

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARISA DE OLIVEIRA LOPES

***Litchi chinensis* Sonn.:**
ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS

Alfenas/MG
2014

MARISA DE OLIVEIRA LOPES

***Litchi chinensis* Sonn.:**
ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Alfenas/MG
2014

Lopes, Marisa de Oliveira.

Litchi chinensis Sonn.: estudos microbiológicos e fitoquímicos. /
Marisa de Oliveira Lopes. - 2014.

100 f. -

Orientador: Geraldo Alves da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Litchi. 2. Compostos Fenólicos. 3. Flavonoides. 4. Agentes
antibacterianos. I. Silva, Geraldo Alves da. II. Título.

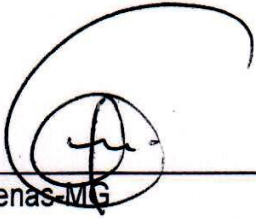
CDD: 581.634

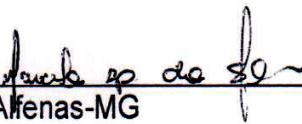
MARISA DE OLIVEIRA LOPES

***Litchi chinensis* Sonn.:**
ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E FITOQUÍMICOS

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 17 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva 
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva 
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo 
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

Dedico este trabalho à minha família Antonio Alfredo, Clara e Rafael,
aos meus pais Ruy e Mercedes e à minha sogra Elza.

AGRADECIMENTOS

A Deus, doador de todas as coisas, princípio e objetivo de minha vida,

Ao meu esposo Antonio Alfredo, pelo apoio e amor incondicional, pela renúncia de projetos pessoais, por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis, esta vitória também é sua,

Aos meus filhos, Clara e Rafael, que por inúmeras vezes tiveram que se conformar com minha “presença meio ausente”,

Aos meus pais que sempre me ensinaram a lutar com perseverança e dedicação,

À minha sogra, que sempre torceu por meu sucesso e pelas inúmeras orações,

Ao Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva, por acreditar que eu seria capaz de realizar este trabalho e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do caminho,

Ao Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco, por sua sempre alegre disposição em transmitir conhecimentos,

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva, por sua inestimável colaboração e incentivo,

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, por sua gentil e valorosa colaboração,

À Prof.^a Cristina Garcia Lopes, diretora da FANUT, pelo apoio e concordância com as alterações de horários,

Às professoras Flávia Della Lucia, Maria Teresa Pedrosa Clerici, Sílvia Silveira Clareto, Eveline Monteiro e Ana Lúcia Leite Moraes, que sempre me incentivaram e apoiaram a alcançar este objetivo,

Aos demais professores da FANUT, obrigada,

À amiga Ana Flávia Silva, dividir as angústias tornou a caminhada mais leve e por todo seu apoio e ajuda: muito obrigada,

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e Ms. Marcelo José Dias, pelas análises realizadas com espectrometria de massas,

À Dr.^a Ingridy Simone Cabral e Isael Aparecido Rosa, pela colaboração com os ensaios quantitativos e da atividade antioxidante,

À Ms. Letícia Almeida e Karina Ferreira Alves, pela colaboração com os ensaios citotóxico e leishmanicida,

Ao Cláudio Daniel Cerdeira, pela colaboração com as análises estatísticas,

À amiga Sílvia Martelli, pela convivência e ajuda no Laboratório de Botânica,

Ao amigo Allan Kardec de Sousa, pelo incentivo nos momentos difíceis,
À secretária Fabiana da Silva, pela ajuda e orientações prestadas,
Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade deste aperfeiçoamento.

"Quaisquer que sejam as condições com as quais me confronto, sei que representam o próximo passo no meu desenvolvimento. Receberei de bom grado todas as provas, pois sei que em mim existe a inteligência para compreendê-las e o poder de superá-las."

Paramahansa Yogananda

RESUMO

A espécie *Litchi chinensis* Sonn., popularmente conhecida como lichieira, é originária da China e tem aplicações medicinais em muitos países, em especial pela medicina tradicional chinesa. O objetivo deste trabalho foi avaliar química e biologicamente o extrato de folhas e frações desta espécie. Foi preparado o extrato hidroetanólico das folhas e, a partir da partição líquido-líquido, foram obtidas as frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa. Foi utilizada a técnica de espectrometria de massas ESI-IT-MSⁿ para traçar o perfil do extrato e das frações. Procedeu-se à quantificação dos teores de fenóis totais, de flavonoides totais, do poder sequestrante do radical DPPH e do poder redutor do extrato de folhas e frações. Além disso, foram avaliadas também as seguintes atividades biológicas *in vitro*: antimicrobiana para bactérias e fungos (ensaio da difusão em ágar e concentração inibitória mínima), leishmanicida e citotoxicidade. O extrato de folhas e frações apresentaram compostos fenólicos como principais constituintes químicos, tais como flavonoides (agliconas e heterosídeos) e taninos condensados. Os resultados da determinação dos fenólicos totais e flavonoides demonstraram que existe uma maior concentração destes compostos na fração acetato de etila em relação ao extrato de folhas e às outras frações e a avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH e do poder redutor demonstra que esta fração também apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* em comparação ao extrato de folhas e às outras frações. Assim, evidencia-se a possível correlação entre estes compostos e a atividade antioxidante. O extrato de folhas de *L. chinensis* e frações testados neste trabalho apresentaram atividade antimicrobiana contra as seguintes bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e frente à bactéria gram-negativa *Proteus mirabilis*. O extrato de folhas de *L. chinensis* e frações não apresentaram atividade contra *L. amazonensis* até a concentração testada de 40 µg/mL, nem tampouco apresentaram toxicidade aos macrófagos murinos até a concentração testada (160 µg/mL). A fração acetato de etila (FrAcOEt) do extrato de folhas apresentou os melhores resultados quanto ao teor de fenóis totais, flavonoides totais, a melhor atividade antioxidante e os menores valores de concentração inibitória mínima, evidenciando assim a viabilidade desta fração do extrato de folhas como fonte potencial de compostos bioativos.

Palavras-chave: Lichia. Triagem fitoquímica. Compostos fenólicos. Atividade antirradicalar. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The species *Litchi chinensis* Sonn., popularly known as litchi, originated in China and has medicinal applications in many countries, particularly in traditional Chinese medicine. The aim of this study was to evaluate leaf extract and fractions of this species both chemically and biologically. The hydroethanolic leaf extract was prepared, and from the liquid-liquid partition, the fractions hexane, ethyl acetate, butanol and aqueous acetate were obtained. The technique of mass spectrometry ESI -IT-MSⁿ was used to determine the profile of the extract and fractions. The quantification of total phenolic content, total flavonoid, the scavenging power of DPPH radical and the reducing power of leaf extracts and fractions was carried out. In addition, the following *in vitro* biological activities were also evaluated: antimicrobial for bacteria and fungi (agar diffusion method and minimum inhibitory concentration), leishmanicidal and cytotoxicity. The leaf extract and fractions showed phenolic compounds as major chemical constituents, such as flavonoids (aglycones and glycosides) and condensed tannins. The results of the determination of total phenolics and flavonoids have shown that there is a higher concentration of these compounds in the ethyl acetate fraction compared to the leaf extract and other fractions and evaluation of scavenging power of DPPH radical and reducing power demonstrates that this fraction also showed higher antioxidant activity *in vitro* compared to the leaf extract and other fractions. Thus, there is evidence of a possible correlation between these compounds and antioxidant activity. The leaf extract of *L. chinensis* and fractions tested in this work had the following antimicrobial activity against gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus* and against the gram-negative bacteria *Proteus mirabilis*. The leaf extract of *L. chinensis* and fractions showed no activity against *L. amazonensis* tested up to a concentration of 40 mg/mL, nor were toxic to murine macrophages in the concentration tested (160 mg/mL). The ethyl acetate fraction (FrAcOEt) of leaf extracts showed the best results on the content of total phenolics, total flavonoids, the best antioxidant activity and the lowest values of minimum inhibitory concentration, thus demonstrating the viability of this fraction of the leaf extract as a potential source of bioactive compounds.

Key words: Litchi. Phytochemical screening. Phenolic compounds. Antiradical activity. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de ocorrência da espécie <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	20
Figura 2 - <i>Litchi chinensis</i> Sonn. em frutificação.	21
Figura 3 - Folha de <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	21
Figura 4 - Inflorescência de <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	22
Figura 5 - Frutos de <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	22
Figura 6 - Representação das moléculas de epicatequina, procianidina B2 e procianidina B4.	25
Figura 7 - Fluxograma da obtenção dos extratos e frações de <i>L. chinensis</i>	34
Figura 8 - Esquema de inoculação das microplacas para os ensaios de CIM.	43
Figura 9 - Curva granulométrica de <i>L. chinensis</i> Sonn. de acordo com a abertura da malha do tamis.	47
Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato de folhas.	48
Figura 11 - Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta do extrato de folhas (EF) de <i>L. chinensis</i>	52
Figura 12 - Espectro de massas, em modo <i>full-scan</i> das frações do extrato de folhas (EF) de <i>L. chinensis</i>	53
Figura 13 - Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 447 proveniente do extrato de folhas (EF) de <i>L. chinensis</i>	54
Figura 14 - Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 864 proveniente do extrato de folhas (EF).	55
Figura 15 - Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 609 proveniente da fração acetato de etila.	56
Figura 16 - Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 575 proveniente da fração acetato de etila.	57
Figura 17 - Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta da FrAq do extrato de folhas (EF) de <i>L. chinensis</i>	58
Figura 18 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.	60
Figura 19 - Estrutura básica dos flavonoides.	63
Figura 20 - Reação química entre o radical DPPH e o BHT.	67
Figura 21 - Capacidade de sequestrar o radical DPPH (% de sequestro) do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i> nas concentrações testadas.	68
Figura 22 - Gráfico do poder redutor do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i> Sonn. e padrões BHT e ácido acórbico nas concentrações testadas.	70
Figura 23 - Percentual de atividade do extrato de folhas de <i>L. chinensis</i> e frações com CIM iguais ou inferiores a 0,1mg/ml.	77
Figura 24 - Índice de susceptibilidade microbiano (ISM,%) frente o extrato de folhas de <i>L. chinensis</i> e frações com CIM iguais ou inferiores a 0,1 mg/ml.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>L. chinensis</i> Sonn.	46
Tabela 2 - Rendimento percentual do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i> Sonn.	48
Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários pesquisadas no extrato de folhas de <i>Litchi chinensis</i> Sonn.	49
Tabela 4 - Valores em mg de equivalente de ácido gálico por g de cada amostra analisada.	60
Tabela 5 - Valores em mg de equivalente de quercetina por g de cada amostra analisada.	64
Tabela 6 - Percentual da atividade do poder sequestrante de radicais DPPH do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i> Sonn.	67
Tabela 7 - Tabela do poder redutor do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i> Sonn. na concentração de 100 µg/mL	70
Tabela 8 - Média do diâmetro dos halos de inibição das frações do EF de <i>L. chinensis</i>	73
Tabela 9 - Tabela comparativa das CIM (mg/mL) do extrato de folhas de <i>L. chinensis</i>	75
Tabela 10 - Tabela comparativa das CIM (mg/mL) das frações do extrato de folhas de <i>L. chinensis</i>	75
Tabela 11 - Atividade total do extrato e frações provenientes das folhas de <i>L. chinensis</i> com CIM inferiores a 0,1 mg/ml.	79
Tabela 12 - Coeficiente de correlação (r) entre o teor quantitativo dos compostos e as atividades antioxidante e antimicrobiana para o extrato e frações de <i>L. chinensis</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS

([M-H]⁺)	Representação da molécula ionizada através de desprotonação
AT	Atividade total
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Butil-hidroxitolueno
CC	Cromatografia em coluna
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CE₅₀	Concentração efetiva para 50% da atividade
CI₅₀	Concentração inibitória para 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EF	Extrato de folhas
EM	Espectrometria de massas
EQ	Equivalente de quercetina
ESI-IT-MSⁿ	<i>Electrospray Ionization – Ion Trap – Mass Spectrometry</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
FrAcOEt	Fração acetato de etila
FrAq	Fração aquosa
FrBuOH	Fração butanólica
FrHex	Fração hexânica
ISM	Índice de susceptibilidade microbiana
IV	Infravermelho
m/z	Razão massa sobre carga
MSⁿ	<i>Tandem mass spectrometry</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
XTT	Hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.2	Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Aspectos botânicos	18
3.2	Aspectos comerciais	22
3.3	Aspectos fitoquímicos	23
3.4	Aspectos etnofarmacológicos	25
3.5	Aspectos farmacológicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Obtenção e identificação do material vegetal.....	31
4.1.1	Secagem.....	31
4.1.2	Moagem e granulometria.....	31
4.2	Obtenção dos extratos secos	32
4.2.1	Obtenção das frações do extrato seco	34
4.2.2	Cálculos do rendimento percentual.....	34
4.3	Triagem fitoquímica dos extratos	34
4.4	Análise do extrato e frações por espectrometria de massas	35
4.5	Determinação quantitativa de constituintes químicos de <i>Litchi chinensis</i>	36
4.5.1	Determinação quantitativa de fenóis totais.....	36
4.5.2	Determinação quantitativa de flavonoides totais.....	37
4.6	Avaliação do poder antirradicalar do extrato seco e frações obtidos das folhas de <i>Litchi chinensis</i>	38
4.6.1	Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH.....	38
4.6.2	Avaliação do poder redutor.....	39
4.7	Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica <i>in vitro</i>	40
4.7.1	Ensaio de difusão em ágar.....	40
4.7.2	Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).....	41

4.7.3	Quantificação da atividade antimicrobiana do extrato e frações com CIM menores ou iguais a 0,1.....	42
4.8	Avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	43
4.9	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	43
4.10	Análise estatística	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Granulometria	45
5.2	Obtenção do extrato seco e frações	46
5.2.1	Cálculos do rendimento percentual do extrato de folhas e frações de <i>L. chinensis</i>	47
5.3	Triagem fitoquímica	48
5.4	Análise do extrato e frações por espectrometria de massas	50
5.5	Determinação quantitativa de constituintes químicos	57
5.5.1	Determinação quantitativa de fenóis totais.....	57
5.5.2	Determinação quantitativa de flavonoides totais.....	61
5.6	Avaliação do poder antirradicalar	65
5.6.1	Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH.....	65
5.6.2	Avaliação do poder redutor.....	68
5.7	Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica <i>in vitro</i>	71
5.7.1	Ensaio de difusão em ágar.....	72
5.7.2	Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM).....	75
5.8	Quantificação da atividade antimicrobiana do extrato e frações com CIM menores ou iguais a 0,1 mg/ml	77
5.8.1	Percentual de atividade.....	77
5.8.2	Índice de susceptibilidade microbiano (ISM).....	78
5.8.3	Atividade total do extrato e frações de <i>L. chinensis</i> com CIM inferiores a 0,1 mg/ml.....	79
5.9	Correlação entre os teores quantitativos dos compostos e as atividades antioxidante e antimicrobiana	80
5.10	Avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	81
5.11	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	82
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A primeira fonte de recursos onde a humanidade encontrou sua base de alimentação como também as primeiras formas de alívio para seus males físicos foram as plantas, tendo muitas delas desempenhado um importante papel no desenvolvimento da medicina ao longo de vários séculos. Conforme observam Viegas, Bolzani e Barreiro (2006), a história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina e no controle de pragas, merecendo destaque a civilização egípcia, greco-romana e chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência, que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos.

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, usados com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos totalmente conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo utilizam-se dos seus benefícios, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos, de maneira empírica e transmitidas de geração a geração oralmente. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

A necessidade de estudos à procura de novos medicamentos através das plantas medicinais é mais fortalecida quando se depara com situações relacionadas às doenças resistentes ao arsenal de fármacos atuais. Para enfrentar essa realidade, pesquisas de novos fármacos originados de produtos naturais despertam grande interesse (HADDOUCHI et al., 2013; JOSHI et al., 2013; XIONG et al., 2013).

Dessa forma, com o propósito de investigar os metabólitos secundários e

testar atividades biológicas, intentou-se aprofundar o olhar científico sobre uma espécie exótica: a *Litchi chinensis* Sonn., conhecida no Brasil como lichieira.

Litchi chinensis Sonn. é uma espécie frutífera originária da China meridional e seu fruto, a lichia, é conhecida como a fruta nacional deste país. O primeiro registro de seu cultivo e consumo data de 140 a 80 a.C. na Dinastia Han. As primeiras lichieiras foram introduzidas no Brasil por volta de 1810, como um presente do imperador da China a D. Pedro I, tendo sido plantadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (DEL AGUILA, 2009).

A espécie é considerada medicinal em muitos países, em especial pela medicina tradicional chinesa. Os principais estudos científicos sobre esta espécie no Brasil se restringem às propriedades antioxidantes dos frutos, bem como em mecanismos de conservação destes após a colheita, evitando-se a rápida degradação da antocianina e o escurecimento enzimático do pericarpo (CHITARRA; CHITARRA, 2005; MOTTA, 2009; SOUZA, 2009; LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2011; LINS et al., 2012).

Em âmbito mundial, as pesquisas científicas desta espécie se aprofundam em sua forte atividade antioxidante e propriedades anticarcinogênicas, concentrando-se principalmente no pericarpo, sementes e flores e, de forma mais escassa, pesquisas com a casca do caule e folhas. Dentro desse contexto, estudos químicos e biológicos desta espécie tornam-se interessantes, haja vista que existe indicação etnofarmacológica em diversos países para ela.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os aspectos químicos e biológicos do extrato de folhas de *Litchi chinensis* Sonn.

2.2 Específicos

- Obter o extrato seco de folhas de *Litchi chinensis* Sonn. e suas frações;
- Realizar a triagem fitoquímica do extrato seco;
- Realizar a análise química do extrato seco e frações por ESI-IT-MSⁿ;
- Quantificar o teor de fenóis totais e de flavonoides totais do extrato seco e frações obtidas a partir das folhas;
- Realizar o ensaio antirradicalar pelos métodos do poder sequestrante de radicais DPPH e do poder redutor no extrato seco e frações;
- Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, *in vitro*, do extrato seco e frações;
- Realizar o ensaio de citotoxicidade, *in vitro*, do extrato seco e frações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos botânicos

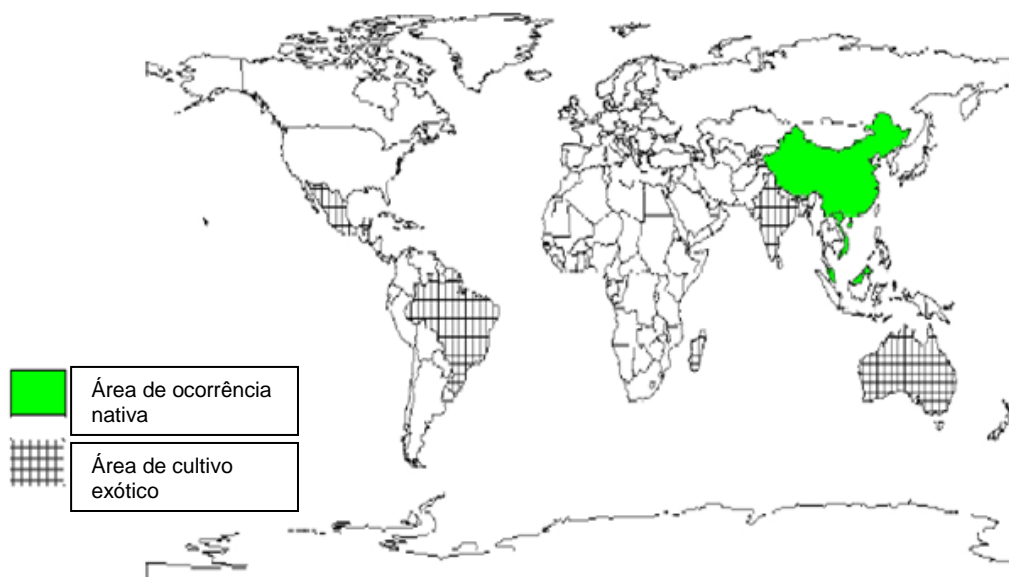
A lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.) é uma espécie importante pertencente à família Sapindaceae. Proveniente do latim *Sapindus*, o termo Sapindaceae significa sapo = sabão + indus = índia, devido à presença de saponinas em frutos, sementes e outros tecidos de algumas espécies, as quais são usadas na fabricação de sabonetes principalmente da espécie *Sapindus saponaria* L.. A família Sapindaceae possui cerca de 150 gêneros e mais de 2.000 espécies, comumente árvores, arbustos, lianas e raramente ervas, com distribuição cosmopolita e bem adaptada nos trópicos e sub-trópicos (MOTTA, 2009).

