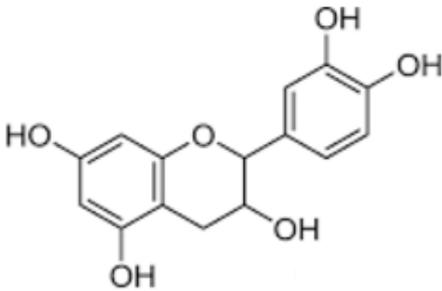
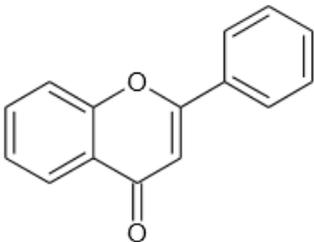
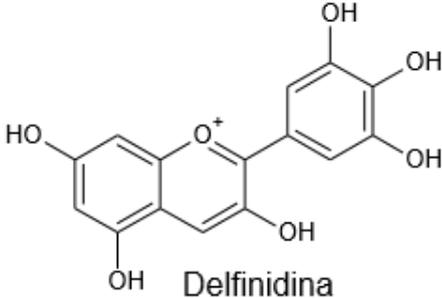


Fonte: DORNAS et al, 2007.

Com grande frequência, os flavonoides apresentam-se oxigenados e conjugados com os açúcares. São denominados de O-heterosídeos quando a ligação se dá através de uma hidroxila e C- heterosídeos quando a ligação é através de um átomo de carbono. A posição ocupada pela porção açúcar, o grau de insaturação e o grau e a natureza dos substituintes influem grandemente na solubilidade da molécula e na sua capacidade de precipitação em presença de metais (SIMÕES et al, 2010).

Os flavonoides podem ser divididos em várias classes com base na sua estrutura molecular, sendo os principais 4 grupos de flavonoides listados na Tabela 1, bem como os membros mais conhecidos de cada grupo.

Tabela 1 - Estruturas moleculares dos 4 principais grupos dos flavonoides

Grupo	Estrutura molecular	Exemplo
Flavonas		 Quercetina
Flavanonas		 Naringina
Catequinas		 Catequina
Antocianidinas		 Delphinidina

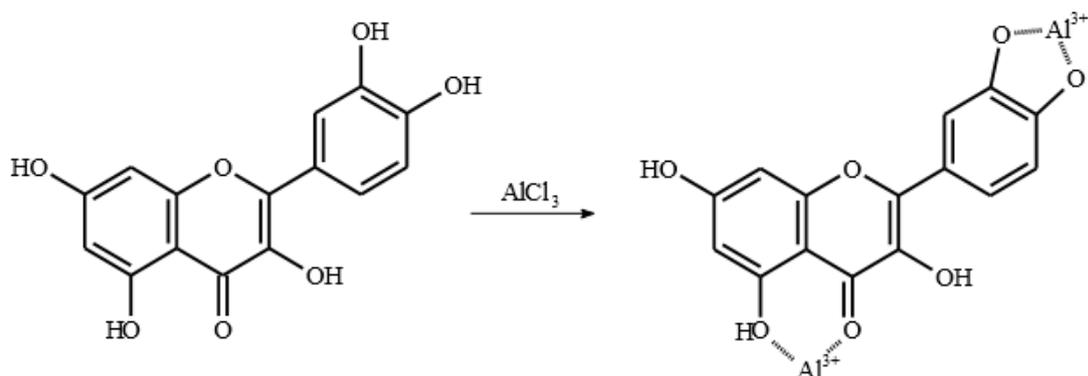
Fonte: Simões 2010

Há vários estudos que relacionam os flavonoides com a atividade biológica frente a algumas doenças. Estes podem atuar como antioxidante, diminuir a proliferação celular em tumores, reduzir colesterol, mobilização de

leucócitos, atuar na ativação da via Complemento, quelar com alguns metais, antitrombogênico entre outras (NIJVELDT et al, 2001).

O método para determinar o teor de flavonoides baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com os flavonoides (Figura 4) em metanol ou em etanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, o desvio da absorvância para comprimentos de onda maiores e a intensificação da absorção. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, onde os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), por isso não interferem no doseamento de flavonoides (WOLLENWEBER et al, 1998; KALIA, 2008).

Figura 3. Complexo formado entre o flavonoide (quercetina) e alumínio



Fonte: WOLLENWEBER *et al*, 1998

### 2.2.1.2 Taninos

Os taninos são, geralmente, encontrados na natureza sob a forma de ésteres solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem compostos fenólicos estes são muito reativos quimicamente e formam pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. São facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, que ocasiona o escurecimento de suas soluções (AZEVEDO et al, 2014).

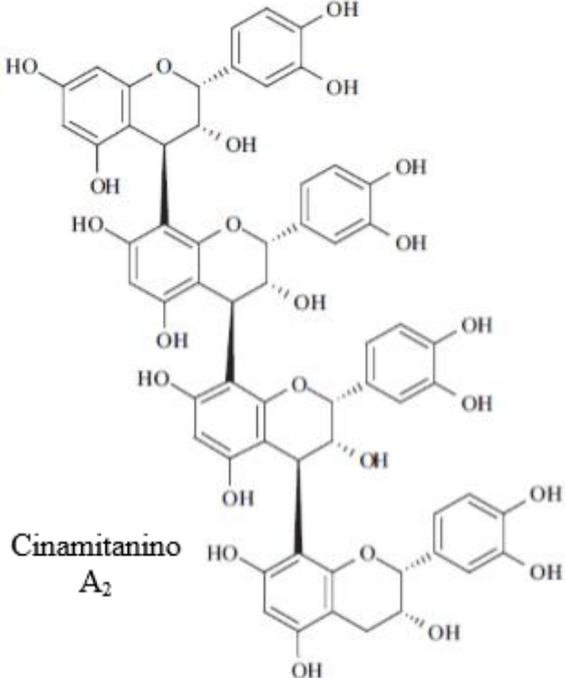
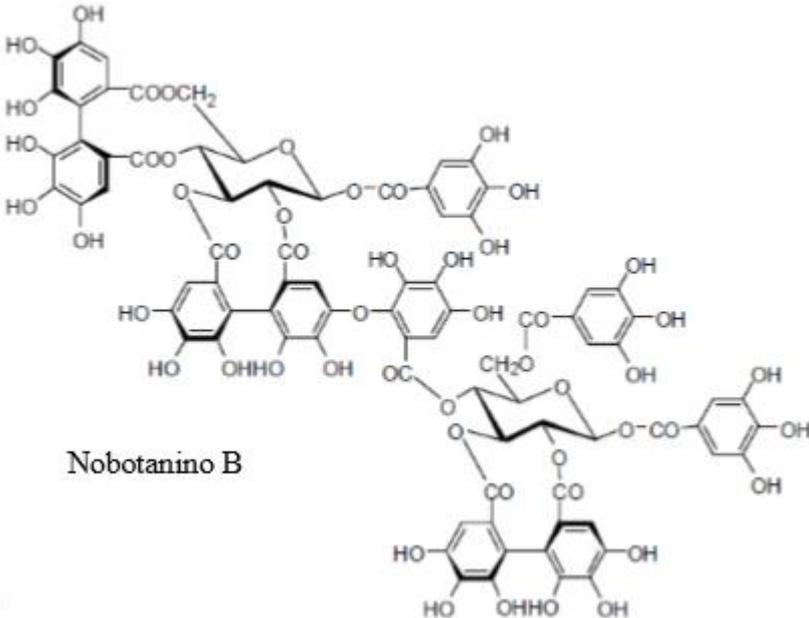
Os taninos possuem alto peso molecular, constituem uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (OSZMIANSKI et al, 2007).

Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas, provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO et al, 2005).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas pertencente ao açúcar são esterificados juntamente com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os taninos gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (BURNS et al, 2000).

A tabela 2 mostra estruturas de taninos hidrolisáveis e condensados.

Tabela 2 - Estrutura de tanino condensado e hidrolisável

Estrutura	Classificação
 <p data-bbox="209 952 391 1019">Cinamitanino A<sub>2</sub></p>	<b>Tanino</b>
 <p data-bbox="309 1624 486 1657">Nobotanino B</p>	<b>Tanino Hidrolisável</b>

Fonte: Simões 2010

As aplicações de drogas, vegetais ou não, contendo taninos em sua composição estão relacionadas, em grande parte, à suas propriedades adstringentes. Por via interna, estes exercem efeito antidiarreico e antisséptico e

por via externa, impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (BRUNETON,1991 *apud* MONTEIRO et al, 2005).

Os taninos são considerados nutricionalmente indesejáveis, pois precipitam proteínas, inibem enzimas e afetam a utilização de vitaminas e minerais (MONTEIRO et al, 2005).

Há diversos métodos que podem ser utilizados para identificação e quantificação de taninos. Na tabela 3 abaixo, mostra algumas das metodologias empregadas.

Tabela 3 - Metodologia para identificação e quantificação de taninos

<b>Nome do ensaio</b>	<b>Tipo do ensaio</b>
Follin-Ciocalteau	químico, colorimétrico
Vanilina	químico, colorimétrico
Precipitação de proteínas	precipitação
HPLC	HPLC
NaNO <sub>2</sub> Enzimático	químico, colorimétrico inibição enzimática
Inibição do crescimento microbiano	toxicológico

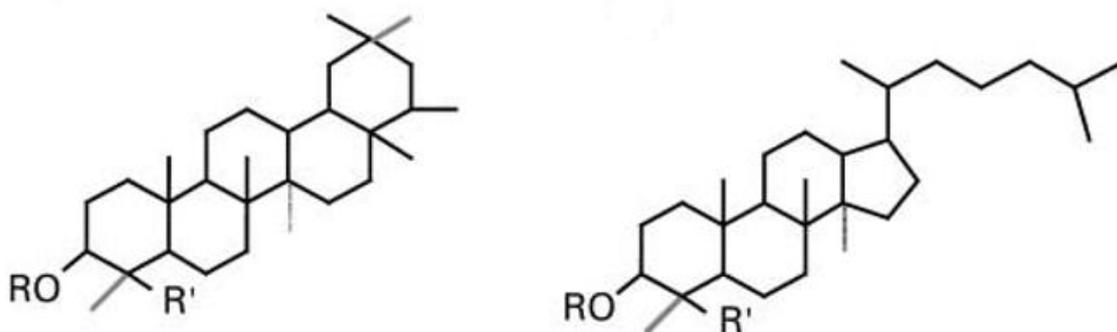
Fonte: Oliveira et al, 1991.

### 2.3 SAPONINAS

As saponinas são glicosídeos naturais tensoativos. Estas são produzidas principalmente pelos vegetais, mas pode também ser produzida pelos animais marinhos e algumas bactérias (RIGUERA, 1997). Eles derivam seu nome da sua

capacidade de formar espumas de sabão, sendo estáveis em soluções aquosas. Este metabólito tem atraído interesse da humanidade desde os tempos antigos devido a estas propriedades citadas. As saponinas consistem em uma porção de açúcar normalmente contendo glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose, ramnose ou metilpentose, ligadas (por uma ligação glicosídica) a um aglicona hidrofóbica (sapogenina) que pode ser triterpenóide ou esteroides naturais conforme a figura 5. A aglicona pode conter uma ou mais ligações insaturadas C-C. A cadeia de oligossacarídeo é normalmente ligada na posição C3 (monodesmosídicas), mas muitas saponinas têm uma porção de açúcar adicional na posição C26 ou C28 (bidesmosídicas). A grande complexidade da estrutura saponina é devido à variabilidade da estrutura da aglicona, a natureza das cadeias laterais e a posição de fixação destas porções sobre a aglicona (FRANCIS et al, 2002).

Figura 4. Estrutura básica das sapogeninas: 1) triterpenóide e 2) esteroide



Fonte: FRANCIS *et al*, 2002

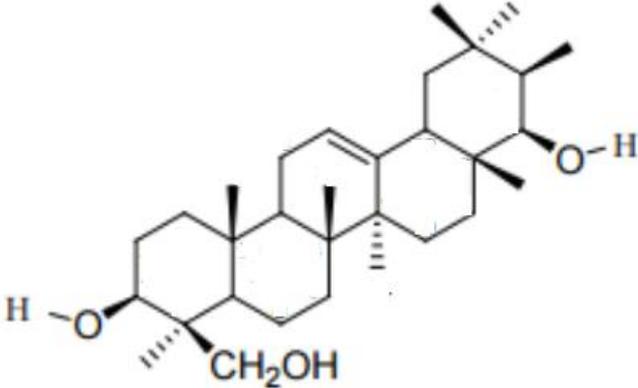
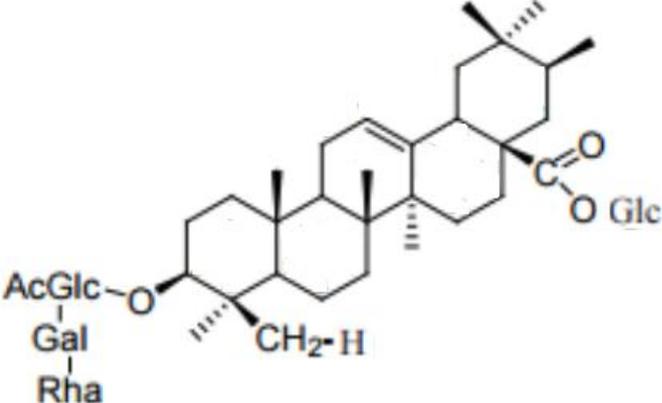
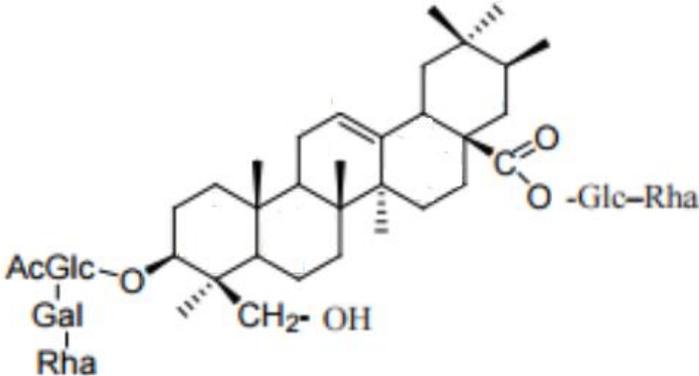
O caráter ácido das saponinas é devido à presença de grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária, como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais (SIMÕES et al, 2010).

As saponinas são substâncias que são derivadas do metabolismo secundário das plantas, sendo relacionadas, principalmente, com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque

fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos considerando-se parte do sistema da defesa das plantas. (FRANCIS et al, 2002).

A tabela 4 mostra algumas estruturas de saponinas.

Tabela 4 - Exemplos de estrutura de saponinas

Estrutura	Nomenclatura
	Sojassapogenol A
	Lablabosideo A
	Lablabosideo C

A natureza química das saponinas exige técnicas muito bem elaboradas e sofisticadas para o seu isolamento, elucidação da estrutura e análise. A tarefa de isolamento de saponinas a partir de material vegetal é também complicada pela ocorrência de muitas substâncias intimamente relacionadas nos tecidos das plantas. Assim, por muitos anos, a caracterização completa de plantas contendo saponinas, mesmo bem conhecidas, não foi alcançada (FRANCIS et al, 2002).

Para identificação de saponinas, utilizam-se métodos corriqueiros e de fácil execução, partindo das propriedades físico-químicas desta classe. Um dos testes utilizados para constatar a presença deste metabólito é o teste de índice de espuma, que avalia a quantidade de espuma formada pelo extrato contendo saponina.

## 2.4 ASPECTOS BOTÂNICOS

### 2.4.1 Família Myrtaceae

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas no Brasil, concentrada em apenas uma única tribo (Myrteae) e três subtribos (Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae). É considerada uma das famílias com grande representatividade no Brasil, com distribuição de suas espécies em todos os biomas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). A família compreende cerca de 100 gêneros e mais de 3.000 espécies de árvores e arbustos, com distribuição por todos os continentes, com exceção à Antártida, tendo grande predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

No geral, as mirtáceas brasileiras não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, na utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local (MARCHIORI; SOBRAL 1997). Por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente (a goiabeira (*Psidium guajava*), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e a gabioba (*Campomanesia xanthocarpa*). Essas espécies representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais. Algumas dessas estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia

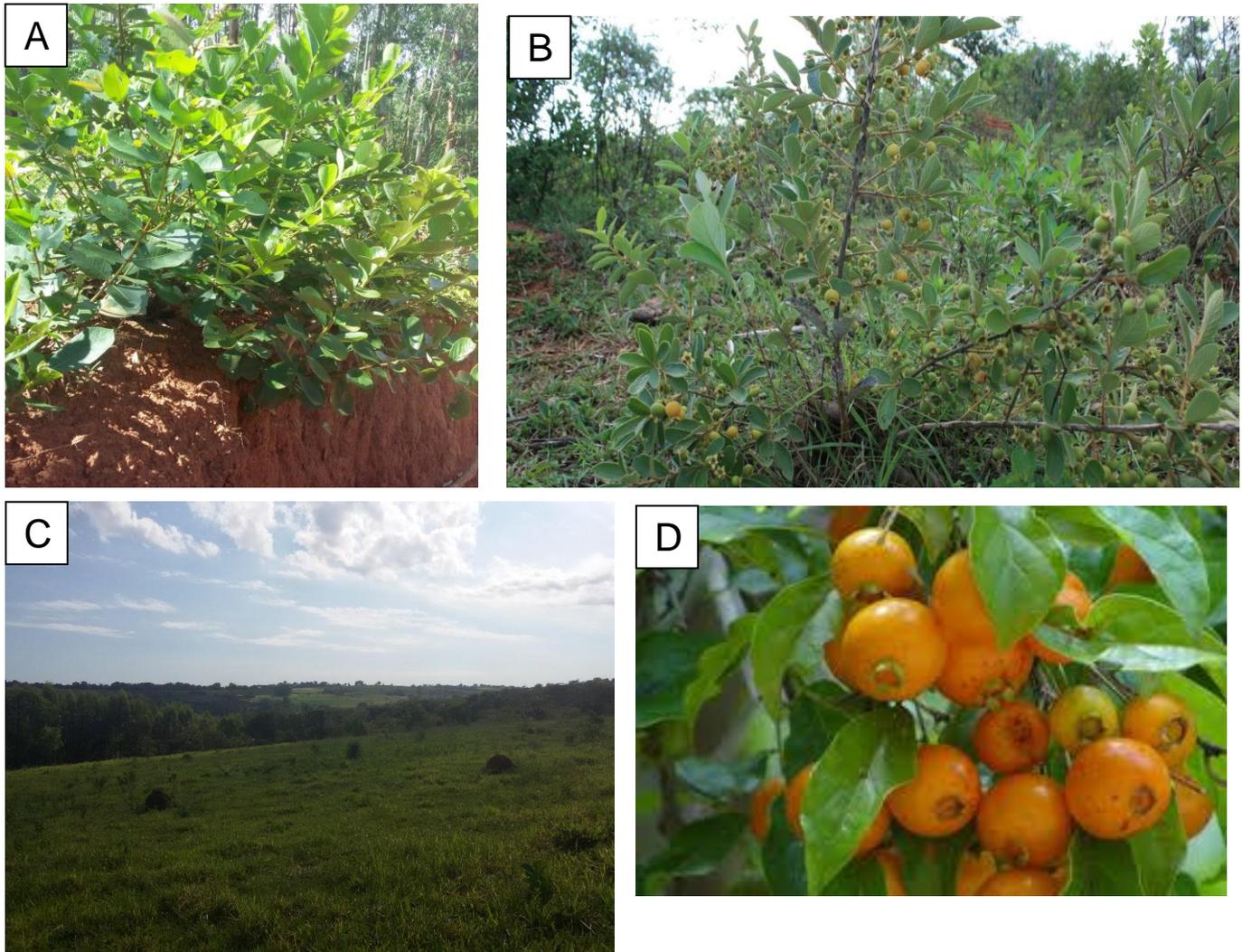
(LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

#### **2.4.2 *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg**

*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. é uma Myrtaceae frutífera lenhosa, pertencente a uma das 3.600 espécies distribuídas em mais de 100 gêneros que compõem esta família botânica (BARROSO, 1991 *apud* VALLILO,2008). É conhecida popularmente por diversos nomes como “guabirobeira”, “gabiropa”, “guabiroba”, “gabiropa”, “guavirova”, “guabiroba-miúda” e “guabirobeira-domato”. É uma espécie encontrada no Cerrado e mata Atlântica brasileira, sendo distribuída geograficamente em Minas Gerais e São Paulo, Rio Grande do Sul e nos países Argentina, Paraguai e Bolívia. Seu hábitat é mais expressivo sobre solos úmidos e bem drenados, porém tem boa adaptação a solos secos, compactos e de pouca fertilidade. Sua árvore possui um porte arbóreo, de até 15 metros de altura, apresentando folhagem verde-clara, flores brancas e o fruto do tipo baga, amarelo, suculento, doce e aromático (LORENZI, 2002; HARDER et al, 2004; CORADIN; SIMINSKI; REIS,2011).

A espécie se apresenta como arbusto, arvoreta ou árvore de 10 a 20 m de altura e até 60 cm de diâmetro; os ramos jovens são glabros. As folhas são verdes e opostas, simples, membranáceas, ovalado-oblongas, medindo de 4-10 cm de comprimento por 3-4,5 cm de largura (VALLILO,2008).

Figura 5. *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg



Legenda

Foto A e B: *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg;

Foto C: Habitat da espécie;

Foto D: folha e fruto de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg;

Fonte: Do autor

A classificação taxonômica de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg é feita da seguinte maneira segundo Lorenzi, 2002:

- a) Reino: Plantae
- b) Divisão: Magnoliophyta
- c) Classe: Magnoliopsida
- d) Ordem: Myrtales
- e) Família: Myrtaceae
- f) Gênero: *Campomanesia*
- g) Espécie: *Campomanesia Xanthocarpa*

O nome *Campomanesia* é uma homenagem ao naturalista espanhol Rodrigues de Campomanês e *xanthocarpa* é uma palavra grega que significa fruto (carpos) amarelo (xanthos). Para o plantio de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, esta espécie é pouco exigente quanto ao tipo de solo, podendo se desenvolver naturalmente nos solos pobres em nutrientes. Os frutos das *Campomanesia* sp. se destacam como importante recurso alimentar da fauna, composta por um grande número de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e até répteis. (BIAVATTI et al, 2004).

A madeira de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg é utilizada para tabuado em geral, confecção de instrumentos musicais e cabos de ferramentas. A árvore apresenta copa piramidal densa bastante decorativa podendo ser empregada no paisagismo em geral. É ótima para o plantio em áreas degradadas de preservação permanente. A lenha é apreciada para sapecagem e torrefação da erva mate, pois desprende um aroma agradável durante a combustão (LORENZI, 2002).

Os frutos são de formato redondo e de cor verde quando jovens e amarelos quando maduros, amadurecem de novembro a dezembro, exalando

aroma adocicado e bastante agradável. O tipo de dispersão é zoocórica atraindo, principalmente, as aves, dentre as quais os sabiás, saíras e sanhaços (MORAIS; LOMBARDI, 2006).

Os frutos das *Campomanesia* têm grande potencial econômico, seja como alimento in natura ou na preparação de doces, sorvetes e licores caseiros. Suas flores são indicadas como melíferas. Sua madeira é usada na produção de instrumentos musicais, agrícolas, lenha, carvão, cerca e tabuado. Algumas espécies são indicadas para paisagismo e reflorestamento para recuperação ambiental. Apresenta valor medicinal no combate à disenteria, febre, escorbuto, e doenças das vias urinárias. Estudos realizados nas folhas dessa espécie indicaram a presença de flavonoides, taninos, saponinas e óleo essencial (MARKMAN, 2004).

Ademais, as Myrtaceae estão entre as famílias com maior riqueza específica nas formações vegetais da costa oriental brasileira, especialmente na Mata Atlântica, sendo a identificação de suas espécies condição indispensável para a quantificação da biodiversidade deste ecossistema (LORENZI, 2002).

## 2.5 ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

Além de seu uso generalizado para o consumo, a infusão preparada a partir das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg é utilizada popularmente, como depurativo, antidiarreica, antirreumática e para diminuir o colesterol no sangue. Apesar de seu uso medicinal, há uma falta de investigações sobre as propriedades farmacológicas da planta (ALICE et al, 1995).

FERNANDES; VARGAS, 2003 realizou estudos com os extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, verificando potencial antimutagênico frente a células cancerígenas *in vitro*.

Suas folhas e casca do caule são tradicionalmente empregadas como um remédio para disenteria, problemas de estômago, febre e como agente anti-inflamatório. Estudos químicos das folhas desta planta revelaram a presença de alguns flavonoides como quercetina, miricetina, quercitrina e rutina. As propriedades antioxidantes dos flavonoides e taninos foram correlacionadas com a atividade antiulcerativas, uma vez que os radicais livres são desenvolvidos em

lesões da mucosa gástrica. Os flavonoides têm mostrado atividade citoprotetora em vários modelos de estudos (MARCHAND,2002).

KLAFKE et al, 2011 realizou estudos com extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg e testou em ratos. Avaliando os resultados, constataram-se atividades antifibrinolítica, antiplaquetária e antitrombótica.

VIECILI et al, 2014 trabalhou com a folha de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg seca padronizada e viabilizou-a em forma farmacêutica de capsulas e tratou pacientes de diversas faixas etárias. Constatou-se nos resultados diminuição do LDL em indivíduos com hipercolesterolemia, da redução dos processos oxidativos e de processos inflamatórios após a utilização da droga. Ademais, notou-se também efeito protetor do endotélio.

MARKMAN et al, 2004 fez estudos utilizado extratos etanólicos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg em ratos e constatou atividade antiulcerogênica dos extratos testados em ratos.

VINAGRE et al, 2010 trabalho com o decocto na concentração de 20% p/v preparado a partir das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg e testou em ratos. Avaliando os resultados histopatológicos e bioquímicos, constatou-se atividade antidiabéticas deste decocto.

Como é de conhecimento, vários estudos relatam a presença de flavonoides em *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. Os flavonoides são formados em plantas a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina e malonato (PIETTA,2000).

### **2.5.1 Processo inflamatório**

Durante muito tempo, a inflamação foi considerada como uma patologia e somente a partir do século XVIII, Hunter propôs que esta seria uma resposta benéfica (BIANCHETTI, 2006).

Esta nada mais é do que a reação dos tecidos vascularizados à lesão local. Apesar dos efeitos da inflamação serem frequentemente observados como indesejáveis devido ao desconforto e sensação desagradável causada, são em essência benéficos. Sem as respostas inflamatórias, infecções menores poderiam facilmente se instalar e generalizar pelo organismo (ROCHA, 2006).

A reação inflamatória se desenvolve rapidamente no local de invasão (tecido) pelo agressor para proteção do ser vivo do ataque, restaurando a homeostase do tecido agredido, isolando, destruindo e/ou diluindo o agressor (GALLIN et al., 1992; BLATTEIS, 2006). Esse processo foi descrito pela primeira vez por Cornelius Celsius há cerca de 2.000 anos, descrevendo alguns dos principais sinais da inflamação que ainda são utilizados: calor, rubor, dor e edema. Hoje em dia é usado também um quinto sinal, descrito por Virchow, que é a perda de funções (TROWBRIDGE, 1997; ROCK; KONO, 2008).

O processo inflamatório envolve uma cadeia de ativações enzimáticas, liberação de mediadores, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação. Neste processo, células imunologicamente competentes são acionadas e agem no sentido de inativar ou destruir microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e proteínas, além de iniciar a reparação tecidual (VANE; BOTTING, 1995; GOODMAN; GILMAN, 2007).

Apesar que este mecanismo de defesa seja na maioria das vezes benéfico, efeitos maléficos indesejáveis são bastante comuns. Geralmente, estes são ocasionados por uma resposta excessiva que pode causar lesão tecidual progressiva, como por exemplo, no caso das artrites, onde o processo inflamatório leva à destruição do osso e da cartilagem, comprometendo a função articular, sendo necessário fármacos anti-inflamatórios ou imunossupressivos para modular o processo antiinflamatório (VANE; BOTTING, 1995; ROCHA, 2006).

Em outras palavras, a inflamação é uma resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões meramente locais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, juntos, com a ativação de fagócitos e das células endoteliais. É um processo mediado por diferentes mecanismos, e ocorre em três fases distintas, aguda, evento transitório caracterizado pelos sinais clássicos da inflamação; subaguda, retardada, onde se nota, predominantemente, a infiltração leucocitária e fase crônica, onde está destacado a ocorrência da degeneração tissular e da reparação fibrótica (SANTOS JÚNIOR, 2003). Sendo assim, a inflamação é um processo inflamatório que é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular do tecido endotelial e do influxo de células leucocitárias até o local inflamado.

A inflamação aguda é caracterizada pelo movimento dos leucócitos para a área de lesão ou trauma. As primeiras células fagocitárias que irão responder são, principalmente, os neutrófilos e em seguida macrófagos. Estes fagócitos de vida mais longa ajudam a destruir o agente causador, auxiliam na sinalização do processo de imunidade específica e atuam na resolução do processo inflamatório. A resposta celular dos fagócitos consiste na marginação ou pavimentação das paredes capilares por leucócitos devido ao aumento da adesividade molecular, emigração dos leucócitos, quimiotaxia ou migração positiva das células para o local de adesão, além da fagocitose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Apesar da inflamação ser iniciada pela lesão, seus sinais e sintomas são produzidos através de mediadores químicos, os quais podem ser classificados de acordo com sua função: aqueles com propriedades vasoativas e propriedades de contração dos músculos lisos (histamina), prostaglandinas, leucotrienos e o fator de ativação das plaquetas (FAP); os fatores quimiotáticos, tais como os fragmentos do complemento (C5a) e citocinas (IL-8); as proteases do plasma capazes de ativar o complemento e os componentes do sistema de coagulação, bem como, moléculas reativas e citocinas liberadas dos leucócitos que, uma vez liberadas para o meio extracelular, são capazes de danificar o tecido adjacente (PORTH; KUNERT, 2004).

A histamina é uma molécula hidrofílica, envolvida em diversos processos fisiológicos celulares como nas reações alérgicas e inflamatórias. Esta encontra-se amplamente distribuída por todo o organismo, sendo encontrada em alta concentração nas plaquetas, basófilos e mastócitos. Provoca a dilatação e aumento da permeabilidade capilar. É um dos primeiros mediadores da resposta inflamatória. Seus efeitos fisiológicos incluem aumento da permeabilidade venular pós-capilar, contração do músculo liso, vasoconstrição pulmonar, aumentos dos níveis de GMPc nas células, produção de prostaglandinas, aumento na secreção de ácido gástrico e do muco, e ativação das células T supressoras (SCHNEIDER et al, 2002; RANG et al., 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SCHARAMM; THORLACIUS, 2004; SILVA; CARVALHO; 2004).

As proteases do plasma (cininas), consistem em complementos protéicos ativados e fatores de coagulação. Uma cinina, a bradicinina, um importante

mediador no processo inflamatório, provoca o relaxamento o relaxamento das arteríolas e constrição das vênulas, gerando um aumento da permeabilidade microcapilar e dor (RANG et al., 2004).

As prostaglandinas são moléculas lipossolúveis onipresentes, derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo liberado pelos fosfolípídeos da membrana celular. Diversas prostaglandinas são sintetizadas do ácido araquidônico por meio da via metabólica da ciclooxigenase. Estas possuem diversos efeitos biológicos: vasodilatação, efeito pirógeno, diferenciação de queratinócitos, quimiotaxia de neutrófilos. As prostaglandinas estáveis (PGE1 e PGE2) induzem a inflamação e potencializam os efeitos da histamina e outros mediadores inflamatórios. A prostaglandina tromboxano A2 promove a agregação plaquetária e vasoconstrição (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Os leucotrienos, são formados a partir do ácido araquidônico, porém através da via da lipooxigenase. São mediadores químicos primeiramente descobertos nos leucócitos. A histamina e os leucotrienos são complementares em sua ação e possuem funções semelhante. A histamina é produzida rápida e transitoriamente, enquanto os leucotrienos mais potentes estão sendo sintetizados. Um leucotrieno provoca a constrição lenta e sustentada dos bronquíolos, sendo um importante mediador inflamatório da asma brônquica e das reações imediatas de hipersensibilidade. Os leucotrienos também têm sido descritos como capazes de afetar a permeabilidade das vênulas pós capilares, as propriedades de adesão das células endoteliais, bem como a quimiotaxia e extravasacularização dos neutrófilos, eosinófilos e monócitos (RANG et al, 2004).

As inflamações agudas são, geralmente, autolimitantes e rapidamente controladas pelas defesas do hospedeiro. Podem desenvolver-se durante o processo inflamatório agudo recorrente ou progressivo, ou, ainda, de respostas insidiosas, de baixo grau, geralmente assintomáticas, incapazes de evocar uma resposta aguda. A inflamação crônica é considerada uma inflamação prolongada, na qual a inflamação ativa, a destruição tissular e a tentativa de reparar os danos ocorrem simultaneamente. A inflamação aguda manifesta alterações, como edema e infiltrado predominantemente neutrofílico. A inflamação crônica, por sua vez, é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, por destruição

tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias, e pelas tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular, fibrose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

### **2.5.2 Dor e nocicepção**

A sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo, causando experiência sensorial e emocional desagradável, associada a presença de um estímulo lesivo que ativa respostas protetoras apropriadas (MERSKEY; BOGDUK, 1994; WOOLF; SALTER, 2000). A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (MILLAN, 1999).

Nocicepção é um processo no qual estímulos mecânicos, térmicos e químicos são detectados por fibras nervosas periféricas (BASBAUM et al, 2009). Essa detecção de lesão tecidual ocorre através de transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos do tipo A delta e C, denominadas nociceptores. A intensidade da dor percebida varia consideravelmente, dependendo do humor do indivíduo, da quantidade de distração com relação à dor, e das sugestões positivas ou negativas de outras pessoas, assim como de vários sistemas neurológicos periféricos e centrais que são capazes de modular a transmissão nas sinapses nas vias nociceptivas (UMPHRED, 1994).

Pode-se classificar a dor em quatro tipos principais grupos: nociceptiva ou fisiológica, dor inflamatória, dor neuropática ou dor funcional. A dor nociceptiva ou fisiológica é causada por um estímulo térmico, mecânico ou químico que se manifesta de forma aguda e momentânea. A dor inflamatória é caracterizada por uma lesão tecidual com liberação de mediadores, que em conjunto deflagram um potencial de ação percebido pelo córtex. É uma dor mais tardia que a nociceptiva e a lesão permanece mesmo após o término do estímulo da dor. A dor neuropática é gerada por patologias do sistema nervoso, podendo ser periférica, central, espinhal, talâmica e trigeminal. A dor funcional é caracterizada pela não existência de um estímulo agudo, não há lesão perceptível e não há

inflamação, a sua explicação pode estar na disfunção de neurotransmissores (SCHAILDE; RICHTER, 2004).

A transmissão do estímulo doloroso, assim como sua inibição, envolve diversos mecanismos (LEWIS; CANNON; LIEBESKIND, 1980). A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, que são neurônios diferenciados com função sensitiva cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais ou trigeminal, e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula e na ponte. Os nociceptores estão presentes em todo o corpo e podem ser divididos em três subtipos: mecanoreceptores, com alto limiar, que respondem à pressão; receptores mecanotérmicos, com baixo limiar, que respondem à pressão e calor e os receptores polimodais, que respondem à pressão, calor e estímulos químicos nocivos (NATALINI, 2000). Os mecanoreceptores e os receptores mecanotérmicos são compostos por terminações nervosas livres de fibras A delta, que são fibras mielinizadas e de condução rápida que se projetam nas lâminas II e III da medula. Por outro lado, os receptores polimodais são inervados pelas fibras C, que não são mielinizadas e, portanto, transmitem o estímulo de forma mais lenta. Essas fibras projetam-se nas lâminas I e II, e são estimuladas por mediadores endógenos (NATALINI, 2000). Essas substâncias endógenas que são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesado (prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios e outros) estimulam os terminais nervosos sensitivos agindo em receptores presentes na membrana desses neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor para o estímulo nocivo (BJÖRKMAN, 1995). Mais especificamente, as prostaglandinas e os leucotrienos sensibilizam os terminais aferentes primários, tornando os nociceptores periféricos mais sensíveis à bradicinina. A ativação dos terminais periféricos resulta na liberação de mediadores nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal (TAIWO; LEVINE, 1988; COHEN; PERL, 1990).

### **2.5.3 Atividade antimicrobiana**

As bactérias são parte integral e inseparável da vida na terra. Elas são encontradas em qualquer tipo de ambiente, revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais. Elas estão intrinsecamente

ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam (SANTOS, 2004).

Nos últimos anos, a resistência dos microorganismos patogênicos a diversas drogas aumentou drasticamente devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas. Nos últimos 30 anos, não houve descoberta de novos agentes antimicrobianos, agravando ainda mais o problema da resistência bacteriana (AMOROSO, 2002; SILVA et al., 2010).

De maneira geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos microorganismos resistentes está aumentando e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (AMOROSO, 2002; SILVA et al., 2010).

O conhecimento fisiopatogênico da infecção é indispensável à escolha da terapia anti-infecciosa apropriada, minimizando valores estatísticos e meta-análises de morbidade e mortalidade em todo o mundo, bem como a ocorrência de outras doenças (SILVA et al, 2010).

Os agentes antimicrobianos têm sido utilizados desde o século XVII no tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal deve ter a característica de toxicidade seletiva, ou seja, a substância deve ser eficiente contra o microrganismo alvo, porém deverá ser não tóxico para o ser humano (ARAÚJO, 2011).

Sendo assim, muitos esforços têm sido feitos para descobrir novos compostos antimicrobianos de vários tipos de fontes, como os oriundos de microrganismos, de animais e plantas. Os extratos de diversas plantas são conhecidos por produzir compostos bioativos que reagem com outros organismos no ambiente e inibem o crescimento de bactérias e de fungos. A ampla variedade de metabólitos secundários, tais como os taninos, os terpenóides, as cumarinas, os alcaloides e os flavonoides possuem a atividade antimicrobiana *in vitro* (SHUKLA, 2011).