Segundo Picoli (2009) a família Sapindaceae abrange quatro espécies de grande interesse comercial em função da qualidade de seus frutos embora, entre todas, a lichia é a que tem maior expressão. São elas: lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), longan (*Dimocarpus longan* Lour.), rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) e pulusan (*Nephelium mutabile* Blume).

Litchi chinensis Sonn. é o único membro do gênero botânico *Litchi*, porém existem três subespécies: a *chinensis*, a *phillippinensis* e a *javanensis*, sendo que a segunda produz frutos não comestíveis e a terceira, frutos de pequeno valor comercial e de interesse apenas na Indochina e em Java. Portanto, somente a *Litchi chinensis chinensis* é de interesse econômico (EMBRAPA, 2009).

Espécie nativa da China, Malásia e Vietnã, a *L. chinensis*. é cultivada também em países como Austrália, Brasil, Honduras, Hong Kong, Índia, Israel, Madagascar, Ilhas Maurício, México, Mianmar, Nova Zelândia, África do Sul, Taiwan, Tailândia, EUA e Zanzibar, segundo dados de Orwa et al. (2009), conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Mapa de ocorrência da espécie *Litchi chinensis* Sonn.



Fonte: Orwa et al., 2009.

No Brasil, as principais espécies representantes desta família são o guaraná (*Paulinia cupana*) e a pitomba (*Talisia esculenta*).

Os frutos da lichieira são muito populares na China e no sul e sudeste da Ásia, porém menos conhecidos na África, Oriente Médio e América. Apesar de já existirem plantios comerciais no Brasil desde a década de 70 que apresentam resultado econômico satisfatório, ela ainda é considerada uma fruta exótica para os brasileiros. Um fator favorável ao cultivo no Brasil é que a produção de lichia ocorre nos meses de novembro a janeiro, onde a procura pelas frutas é alta e não apresenta concorrência com outros países produtores (TAKATA et al., 2011).

A lichieira (FIGURA 2) é uma árvore rústica e longeva – árvores de mais de 1.200 anos ainda florescem e dão frutos – com um belo porte, folhas verde escuro permanente, a planta atinge 10 a 12 metros de altura e tem tendência a desenvolver ramos direcionados para o solo. O sistema radicular das plantas, originadas de semente, apresenta uma grande raiz pivotante (praticamente ausente nas originadas por processos vegetativos), sendo que as raízes absorventes se distribuem no perfil do solo até uma profundidade de 1.0 metro (MOTTA, 2009).

Figura 2 - *Litchi chinensis* Sonn. em frutificação.



Fonte: < <http://www.izzobr.com/hibiscos/FloresJardins/slides/Lichia.html> >

As folhas (FIGURA 3) são alternadas, compostas, apresentando um número variável de folíolos entre dois a doze. As dimensões do pecíolo e da ráquis, bem como a disposição, número, forma e dimensão dos folíolos podem caracterizar os cultivares (PICOLI, 2009).

Figura 3 - Folha de *Litchi chinensis* Sonn.



Fonte: Do autor

A inflorescência, ilustrada na Figura 4, ocorre em forma de panícula e é produzida em ramificação do ano, sendo composta de centenas de pequenas flores brancas. Normalmente, a florada começa em fins do inverno a início da primavera, ocorrendo três tipos de flores que se abrem consecutivamente na mesma panícula, sendo duas funcionalmente masculinas e uma feminina. As masculinas não possuem óvulo e as femininas são hermafroditas. A segunda variedade de flor masculina possui pistilo rudimentar e ovários não desenvolvidos (MOTTA, 2009).

Figura 4 - Inflorescência de *Litchi chinensis* Sonn.



Fonte: Motta, 2009

A fruta lichia é uma drupa, e tem seu desenvolvimento completo em aproximadamente 11 a 16 semanas, com duas fases bem perceptíveis, sendo assim a primeira fase determinada pelo crescimento da casca e da semente e a segunda é um rápido crescimento do arilo (SALOMÃO, SIQUEIRA e PEREIRA, 2006).

Segundo Martins, Bastos e Scallopí Júnior (2001), os frutos apresentam formas e tamanhos variáveis, dependendo do cultivar, conforme se observa na Figura 5, podendo ser oval, redondo ou cordiforme e atingir até 5 cm de comprimento por 4 cm de largura; o peso pode variar de 10 a 35 g. A casca é vermelho brilhante, delgada, coriácea e quebradiça. A polpa é, normalmente, branca e translúcida. A semente é marrom-brilhante, com tamanho aproximado de 10 a 18% do fruto. Pode ocorrer aborto de sementes, as chamadas "língua-de-galinha", o que não diminui muito o tamanho dos frutos, que passam a ser preferidos por apresentarem uma maior porcentagem de polpa.

Figura 5 - Frutos de *Litchi chinensis* Sonn.



Nota: A) Variedade Bengal; B) Variedade Brewster

Fonte: <http://www.fazendacitra.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=78>

A cultivar 'Bengal' é a mais conhecida no Brasil e uma das mais cultivadas nas regiões subtropicais. Ela apresenta características como maturação precoce e moderado vigor (SOUZA, 2009).

Os frutos apresentam-se em cachos, a casca é rugosa e fácil de ser destacada. A polpa é gelatinosa, translúcida, sucosa e de excelente sabor, lembrando ao da uva Itália e não é aderente ao caroço (CARVALHO; CUNHA; RODRIGUES, 2005).

3.2 Aspectos comerciais

Pauly, Danoux e Henry (2004) estudaram os extratos metanólico e aquoso do pericarpo da fruta e os patentearam sob n° US 20040101508, utilizando-os em preparações cosméticas tópicas sob a forma de shampoo, espuma de banho, creme, loção, bastão, pó e pomada. São indicados para o cuidado da pele e cabelo, como protetores solares contra radiações UVA e UVB e, para o controle do envelhecimento (antiidade), como inibidores da protease, colagenase e/ou elastase.

Nas preparações farmacêuticas, administradas oralmente como comprimidos, drágeas, cápsulas, xaropes, soluções ou granulados, são úteis no controle dos radicais livres, agindo como antioxidantes e também como anti-inflamatório. Do ponto de vista industrial e comercial a lichia se torna uma fonte importante, pois se encontra disponível no mercado uma série de produtos à base desta espécie, dentre eles sabonetes, xampus, cremes, balas, repositores energéticos e perfumes (MOTTA, 2009).

Além de seu uso principal como fruta fresca, a lichia pode ser utilizada em temperos, molhos, conservas, vinhos, geleia, sucos e sorvetes. Já a lichia seca, tipo passa, pode ser utilizada em chás, como adoçante (CARVALHO; CUNHA; RODRIGUES, 2005).

Alves et al. (2011) desenvolveram quatro vinhos a partir dos frutos de *L. chinensis* preparados com três cepas de leveduras (UFLA CA11, CA1183 UFLA e UFLA CA1174) e uma fermentação espontânea (SPON), sendo que a análise sensorial indicou que os três primeiros vinhos tiveram taxas de aceitação acima de

75%. Estes processos visam agregar valor ao fruto, evitando perdas provenientes da curta vida de prateleira da lichia.