Existem diversas classes de antimicrobianos disponíveis no mercado contra diversos tipos de microrganismos. Os mecanismos de ação dos antimicrobianos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas podem ser divididos em quatro categorias, incluindo inibição da síntese da parede celular, da função da membrana celular, da síntese proteica e da síntese de ácidos nucleicos (TORTORA; FUNKE, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem, por objetivos, realizar a caracterização química bem como a verificação da atividade biológica dos extratos hidroetanólico seco obtidos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos hidroetanólico seco das folhas, caule e raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg;
- Realizar a triagem e a caracterização química por CCD dos extratos;
- Quantificar, por métodos espectrofotométricos, os teores de fenóis totais e flavonoides;
- Avaliar as atividades antimicrobianas dos extratos;
- Avaliar o efeito antinocepcivo e antiinflamatório do extrato das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, através do teste de Formalina, teste de Von Frey filamento e teste de peritonite induzida por LPS;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas, raízes e caules da espécie *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg foram coletadas às 13 horas, em novembro de 2014, no sul do Estado de Minas Gerais, no município de Paraguaçu, em um campo aberto próximo a mata nativa, sob as coordenadas geográficas longitude 45°49'45" e latitude 21°31'51.7". As coordenadas foram coletadas com o auxílio de um GPS com precisão de 10 metros.

### 4.2 DEPÓSITO DA EXICATA

A exsicata foi depositada e registrada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, campus Alfenas-MG, sob o número de registro 2541. A espécie foi identificada e catalogada pelo Prof. Dr. Flávio Nunes Ramos, do Instituto de Ciências da Natureza – UNIFAL-MG.

### 4.3 SECAGEM E MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL

As folhas, raiz e caule coletados foram dispostas em camadas finas, sendo submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (Solab® SL 102), a 45°C, durante 72 horas. A temperatura da estufa foi controlada por meio de termostato e de termômetro, os quais garantiram a homogeneidade no processo.

Após a secagem, o material vegetal passou por uma divisão grosseira, seguida pela pulverização em moinho de facas (Cienlab® CE 430). O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR SECAGEM

Cerca de 5 g de cada material vegetal fresco foram colocados para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45°C. O material vegetal foi pesado diariamente até o peso constante e os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou de água percentual, pela média de três determinações. As amostras foram pesadas em um tempo pré-estabelecido, de 6 em 6 horas (MELLO; PETROVICK, 2000).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA

O pó das folhas obtido, após a moagem, foi padronizado quanto ao seu tamanho médio de partícula, segundo os critérios especificados pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). Para isto, foram utilizados tamises de malhas 180, 250, 355, 500, 710 e 850 µm, do menor para o maior diâmetro, e um agitador eletromagnético Bertel®.

Inicialmente foi feita a regulagem do reostato, na finalidade de calibrar a intensidade da vibração. Para isto, 50 g do pó a ser analisado foram colocados no tamis mais fino da série escolhida e efetuou-se a tamisação com o conjunto de 6 tamises selecionados, nas intensidades de vibração 1, 3, 5, 7 e 9, durante 2 minutos. De posse desses dados, a vibração foi regulada de acordo com o peneiramento que apresentou o melhor rendimento; no caso, foi escolhida a vibração de número 7. Com a vibração já pré-selecionada, 100 g da amostra foram pesados e transferidos para o tamis de malha 850 µm e submetidos à vibração por 15 minutos. Após o término do tempo, a amostra retida em cada tamis foi removida, transferida para um papel impermeável e pesada.

Em seguida, os tamanhos médios das partículas foram mensurados e a distribuição das partículas foi expressa pela referência à abertura nominal da malha dos tamises utilizados. Para o cálculo do tamanho médio das partículas ( $T_m$ ) foi utilizada a seguinte expressão, dada por Ansel, Popovich e Allen Jr, (2000):  $T_m = [\sum (\% \text{ retida}) \times (\text{abertura média})] / 100$ .

## 4.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS

O preparo do extrato seco das folhas, caule e raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg foi realizado no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e no Laboratório de Farmacognosia da UNIFAL-MG.

O pó obtido foi submetido ao método de extração exaustivo de percolação simples, segundo Prista, Alves e Morgado, (2008). O processo teve início com o intumescimento prévio do pó com etanol 70% (v/v) durante 1 hora fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura de pó + etanol 70% v/v da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou de caminhos alternativos dentro do percolador. O álcool foi adicionado aos poucos, até cobrir a superfície do pó, e a mistura foi deixada em maceração por 48 horas. Após este período, procedeu-se a percolação na vazão de 1-2 mL/min.

Todas as soluções extrativas (percolado) foram concentradas em rotaevaporador (Fisatom® 801), à temperatura de 50°C. Posteriormente, foram congeladas e submetidas ao processo de liofilização nas condições ideais de pressão (380 mmHg), temperatura (-40°C) e tempo (72 horas).

Após a obtenção dos extratos secos, os produtos foram acondicionados em frascos âmbar e mantidos em geladeira, até o momento do uso, identificados.

## 4.7 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A detecção dos principais grupos de substâncias presentes no extrato seco das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg foi obtida por meio de reações químicas qualitativas, que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou de precipitado característico. Os testes foram realizados em triplicata, segundo as metodologias propostas a seguir.

### 4.7.1 Taninos

Uma alíquota de 1 g de extrato seco foi dissolvida em 10 mL de água destilada. Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro. Separou-se cinco porções de 2 mL em tubos de ensaios e adicionou-se separadamente 1 a

2 gotas dos seguintes reativos: solução alcoólica de cloreto férrico a 1% (m/v), acetato de cobre 3% (m/v), solução de gelatina 2,5% (m/v), cloridrato de quinino 5% (m/v), e solução alcoólica de vanilina 1% (m/v) (CARDOSO, 2009).

#### 4.7.2 Catequinas

Em alguns miligramas da droga vegetal, adicionou-se 3 mililitros de metanol e realizou-se a filtração. Foi adicionado 1 mililitro de solução aquosa de vanilina 1% e 1 mililitro de ácido clorídrico concentrado. O surgimento de coloração vermelha intensa é indicativo da presença de catequinas (SIMÕES, 2007).

#### 4.7.3 Flavonoides

A extração foi realizada em um erlenmeyer, adicionando cerca de 1 grama de droga vegetal e 30 mL de etanol 70%. Tampou-se com papel alumínio para aquecimento em chapa até ebulição e fervura por 5 minutos. Em seguida, filtrou-se a droga em papel de filtro pregueado e recolheu-se o filtrado para as reações a seguir.

a) Reação de Shinoda: em um tubo de ensaio imerso em banho de gelo, adicionou-se 2 mililitros do extrato alcóolico juntamente com 3 fragmentos pequenos de magnésio metálico, para finalizar a reação adicionou-se 1ml de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de uma coloração vermelha ou rósea indica que a reação é positiva.

b) Reação com cloreto de alumínio: realizou-se a reação com cloreto de alumínio, pingando o extrato alcóolico sobre um papel de filtro em dois lugares diferentes. Sobre um dos pontos onde foi aplicado o extrato, pingou-se uma solução alcoólica de cloreto de alumínio e observou-se no UV. A presença de mancha fluorescente indica uma reação positiva.

c) Reação com cloreto férrico: em um tubo de ensaio, adicionou-se 2 mililitros de extrato alcóolico e 4 gotas de solução de cloreto férrico. O desenvolvimento de coloração azul esverdeado indica a presença de compostos fenólicos na droga vegetal (SIMÕES, 2007).

#### 4.7.4 Glicosídeos cardioativos

Realizou-se a extração da droga vegetal, utilizando 1 grama da droga juntamente com 30 mililitros de etanol 70% e 8 aquecendo por 5 minutos após a ebulição. Depois de resfriado, o extrato foi filtrado em papel de filtro e colocado em um funil de decantação. Ao funil, adicionou-se 15 mililitros de água destilada e foi feita a extração com 20 mililitros de éter etílico, separando a fase orgânica para a realização das reações.

a) Reação de Liebermann-Burchard: adicionou-se 2 mililitros do extrato etéreo (fase orgânica) em uma cápsula de porcelana, que foi colocada em capela até a evaporação do solvente. Ao resíduo, adicionou-se 1 mililitro de anidrido acético e transferiu-se cuidadosamente para um tubo de ensaio. Foi adicionado lentamente 1 mililitro de ácido sulfúrico concentrado pela parede do tubo de ensaio, em banho de gelo. O aparecimento de coloração vermelho-acastanhada indica a presença de núcleo esteroidal.

b) Reação de Salkowski: adicionou-se 2 mililitros do extrato etéreo a um tubo de ensaio e 1 mililitro de reativo de Salkowski, cuidadosamente em banho de gelo. O desenvolvimento de coloração vermelho-acastanhada confirma a presença de núcleo esteroidal.

c) Reação de Baljet: adicionaram-se mililitros do extrato etéreo a uma cápsula de porcelana, que foi colocada em capela até a completa evaporação do solvente. Ao resíduo, adicionou-se 1 mililitro de solução de ácido pícrico 0,5% e transferiu-se para um tubo de ensaio. Ao tubo, adicionou-se 5 gotas de hidróxido de potássio 5%. O aparecimento de cor alaranjada intensa indica a presença de anel lactônico pentagonal na droga vegetal.

d) Reação de Keller-Kiliani: adicionou-se 2 mililitros do extrato etéreo a uma cápsula de porcelana, que foi colocada em capela até a obtenção do resíduo. Adicionou-se 1 mililitro de ácido acético concentrado e transferiu-se para tubo de ensaio. Ao tubo, foi adicionado 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 2% e 1 mililitro de ácido sulfúrico concentrado pela parede do tubo, de modo que os dois líquidos não se misturaram. O desenvolvimento de um anel vermelho-pardo e o aparecimento de coloração azul-esverdeada na solução acética indica a presença de desoxi-açúcares (SIMÕES, 2007).

#### 4.7.5 Esteróides e triterpenóides

Utilizou-se 50 miligramas da droga vegetal em 3 mililitros de clorofórmio e procedeu-se a filtração. Adicionou-se ao extrato clorofórmico 2 mililitros de anidrido acético. Agitou-se suavemente. Pelas paredes do tubo adicionou-se 1 mililitro de ácido sulfúrico concentrado. A sucessão de cores, de azul evanescente seguido de verde persistente, indica um resultado positivo para esteroides e triterpenóides (SIMÕES, 2007).

#### 4.7.6 Derivados da cumarinas

Utilizou-se 30 miligramas de droga vegetal em 5 mililitros de éter etílico. Concentrou-se em banho-maria até obter 0,5 mililitros. Em um papel de filtro, aplicaram-se gotas da solução etérea, formando duas manchas. A uma delas, adicionou-se 1 gota de hidróxido de sódio 1M. Observou-se à luz ultravioleta. A presença de fluorescência azul na mancha indica reação positiva (SIMÕES, 2007).

#### 4.7.7 Saponinas

A extração foi realizada através do método de decocção. Em um erlenmeyer cerca de 1 grama da droga vegetal em pó juntamente com 20 mililitros de água destilada mantendo à ebulição por 5 minutos.

Filtrou-se através de papel plegueado, após o resfriamento, realizaram-se as seguintes reações:

a) Formação de espuma resistente a ácidos minerais diluídos: em um tubo de ensaio, adicionou-se 5 mililitros da solução obtida anteriormente e agitou-se vigorosamente. Após 10 minutos, adicionaram-se gotas de ácido sulfúrico diluído aos tubos e agitou novamente. A formação de espuma persistente e resistente a ácidos minerais diluídos indica a presença de saponinas na droga vegetal.

b) Hidrólise ácida: ao extrato obtido anteriormente, adicionou-se 10 mililitros de ácido sulfúrico 20% e levou a ebulição por 5 minutos. Filtrou-se em papel de filtro plegueado. Transferiu-se 5 mililitros deste filtrado para um tubo de ensaio e agitou-se vigorosamente. Para outro tubo de ensaio, transferiu-se

o material insolúvel do papel de filtro com o auxílio de aproximadamente 5 mililitros de água destilada. Agitou-se vigorosamente. A presença de material insolúvel indica hidrólise ácida das saponinas da droga vegetal com conseqüente insolubilidade das sapogeninas, assim a não formação de espuma persistente indica a ausência de saponinas (SIMÕES, 2007).

#### **4.7.8 Alcalóides**

Em um erlenmeyer, aqueceu-se cerca de 1 grama da droga vegetal em 30 mililitros de ácido clorídrico a 4%, deixar 5 minutos após a ebulição. O extrato foi filtrado, em papel de filtro. Em seguida, realizou-se a alcalinização do filtrado com hidróxido de amônio até que este atingisse pH 9, verificando com fita indicadora.

Em um funil de decantação, realizaram-se duas extrações com 10 mililitros de clorofórmio. Separou-se 5 mililitros do resíduo orgânico, transferiu-se esta amostra para uma cápsula de porcelana (A) e o restante para outra cápsula (B), que foram colocadas em capela até a evaporação completa da solução etérea.

Reações de Precipitação: o conteúdo da cápsula A foi ressuspenso em 2 mililitros de ácido clorídrico 10% e solubilizado. Separaram-se quatro porções de 0,5 mililitros em 4 tubos de ensaio e adicionaram-se gotas de reagente de Bouchardat, Dragendorff, Bertrand e Mayer respectivamente ao tubo 1, 2,3 e 4, sendo que o aparecimento dos precipitados específicos indica reação positiva para alcaloides (SIMÕES, 2007).

#### **4.7.9 Antraquinonas**

Reação de Borntrager direta: em um erlenmeyer, pesou-se cerca de 0,5 gramas da droga vegetal, adicionou-se 2 mililitros de éter etílico e agitou-se. Com uma pipeta Pasteur, transferiu-se o sobrenadante para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2 mililitros de solução aquosa de hidróxido de amônio

10% ao tubo. O desenvolvimento de coloração vermelha ou violeta na fase aquosa indica a presença de antraquinonas livres.

a) Reação de Borntrager indireta para O-glicosídeos: ao pó da droga anteriormente extraído com éter, adicionou-se 30 mililitros de água destilada e 4 mililitros de ácido clorídrico concentrado, tampou-se com papel alumínio e aqueceu até a fervura, mantendo o aquecimento por cinco minutos. A solução foi resfriada e filtrada em papel de filtro pregueado. Em um funil de separação, extraiu-se a solução aquosa ácida com 8 mililitros de éter etílico. Transferiu-se 2 mililitros da fase orgânica para um tubo de ensaio e adicionou-se 2 mililitros da solução aquosa de hidróxido de amônia (10%). O desenvolvimento de coloração vermelha ou violeta na fase aquosa indica a presença de antraquinonas livres.

b) Reação de Bornträger indireta para C-glicosídeos: em um erlenmeyer contendo a fase aquosa ácida obtida da reação anterior, adicionou-se 8 mililitros de uma solução de cloretoférrico 25% e aqueceu até ebulição, mantendo a solução sob aquecimento por 10 minutos. Após resfriada, a solução foi transferida para um funil de separação e extraída com 8 mililitros de éter etílico. Adicionou-se 3 mililitros da solução de hidróxido de amônio à fase orgânica. O aparecimento de coloração vermelha ou violeta na fase aquosa indica a presença de antraquinonas livres (SIMÕES, 2007).

#### 4.8 TRIAGEM FITOQUÍMICA POR CCD

Os extratos secos das folhas, raiz e caule de *Campomanesia xanthocarpa* foram dissolvidos, separadamente, nos respectivos solventes utilizados nas extrações (etanol), a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg/mL. As análises cromatográficas foram feitas em microplacas de sílica gel 60 F254 (5x5 cm), utilizando uma mistura de acetato de etila, metanol e água (81:11:8) como fase móvel. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para a identificação dos compostos químicos presentes, 10 µL das soluções-amostra e de soluções de padrões autênticos (Sigma®) na mesma concentração (1 mg/mL) – quercetina, ácido gálico, catequina, antraquinona e pilocarpina – foram aplicados a cada uma das placas. Todas as placas foram submetidas à

revelação por luz ultravioleta (UV). Em seguida, cada placa, separadamente, foi submetida a reveladores diferentes: anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C (flavonoides, saponinas, terpenos, taninos e catequinas), NP/PEG (flavonoides), cloreto férrico e reativo de Dragendorff (alcaloides). Todas as classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER, BLADT; ZGAINSKY, 2009).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Alíquotas dos extratos secos das folhas, raiz e caule foram diluídas em etanol absoluto, para se obter uma concentração de 250 µg/mL. 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e em seguida, foram acrescentados aos tubos 2,0 mL de carbonato de sódio a 4% (m/v). Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso. Depois de transcorridas 2 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® TCC 240 A, a 750 nm (correspondente ao pico de absorção dos óxidos de molibdênio e de tungstênio), ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto. Os mesmos procedimentos foram realizados com o ácido gálico em solução etanólica, nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica:  $A = 0,0134C + 0,0109$ , onde C é a concentração de ácido gálico e A é a absorbância a 750 nm. O coeficiente de correlação obtido foi de  $R^2 = 0,9879$ . A quantidade de polifenóis no extrato foi determinada por interpolação da absorbância das soluções-amostra contra a curva de calibração. Os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico – EAG (mg de ácido gálico/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

As alíquotas de cada um dos extratos secos foram diluídas em etanol absoluto, para se obter uma concentração de 500 µg/mL. A 0,5 mL de cada

amostra, foram adicionados 1,5 mL de etanol absoluto. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio hexaidratado 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O volume da solução foi completado para 5 mL com 2,8 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos. Por último, foram feitas as leituras em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® TCC 240 A, no comprimento de onda de 425 nm (correspondente ao pico de absorção do complexo flavonoide-alumínio), ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto. Os mesmos procedimentos foram realizados com a quercetina em solução etanólica, nas concentrações de 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica  $A = 0,0055C + 0,0416$ , onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 425 nm e o coeficiente de correlação foi de  $R^2 = 0,9979$ . A quantidade de flavonoides foi determinada pela interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração e os valores foram expressos como equivalentes de quercetina – EQ (mg de quercetina/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata (KALIA et al., 2008).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Todos os experimentos de avaliação de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG, sob colaboração e supervisão da professora Dr<sup>a</sup>. Amanda Latércia Tranches Dias. Na avaliação do perfil de sensibilidade, foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas de 50% do crescimento (MIC50) e de 90% do crescimento (MIC90). As determinações dos valores de concentrações inibitórias foram realizadas segundo a metodologia de microdiluição em caldo, conforme documento M27-S4 (CLSI, 2012) para leveduras. O meio de cultura utilizado foi o caldo Müeller-Hinton. Os ensaios foram realizados com leveduras padrões (ATCC), tanto oportunistas como patogênicos. As leveduras utilizadas no ensaio foram *Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. As amostras de fungos foram mantidas em agar Sabouraud a 8°C, até o momento da realização dos testes. Os extratos secos das folhas, raiz e caule foram avaliados nas concentrações de 1000; 500; 250;

125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81; 3,9 e 1,95 µg/mL, em DMSO. O solvente DMSO também foi acrescentado no meio de cultura, nas mesmas concentrações dos extratos, e foi utilizado no ensaio como controle negativo. Fluconazol foram utilizados como drogas padrões para os fungos. Todos os testes foram realizados em triplicata. Além disso, foram determinados outros parâmetros para os resultados com MIC50 menores do que 100 µg/mL, como a atividade antimicrobiana total (AT), o índice de susceptibilidade (ISM%) e o percentual de atividade (P%), segundo as metodologias descritas nos trabalhos de Bonjar, (2004), e Eloff, (2004). A atividade antimicrobiana total (AT) foi calculada como a razão entre a quantidade do material extraído por 1 g de planta e a concentração inibitória mínima, através da seguinte expressão:  $AT = \text{Rendimento} / \text{MIC50}$ .

O índice de susceptibilidade (ISM%) foi calculado como a razão entre o número de extratos efetivos contra cada microrganismo e o total de extratos vegetais testados, segundo a expressão:  $ISM\% = (n1 / n2) \times 100$ , em que n1 é o número de extratos efetivos para cada microrganismo e n2 é o número total de extratos analisados. O percentual de atividade (P%) foi calculado como a razão entre o número de cepas susceptíveis aos extratos vegetais e o total de cepas microbianas testadas. Os resultados foram multiplicados por 100 e expressos em porcentagem, segundo a expressão:  $P\% = (C / T) \times 100$ , em que C é o número de cepas susceptíveis e T é o número total de cepas usadas no teste.

#### 4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCEPTIVA

No estudo biológico serão realizados testes para avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato seco das folhas para verificar o uso popular da gabiropa (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) como planta medicinal nestas patologias

##### 4.12.1 Modelo Animal

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25 ± 5g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*, durante todo

experimento, garantida sua adaptação por 3 dias em sala climatizada a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e foram mantidos sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h. Ao término, os animais foram sacrificados com isoflurano. Para os experimentos, os animais foram subdivididos e mantidos separadamente em grupos.

#### **4.12.2 Atividade antiinflamatória e antinoceptiva**

##### 4.12.2.1 Teste da formalina

Este teste foi realizado utilizando 6 grupos de 8 camundongos, os quais foram tratados da seguinte forma:

Grupo 1: Veículo água destilada v.o.;

Grupo 2: Extrato hidroetanólico da folha de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (10mg/Kg, v.o.);

Grupo 3: Extrato, 100mg/Kg, v.o.;

Grupo 4: Extrato, 1000mg/Kg, v.o.;

Grupo 5: Indometacina, 5 mg/Kg, v.o.;

Grupo 6: Morfina, 10 mg/Kg, i.p.

Após 1 hora do tratamento dos grupos 1 ao 5, e 30 minutos do tratamento do grupo 6 aplicou-se subcutaneamente 20 $\mu\text{L}$  de solução de formaldeído a 2,5% na região plantar da pata traseira direita dos animais e no grupo 1 aplicou-se 20 $\mu\text{L}$  salina. Imediatamente observou-se então o tempo que os animais levaram lambendo a pata que recebeu a solução de formalina durante 5 minutos após a aplicação e por mais 10 minutos após 20 minutos da aplicação do estímulo nociceptivo (VILELA et al., 2009).

##### 4.12.2.2 Teste de Von Frey

Neste modelo experimental, administrou-se uma injeção intraplantar de carragenina e a tensão medida por filamentos de Von Frey (Stoelting, Chicago, EUA) segundo o método up and down. Este método foi padronizado para medir

(em g) o limiar da alodínia mecânica de cada camundongo, segundo a metodologia de Chaplan et al (2000). Foram utilizados uma série de filamentos (0,6g, 1,0g, 1,4g, 2g e 4g) aplicados em ordem crescente para determinar o limiar de retirada da pata. A tensão aplicada na pata foi repetida até que se consigam três medidas similares. Cada camundongo foi colocado em uma caixa de acrílico (12x10x17 cm de altura), por 30 minutos antes do teste. Durante esse período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com os filamentos e, após esse período, a leitura basal foi realizada.

Em seguida os animais receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1: Veículo água destilada v.o.;

Grupo 2: Veículo água destilada v.o.;

Grupo 3: Extratos aquosos de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, 10mg/Kg,

v.o.;

Grupo 4: Extrato, 100mg/Kg, v.o.;

Grupo 5: Extrato, 1000mg/Kg, v.o.;

Grupo 6: Indometacina, 10 mg/Kg, v.o.;

Após uma hora do tratamento, os animais do grupo 2 ao 6 receberam uma injeção intraplantar de carragenina de 20 $\mu$ L 100 $\mu$ g/pata e o grupo 1 injeção intraplantar de salina. Após a administração intraplantar de carragenina e salina, registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal com os filamentos a cada intervalo nos tempos de meia hora a quatro horas da aplicação da carragenina.

#### 4.12.2.3 Peritonite induzida por LPS

No teste de peritonite induzida por LPS, foram utilizados 5 grupos de 8 camundongos, os quais foram tratados da seguinte forma:

Grupo 1: Veículo água destilada v.o.;

Grupo 2: Extrato hidroetanólico da folha de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg 10 mg/Kg v.o.;

Grupo3: Extrato, 100 mg/ Kg v.o.;

Grupo 4: Extrato, 1000 mg/ Kg v.o.;

Grupo 5: Indometacina v.o. 10 mg/ Kg;

Após 1 hora de tratamento, cada camundongo dos grupos 2 ao 5 recebeu uma injeção via intraperitoneal de lipopolissacarídeos (LPS) de *E. coli* 026:B6 (100 µg/Kg) em solução salina estéril, isenta de pirógenos e no grupo 1 cada camundongo recebeu injeção intraperitoneal de salina. Após 4 horas da injeção de LPS, os camundongos foram sacrificados por superdosagem de isoflurano via inalatória e as células foram coletadas via injeção de 3,0 mL de PBS contendo 0,5% de citrato de sódio. O abdômen do camundongo foi delicadamente massageado para desprendimento das células da cavidade. Esta suspensão de células livres de sangue foi aspirada com auxílio de uma seringa. O lavado abdominal foi acondicionado em tubos plásticos e, posteriormente, foi realizada contagem de células utilizando a câmara de Neubauer (Cunha et al., 1989; Vilela et al., 2010).

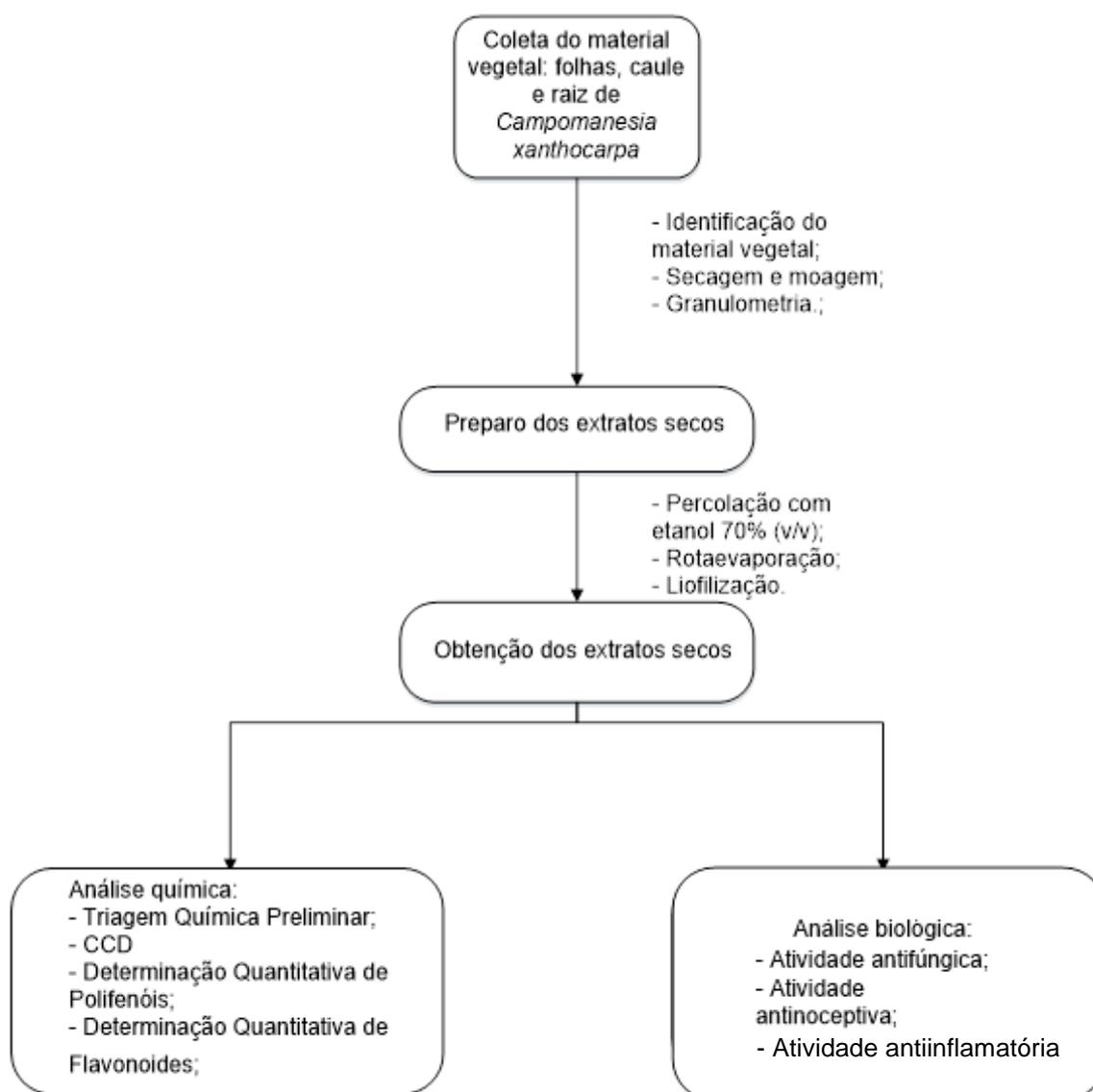
#### 4.12.2.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman - Keuls. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

## 5 FLUXOGRAMA DOS TESTES ENVOLVIDOS

A figura 6 mostra, resumidamente, o fluxograma dos procedimentos empregados no estudo.

Figura 6. Fluxograma representativo dos procedimentos utilizados no estudo.



Fonte: do autor

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 DETERMINAÇÃO POR PERDA DE SECAGEM

Concomitantemente ao processo de secagem da espécie vegetal, determinou-se a perda por dessecação. A estabilização de uma amostra de 4,427 g da droga vegetal deu-se após 72 horas do início do processo de secagem, com a obtenção de uma massa constante de 2,222 g, após três pesagens consecutivas. O resultado obtido foi de 50,192%  $\pm$  0,67 de perda de água e/ou de substâncias voláteis durante a secagem. A determinação da perda por secagem tem o objetivo de impedir que a droga permaneça úmida, após uma secagem ineficiente, ou que ocorra a deterioração dos metabólitos secundários de interesse por secagem excessiva (MELLO & PETROVICK, 2000).

A determinação do teor de água e/ou substâncias voláteis representa um dos parâmetros da qualidade do processo de secagem e da garantia de conservação das drogas vegetais. O valor encontrado no presente estudo encontra-se dentro do intervalo de valores estabelecidos pelos compêndios oficiais, o que indica uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal (COSTA et al., 2009).

A importância da determinação da perda por secagem está diretamente relacionada à estabilidade microbiológica da matéria-prima vegetal, pois este parâmetro expressa a vulnerabilidade do material em permitir o crescimento de fungos e bactérias. Sendo assim, deve-se considerar também a estabilidade química, representada principalmente pelos processos de hidrólise, que podem degradar os metabólitos secundários presentes na composição do material vegetal (NUNES et al., 2009).

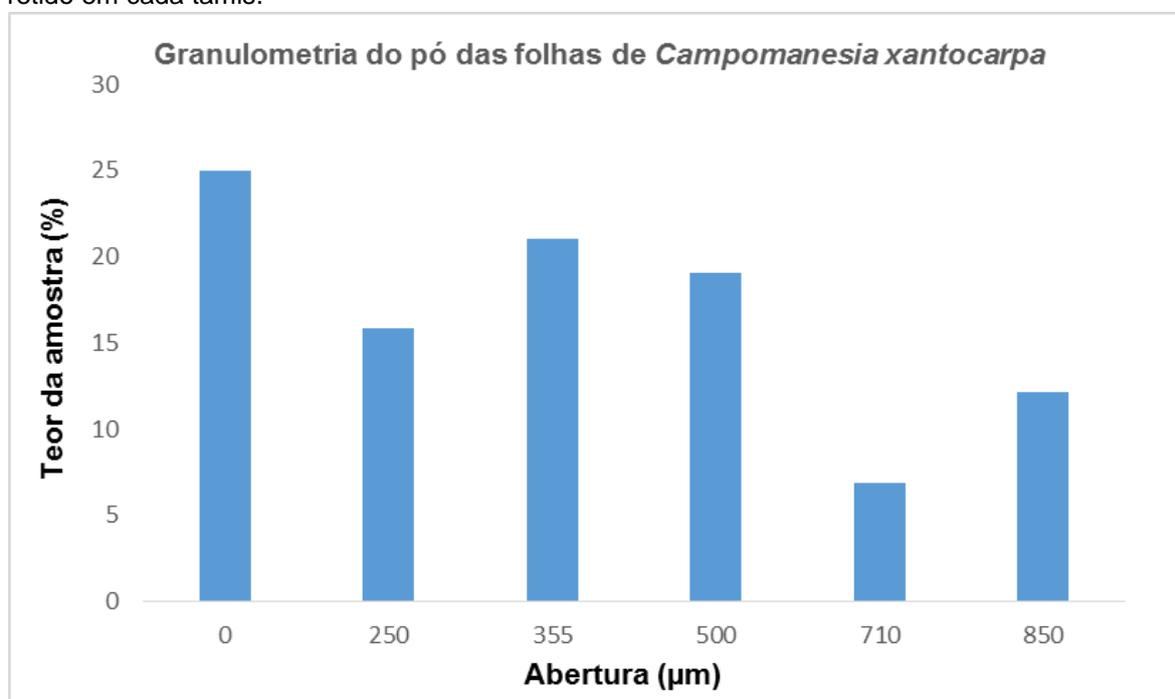
Do ponto de vista tecnológico, é importante conhecer o conteúdo de água e/ou substâncias voláteis em uma matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento. Assim, a determinação da perda por secagem é um ensaio de grande relevância para a produção de fitoterápicos (NUNES et al., 2009). Sendo assim, este parâmetro deve ser avaliado na seleção das operações produtivas, na manipulação e na seleção das condições

de armazenamento do material vegetal, bem como do material de acondicionamento (MENDEZ et al., 2011).

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA

Realizou-se a análise granulométrica do pó obtido das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*. Os resultados, mostrados no histograma abaixo (Figura 7), mostram que a maioria das partículas estão localizadas na faixa granulométrica de 250 a 355  $\mu\text{m}$ .

Figura 7. Distribuição da porcentagem do pó das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* retido em cada tamis.



Fonte: do autor

Sabe-se que, de acordo com os dados descritos na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010), o pó obtido das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* pode ser classificado como um pó moderadamente grosso, definido por apresentar partículas que passam, em quase sua totalidade, pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu\text{m}$  e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250  $\mu\text{m}$ .

Sabe-se que as granulometrias dos pós interferem diretamente na qualidade do processo extrativo. A mistura de pós será mais fácil e mais

uniforme, se as partículas dos materiais forem, aproximadamente, do mesmo tamanho extração (MENDES et al., 2011).

Os pós de tamanho de partícula maior, como os desta classificação, são mais favoráveis aos processos extrativos, pois as partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando assim a viscosidade do meio e isso impede a penetração de solventes. O pó moderadamente grosso apresenta, também, a vantagem de evitar a formação de aglomerados, já que as partículas muito pequenas quando em contato com o líquido extrator podem entupir os filtros de percoladores durante os processos de extração (MENDES et al., 2011).

O pó obtido, após a moagem no moinho de facas, apresentou partículas não homogêneas. Dessa forma, faz-se necessário realizar a determinação do tamanho médio das partículas do pó das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, através da granulometria. A tabela 5 abaixo, expressa os resultados obtidos.

Tabela 5 – Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de *Campomanesia xanthocarpa*

Abertura da malha (µm)	Abertura média (mm)	Peso retido* (g)	Peso retido (%)	% retida x abertura média
0**	0,090	25,09	25,03	2,253
250	0,303	15,89	15,86	4,806
355	0,423	21,09	21,04	8,900
500	0,675	19,09	19,05	12,856
710	0,780	6,89	6,87	5,356
850	0,850	12,17	12,14	10,319
		100	100	44,49

Nota: \*Média de três determinações;

\*\*Fundo coletor.

Fonte: do autor.

De acordo com os dados da Tabela 5, calculou-se o tamanho médio da partícula, através da equação de Ansel, Popovich e Allen Jr, (2000):  $T_m = [\sum (\% \text{ retida}) \times (\text{abertura média})] / 100$ . O tamanho médio encontrado para as partículas do pó vegetal foi de 0,445 mm.

### 6.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Os resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato seco foram referentes ao desenvolvimento de coloração e/ou de precipitado característico dos grupos de substâncias presentes na droga vegetal. Os resultados das análises estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Análise fitoquímica preliminar do extrato seco das folhas de *Campomanesia Xanthocarpa*

<b>Constituintes analisados</b>	<b>Reações químicas</b>	<b>Resultado obtido</b>
<b>Antraquinonas</b>	Reação de Borntrager direta	Negativo
	Reação de Borntrager indireta	Negativo
<b>Saponinas</b>	Espuma persistente	Positivo
	Hidrólise ácida	Positiva
<b>Alcaloides</b>	Reagente Mayer	Negativo
	Reagente Bouchardat	Negativo
	Reagente Dragendorff	Negativo
<b>Taninos</b>	Reação com cloreto férrico	Positivo
	Reação com acetato de cobre	Positivo
	Reação taninos condensados	Positivo
<b>Flavonoides</b>	Reação de Shinoda	Positivo
	Reação Cloreto Férrico	Positivo
	Reação Cloreto de Alumínio	Positivo
<b>Glicosídeos cardioativos</b>	Reação de Liebermann-Buchard	Positivo
	Reação de Salkowski	Positivo
	Reação de Bajlet	Negativo
	Reação de Keller-Kiliani	Negativo
<b>Esteroides e Triterpenóide</b>	Reação Anidrido Acético	Positivo
<b>Derivados de cumarinas</b>	Reação Luz UV	Negativo
<b>Catequinas</b>	Reação Vanilina	Positivo

Fonte: do autor

Dentre os grupos de metabólitos secundários pesquisados nos ensaios fitoquímicos (tabela 6), foi possível identificar saponinas, taninos, flavonoides, catequinas, esteroides e triterpenóides.

Na identificação de saponinas, ocorreu a formação de espuma persistente e resistente a ácidos minerais diluídos indicando a presença de saponinas na droga vegetal, sendo a espuma de 5 milímetros de espessura. No teste de hidrólise ácida das saponinas da droga vegetal ocorreu a precipitação, uma vez que o ácido realizou a hidrólise e formou um precipitado (sapogeninas) que é insolúvel em água (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009).