3.3 Aspectos fitoquímicos

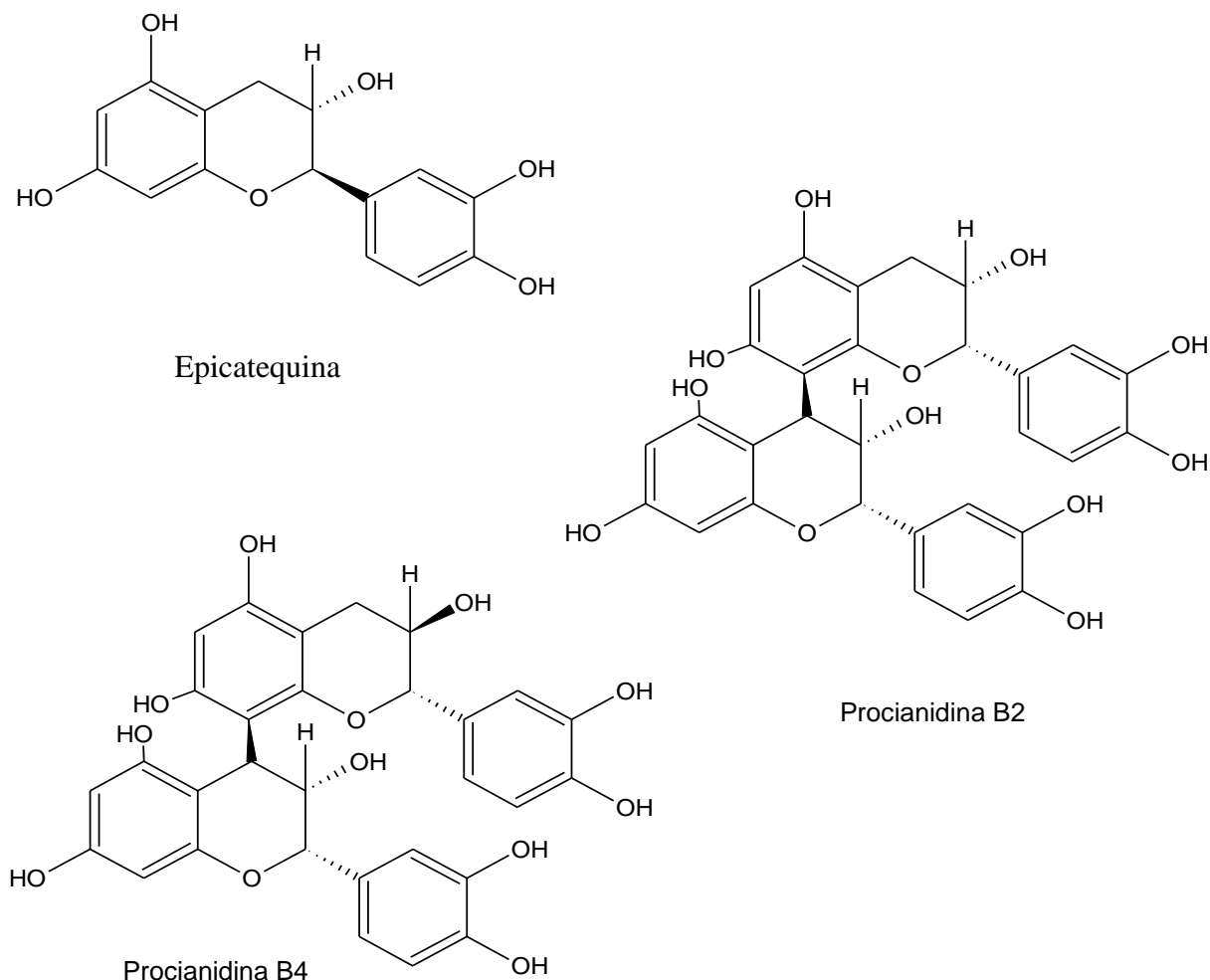
Gontier et al. (2000) encontraram ácidos graxos de importância industrial nas sementes de *L. chinensis*, contendo em suas estruturas um anel ciclopropanóico (diidrosterculato de metila foi o mais abundante), além de um ácido aminado incomum, denominado α -(metilenociclopropil) glicina.

Chyaua et al. (2003), avaliaram os compostos voláteis do suco fresco de frutos de lichia e identificaram um total de vinte e cinco compostos (glicosídeos livres e compostos voláteis), incluindo um éster, quatorze álcoois, dois aldeídos, quatro ácidos, duas cetonas e dois terpenos. Na fração livre, os principais compostos voláteis encontrados foram: acetoína (30,1%), geraniol (15,6%), 3-metil-2-buten-1-ol (15,3%), ácido octanóico (28%), 2-feniletanol (4,91%), *cis*-ocimeno (4,32%) e ácido butírico (3,4%).

Em um estudo de Duan et al. (2007) com o pericarpo de frutos de lichia, ficou caracterizada a presença de substâncias fenólicas como a cianidina-3-rutinosídeo, a cianidina-3-glicosídeo, a quercetina-3-rutinosídeo, a quercetina-3-glicosídeo, a procianidina B4, a procianidina B2, a epicatequina e os taninos condensados (proantocianidinas poliméricas).

Liu et al. (2007) identificaram as principais procianidinas poliméricas isoladas do pericarpo de lichia como sendo: a (-)-epicatequina, a procianidina A2 e a procianidina trimérica: epicatequina-($4\beta \rightarrow 8$, $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$)-epicatequina-($4\beta \rightarrow 8$)-epicatequina. Os resultados mostraram que as procianidinas isoladas do pericarpo de lichia obtiveram altas atividades antioxidantes *in vitro*, indicando que o pericarpo de lichia pode ser utilizada como uma nova planta fonte de compostos antioxidantes. Estas mesmas procianidinas também foram caracterizadas no estudo de Li et al. (2012) e Yang et al. (2012). A Figura 6 representa a estrutura dos flavonoides procianidina B2, procianidina B4 e epicatequina isolados no pericarpo de *L. chinensis*.

Figura 6 - Representação das moléculas de epicatequina, procianidina B2 e procianidina B4.



Fonte: Li e Jiang (2007)

Prasad et al. (2009) identificaram cinco compostos fenólicos a partir do extrato etanólico 50% de sementes de *L. chinensis*: o ácido gálico, a procianidina B2, (-) galocatequina-, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina-3-galato.

Usando um método de bioatividade guiada, Ren et al. (2011) isolaram glicosídeos nunca relatados anteriormente do extrato etanólico 50% de sementes *L. chinensis*. Os compostos foram identificados como (2*R*)-naringenina-7-*O*-(3-*O*- α -*L*-ramnopiranosil- β -*D*-glicopiranosídeo) e (2*S*)-pinocembrina-7-*O*-(6-*O*- α -*L*-ramnopiranosil- β -*D*-glicopiranosídeo). Os dois compostos isolados apresentaram atividade no ensaio de inibição da α -glicosidase.

No estudo de Wang et al. (2011), uma investigação química do extrato etanólico 95% de sementes de *L. chinensis* levou ao isolamento de quatro novos

compostos: $2\alpha,3\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-(4- β -8-catequina); 2β , 3β -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-(4 α -8-epicatequina); litchiol A e litchiol B, juntamente com onze outros conhecidos: 2,5-di-hidroxi-hexanóico, soscopoletina, ácido cumárico, ácido protocatequínico, $2\alpha,3\alpha$ -epoxi-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-(4- β →8)-epicatequina, pterodotriol *D*-6-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo, dihidrochalcona-4'-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo, pinocembrina-7-rutinosídeo, pinocembrina-7-neohesperidosídeo, narirutina e naringina. Suas estruturas foram elucidadas com base principalmente nos métodos de RMN, EM, infravermelho (IV) e ultravioleta (UV).

Xu et al. (2011) isolaram um ciclopropil-glicosídeo contendo ácidos graxos das sementes de *L. chinensis*, o ácido 3,12-di-hidroxi-*cis*-3,4-metilenododecanoico 3-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo.

Guo et al. (2012) isolaram cinco constituintes químicos a partir da fração acetato de etila, partindo do extrato etanólico de sementes de lichia. As estruturas químicas foram elucidadas como: estigmasterol, *p*-hidroxi-benzaldeído, ácido protocatequínico, daucosterol e canferol-3-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo.

Do trabalho de investigação fitoquímica de Jiang et al. (2013) a partir do extrato metanólico do pericarpo de *L. chinensis* resultou o isolamento dos compostos fenólicos: ácido 2-(2-hidroxi-5-(metoxicarbonil)fenoxibenzoico), juntamente com canferol, isolariciresinol, estigmasterol, butil-hidroxitolueno, 3,4-dihidroxil benzoato, metil-etil-chiquimato e chiquimato. A maioria foi encontrada no pericarpo de lichia pela primeira vez. As atividades antioxidantes dos oito compostos foram determinadas por ensaio de radicais DPPH e os resultados mostraram que o ácido 2-(2-hidroxi-5-(metoxicarbonil)-fenoxi) benzoico, canferol, isolariciresinol, butil-hidroxitolueno e ácido 3,4-di-hidroxibenzoato exibiram boas atividades antioxidantes.

3.4 Aspectos etnofarmacológicos

Os usos populares mais encontrados para a lichia são antiescorbútico, anti-inflamatório, analgésico, antitérmico, antitussígeno e diurético, além de indicações para dor de estômago e prevenção de tumores. O chá da casca é utilizado no combate à diarreia. A semente, devido às propriedades adstringentes, é transformada em pó e usada para curar problemas intestinais (SALLES, 2007).

Houghton e Osibogun (1993) realizaram um estudo de revisão sobre plantas utilizadas para o tratamento de mordedura de cobra a partir de uma variedade de fontes bibliográficas. Uma vez que o acesso aos soros antiofídicos usados nos países ocidentais não estão prontamente disponíveis em muitas sociedades, o uso de plantas constitui a parte principal dos tratamentos usados por curandeiros tradicionais. Diante disso, não é surpreendente que muitas plantas têm a reputação de ser útil contra mordedura de cobras em vários países em todo o mundo. Esses autores citam Perry e Metzger (1980) afirmando o uso de folhas de *L. chinensis* no sudeste da Ásia para este fim.

Martins (2005) observa em seu trabalho que o suco da fruta é indicado para combater febres passageiras, aliviar a tosse, problemas no fígado e estômago. Indica ser um bom anti-inflamatório, também usada em casos de polidipsia, soluços, dores de dente, hemorragias externas e hérnias. Enquanto a semente e a casca da raiz são utilizadas no tratamento de hérnias e inchaço. As sementes também têm um efeito analgésico como as flores, acalmando dores de garganta.

Faysal (2008) pesquisou o uso etnofarmacológico de onze plantas medicinais no distrito de Khulna, em Bangladesh, entre elas a *L. chinensis*. Uma revisão da literatura foi então iniciada a fim de investigar sobre a atividade terapêutica e os constituintes químicos destas plantas medicinais. Neste estudo, *L. chinensis* aparece com indicações para tratar distúrbios neurológicos, varíola e infecção de garganta.

Em três estudos de Rahmatullah et al. (2010a; 2010b e 2010c), sobre os relatos de plantas medicinais utilizadas pelos praticantes da medicina popular em aldeias de Bangladesh, estes autores descrevem a ação de *L. chinensis* como estimulante do nervo, hérnia, varíola, indigestão em bovinos, onde o suco da planta inteira é triturada e administrada por via oral. Também é indicada para indigestão e perda de apetite, além de aplicações tópicas do suco das folhas contra picadas de insetos.

Wang et al. (2011) relataram que as sementes de *L. chinensis* têm sido comumente usadas na medicina tradicional chinesa para o alívio da dor nevrálgica.