Na identificação de taninos, a reação com cloreto férrico observou-se o aparecimento de uma nítida coloração amarronzada, que é indicativo da presença de taninos. Para as reações com acetato de cobre, constatou-se o aparecimento de turvação, indicando a presença de taninos. Na reação para taninos condensados, houve o aparecimento de coloração vermelha, portanto, detectou-se a presença de taninos condensados (WAGNER et al, 2009).

Na identificação de flavonoides, a reação de Shinoda (reação da cianidina), observou-se a coloração avermelhada, sendo a reação positiva. Na reação com o cloreto de alumínio, houve a manifestação de fluorescência verde amarelo intensa, característica, indicando a presença de compostos flavônicos. Na reação com o cloreto férrico, ocorreu o aparecimento da coloração variável verde-castanha sendo positiva para (WAGNER et al, 2009).

Nas reações para identificação com catequinas, houve o surgimento de coloração vermelha intensa, indicando reação positiva para a presença de catequinas (WAGNER et al, 2009).

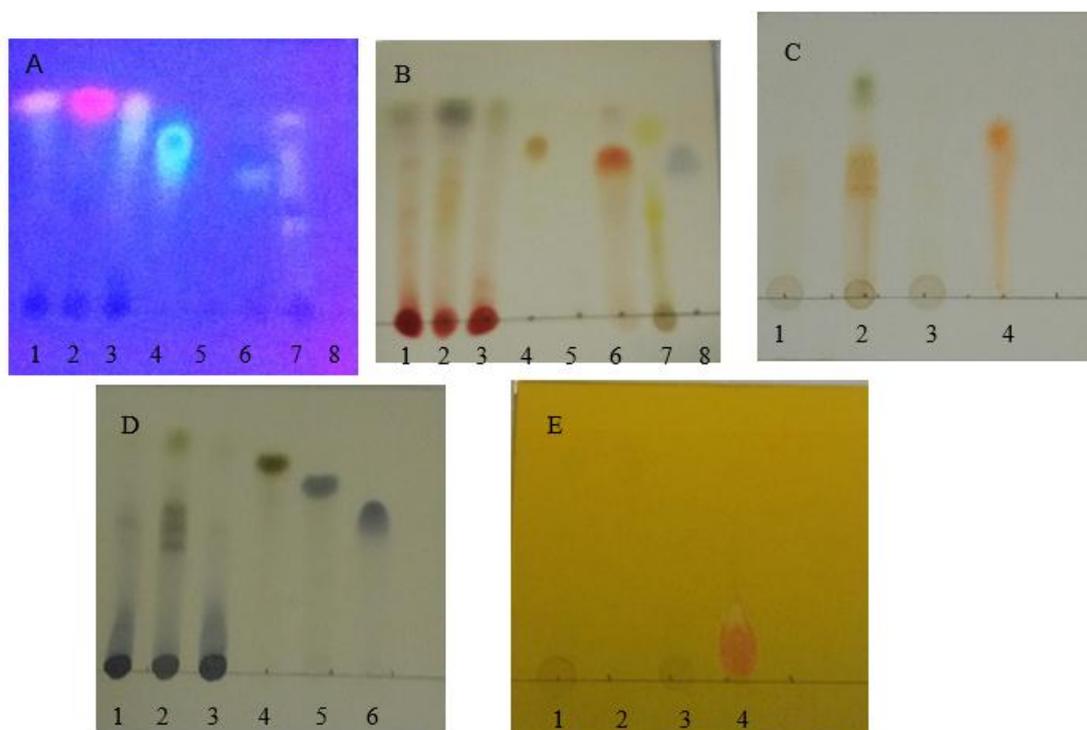
Na identificação de esteroides e triterpenóides ocorreu uma sucessão de cores, de azul evanescente seguido de verde persistente foi observada, indicando reação positiva para a presença de esteroides e triterpenos (WAGNER et al, 2009).

Na identificação de glicosídeos cardioativos, foi possível identificar a presença de anel esteroidal na droga vegetal, pois as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski apresentaram resultados positivos, havendo o desenvolvimento de coloração vermelha-acastanhada. Na reação de Keller-Kiliani, não houve o desenvolvimento de anel vermelho-pardo e o aparecimento de coloração azul-esverdeada na solução acética, indica a não presença de desoxi açúcares. Na reação de Baljet, não houve o aparecimento de cor alaranjada intensa, portanto não foi possível identificar a presença de anel lactônico na droga vegetal (WAGNER et al, 2009).

## 6.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA POR CCD

A análise fitoquímica por CCD caracterizou a presença dos constituintes majoritários nos extratos de *Campomanesia xanthocarpa*, conforme a Figura 8.

Figura 8. Perfis cromatográficos dos extratos secos obtidos das folhas, caule e raiz de *Campomanesia xanthocarpa*.



Legenda:

- A – UV 365 nm: 1 - EC; 2 – EF; 3 – ER; 4 – Qct; 5 – Ac.Gal.; 6 – Ctq.; 7 – Atrq; 8- Dgx;  
 B – Anisaldeído sulfúrico: 1 - EC; 2 – EF; 3 – ER; 4 – Qct; 5 – Ac.Gal.; 6 – Ctq.; 7 – Atrq; 8- Dgx;  
 C – NP/PEG: 1 - EC; 2 – EF; 3 – ER; 4 – Qct.;  
 D – Cloreto férrico: EC; 2 – EF; 3 – ER; 4 – Qct.; 5 – Ctq.; 6 – Ac.Gal.;  
 E – Reativo de Dragendorff; 1 - EC; 2 – EF; 3 – ER; 4 – Piloc.;

Fonte: do autor

Nas análises realizadas por CCD, utilizou-se fase móvel, constituída por uma mistura de acetato de etila, metanol e água na proporção 81:11:8 respectivamente, e fase estacionária de sílica-gel F254.

A análise do perfil cromatográfico foi realizada pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas após serem reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER et al, 2009).

Quanto às classes de metabólitos presentes nos extratos, pode-se observar, por análise no UV (Figura 8a), uma mancha fluorescente verde amarelada no extrato 3, que sugerem a presença de ácidos fenólicos. Observam-se manchas avermelhadas intensas no final da placa no extrato 2, que podem sugerir a presença de antocianidinas e saponinas, além de algumas manchas alaranjadas menores, que podem indicar a presença de flavonoides no extrato 1.

Na revelação por anisaldeído sulfúrico e posterior aquecimento a 100°C (Figura 8b), todos os extratos manchas de coloração vermelho-tijolo próximas ao ponto de aplicação, que sugerem a presença dos taninos condensados, manchas amareladas no extrato 2, que correspondem aos flavonoides, e várias manchas avermelhadas, que podem indicar a presença de catequinas e taninos hidrolisáveis. Os extratos apresentaram manchas esverdeadas no centro e no final da placa, que pode sugerir a presença de antocianidinas e saponinas, respectivamente. Nota-se também coloração roxa, que é indicativo de terpenos.

Com o revelador NP/PEG (Figura 8c), pode-se observar que todos os extratos apresentaram algumas manchas amareladas e alaranjadas, que sugerem a presença de flavonoides da classe dos flavonóis e das flavonas, respectivamente.

O cloreto férrico (Figura 8d) forma manchas de colorações escuras na presença de compostos fenólicos. Em todos os extratos, pode-se observar manchas de coloração acinzentada próximas ao ponto de aplicação, que sugerem a presença de taninos condensados; e manchas acastanhadas, que podem indicar a presença dos flavonoides.

A placa revelada com reativo de Dragendorff mostrou que os extratos não apresentam alcaloides, sendo apenas revelada uma mancha vermelha correspondente ao padrão pilocarpina.

## 6.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOATAIS E FLAVONOIDÉS

Considerando os dados apresentados na literatura e através dos dados evidenciados nas CCD realizado para os extratos de *Campomanesia xanthocarpa*, foram realizadas as quantificações dos teores de fenóis totais e flavonoides, em cada um dos extratos preparados. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Teores de polifenóis torais e flavonoides nos extratos de *Campomanesia xanthocarpa*.

<b>Extrato</b>	<b>Polifenóis totais (mg EAG/g extrato)</b>	<b>Flavonoides (mg EQ/g extrato)</b>
<b>Caule</b>	39,3 ± 1,8 <sup>c</sup>	9,3 ± 1,2 <sup>b</sup>
<b>Folha</b>	35,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	23,3 ± 2,1 <sup>c</sup>
<b>Raiz</b>	21,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,4 ± 1,4 <sup>b</sup>

Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Scott e Knott, (1974), sendo  $p < 0,05$ .

Legenda: EAG – equivalentes em ácido gálico; EQ – equivalentes em quercetina;

Fonte: do autor

A partir dos resultados obtidos, foi possível confirmar e quantificar a presença de compostos fenólicos pela metodologia de Folin-Ciocalteu. Avaliando os dados da tabela 7 acima, observa-se que os extratos do caule e da folha apresentam os maiores valores de compostos fenólicos, de  $39,3 \pm 1,8$  e  $35,9 \pm 1,3$  mgEAG/g respectivamente.

Em relação ao ensaio de flavonoides, os extratos da folha e caule apresentaram os maiores valores de concentração, sendo de  $23,3 \pm 2,1$  e  $9,3 \pm 1,2$  mgEQ/g extrato respectivamente.

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos largamente distribuídos nas plantas e têm várias atividades biológicas, destacando-se a prevenção e tratamento de muitas doenças (FANG et al., 2015).

Quando os extratos obtidos do caule, folhas e raiz de *Campomanesia xanthocarpa* são comparados, quanto ao teor de polifenóis totais, a extratos de plantas ricas como o chá-verde (*Cammelia sinensis*), que apresentam em sua

constituição cerca de 30 a 55 mg/g desses compostos, pode-se observar que os extratos apresentaram teores não muito inferiores de fenóis, cujos valores variaram entre 39,3, 35,9 e 21,5 mg/g, respectivamente (PEREIRA et al., 2014).

Kataoka e Cardoso (2013) realizaram testes a fim de caracterizar o perfil fitoquímico das espécies *Campomanesia xanthocarpa* e *Campomanesia sessiliflora*, trabalhando com as folhas de ambas, sendo as folhas foram coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta em questão. Nos testes de fenóis totais, encontraram diferentes valores devido à coleta de material vegetal em diferentes fases como foi citado, onde no período reprodutivo da *Campomanesia xanthocarpa* obteve-se o maior valor ( $334,18 \pm 11,73$  mgEAG/g). Para *Campomanesia sessiliflora*, o maior valor encontrado foi de  $95,50 \pm 0,46$  mgEAG/g durante a fase reprodutiva. Os valores obtidos por Kataoka e Cardos são valores bem superiores ao encontrado neste presente estudo, sendo bem discrepantes.

Rocha (2011) estudou a espécie *Campomanesia pubescens*, utilizando praticamente quase todas as partes da planta. De todas as partes, a folha apresentou maior quantidade de teor de fenóis totais ( $115,0 \pm 1,8$  mgEAG/g), seguido pelo caule ( $114,0 \pm 1,3$  mgEAG/g), fruto ( $31,0 \pm 0,5$  mgEAG/g) e raiz ( $19,3 \pm 0,6$  mgEAG/g). De todos os valores obtidos no estudo de Rocha, apenas os valores da raiz são próximos ao deste estudo, sendo os demais bem discrepantes quando comparados.

Analisando a comparação dos estudos de Kataoka e Cardoso (2013) e Rocha (2011), ambos possuindo resultados tão discrepantes quando comparado com os resultados deste estudo, pode-se levantar algumas hipóteses possíveis. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), diversos fatores que podem afetar o conteúdo de metabólitos secundários das plantas. A espécie *Campomanesia* utilizadas em ambos os trabalhos, foram coletados em locais diferentes um dos outros. Sabe-se fatores ambientais como latitude, nutrientes do solo, podem afetar o conteúdo de compostos produzidos pelo vegetal.

Um dos fatos que justificam a expressiva presença dos flavonoides dentre os compostos presentes naturalmente no reino vegetal é a sua capacidade de proteção das plantas contra a radiação ultravioleta. Os flavonoides, devido à presença de anéis aromáticos associados a hidroxilas em suas estruturas

químicas, têm a capacidade de captação da radiação e estabilização da mesma, evitando, assim, danos no material genético do vegetal (WU et al., 2015).

Além de trabalharem com quantificação de polifenóis, Kataoka e Cardoso (2013) também quantificaram flavonoides das espécies *Campomanesia xanthocarpa* e *Campomanesia sessiliflora*, trabalhando com as folhas de ambas, sendo as folhas foram coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta em questão. Dentre todas as amostras, a que apresentaram melhores resultados foram as folhas coletadas no período reprodutivo ( $35,60 \pm 0,69$  mgEQ/g). O resultado ficou bem próximo do encontrado quando comparado ao encontrado neste estudo ( $23,3 \pm 2,1$  mgEQ/g).

Lima e colaboradores (2000) avaliaram o teor de flavonoides da espécie *Malpighia* sp L. (acerola) utilizando os frutos de diferentes variedades como amostra. Dentre as várias amostras que foram utilizadas, o que apresentou melhor resultado foi a da variedade Inada ( $20,22$  mgEQ/g), valor bem próximo ao encontrado da folha de *Campomanesia xanthocarpa*.

Sendo assim, podemos chegar à conclusão que, a espécie *Campomanesia xanthocarpa* apresenta relativamente grande teor de polifenóis e de flavonoides. Para alcançar tal valor de fenóis encontrado pela metodologia de Follin-Ciocalteau, hipoteticamente podemos afirmar que é devido ao fato de a espécie apresentam compostos como taninos e compostos não fenólicos como saponinas, conforme se encontra na literatura.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA

### 6.6.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs) para leveduras do gênero *Candida*

A Tabela 8 mostra os valores de MIC50 e MIC90 obtidos para cada uma das amostras testadas, frente às leveduras do gênero *Candida* sp.

Tabela 8 - Avaliação do perfil de sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* sp frente aos extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*.

Extrato	Fungos	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
<b>Fluconazol</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50	1	1	32	16	1
<b>Folha</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50	31,25	125	125	15,625	125
	IC90	250	500	250	250	1000
<b>Caule</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50	-	125	15,625	3,9	250
	IC90	-	-	500	500	1000
<b>Raiz</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC50	125	62,5	62,5	7,81	62,5
	IC90	250	250	250	125	125

Legenda

IC50: inibição de 50% do crescimento;

IC90: inibição de 90% do crescimento;

-: ausência de atividade nas concentrações analisadas;

Fonte: do autor

Os extratos que apresentam  $\text{MIC}_{50}$  menor do que  $100 \mu\text{g/mL}$  são considerados com excelente atividade antimicrobiana, os que têm  $\text{MIC}_{50}$  entre  $100\text{-}500 \mu\text{g/mL}$  são moderadamente ativos,  $\text{MIC}_{50}$  entre  $500\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$  são pouco ativos e  $\text{MIC}_{50}$  maior que  $1000 \mu\text{g/mL}$  são inativos (HOLETS et al., 2002).

Analisando a tabela 6, os extratos apresentam valores abaixo de  $100 \mu\text{g/mL}$  mostrando o grande potencial da espécie *Campomanesia xanthocarpa* contra alguns tipos de leveduras.

No geral, os extratos não foram muito efetivos contra a levedura *C. albicans*, com exceção apenas do extrato das folhas que apresentaram  $\text{MIC}_{50}$  de  $31,25 \mu\text{g/mL}$ . O extrato do caule não inibiu o crescimento da levedura nas concentrações testadas, logo não foi efetivo nas concentrações testadas frente a levedura. O extrato da raiz mostrou-se pouco efetivos, apresentando  $\text{MIC}_{50}$  de  $125 \mu\text{g/mL}$  e  $\text{MIC}_{90}$  de  $250 \mu\text{g/mL}$ .

Contra a levedura *C. tropicalis*, apenas o extrato da raiz apresentou um bom resultado, apresentando  $\text{MIC}_{50}$  de  $62,5 \mu\text{g/mL}$ . Os extratos das folhas e do caule apresentaram valores razoavelmente bons, sendo o  $\text{MIC}_{50}$  de  $125 \mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Quando testados contra a *C. kruzei*, quase todos os extratos se mostraram altamente efetivos quando comparado ao controle positivo Fluconazol. O extrato do caule foi o que apresentou melhor resultado, sendo o MIC<sub>50</sub> de 15,625 µg/mL. Este extrato foi duas vezes mais eficaz que o controle positivo Fluconazol, que apresentou MIC<sub>50</sub> de 32 µg/mL. O extrato do caule apresentou um bom resultado, sendo seu MIC<sub>50</sub> de 62,5 µg/mL. O extrato da folha apresentou o MIC<sub>50</sub> maior, sendo de 125 µg/mL.

De todas as leveduras testadas, a *C. glabrata* foi que apresentou maior sensibilidade. Os extratos do caule, raiz e folha apresentaram um MIC<sub>50</sub> de 3,9, 7,81 e 15,625 µg/mL. Quando comparado ao Fluconazol (MIC<sub>50</sub> 16 µg/mL), os valores de MIC<sub>50</sub> obtidos são excelentes, visto que os extratos apresentam um pool de diversos compostos, sendo o de interesse (ação fungicida) encontra-se em quantidade menor que a droga controle.

OS extratos, no geral, não foram tão eficazes contra a *C. parapsilosis*, sendo apenas o extrato da raiz que apresentou um MIC<sub>50</sub> de 62,5 µg/mL. Además, os extratos de caule e folha apresentaram MIC<sub>50</sub> de 250 e 125 µg/mL respectivamente.

Analisando de uma maneira geral todos os extratos contra as leveduras, o extrato da raiz foi a que apresentou melhores resultados frente todas as leveduras testadas. Provavelmente, isso deve ser ao fato de as raízes serem mais susceptíveis a ataques de fungos. Logo, os vegetais produzem neste órgão metabólitos secundários como a saponina, que possui descrito na literatura ação fungicida descrita (KAISER, 2010).

Sabe-se que as saponinas possuem em sua estrutura química triterpenóide e esteroide como parte fundamental da molécula. Por possuir caráter lipofílico, estes compostos conseguem interagir com as membranas dos fungos, levando a vários mecanismos, como desestabilização, levando a morte das leveduras (FRANCIS *et al*, 2002).

A ação antifúngica pode ser também pela ação dos compostos fenólicos. A capacidade de inibição fúngica, em um determinado extrato, pelos compostos fenólicos, é devida a um efeito de estabilização dos radicais livres celulares, que previnem, assim, os danos nas células infectadas (JAMKHANDI *et al*, 2014). Levando-se em consideração apenas os taninos, estes podem inibir enzimas fúngicas, através da complexação com substratos enzimáticos e íons metálicos,

além de modificar a membrana celular microbiana, alterando o seu metabolismo (PANDEY; KUMAR, 2013).

As infecções fúngicas em seres humanos são ocasionadas, em grande parte dos casos, por reações alérgicas às proteínas dos fungos ou a toxinas produzidas pelos mesmos. Essas infecções são responsáveis pelo aumento da taxa de morbidade e mortalidade em pacientes graves e imunocomprometidos, sendo que as espécies de *Candida sp* são as principais leveduras que causam micoses oportunistas em todo o mundo (MAYER *et al*, 2013).