3.5 Aspectos farmacológicos

De acordo com Besra, Sharma e Gomes (1996), o extrato etéreo de petróleo das folhas de *L. chinensis* revelou atividade anti-inflamatória significativa ao inibir edema inflamatório induzido por carragenina e granuloma induzido por “pellet” de algodão, sugerindo um mecanismo de ação com envolvimento imunológico, uma vez que foi comprovado que a inibição não foi realizada via ácido araquidônico. As frutas e vegetais contêm diversos compostos antioxidantes, tais como ácido ascórbico, tocoferol, glutatona e carotenoides, os quais podem contribuir para a proteção contra o dano oxidativo. Além disso, o extrato possui ação analgésica e antipirética ao inibir, em camundongos, respectivamente, convulsões induzidas por ácido acético e pirexia. Neste estudo, o extrato foi considerado atóxico até a concentração de 1g/kg por via intra-peritoneal.

Avaliando o mecanismo farmacológico do extrato aquoso da semente de lichia, Guo et al. (2004) conseguiram antagonizar a resistência à insulina em ratos com diabetes tipo 2, induzido. De acordo com os resultados obtidos, o extrato pode reduzir os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da hiperleptinemia e da hiperinsulinemia, antagonizar a resistência e fortificar a sensibilidade à insulina, reajustar a lipodistrofia e o metabolismo irregular de glicose, além de reforçar a ação antioxidante e melhorar as funções do fígado e rim.

Wang et al. (2006a) em seus estudos objetivando avaliar a atividade anti-câncer *in vitro* e *in vivo* para o carcinoma hepatocelular, concluíram que o extrato aquoso do pericarpo de lichia exibe uma grande inibição da proliferação e indução à apoptose das células cancerígenas.

Wang et al. (2006b) testaram o extrato alcoólico do pericarpo de *L. chinensis* contra câncer de mama utilizando tanto modelos *in vitro* como *in vivo* e demonstraram um efeito inibitório dose e tempo-dependentes sobre o crescimento de células cancerosas *in vitro*. Foi também observada no experimento a expressão *in vivo*. Os achados deste estudo sugerem que extrato alcoólico do pericarpo de *L. chinensis* possa ter potencial atividade contra câncer de mama humano.

Li e Jiang (2007) traçaram uma revisão do *status* do isolamento, identificação, atividade biológica, utilização e perspectivas para os flavonoides encontrados no pericarpo de lichias. Tendo em vista que o pericarpo compreende 15%, em peso,

correspondente a toda a fruta fresca, este se torna uma importante fonte de flavonoides. Os flavonoides e as antocianinas extraídas do pericarpo de lichias apresentam bom potencial para atividade antioxidante como também apresentam um efeito inibitório dose-dependente sobre câncer de mama humano, que pode ser atribuído, em parte, à inibição da proliferação e indução de apoptose em células cancerosas (HELF e MCF-7). Estes autores sugerem que os flavonoides extraídos do pericarpo de lichias podem ser componentes potencialmente úteis para alimentos funcionais e / ou futuras drogas anti-câncer de mama.

Zhao et al. (2007) demonstraram que flavonoides obtidos da extração hidroetanólica (85%) do pericarpo dos frutos exibiram efeito imunomodulatório e antitumoral. Três principais flavonoides foram obtidos: a epicatequina, a proantocianidina B2 e a proantocianidina B4. Em ensaios *in vitro* utilizando esplenócitos de rato foram encontrados efeitos imunomodulatório e antitumoral significativos para estes três flavonoides e para a fração acetato de etila deste extrato.

Roy et al. (2008) estudaram a indução de apoptose em células leucêmicas humanas das linhagens U937, K562 e HL-60 pelo extrato metanólico 50% de folhas de *L. chinensis* através da ativação mitocondrial mediada por cascatas de caspases. O extrato metanólico 50% de folhas inibiu o crescimento celular e a atividade metabólica das células leucêmicas e mostrou características de apoptose. A análise por citometria de fluxo de células mostraram número apreciável no início e final das fases apoptóticas. Enquanto o ciclo das populações celulares das linhagens U937 e K562 pararam na fase G₂/M, o ciclo celular das populações de HL-60 pararam na fase G₁. O extrato metanólico 50% de folhas de *L. chinensis* induziu apoptose mediada através da via mitocondrial intrínseca, envolvendo a liberação de citocromo C para o citosol e a ativação da caspase-9 e caspase-3.

Prasad et al. (2009) estudaram a atividade antioxidante e anti-tirosinase a partir de extratos de sementes de *L. chinensis*. Utilizando cinco diferentes tipos de solventes polares: etanol, etanol a 50%, metanol, metanol 50% e água. Estes extratos foram avaliados quanto ao teor de fenólicos totais, capacidade antioxidante e atividade anti-tirosinase. O extrato etanólico 50% apresentou a maior capacidade antioxidante total, a maior capacidade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) e a maior atividade inibidora contra a peroxidação dos lípidos e foi comparável à atividade do antioxidante sintético utilizado, o butil-hidroxitolueno

(BHT). Este estudo sugere que as sementes de lichia podem ser usadas como uma fonte potencialmente acessível de antioxidantes naturais.

Yang et al. (2010) estudaram o efeito protetor do extrato aquoso de flores de lichia sobre a saúde cardiovascular em *hamsters* com dieta rica em gorduras e colesterol. O estudo indicou que o extrato aquoso de flores contém uma abundância de compostos fenólicos, ou seja, fenóis, flavonoides e taninos. Foram realizadas análises no soro, no fígado, na gordura visceral e nas fezes. A determinação de parâmetros de lipídeos séricos, de colesterol, de triglicérides e de expressões hepáticas foi utilizada para caracterizar o efeito protetor cardiovascular *in vivo*. Foi observado que o extrato aquoso de flores de lichia reduziu o nível de lipídeos séricos, normalizou a expressão gênica do receptor LDL, além de aumentar a excreção fecal dos ácidos biliares e lipídicos, demonstrando um bom efeito protetor da saúde cardiovascular.

Bhoopata et al. (2011) estudaram o efeito hepatoprotetor de *L. chinensis* em ratos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Estes autores observaram um decréscimo significativo de células apoptóticas em conjunto com a restauração de alterações morfológicas e confirmaram o efeito hepatoprotetor nos ratos induzidos CCl₄. Eles associaram esta atividade às propriedades antioxidante, antiperoxidação lipídica e antiapoptose, quantificando a vitamina C e compostos fenólicos.

Além dos estudos farmacológicos, foram encontrados relatos de reações alérgicas após o consumo de lichia. Um paciente atópico sofreu uma reação anafilática após o consumo desta fruta. Neste estudo, os autores encontraram a proteína profilina, que está presente em quantidades significativas na lichia, como sendo a provável desencadeadora da reação anafilática (FÄH; WÜTHRICH; VIETHS, 1995).

Nesse mesmo sentido, Zhou et al. (2012) estudaram os efeitos de compostos isolados de frutos de *L. chinensis* em prostaglandina E₂ e produção de óxido nítrico em células de macrófagos murinos J774. Os resultados demonstraram que os compostos isolados a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico dos frutos de *L. chinensis* (álcool benzílico, hidrogenoquinona e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído) induziram incrementos na potência das atividades de PGE₂ e NO, o que justificaria os sintomas inflamatórios causados em pessoas alérgicas após o consumo.

As influências do processamento térmico sobre a potência alergênica da lichia foi o alvo de pesquisa Hoppe et al. (2006). Neste estudo foi verificado que o potencial alergênico da lichia tem uma pequena redução quando consumida na forma processada e enlatada. Tratamentos térmicos mais drásticos afetariam a qualidade sensorial, assim observa-se que alguns fatores relacionados à variação na composição nutricional e fenólica, bem como a atividade antioxidante da fruta são influenciadas pelos métodos de conservação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e identificação do material vegetal

O material vegetal foi constituído por folhas de *Litchi chinensis* Sonn. coletadas de um único espécime vegetal. A coleta foi realizada na Fazenda dos Campos, situada no município de Alfenas, localizada a 808,0 m de altitude, latitude 21°20'27,3" S e longitude 45°53'29,2" HO, no dia quatro de junho de 2012 às 9 horas. As folhas foram então encaminhados para o laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas para iniciar os processos de secagem, da produção da droga vegetal em pó e da extração.

A coleta do material vegetal florido para a preparação da exsicata foi realizada no dia oito de dezembro de 2012, identificada pelo Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva e depositada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas (Departamento de Botânica) sob o número 2.276.

4.1.1 Secagem

As folhas foram separadas manualmente e mantidas sem rasuração para o processo de secagem. Este material foi disposto em camadas finas e submetido à secagem em estufa com circulação de ar (FANEM modelo 320-SE) a 45°C durante 40 horas. O tempo para a completa secagem foi determinado quando o peso da amostra do material vegetal se manteve constante. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem (OLIVEIRA, AKISUE e AKISUE, 1991).

4.1.2 Moagem e granulometria

As folhas de *Litchi chinensis* Sonn. foram triturados em moinho de facas (Cienlab modelo CE-430) até a obtenção do pó. O pó obtido foi padronizado através da mensuração do tamanho médio das partículas utilizando a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição p. 92 (2010) intitulada Determinação da granulometria dos pós. Este ensaio foi realizado utilizando Agitador de Peneiras Eletromagnético (ErTel®) com conjunto de tamises com malhas variando de 250 a 850 µm sob a vibração 9, estabelecida anteriormente, por um período de 15 minutos. A partir dos resultados foram calculadas as frequências percentuais, as frequências percentuais cumulativas, o tamanho médio das partículas, além da determinação da curva granulométrica. A seguinte fórmula proposta por Ansel, Popovich e Allen (2000) foi utilizada para o cálculo do tamanho médio das partículas:

$$tm = \Sigma \frac{(\%retida). (abertura\ média)}{100}$$

O pó obtido foi armazenado em frasco de vidro âmbar e armazenado ao abrigo da luz e umidade até o processo de extração.

4.2 Obtenção dos extratos secos

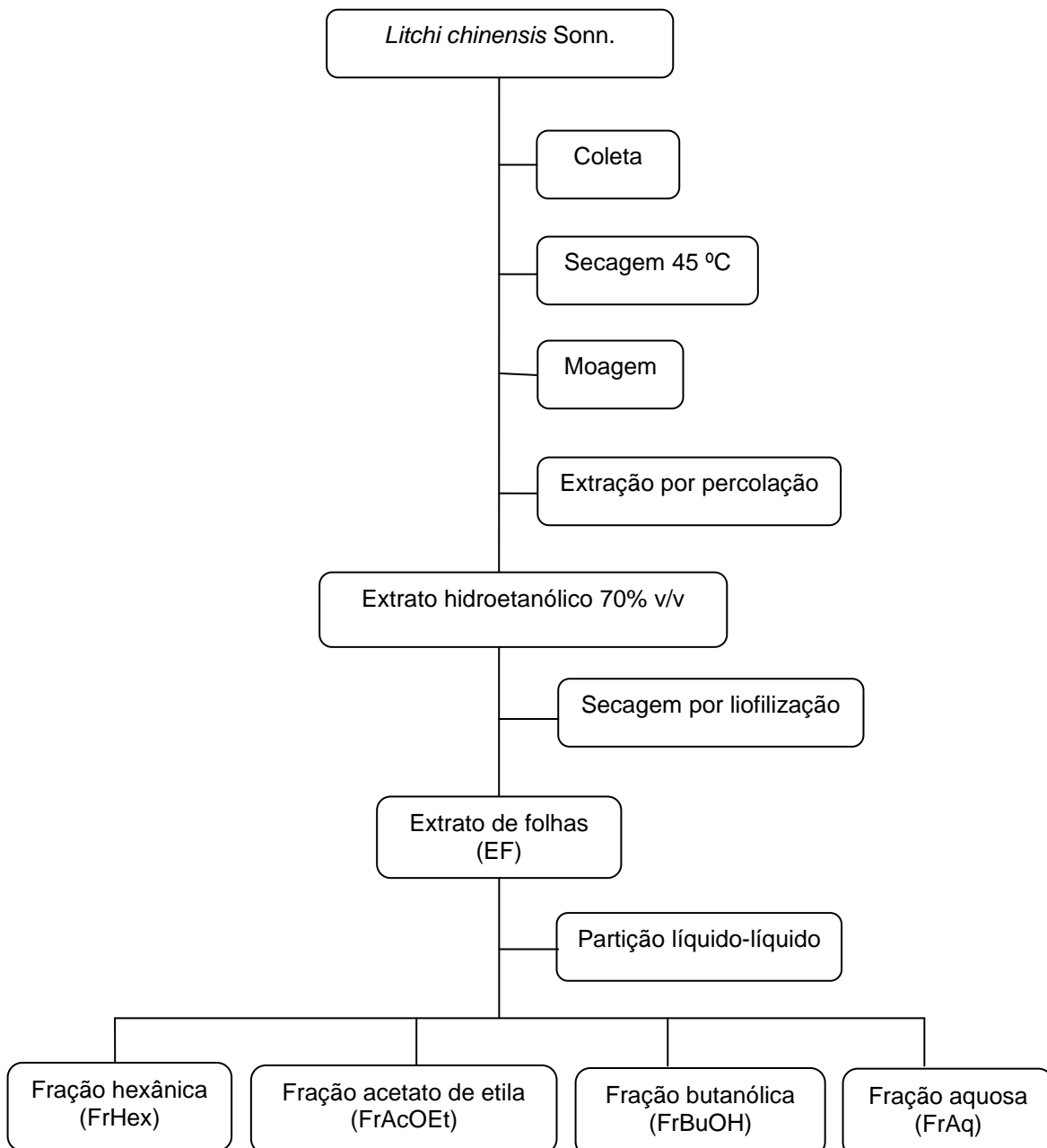
O extrato hidroetanólico foi obtido através do método de extração exaustivo de percolação simples segundo Prista, Alves e Morgado (1991). O processo iniciou-se com o intumescimento prévio do pó com etanol 70% (v/v) durante 1 hora fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%). O empacotamento foi realizado da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. O pó foi coberto com algodão para evitar a elevação do material ao ser acrescentado o líquido extrator. O álcool 70% (v/v) foi então adicionado aos poucos até ficar acima da superfície do pó e deixado em maceração por 48 horas. Depois deste período o percolador foi aberto na vazão de 40 a 60 gotas/minuto.

Após a extração, o percolado foi rotaevaporado, sob pressão reduzida, em temperatura média de 45° C. O extrato foi transferido para um recipiente de vidro e armazenado em geladeira para posterior secagem.

O extrato obtido de acordo com a metodologia anterior foi seco através do processo de liofilização utilizando o Liofilizador Liotop L101.

Após a obtenção do extrato seco, o mesmo foi armazenado em frasco âmbar e mantido em dessecador. A Figura 7 mostra o fluxograma da obtenção dos extratos e das frações de *L. chinensis*.

Figura 7 - Fluxograma da obtenção dos extratos e frações de *L. chinensis*.



4.2.1 Obtenção das frações do extrato seco (EF)

Foi realizada a separação das frações do extrato de folhas (EF) visando à preparação dos constituintes químicos através de suas polaridades. A metodologia empregada baseou-se no processo de partição líquido-líquido, utilizando-se uma série de solventes com gradiente crescente de polaridade, como segue: hexano, acetato de etila e butanol. Uma alíquota de 7 g do extrato de folhas (EF) foi solubilizada em 250 mL de água destilada. Em seguida realizaram-se partições sucessivas, em funil de separação, com hexano 1:1, v/v (4x), seguido por acetato de etila 1:1, v/v (6x) e butanol 1:1, v/v (6x). Desse processo obteve-se como resíduo resultante a fração residual aquosa. Após evaporação em rotaevaporador até a eliminação completa dos solventes, as frações foram transferidas para recipientes de vidro pesados e colocados em capela sob jato de ar comprimido, com exceção da fração aquosa que foi liofilizada. Foram obtidas então as respectivas frações: hexânica (FrHex), acetato de etila (FrAcOEt), butanólica (FrBuOH) e aquosa (FrAq).

4.2.2 Cálculos do rendimento percentual

O rendimento percentual (R) para o processo extrativo apresentado foi calculado dividindo a massa (M) de extrato seco obtido pela massa (M) da droga vegetal em pó utilizado na extração e multiplicando o resultado por 100, conforme a expressão:

$$R (\%) = (M_{\text{extrato seco}} / M_{\text{droga vegetal em pó}}) \times 100$$

4.3 Triagem fitoquímica dos extratos

O extrato de folhas (EF) foi submetido a processos químicos de identificação qualitativa seguindo a metodologia proposta por Barbosa (2001). As amostras do

extrato foram analisadas em triplicada e os ensaios foram analisados quanto ao desenvolvimento de coloração e/ou precipitação característica.

Em relação à presença de alcaloides, o extrato foi testado com os seguintes reativos de precipitação: Mayer, Bouchardat, Dragendorff e Bertrand.

A presença de antraquinonas foi avaliada através das seguintes reações de identificação: Reação de Bornträger direta (pesquisa de antraquinonas livres), Reações de Bornträger indireta (pesquisa de O-heterosídeos e C-heterosídeos).

O extrato de folhas (EF) foi analisado através das reações de identificação do anel esteroidal pelas reações de Liebermann-Burchard e de Salkowski para avaliar a presença de esteroides e/ou triterpenos.

A presença de flavonoides no extrato de folhas (EF) foi analisada pela reação de Shinoda e pelas reações com cloreto de alumínio e cloreto férrico.

Os polissacarídeos foram analisados pelas seguintes reações: Benedict (presença de açúcares redutores); Fehling e Tollens (presença de aldoses); Molish (açúcares solúveis totais) e reação com floroglucinol (presença de pentoses).

A presença de saponinas no extrato foi testada utilizando-se as técnicas de hidrólise ácida, hemólise e formação de espuma resistente a ácidos minerais diluídos, onde a mistura dos extratos com água é colocada em um tubo de ensaio sob forte agitação e depois submetida à presença de ácido sulfúrico diluído para verificação da propriedade afrogênica.

A presença de taninos no extrato foi testada pelas reações com cloreto férrico a 2% e acetato de cobre a 3% e através das reações de precipitação com proteínas e alcaloides, além da reação para taninos condensados.

4.4 Análise do extrato e frações por espectrometria de massas

A análise do extrato de folhas (EF) e frações foi realizada pelo método de inserção direta no sistema ESI-IT-MSⁿ no Laboratório de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus Experimental do Litoral Paulista.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LTQ XL da Thermo Scientific Linear 2D, equipado com um dispositivo de inserção direta

da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). Os extratos foram analisados no modo de ionização por electrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS^n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -41 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LTQ XL. O primeiro evento foi uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 2.2 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

4.5 Determinação quantitativa de constituintes químicos de *Litchi chinensis*

As determinações quantitativas de constituintes químicos foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da UNIFAL-MG.

4.5.1 Determinação quantitativa de fenóis totais

Os conteúdos de compostos fenólicos no extrato e frações de folhas foram determinados baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações, citado por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Foram preparadas soluções das amostras a uma concentração de 0,1 mg/mL. Uma alíquota de 500 μ L destas soluções foi transferida para tubos de ensaio recobertos com papel alumínio. Foram adicionados 2500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu 10%. Após um período de 2 a 5 minutos, foi adicionado 2000 μ L de carbonato de

sódio (Na_2CO_3) a 4% e os tubos foram agitados por 30 segundos. Após 2 horas de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu 2550 modelo TCC 240A a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o etanol absoluto e todos os reagentes, exceto o extrato a ser analisado. O teor de fenóis totais foi determinado utilizando uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata e cada amostra teve seu ajuste a partir da leitura do branco da amostra.