*C. albicans* e *C. krusei* são os principais patógenos responsáveis pela maior parte das infecções hospitalares. As leveduras *C. glabrata* e *C. parapsilosis* podem crescer como biofilmes em materiais de uso hospitalar, como cateteres, agulhas e outros dispositivos médicos, sendo considerados fatores de risco adicionais ao uso de antibióticos (PIRES, 2010).

#### **6.6.2 Quantificação da atividade antifúngica dos extratos com MIC50 menor ou igual a 100 µg/MI**

Segundo a literatura, os extratos de plantas que apresentam uma excelente atividade antimicrobiana são aqueles cujos valores de MIC50 apresentam-se menores ou igual a 100 µg/mL. Portanto, para os extratos de caule, folha e raiz, foram calculados a atividade antimicrobiana total (AT), o índice de susceptibilidade microbiana (ISM%) e o percentual de atividade (P%) sobre o microrganismo *Candida glabrata*.

A atividade antimicrobiana total (AT) é calculada como a razão entre a quantidade do material extraído por 1 g de planta e a concentração inibitória mínima, o índice de susceptibilidade (ISM%) é a razão entre o número de extratos efetivos contra cada microrganismo e o total de extratos vegetais testados e o percentual de atividade (P%) é calculado como a razão entre o número de cepas susceptíveis aos extratos vegetais e o total de cepas microbianas testadas (ELOFF, 2004).

Com base nesses dados, calcularam-se os valores de AT para o microrganismo que apresentou maior sensibilidade aos extratos, cujos resultados estão indicados na Tabela 8.

Tabela 9 - Atividade antimicrobiana total dos extratos provenientes dos extratos de *Campomanesia xanthocarpa* com valores de MIC<sub>50</sub> inferiores a 100 µg/mL.

<b>Extrato</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>MIC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>AT (mL/g)</b>
<b>Caule</b>	<i>Candida glabrata</i>	3,9	384
<b>Raiz</b>	<i>Candida glabrata</i>	7,81	192
<b>Folha</b>	<i>Candida glabrata</i>	15,625	960

Fonte: do autor

De acordo com os estudos de Eloff, (2004), a atividade antimicrobiana total permite comparar a atividade de diferentes extratos de uma planta, utilizando-se de uma base mais racional e padronizada. Ela indica, teoricamente, em quantas vezes os compostos encontrados em 1 g de planta podem ser diluídos e, dessa forma, ainda apresentar a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos.

De acordo com a Tabela 8, observa-se que o extrato do caule mostrou a melhor AT, com valor de 960 mL/g. Isso demonstra que os prováveis componentes com ação antimicrobiana que estão presentes neste extrato, por grama da planta, podem ser diluídos até aproximadamente 960 vezes e, mesmo assim, ainda inibir o crescimento de *Candida glabrata*.

O índice de susceptibilidade microbiano (ISM%) varia de 0 (resistente a todos os extratos) até 100 (susceptíveis a todos os extratos). Este parâmetro avalia a susceptibilidade relativa entre os microrganismos testados, em que houve valores de MIC<sub>50</sub> iguais ou menores que 100 µg/ml com as amostras testadas (TANAKA et al., 2005).

O valor de ISM% calculado, considerando os 3 extratos testados, foi de 100%, ou seja, houve inibição do crescimento microbiano frente a 66,6% dos extratos de caule, folha e raiz. O percentual de atividade (P%) avalia o potencial antimicrobiano dos extratos de *Campomanesia xanthocarpa* testados e representa o percentual de microrganismos que não apresentam crescimento na presença desses extratos.

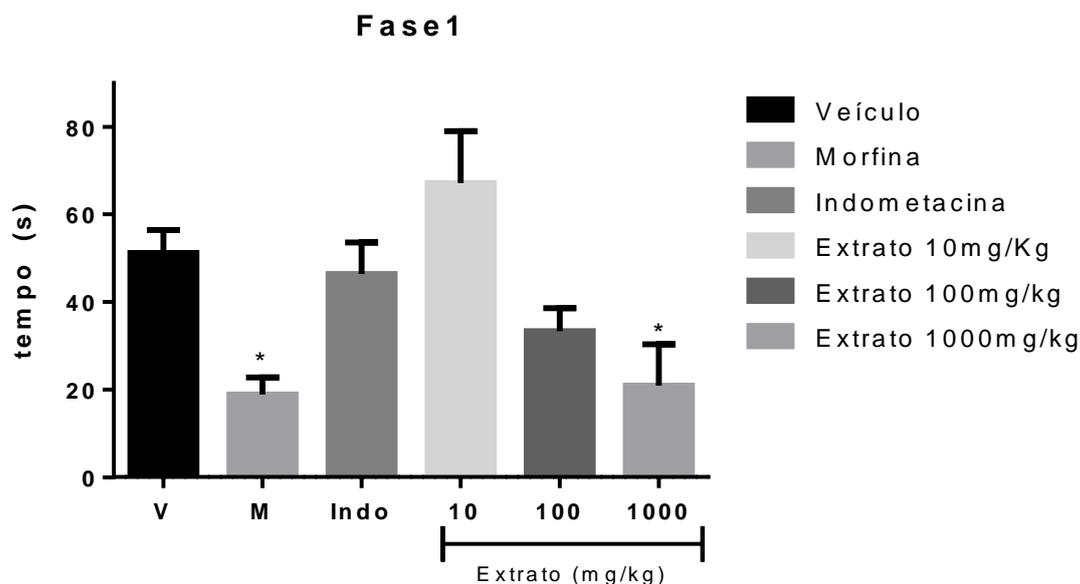
Este índice permite realizar a comparação entre os extratos que apresentaram MIC<sub>50</sub> menor ou igual a 100 µg/ml e determinar os mais ativos (TANAKA et al., 2005). O valor de P% calculado para os extratos foi de 40,0% para o extrato da folha e caule, e de 80,0% para o extrato da raiz.

## 6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCEPTIVA

No teste da Formalina, administração desta na pata dos animais induziu uma resposta bifásica como esperado, com a primeira fase nos primeiros 5 min e a segunda fase ocorrendo entre 15 e 40 min. Os animais apresentaram os seguintes resultados (Média  $\pm$  EPM) na primeira fase: 51,18  $\pm$  5,23s para veículo (V); 18,90  $\pm$  3,88s para morfina (M); 46,36  $\pm$  7,25s para indometacina (Indo); 67,20  $\pm$  11,80s para EHCx 10 mg/Kg; 33,33  $\pm$  5,25s para EHCx 100 mg/Kg e 20,90  $\pm$  9,43s para EHCx 1000 mg/ Kg.

Quando comparada ao grupo controle veículo, apenas o EHCx na concentração de 1000 mg/Kg diminuiu o tempo de lambida ( $p < 0,05$ ). O grupo controle Morfina diminuiu o tempo de lambida quando comparado ao grupo controle Veículo ( $p < 0,05$ ).

Figura 9: Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg), indometacina ou morfina no tempo de lambida durante a primeira fase do teste da formalina.



Nota: O símbolo demonstra o nível de significância: \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo (V).

Legenda:

V – Veículo

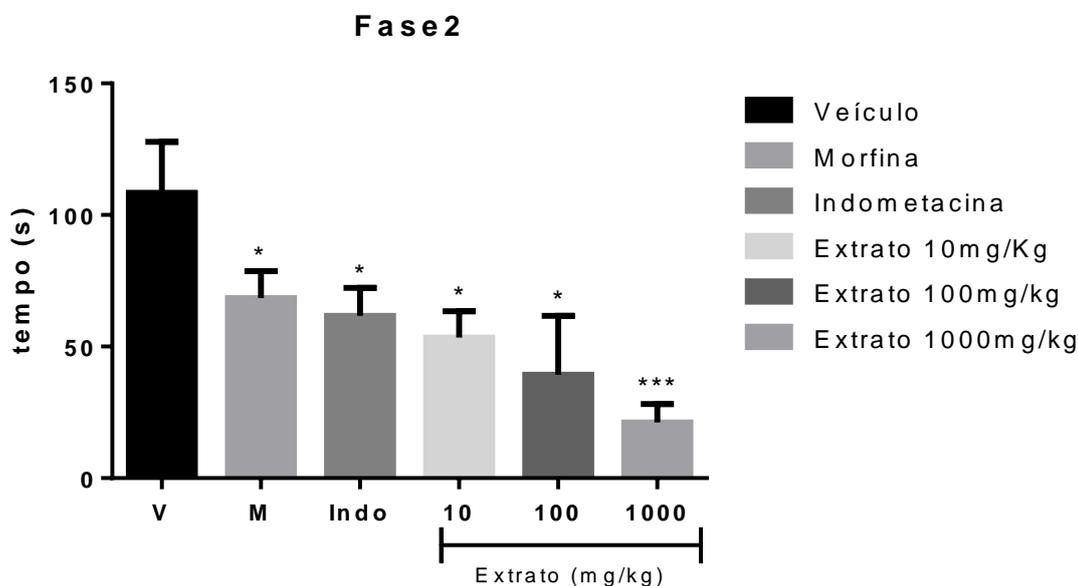
M – Morfina

Indo – Indometacina

O extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg apresentou os seguintes resultados (Média  $\pm$  EPM) na segunda fase: 108,5  $\pm$  19,33s para veículo (V); 68,4,90  $\pm$  10,28s para morfina (M); 61,64  $\pm$  10,63s para indometacina (Indo); 53,40  $\pm$  10,05s para EHCx 10 mg/Kg; 39,33  $\pm$  10,05s para EHCx 100 mg/Kg e 21,20  $\pm$  6,98s para EHCx 1000 mg/ Kg.

Todos os extratos obtiverem diminuição do tempo de lambida quando compara ao grupo controle Veículo, sendo  $p < 0,05$  para os extratos na concentração de 10 e 100 mg/Kg e  $p < 0,001$  para o extrato na concentração de 1000 mg/Kg. O grupo controle Morfina diminuiu o tempo de lambida quando comparado ao grupo controle Veículo ( $p < 0,05$ ).

Figura 10: Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg), indometacina ou morfina no tempo de lambida durante a segunda fase do teste da formalina.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo veículo (V).

Legenda:

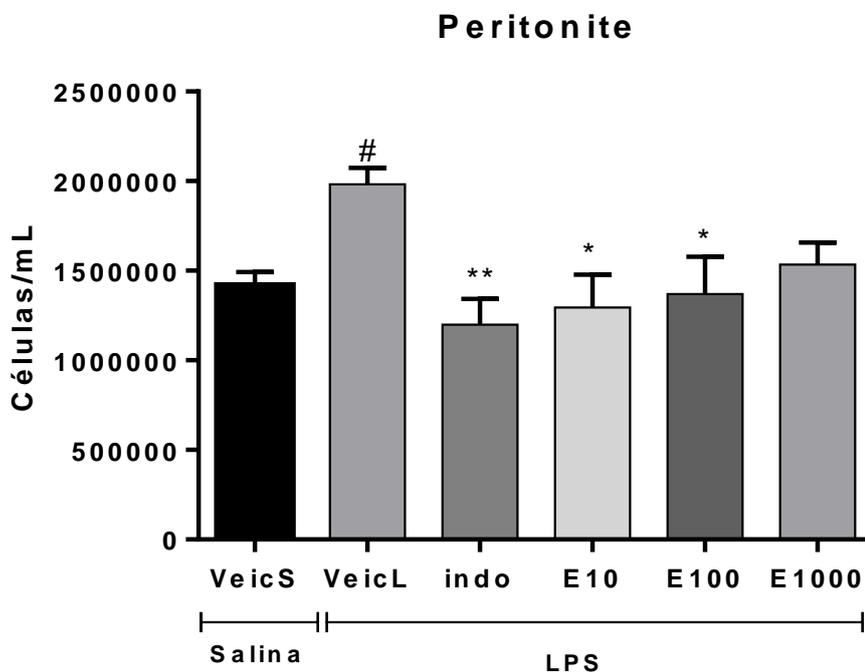
V – Veículo

M – Morfina

Indo – Indometacina

No teste de peritonite induzida por LPS, foi possível observar uma redução do número de leucócitos nos extratos de 10 e 100 mg/Kg quando comparado ao grupo controle VeicL. Foram encontradas na cavidade peritoneal  $198,3 \pm 9,2 \times 10^4$  células para o grupo VeicL,  $141,7 \pm 7,5 \times 10^4$  células para o grupo VeicS. Avaliando estes grupos, houve um aumento nas contagens de células do grupo Veículo + LPS quando comparado ao grupo controle Veículo + salina, ( $p < 0,05$ ). Após o tratamento com extrato seco das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, houve redução ( $p < 0,05$ ) do número de leucócitos para os extratos de 10 e 100 mg/Kg, que apresentaram contagem de células na cavidade peritoneal de  $129,9 \pm 18,3 \times 10^4$  e  $136,9 \pm 20,9 \times 10^4$  respectivamente, quando comparado ao grupo Veículo + LPS ( $p < 0,05$ ). Foram encontradas na cavidade peritoneal  $153,5 \pm 12,2 \times 10^4$  células do extrato na dose de 1000 mg/Kg e  $119,9 \pm 14,3 \times 10^4$  após o pré-tratamento da indometacina.

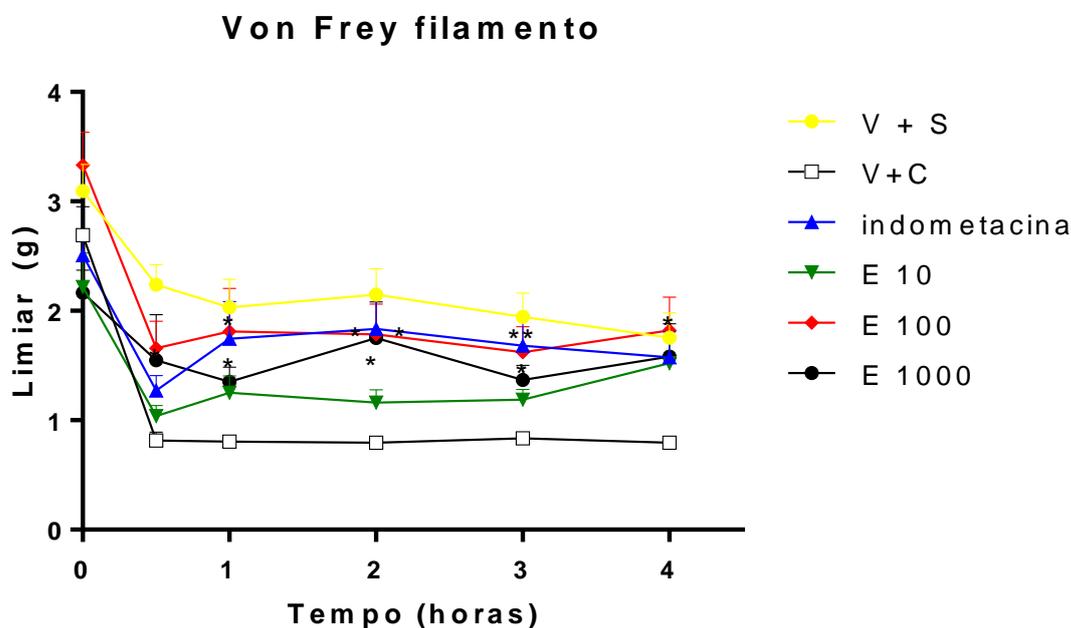
Figura 11: Efeito do tratamento com veículo, EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) e indometacina no número de leucócitos na cavidade peritoneal.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo veículo + LPS (VeicL). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Analisando o gráfico da figura 12, observou-se uma redução no limiar mecânico nos grupos controle Veículo + carragenina, nos extratos em todas as doses e grupo controle indometacina quando comparado ao grupo Veículo + salina, entre o intervalo de tempo 0-30 minutos.

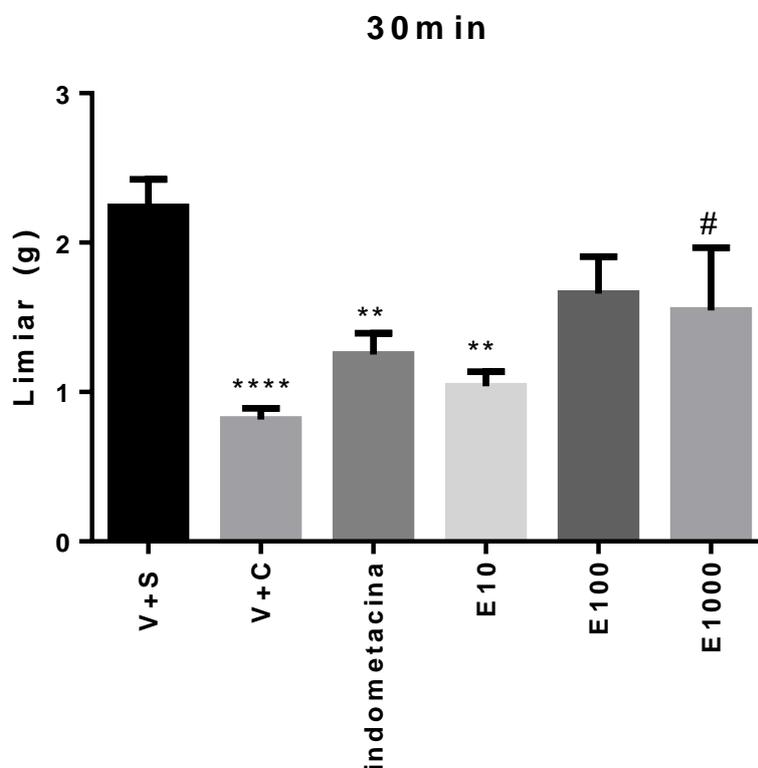
Figura 12: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernociceção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo veículo + salina (VeicS).

No tempo 30 minutos, o EHCx na concentração de 1000 mg/Kg obteve um limiar mecânico menor quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ). A indometacina obteve um limiar menor ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle Veículo + salina, assim como o EHCx 10 mg/Kg. Quando comparado ao grupo controle Veículo + salina, o grupo controle Veículo + carragenina obteve um limiar maior ( $p < 0,0001$ ). Os dados do tempo 30 minutos podem ser observados na figura 13.

Figura 13: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 30 minutos, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$  \* e  $p < 0,0001$  quando comparado com o grupo veículo + carragenina (VeicC). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Legenda:

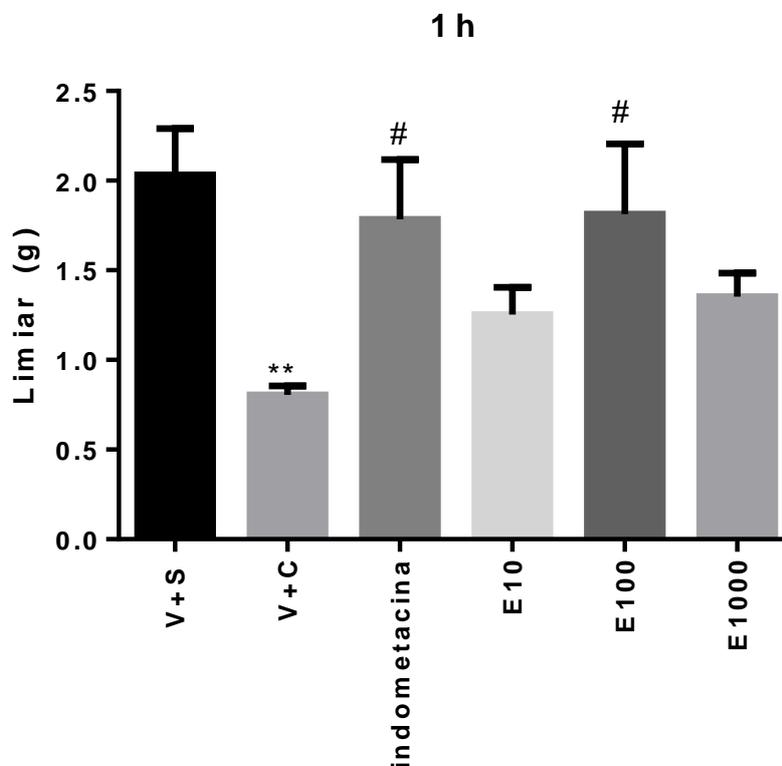
V + S – veículo + salina

V + C – veículo + carragenina

EHCx – Extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

No tempo 1 hora, o EHCx na concentração de 100 mg/Kg obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ), assim como a indometacina ( $p < 0,01$ ). O grupo controle Veículo + carragenina obteve um limiar menor ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle Veículo + salina. Os dados do tempo 1 hora podem ser observados na figura 14.

Figura 14: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 1 hora, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo veículo + carragenina (VeicC). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Legenda:

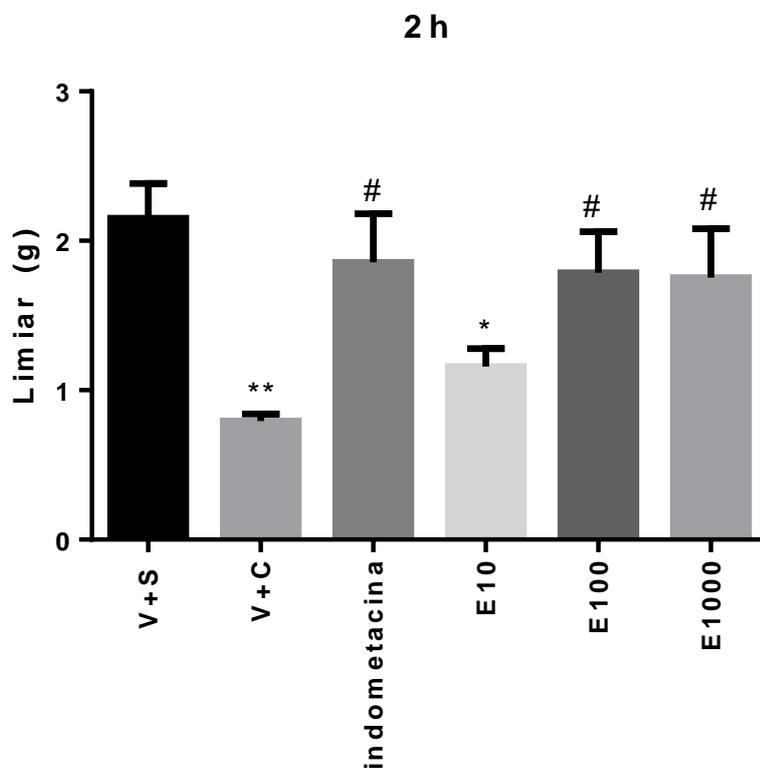
V + S – veículo + salina

V + C – veículo + carragenina

EHCx – Extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

No tempo 2 horas, o EHCx na concentração de 100 e 1000mg/Kg obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ), assim como a indometacina ( $p < 0,05$ ). O grupo controle Veículo + carragenina obteve um limiar menor ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle Veículo + salina. O extrato 10 mg/Kg obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ). Os dados do tempo 2 horas podem ser observados na figura 15.

Figura 15: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 2 horas, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparado com o grupo veículo + carragenina (VeicC). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Legenda:

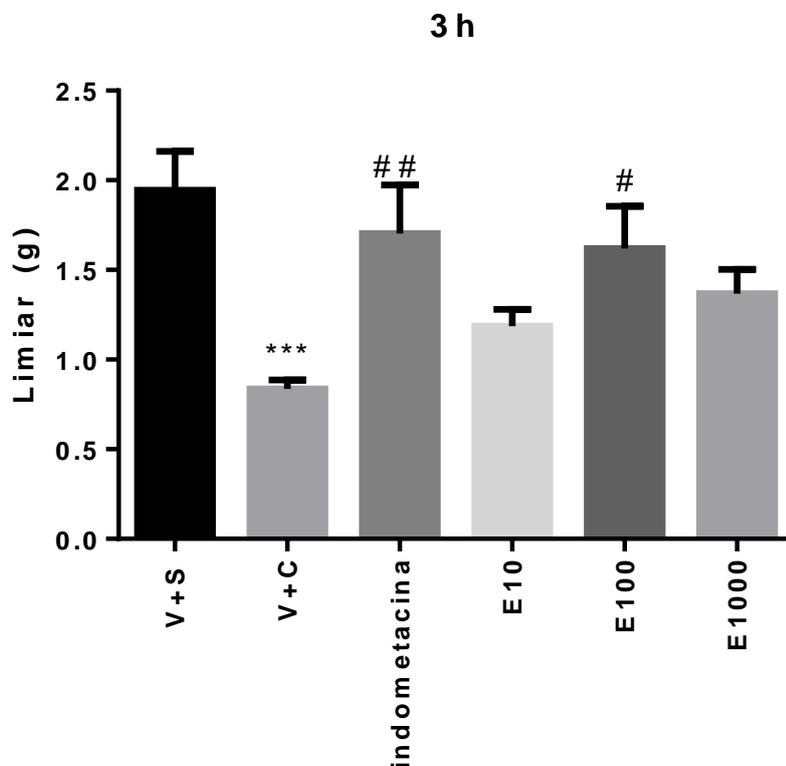
V + S – veículo + salina

V + C – veículo + carragenina

EHCx – Extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

No tempo 3 horas, o EHCx na concentração de 100 mg/Kg obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ). A indometacina obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ). O grupo controle Veículo + carragenina obteve um limiar menor ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle Veículo + salina. Os dados do tempo 3 horas podem ser observados na figura 16.

Figura 16: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 3 horas, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo veículo + carragenina (VeicC). #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Legenda

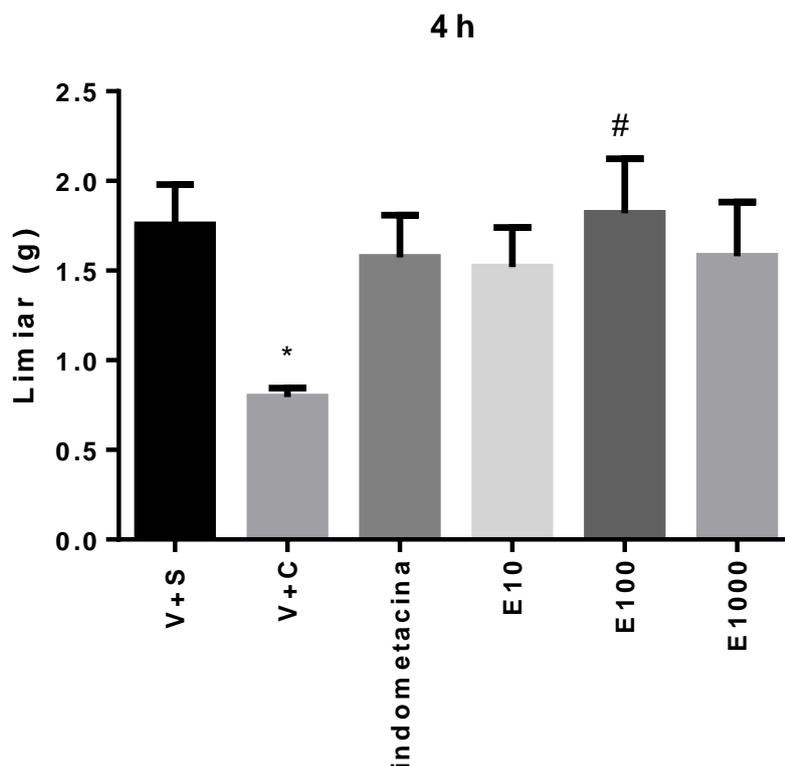
V + S – veículo + salina

V + C – veículo + carragenina

EHCx – Extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

No tempo 4 horas, o EHCx na concentração de 100 mg/Kg obteve um limiar mecânico maior quando comparado ao grupo controle Veículo + carragenina ( $p < 0,05$ ). O grupo controle Veículo + carragenina obteve um limiar maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle Veículo + salina. Os dados do tempo 4 horas podem ser observados na figura 17.

Figura 17: Efeito da administração de EHCx (10,100 e 1000mg/Kg) em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camundongos no tempo 4 horas, detectada pelo Von Frey filamento.



Nota: Os símbolos demonstram os níveis de significância: \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo + carragenina (VeicC). #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + salina (VeicS).

Legenda

V + S – veículo + salina

V + C – veículo + carragenina

EHCx – Extrato hidroetanólico de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

A carragenina causou uma diminuição no limiar mecânico dos animais, como podemos observar no grupo tratado com veículo.

Esta redução no limiar já era esperada, pois diversos mediadores inflamatórios participam da hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos, como por exemplo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , prostaglandinas e aminas

simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005). Em outras palavras, a carragenina aumenta a sensibilidade dos nociceptores de fibras A $\delta$  e nociceptores de fibras C a estímulos que normalmente não causaria dor (alodínia) e podendo também ativar os mecanorreceptores, resultando em hiperalgesia (LE BARS et al, 2001).

Após os camundongos receberem o tratamento com extratos nas doses de 10,100 e 1000 mg/Kg, foi observado uma diminuição do limiar nestes grupos na primeira hora. Esse aumento no limiar mecânico pode ser relacionado aos compostos presentes no extrato seco das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, uma vez que são encontrados flavonoides e estes são responsáveis pela ação antinoceptiva (WOLLENWEBER,1998).

O teste da Formalina consiste em uma injeção de solução de formaldeído por via subcutânea intraplantar, que induziu várias respostas motoras bem caracterizadas, cuja avaliação destas permite que a intensidade da resposta nociceptiva seja quantificada. Esta indução da nocicepção ocorre em duas fases distintas, que são denominadas de fase neurogênica (fase I) e fase inflamatória (fase II). As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sensibilidade a drogas analgésicas. A dor neurogênica dura de 0-5 minutos e é causada após a ativação direta dos nociceptores periféricos, como fibras C e A $\delta$ , produz um comportamento característico padrão como indicativo de dor e remete a uma ação em nível de sistema nervoso central (DEL-VECHO et al, 2007). A dor inflamatória dura de 15-30 minutos e se dá após a liberação de alguns mediadores, causando uma facilitação sensorial e uma sensibilização central da medula espinhal (DE LIMA, 2008).

Na fase I, apenas o extrato na dose 1000 mg/Kg e a morfina tiveram diminuição do tempo de lambida quando comparado ao grupo controle Veículo ( $p < 0,05$ ). Já na fase II, todos os extratos e grupo indometacina apresentaram redução do tempo de lambida quando comparada ao grupo controle Veículo, evidenciando uma atividade antiinflamatória.

Fármacos de ação central, como os opióides, atuam tanto na fase I quanto na fase II. O termo opióides aplica-se a qualquer substância que produza efeitos semelhantes aos da morfina. A morfina é um potente analgésico com boa ação sedativa e ansiolítica e é relativamente seletiva para os receptores  $\mu$  (BUENO et al., 2006). Este agonista opióides  $\mu$  inibem seletivamente vários reflexos

nociceptivos e induzem analgesia profunda quando administrados. A morfina atua nos receptores de opióides encontrados nas terminações dos nervos aferentes primários, que causa a liberação de neurotransmissores desencadeando uma resposta contra ao estímulo (físico, químico ou térmico) causado, suprimindo-o (REISINI; PATERNAK, 1996).

Analisando os dados da figura 9, apenas o extrato na dose 1000 mg/Kg ( $20,90 \pm 9,43s$ ) teve ação na fase I quando comparada ao grupo controle Veículo ( $51,18 \pm 5,23s$ ) com  $p < 0,05$ , evidenciando ação analgésica. Já na fase II (figura 10), todas as doses do extrato apresentaram diminuição do tempo de lambida quando comparadas ao grupo controle Veículo ( $68,4,90 \pm 10,28s$ ), sendo que nas doses de 10 mg/Kg ( $39,33 \pm 10,05s$ ) e 100 mg/Kg ( $39,33 \pm 10,05s$ ) com  $p < 0,05$  e 1000 mg/Kg ( $21,20 \pm 6,98s$ ) com  $p < 0,001$ , evidenciando uma potente ação antiinflamatória. Esse resultado pode ser associado a substâncias bioativas encontradas na espécie *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg como os flavonoides (WOLLENWEBER, 1998).

Como esperado, a indometacina não observou ação na fase I mas exerceu ação na fase II. Este fármaco é um antiinflamatório não esteroideal que atua como um inibidor não seletivo de enzimas ciclo oxigenase (COX1 e 2), diminuindo a produção de prostaglandinas inflamatórias (VANE; BOTTING, 1987; MITCHELL; WARNER, 1999; FERREIRA, 2002; SULEYMAN et al., 2007).

Peritonite induzida por LPS é uma metodologia que consiste em verificar a migração celular de leucócitos, que é caracterizada pela administração intraperitoneal de uma endotoxina, lipopolissacarídeo (LPS), que acarreta no aumento da permeabilidade vascular, grande infiltração de polimorfos nucleares e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos por exemplo, têm importante participação em diversos processos infecciosos, sendo potentes estimuladores da produção de citocinas por macrófagos e monócitos (AMURA et al., 1997). O LPS está presente na membrana externa das bactérias gram-negativas, que leva a indução de eventos fisiopatológicos durante a inflamação e a sepse (GIUSTI-PAIVA et al, 2003). O LPS liga-se aos receptores do tipo Toll (TLR4) que estão presentes em células fagocíticas e produz citocinas pró-inflamatórias e migração leucocitária. Em outras palavras, a peritonite induzida por LPS é semelhante a

uma infecção bacteriana e representa um modelo de estudos para inflamação peritoneal aguda (VILELA et al., 2010).

A inibição da migração dos leucócitos para cavidade peritoneal pode acontecer, hipoteticamente, de duas maneiras: 1) inibição da produção de substâncias quimiotáticas que atuam na facilitação da migração dos leucócitos; 2) inibição da expressão de moléculas de adesão para o local de injúria e inflamação (SHERWOOD; TOLIVERKUNSKY, 2004).

Observando a figura 11, o extrato na dose de 10 mg/Kg ( $136,9 \pm 20,9 \times 10^4$ ) e 100 mg/kg ( $136,9 \pm 20,9 \times 10^4$ ) apresentaram contagem de leucócitos menor quando comparado ao grupo controle Veículo + LPS ( $198,3 \pm 9,2 \times 10^4$ ) com  $p < 0,05$ . Essa diminuição na migração celular, pode ser associada a ação dos flavonoides que possuem ação antiinflamatória (WOLLENWEBER, 1998). Esses compostos diminuem a migração celular por atuar no controle da cascata de sinalização NF- $\kappa$ B, diminuindo, conseqüentemente, o processo inflamatório (GOMES et al, 2008).

Queiroz (2011) avaliou a atividade antiinflamatória da espécie *Piptadenia stipulaceae*, utilizando a fase aquosa, a fase acetato de etila e um flavonoide, galeatina 3,6-dimetil éter, que foi isolado das partes aéreas da planta. Nesse estudo foi aplicado o ensaio de peritonite induzida por zymosan A em camundongos e realizou-se a contagem total do número de células do lavado peritoneal, que demonstrou importante efeito anti-inflamatório da fase aquosa, da fase acetato de etila e do galeatina 3,6-dimetil éter, que reduziu a contagem de leucócitos quando comparado ao grupo controle. Essa redução do recrutamento leucocitário é devido a sua provável capacidade de diminuir a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Indometacina, utilizada como fármaco padrão, quando administrada via oral reduziu o recrutamento de leucócitos quando comparada com o controle. O flavonoide 3,6-dimetil éter foi avaliado ainda quanto à sua capacidade de inibir, in vitro, COX ovina, utilizando para isso um kit imunoenzimático de determinação da inibição de COX-1/COX-2 ovina. Observou-se que 3,6-dimetil éter, na concentração de 0,2  $\mu$ M, inibiu significativamente tanto a COX como a COX-2 quando comparada ao controle.

Barros (2010), avaliou vários flavonoides com grande potencial de atividade biológica e constatou que, a quercetina também age reduzindo a adesão de

células inflamatórias ao endotélio vascular, mesmo modo de ação da luteolina. Ambos flavonoides citados são frequentemente encontrados em espécies da família Myrtaceae (FERREIRA, et al 2014).

De maneira geral, o efeito antiinflamatório e antinoceptivo dos testes de formalina, peritonite induzida por LPS e Von Frey filamento é decorrente de substâncias bioativas presentes no extrato bruto das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, como por exemplo flavonoides. Estes compostos possuem várias atividades biológicas, entre elas antioxidante, antialérgica, analgésica e antiinflamatória, vastamente estudadas e relatadas na literatura (BORRELLI; IZZO, 2000; CARBONEZI et al., 2007). Estes compostos podem atuar de maneira similar ao ácido acetil salicílico, modulando células envolvidas no processo da inflamação (linfócito T), inibindo a produção de citocinas pró inflamatórias e modulando as enzimas da via do ácido araquidônico tais como COX, LOX e PLA<sub>2</sub> (COUTINHO, 2009), diminuindo assim a síntese de prostaglandinas, reduzindo alguns mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-1) e aumentando a produção de interleucinas como a IL-10 (NIJVELDT et al, 2001).

Segundo Camargo (2007), os flavonoides e compostos fenólicos interferem o metabólito araquidonato, visto que são capazes de inibir os sistemas de enzimas tais como PLA<sub>2</sub>, COX e 5-LOX.

Ferreira e colaboradores (2013) realizaram o fracionamento e identificação de flavonoides da espécie *Campomanesia adamantium* via HPLC e conseguiram identificar os flavonoides quercetina, micertina e miricitrina comparando os tempos de retenção dos respectivos compostos. Em estudos anteriores, esses compostos promoveram a redução da dor aguda e crônica (MORIKAWA, et al., 2003; MEOTTI et al., 2006; FILHO et al., 2008).

Pinho-Ribeiro e colaboradores (2015), testaram o flavonoide hesperidina metil chalcona (HMC) em camundongos afim de avaliar a atividade antiinflamatória e antinoceptiva. Os autores observaram redução dos processos inflamatórios e ação analgésica quando os animais foram tratados com flavonoide na concentração de 30 mg/Kg.

Vários estudos comprovaram que os flavonoides apresentam diferentes mecanismos de ação. Estes podem atuar inibindo a síntese de TNF- $\alpha$  e bloqueando as enzimas fosfolipase (AGNIHOTRI et al, 2010).

Apigenina e quercetina, ambos flavonoides, inibem a COX-2, diminuindo a produção de prostaglandinas. O flavonoide caempferol-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo inibe a produção de TNF- $\alpha$ , possuindo uma significativa atividade anti-inflamatória (BARROS, 2012).

Moraes (2011), avaliou o mecanismo de ação anti-inflamatório do flavonoide BAS1(flavona), isolado da planta *Brosimum acutifolium*, em macrófagos murinos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Constatou-se que o BAS1 suprimiu significativamente a expressão da enzima iNOS em macrófagos murinos, comparado ao grupo não tratado com o flavonoide, dessa forma um importante mecanismo de ação do BAS1 é reduzir a síntese de NO.

Schwanke (2012), avaliou a ação anti-inflamatória do flavonoide miricitrina em modelo de colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS). Foi comprovado que o tratamento oral com esse flavonoide diminuiu os danos macro e microscópicos no cólon dos animais, tendo ação anti-inflamatória através da inibição da migração de neutrófilos para o local inflamado e pela redução dos níveis de produção e/ou expressão de citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias.

Loke et al (2008), realizou um estudo com o propósito de avaliar a atividade anti-inflamatória da quercetina, luteolina, caempferol e taxifolina, relacionando suas propriedades anti-inflamatórias com suas estruturas químicas. Constatou-se que a presença de um grupamento hidroxila na posição 3' do anel B e outro na posição 4' do mesmo anel, formando um sistema orto di-hidroxilado, é importante para inibir a formação de leucotrienos B4. Caempferol, flavonoide que não possui a hidroxila na posição 3', ou seja, não há formação do sistema orto di-hidroxilado, tem efeito 60% menor que a quercetina, composto com os dois grupamentos hidroxila. A ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C também é importante para a atividade anti-inflamatória, uma vez que, como é observado na taxifolina, a ausência desta dupla ligação causa a perda da aptidão para inibir a síntese de leucotrienos B4.

Coutinho e colaboradores (2009), concluíram em seu estudo que para o flavonoide exercer uma boa atividade anti-inflamatória, este deve ter a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, o número e a posição dos grupamentos hidroxilas, como os das posições 3' e 4' do anel B e 5 e 7 do anel

A, a carbonila em 4 do anel C e a não glicosilação da molécula, ou seja, o composto estar na sua forma aglicona, sem resíduos de açúcar.

A análise fitoquímica preliminar e CCD realizados neste estudo constatou a presença de flavonoides no extrato hidroetanólico seco de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg, que são umdos responsáveis pela ação antiinflamatória observada em todos os testes realizados.

## 7 CONCLUSÕES

A análise granulométrica da droga vegetal obtida das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, permitiram estabelecer especificações de qualidade, servindo de referência para assegurar a reprodutibilidade de estudos posteriores.

A triagem fitoquímica preliminar e a cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos das folhas, caule e raiz de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg revelaram a presença de compostos fenólicos, de acordo com a literatura relatada para o gênero *Campomanesia* sp.

Foram verificados que os extratos foram apresentaram grandes teores de compostos fenólicos e flavonoides. A importância dessas determinações foi correlacionar os teores encontrados nos extratos, com a triagem fitoquímica e com as diversas atividades biológicas comprovadas destes compostos.

No ensaio antimicrobiano, os extratos apresentaram excelentes resultados frente às leveduras testadas. Ressalta-se que, de todos os extratos testados, o extrato da raiz apresentou resultados muito satisfatório a todas as leveduras, sendo que em algumas destas, foi superior até ao controle positivo.

Neste trabalho mostrou-se o efeito do extrato hidroetanólico seco das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg em diferentes respostas antinociceptivas geradas por estímulo nocivo químico produzido por injeção de formalina ou carragenina, nos testes de Formalina e Von Frey filamento respectivamente. O extrato hidroetanólico das folhas também apresentou um efeito anti-inflamatório, reduzindo a migração leucocitária induzida por LPS no teste de peritonite.

Como *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg é conhecida e utilizada na medicina popular, é essencial esclarecer os mecanismos de ação do extrato, bem como isolar substâncias que possam ser responsáveis pelos efeitos apresentados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATI, R. T. **Estudo biofarmacognóstico** – *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum. (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

AGNIHOTRI, S. et al. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **International Journal of Pharmaceuticals and Nutraceuticals Research**. v.1, n.2, p. 150-67, 2010.

ALICE, CB et al. Plantas Medicinais De Uso Popular: **Atlas Farmacognóstico**. Canoas, Brazil: Ulbra; 1995.

AJAO, M.Y.; AKINDELE, A.J. Anxiolytic and sedative properties of hydroethanolic extract of *Telfairia occidentalis* leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 301-309, 2013.

ALVARENGA, A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolf Lutz**, v.66, n.1, p. 01-09, 2007.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000, 177 p.

AMES et al. The causes and prevention of cancer-review. *Proc. Natl. Acad. Sci.*v.92, n.? p.5258-5265, 1995.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, vol. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.

ARAÚJO, I.S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no Estado do Pará**, 2011, 103 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

AZEVEDO, L.F.P. et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014

BARROS, M.C.T.C. **Preparação de novos derivados flavonoides com potencial atividade biológica**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc. Anna Nery**, v. 15, n.1, p. 132-139, 2011.

BIANCHETTI, E. S. **Estudo da interferência de diferentes dietas nutricionais sobre as ações antiinflamatória e analgésica do Etoricoxib (Arcóxia®)**. Dissertação (Mestrado). UNIFENAS, Alfenas, 2006.

BIAVATTI, M. W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v.93, n.2-3, p.385-389, 2004.

BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non - steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.39, p.103, 144, 1995.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacol Ther** [S.l.], v. 111, n. 1, p. 194-223, Jul 2006.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutr Rev**, v.56, n.11. p.317-333,1998.

BARTH, D. T.; PROCHNOW, M. Guabiroba, um gostinho inconfundível. Disponível em: <http://www.apremavi.org.br/noticias/apremavi/776/guabiroba-um-gostinho-inconfundivel>. Acesso em: 15 out. 2015.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research** [online], v.14, n.8, p.1099-1573, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8<581::AIDPTR776>3.0.CO;2-S](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8<581::AIDPTR776>3.0.CO;2-S). Acesso em: 19 ago. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 de março de 2010.

BUENO, A.X. et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Rev Bras Farmacogn.** V.16, n.?, p. 317-323, 2006.

BURNS R.E. *et al.* Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolics content of red wines. **J Agric Food Chem**, v.48, n.2, p.220-230, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CAMARGO, C. A. **Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzidas pelo acetaminofeno em camundongos.** 2007. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Campinas, Campinas 2007.

CARDOSO, C. M. Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral.** São Paulo: Pharmabooks, 2009. 148 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/52664007/manual-de-controle-de-qualidade-de-materias-primasvegetais-para-farmacia-magistral>>. Acessado em: 27 de out de 2015.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods** .v. 53, n. 1, p. 55-63, Jul 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-S4.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

COSTA, R.S. et al. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

COHEN, R. D.; PERL, E. R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **Journal of Neurophysiology**, v.64, p. 457- 464, 1990.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial** – Plantas para o Futuro – Região Sul. 1. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011, 936 p.

COUTINHO M.A.S., et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev Virtual Quím**, v.1, n.3, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/51/98>. Acesso em: 19 ago. 2016.

CUNHA, FQ et al. In vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **Brit J Exp Pathol** 70: 1-8, 1989.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** [S.l.], v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005.

DE LIMA, D. A. N. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do acuponto kunlun (BL60) em camundongos. **Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 58, 2008.

DEL-VECHO, G.; SOUSA, O.V.; YAMAMOTO, C.H.; KAPLAN, M.A.C; Antinociceptive and antimicrobial activities of *ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae) **Rev Bras Farm**, v. 88, n. 4, p. 181-184, 2007.

DORTA EJ. Introdução. In: **Escala Rural: especial de plantas medicinais**. v.1, n.4, p.1-62. São Paulo: Escala Ltda; 1998.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, supl. 01, p. 06-08, 2004.

EDDY, N. B; LEIMBACK, D. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, n.107, p. 385 -393, 1953.

ELDIN S, DUNFORD A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. 1º ed. São Paulo: Manole; 2001.

ELOFF, J.N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassayguided fractionation. **Phytomedicine**, v. 11, p. 370-371, 2004.

FRANCIS *et al.* The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.?, p.587-605, 2002.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, v. 1, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acessado em: 8 de Nov. de 2015

FERNANDES, J.B., VARGAS, V.M. Mutagenic and anti-mutagenic potential of the medicinal plants *M. laevigata* and *Campomanesia xanthocarpa*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n.?,p. 269–273,2003.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International Journal Clinical Practice Supplement**, n. 128, p. 2-10, 2002.

FERREIRA, C. F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.145, n.?, p.100-108,2013.

FERREIRA, F.P.S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FILHO, A.W. et al. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research** v.31, n.?, p. 713–721, 2008.

FRANZON et. al. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 325-345, 2009.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia aplicada: fundamentos da terapêutica racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GALLIN, J. I. et al. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. **Curr Opin Immunol** [S.I.], v. 4, n. 1, p. 53-6, Feb 1992.

GIUSTI-PAIVA, A., et al. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neuroscience Letters**, n. 346, p. 21–24. 2003.

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

GOFF J. **As doenças têm história**. 2a ed. Lisboa : Terramar ; 1997.

GOMES A, et al. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. **Curr Med Chem.**; v.15, n.? p.1586-605, 2008.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal**: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2011, 512 p.

GOODMAN, H.G. GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed, p. 424-431. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.

HARDER, I. C. F.; TEIXEIRA, L. A. J.; POMMER, C. V.; GALLO, P. B. Desenvolvimento inicial de plantas de espécies frutíferas nativas e exóticas em Mococa, SP. Congresso Brasileiro de Fruticultura. **Anais...** Florianópolis, 2004, p.1622.

HOLETS, F.B. et al. Screening of some slants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Decoction of Certain Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

KATAOKA, V.M.F.; CARDOSO, C.A.L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.1, p.121-129, 2013.

KAISER, S. *et al.* Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p. 300-309, 2010.

KALIA, K. *et al.* Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosan-guinea* Lodd. and Quantification of its Phenolic Constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 1129-1134, 2008.

KHANAM, U. K. S., *et al.* Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n.?, p. 979 – 987, 2012.

KING A, YOUNG G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v. 50, n.2, p. 213-218, 1999.

JAMKHANDE, P.G. Antioxidant, antimicrobial activity and in silico PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. root extract. **Beni – Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p. 140-148, 2014.

KLAFKE, J.Z; DA SILVA, M.A.; PANIGASETAL,T.F.Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients, **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 127, no. 2, pp. 299–305, 2010.

KLAFKE, J.Z. Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, n.? P.1-8, 2011.

KOSTER, R., ANDERSON, M. and DE-BEER, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** 18: 412-418.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAGO, E. S. G; SILVA, R. da Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico - químicos e avaliação sensorial. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 419-425, 2006.

LAINETTI R, BRITO ERS. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Ediouro; 1980.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil. An illustrate synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, dez. 1997.

LE BARS, D. et al. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v.53, n.4, p. 597 – 652, 2001.

LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Opioid and non - opioid mechanisms of stress analgesia. **Science**,v.208, p.623-625, 1980.

LIMA, V.L.A.G. et al. Flavonoides em seleções de acerola (*Malpighia* sp L.). 1- Teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1063-1064, 2000.

LIMA, D. F.; et al. O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 683-693, 2011.

LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, n. 1, p. 18-22, 2000.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**.1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.

LOKE, W.M. et al. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Biochem Pharmacol.**; v.75, n.5, p.1045-53, 2008.

MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomed Pharmacother**, v.56, n.?, p.296-301, 2002.

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. Ed. Da UFSM, p. 304, 1997, Santa Maria.

MARKMAN, B. E. O. **Caracterização farmacognóstica de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (Myrtaceae)**, 2002, 192 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARKMAN, B.E.O. *et al.* Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.2004, p.55-57, 2004.

MAYER, F.L. *et al.* Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae) hidroalcoholic extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MEOTTI, F.C. *et al.* Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine–nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V.316,n.?,p. 789–796, 2006.

MENDEZ, A.S.L. *et al.* Caracterização de preparações extrativas obtidas de Passiflora alata Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MESQUITA *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n.3, p. 439-345, 2009.

MERSKY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. Seattle: IASP Press, 1994.

MIDDLETON, E.J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv Exp Med Biol**, v.439, n.?, p.175–182, 1998.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review: **Prog Neurobiol**, v.57, p.1-164, 1999.

MITCHELL, J.A., WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.6, p.1121-1132, 1999.

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

MORAES WP. **Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 isolado da planta Brosimum acutifolium**. Tese Doutorado. Belém: Universidade Federal do Pará; 2011.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**, 2007, 60 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORAIS, P.O.; LOMBARDI, J. A. A Família *Myrtaceae* na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v.7, n.1, p.3-32, 2006.

MORIKAWA, K. et al.. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**. V.74,n.?,p. 709–721, 2003.

NACZK M., SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A**; v.1054, n.?, p.95-111, 2004.

NATALINI, C. C. **Comparative evaluation of the effects of epidural morphine, alentanil, butorphanol, tramadol and U-50488H in horses**. Tese (doutorado) – University of Minnesota, 2000.

NIJVELDT, R.J. *et al* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. **Am. J. Clin. Nutr.** ,v.74, n.?, p. 418-425, 2001.

NUNES, K.M. et al. Padronização da Tintura de Calendula officinalis L. para seu Emprego em Formulações Semi-Sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmaceutics**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu,1991, 412 p.

OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

OSZMIANSKI J. *et al* Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chem**, v.100, n.2, p.579-583,2007.

PANDEY, A.K.; KUMAR, S. Perspective on Plant Products as Antimicrobials Agents: A Review. **Pharmacologia**, v. 4, n. 7, p. 469-480, 2013.

PEREIRA, C. M. M. et al. Estudo fitoquímico e das atividades antioxidante e antimalárica de *Myrciaria cauliflora* Berg. (Myrtaceae). In: Jornada Farmacêutica da UNESP, 56, 2009. Araraquara. **Anais...** [S.I.]: UNESP-SP, 2009.

PEREIRA, V.P. et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Cammelia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 490-498, 2014.

PIETTA, G.P. Flavonoids as Antioxidants-REVIEW. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. ?, p. 1035-1042, 2000.

PINHO - RIBEIRO, A.F. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mices, oxidative stress, cytokines and NF- kB. *Chemico- Biological Interaction*. V. 228, n.? p. 88-99, 2015.

PIRES, R.H. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise**, 2010, 172 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

QUEIROZ, A.C. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke (Fabaceae) e inibição de COX por Galetina 3,6-Dimetil Éter (FGAL). Dissertação Mestrado. Maceió: Universidade Federal de Alagoas; 2011.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REISINE, T.; PASTERNAK, G. **Analgésicos e antagonistas opióides**. In: Goodman e Gilman. *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª ed.; Hardman, J. G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon. R. W.; Gilman. A. G. eds. McGraw Hill., p.379-404, 1996.

RIBEIRO, S.S.S. *et al.* Ação do extrato aquoso de canela-da-índia (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) sobre *Escherichia coli*. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. **Anais...** [S.l.]: CEFET-ES, 2007.

RIGUERA, R. Isolating bioactive compounds from marine organisms. **Journal of Marine Biotechnology**, v.5,n.?, p.187–193, 1997.

ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da Arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC)**. 2006. Dissertação. (Mestrado em Química), Franca, SP, 71 p., 2006

ROCHA, E. O. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg (Guabiroba)**, 2011, 42 f. dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev Pathol** [S.l.], v. 3, p. 99-126, 2008.

ROWAN, D.D. Volatile Metabolites. **Metabolites**, v. 1, n. 1, p. 41-63, 2011.

RUFFA *et al.* Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n.3, p. 335-339, 2002.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n.4, p. 381-389, 1997.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 206 –210, 2003.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm.** v.13, n. ?, p. 64-70, 2004.

SALEEM *et al.* Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n.3, p. 327-336, 2002.

SCHAILDE, H. G; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Current concepts in clinical surgery**. v. 389, p. 237-243, 2004.

SCHARAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in a mast cell-dependent inflammation inhibitory of glucocorticoids. **Inflammation research**, v.53, (12), p. 644-652, 2004.

SCHNEIDER, E. et al. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. **Trends immunol**, v.5, p. 255-263, 2002.

SCHWANKE RC. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do flavonóide miricitrina na colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS) em camundongo e estudo do seu perfil farmacocinético em roedores**. Tese Doutorado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of inflammatory response. **Best Pract Res. Clin. Aneesthesiol**, v.18, p. 385-405, 2004.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SHUKLA, S. et al. Antimicrobial efficacy of *Raphanus sativus* root juice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 89-92, 2011.

SILVA, C.S.; CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: **Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo, Tecmedd, 2004.

SILVA, M.I.G., et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacognosia**, v.16, n.?, p. 455-462, 2006.

SILVA, V. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia sidoides* Cham. Sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SILVA, GA, AKISUE, G 2000. Morfodiagnose de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal). *Lecta*, Bragança Paulista 15: 63-97.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2010.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, v.15; n.1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, F.C.F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SULEYMAN H. et al. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v.59, n.3, p.247-258, 2007.

TAIWO, Y.; LEVINE, J. D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradikinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Research**, v.458, p.402 - 406, 1988.

TOMAZZONE, M.I. *et al.* Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, v.15, n.1, p. 115-121, 2006.

TORTORA, G. J., FUNKE B. R. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, p.827.

TOSCAN, C.M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**, 2010, 84f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010

TROWBRIDGE, H. O. E., ROBERT C. **Inflammation: a review of the process**. 5th ed. ed. Chicago: Quintesse Pub. CO., 1997.

UMPHRED, D. A. **Fisioterapia Neurológica**. 2ª ed. Ed. Manole, 1994.

VALLILO, M.I. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.? p.231-237,2008.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **The FASEB Journal**, v.1, n.2, p. 89-96, 1987.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. **Inflamm. Res.** v.44, n.1, p.1-22, 1995.

VIECILI, et al, 2014. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 234, n.?, p. 85-92, 2014.

VILELA, et al, . Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n.?, 206-310, 2009.

VILELA, F. C., et al. Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p.737–741, 2010.

VINAGRE, A.P.S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 46, n. 2010.

VINEGAR, R. et al., Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 143, n.?, p. 711-714, 1973.

WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **J Community Health**, v.26, n.2, p.79-92, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant Drug Analysis**. 2 ed. Berlin: SpringerVerlag, 2009.

WOLLENWEBER, E.J.M. et al. Flavones and Flavonols. In: HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: advances in research since 1980**. 1 ed. London: Chapman and Hall, p. 233-302, 1998.

WOOLF, G.; SALTER, M. W. Neuronal plastic: increasing the gain the pain. **Science**, v.288, n.5472, p.1765-1769, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Rev Panam Salud Publica**. v.12, n.5, p.366-370, 2002.

WU, S. et al. Bioactive and Marker Compounds from Two Edible Dark-Colored Myrciaria Fruits and the Synthesis of Jaboticabin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4035-4043, 2013.

YU, H.G. *et al.* A new rapid and non-radioactive assay for monitoring and determining the proliferation of retinal pigment epithelial cells. **Korean J Ophthalmol**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2003.

ZUCCHI et. al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri-GO. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 2, p. 273-279, 2013.