4.5.2 Determinação quantitativa de flavonoides totais

A determinação de flavonoides foi realizada utilizando o método colorimétrico por espectrometria no UV citado por Kalia et al. (2008). Primeiramente foi construída uma curva de calibração utilizando a quercetina como padrão nas concentrações de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir das amostras diluídas em etanol absoluto na concentração de 0,25 mg/mL foram realizados os ensaios. Uma alíquota de 500 μL de cada amostra foi transferida para tubos de ensaio. Em seguida 1500 μL de etanol absoluto foram adicionados. Posteriormente 100 μL da solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10% (p/v) e 100 μL de acetato de potássio (CH_3COOK) 1M foram adicionados aos tubos. O volume da solução foi completado para 5 mL com 2800 μL de água destilada. Os tubos foram agitados para homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos.

Em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu 2550 modelo TCC 240A no comprimento de onda de 425 nm, correspondente ao pico de absorção do quelato quercetina-alumínio, ajustando o zero de absorbância com a solução do branco.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg de EQ (equivalentes de quercetina) por grama de extrato e apresentados como média das análises.

4.6 Avaliação do poder antirradicalar do extrato seco e frações obtidos das folhas de *Litchi chinensis*

A avaliação do poder antirradicalar do extrato e das frações de *L. chinensis* foi realizada pelos métodos do poder sequestrante de radicais DPPH e do poder redutor.

4.6.1 Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH

A avaliação da atividade seqüestrante de radicais DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen, Chang e Duh (2005) com modificações. As soluções das amostras e dos padrões (quercetina, ácido ascórbico e BHT) foram preparadas nas seguintes concentrações: 1,56 µg/mL; 3,125 µg/mL; 6,25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL. Uma alíquota de 2,0 mL da solução das amostras a serem testadas e dos padrões foram adicionadas a 0,5 mL de solução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) na concentração 0,5 mM. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção da luz, por 30 minutos. Logo após, foram lidas as absorvâncias em 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu 2550 modelo TCC 240A. Foram realizados ensaios em branco para as mesmas concentrações das amostras utilizando, ao invés do DPPH, 0,5 mL de etanol, enquanto que o controle negativo foi preparado com 2 mL de etanol adicionado a 0,5 mL da solução de DPPH. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A partir das médias das leituras, calculou-se a diferença de absorvância entre a amostra e o branco e obteve-se as atividades antioxidantes percentuais segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade Antirradicalar (\%)} = \left\{ \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\} \times 100$$

A absorvância lida a 517 nm diminui à medida que a reação entre as moléculas antioxidantes e os radicais de DPPH ocorre. Assim, quanto mais rapidamente decresce a absorvância, maior será a atividade antirradicalar do extrato sob estudo.

A porcentagem de sequestro de radical DPPH corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de radical DPPH em 50% é denominada concentração efetiva média (CE_{50}). Quanto maior o consumo de radical DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007).

4.6.2 Avaliação do poder redutor

A avaliação do poder de redução das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yildirim, Oktay e Bilaloglu (2001) *apud* Yildirim, Mavi e Kara (2001) com modificações.

As amostras e os padrões (Ácido ascórbico e BHT), em triplicata, foram preparados nas seguintes concentrações: 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ e de cada uma foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para tubos de ensaio de 25,0 mL. A esta alíquota foram adicionados: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6); 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Uma porção de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionada à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Uma quantidade de 2,5 mL da mistura foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl_3 (0,1%). A leitura da absorvância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu 2550 modelo TCC 240A. A absorvância elevada indica grande poder redutor.

4.7 Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro*

Os ensaios de avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica do extrato e frações de folhas de *L. chinensis* foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG.

4.7.1 Ensaio de difusão em ágar

A ação antimicrobiana foi avaliada pelo método da difusão em ágar segundo metodologia proposta no documento M7-A6 (CLSI, 2003) para bactérias, M24-A2 (CLSI, 2011) para micobactérias e M44-A2 (CLSI, 2009) para fungos. Foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura com auxílio de um tubo metálico. Para as bactérias foi utilizado o Ágar Mueller Hinton e para as leveduras o Ágar Mueller Hinton adicionado de 2% de glicose. Foi preparada a suspensão de microrganismos em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland e as mesmas foram inoculadas na superfície do meio de cultura com auxílio de swab. Após inoculação, os poços foram preenchidos com 40 µL dos extratos na concentração de 50 mg/mL (p/v) utilizando como controle positivo de ação antimicrobiana a solução de clorexidina a 0,12%, e como controle negativo a água destilada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, exceto para *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, que ficaram incubadas por 48h. Após a incubação, foram feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, em milímetros, com auxílio de régua milimetrada.

A atividade antimicobacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra) e *Mycobacterium bovis* (amostra BCG) foi determinada pela técnica de difusão em meio Middlebrook 7H10 Agar adicionado de Middlebrook OADC Enrichment. O extrato vegetal estéril, na concentração de 50 mg/mL, num volume de 10µL, foi colocado em discos de papel de filtro de 10 mm de diâmetro e secos na estufa a 37°C. O Ágar Middlebrook 7H10 foi inoculado com as suspensões de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra) e *Mycobacterium bovis* (amostra BCG) separadamente em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5

da Escala de Mac Farland, com auxílio de pérolas de vidro para desagregação das colônias. Foi utilizada como controle positivo solução de Rifamicina 30 µg e como controle negativo, água destilada. As culturas foram incubadas a 37°C por 28 dias.

O extrato e frações de folhas de *L. chinensis* foram testados frente às cepas de: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 mantidas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

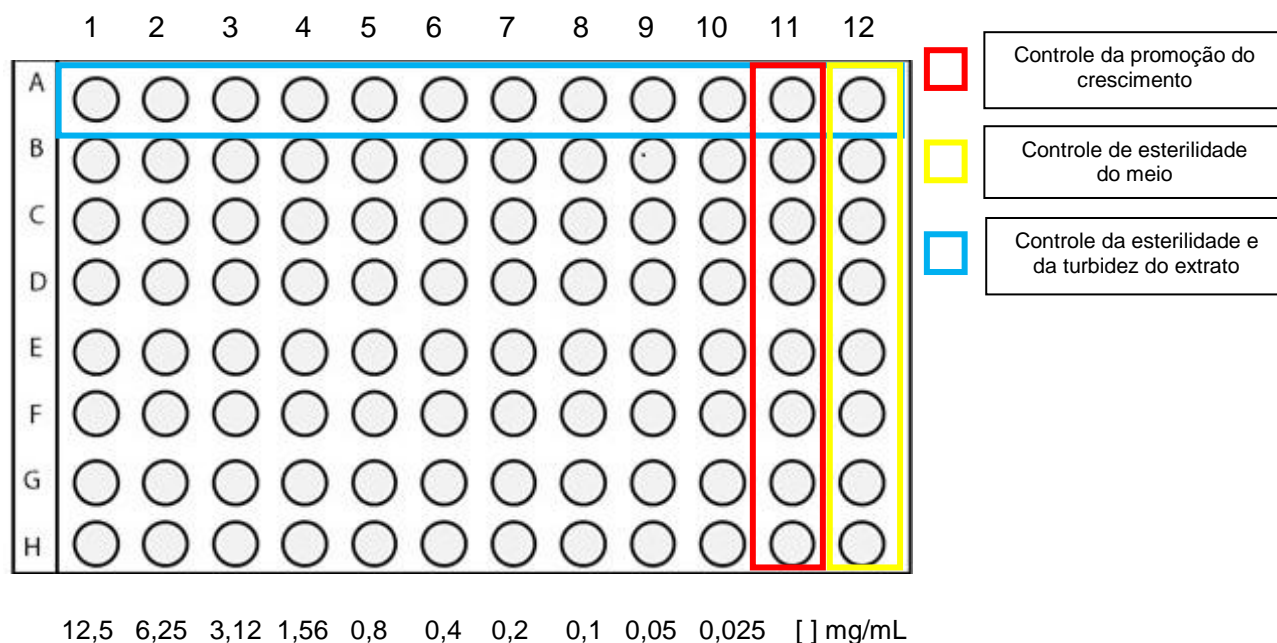
4.7.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* foi determinada por microdiluição em caldo conforme metodologia proposta no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Para o teste, as bactérias foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 35°C/18 horas. As suspensões microbianas foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland em solução fisiológica estéril. Cada poço foi adicionado de 100 µL de caldo Müller-Hinton e no primeiro poço, 100 µL de caldo Müller-Hinton 2x concentrado e 100 µL da solução estéril das amostras do extrato e frações na concentração de 25 mg/ml. A partir desta concentração foram realizadas as diluições de modo a obter as concentrações de 12,5 mg/mL até 0,025 mg/mL. Alíquotas de 10 µL da suspensão bacteriana padronizada na escala 0,5 de MacFarland foram acrescentadas individualmente a cada poço. A presença de turbidez após a incubação por 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica foi considerada indicativa de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato na qual não houve turvação. Foram realizados os controles

de esterilidade do meio de cultura, do extrato e da promoção do crescimento conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema de inoculação das microplacas para os ensaios de CIM.



Fonte: Do autor

4.7.3 Quantificação da atividade antimicrobiana do extrato e frações com CIM menores ou iguais a 0,1 mg/ml

A partir dos dados obtidos foi calculada a atividade antimicrobiana total, sendo a razão entre a quantidade em mg do material extraído, por 1 g de droga vegetal, e a concentração inibitória mínima (ELOFF, 2004).

De acordo com Bonjar (2004), o percentual de atividade foi calculado como a razão entre o número de microrganismos susceptíveis aos extratos vegetais e o total de microrganismos testados.

O índice de susceptibilidade microbiano (ISM) é determinado como a razão entre o número de extratos efetivos contra cada microrganismo e o total de extratos vegetais testados. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.8 Avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

Os ensaios de avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIFAL-MG, seguindo metodologia descrita por Pereira et al., 2010.

As promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), foram cultivadas em uma placa de 24 poços em meio Schneider's Drosophila suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado e 1% de penicilina (10000 µL/mL)/estreptomicina (10mg/mL). Os parasitas foram coletados, ressuspensos em meio alcalino, contadas em câmara de Neubauer e ajustados à concentração de 1×10^6 células/mL. O extrato e as frações foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações que variaram na faixa de 0,1 µg/mL a 40 µg/mL e foram adicionados às culturas de promastigotas a 1×10^6 células/mL e posteriormente incubados a 25°C. Após 72h de incubação, os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com os controles, com apenas DMSO na concentração de 0,6% v/v, para a determinação da concentração inibitória de 50% de crescimento (CI₅₀). Todos os testes foram realizados em triplicata e a anfotericina B foi utilizada como medicamento de referência.

4.9 Teste de citotoxicidade in vitro

Para avaliação da citotoxicidade foram utilizados os macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO₂, dispostos em placas de 24 poços na razão de 8×10^5 células por poço, aos quais foram adicionados o extrato e as frações a serem avaliados em várias concentrações que variaram no intervalo de 0,1 µg/mL a 160 µg/mL e incubados por 72 horas. Após o período de incubação foi adicionado 50 µL de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cada poço, com nova incubação por 4 horas, e então as células foram lisadas com DMSO e avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm para a determinação da concentração citotóxica média

(CC₅₀), ou seja, a concentração que reduz a viabilidade celular em 50% por comparação ao controle sem adição de drogas (PEREIRA et al., 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 Análise estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do software SISVAR Versão 5.3/DEX-UFLA (Copyrigh, 1999-2010).

A análise estatística dos ensaios quantitativos para compostos fenólicos e flavonoides bem como os ensaios da atividade antirradicalar foram realizadas pela análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Scott e Knott para observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$).

A análise estatística dos experimentos da atividade antimicrobiana foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) seguidas do teste de Scott e Knott (1974). A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

As análises de correlação foram obtidas pelo coeficiente de correlação de Spearman (r).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Granulometria

O ensaio granulométrico foi realizado com o objetivo de padronizar o tamanho médio das partículas, sendo este um importante parâmetro a ser estabelecido porque exerce influência direta sobre a eficiência do processo extrativo. A superfície de contato entre a droga vegetal e o líquido extrator determinará o rendimento final do extrato e o teor de compostos extraídos, além de garantir o preenchimento correto no percolador.

De acordo com a classificação da Farmacopeia Brasileira 5^o ed. (2010), o pó das folhas de *L. chinensis* Sonn., após o processo de granulometria, foi classificado como pó grosso, ou seja, aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com a abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 mm.

Os resultados das frequências percentuais e frequências percentuais cumulativas para as folhas de *L. chinensis* Sonn. estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequências percentuais, frequências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de *L. chinensis* Sonn.

Abertura da malha (μm)	Abertura média (μm)	Fração retida acumulada %	Teor de amostra %
0*	125	3,26	14,07
250	302,5	11,53	8,27
355	427,5	29,77	18,24
500	605	65,19	35,42
710	780	86,69	21,50
850	850	100,00	2,50
Tamanho médio			217,31

Nota: * Fundo coletor

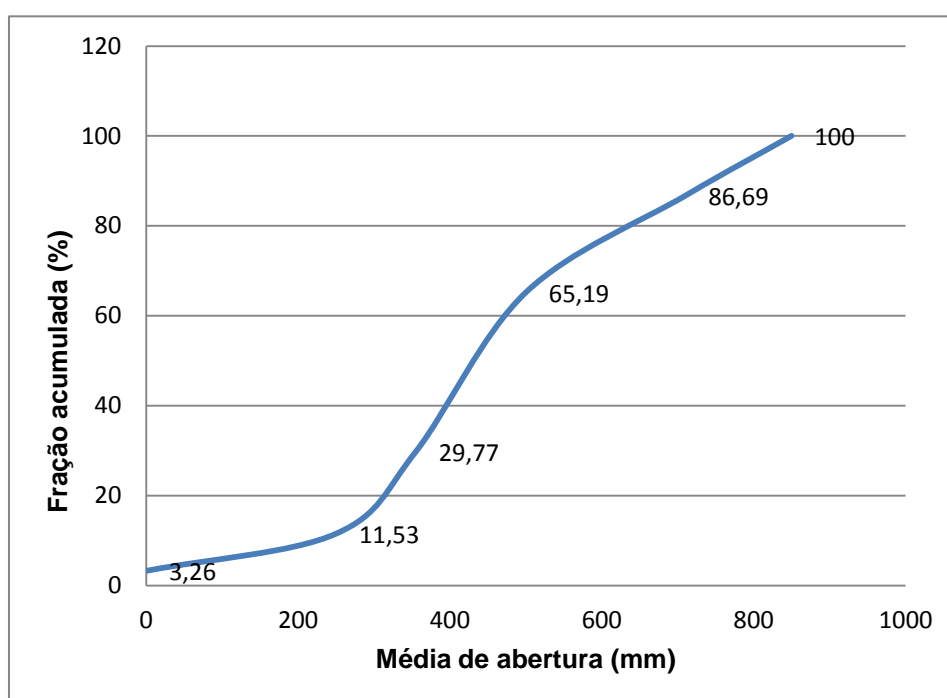
Fonte: Do autor

A estrutura tecidual das diversas partes de uma planta é heterogênea. Os órgãos constituintes de raízes e de caules possuem os tecidos mais densos,

enquanto que em folhas e flores os tecidos apresentam uma densidade menor (MIGLIATO et al., 2011). Tendo em vista que o processo de moagem resulta em partículas irregulares, determinou-se o tamanho médio através das determinações granulométricas, sendo que as partículas do pó das folhas de *L. chinensis* neste trabalho apresentaram tamanho médio de 217,31 μm .

Os resultados da fração acumulada de acordo com a abertura da malha do tamis estão representados na Figura 9 através da determinação da curva granulométrica.

Figura 9 - Curva granulométrica de *L. chinensis* Sonn. de acordo com a abertura da malha do tamis.

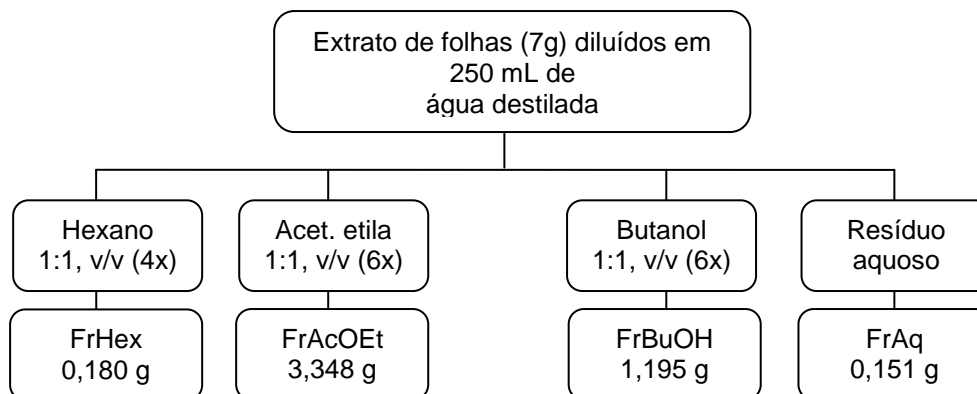


Fonte: Do autor

5.2 Obtenção dos extratos secos e frações

O extrato hidroetanólico de folhas obtido após a percolação foi submetido ao processo de secagem pelo método de liofilização. Após a realização da partição líquido-líquido, as frações e suas respectivas massas finais estão expressas na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato de folhas.



Fonte: Do autor

5.1.1 Cálculos do rendimento percentual do extrato de folhas e frações de *L. chinensis*

O rendimento da extração foi calculado em porcentagem de extrato seco em relação à droga vegetal. Após a partição líquido-líquido e a secagem das frações obtidas, os cálculos do rendimento (%) foram realizados também em relação à droga vegetal. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimento percentual do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* Sonn.

	EF	FrHex	FrAcOEt	FrBuOH	FrAq
Rendimento					
(%)	26,92	0,69	12,88	4,59	0,58

Legenda: EF = Extrato de follhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa.

Fonte: Dados do autor

O extrato de folhas (EF) obteve o rendimento de 26,92% em relação à droga vegetal. Após a partição, a fração acetato de etila foi a que apresentou o maior rendimento (12,88%), seguido da fração butanólica (4,59%). As frações hexânica e aquosa tiveram os menores rendimentos (0,69% e 0,58%, respectivamente).

5.3 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada submetendo-se o extrato de folhas de *L. chinensis* (EF) a diversos testes qualitativos de precipitação e coloração específicos para as principais classes de metabólitos secundários, a fim de obter o perfil dos constituintes químicos presentes nesta espécie. Foram utilizadas reações específicas para a pesquisa de alcaloides, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenos, flavonoides, polissacarídeos, saponinas e taninos, com o intuito de verificar a presença ou ausência do constituinte químico em questão.

Os resultados da triagem fitoquímica estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Classes de metabólitos secundários pesquisadas no extrato de folhas de *Litchi chinensis* Sonn.

CLASSES DE METABÓLITOS	EF
Alcaloides	
Mayer	-
Bouchardat	-
Dragendorff	-
Bertrand	-
Antraquinonas	
R. Bornträger direta	-
R. Bornträger indireta (O-heterosídeo)	-
R. Bornträger indireta (C-heterosídeo)	-
Esteroides e/ou triterpenos	
Liebermann-Burchard	+
R. de Salkowski	+
Flavonoides	
R. de Shinoda	+
R. com cloreto de alumínio	+
R. com cloreto férrico	+
Polissacarídeos	
Reação de Benedict	+
Reação de Fehling	+
Reação de Tollens	+
Reação de Molish	+
Reação com floroglucinol	+
Saponinas	
Formação de espuma	-
Hidrólise ácida	-
Hemólise	-
Taninos	
Reação com cloreto férrico	+
Reação de precipitação com proteínas	+
Reação de precipitação com alcaloides	+
Reação com acetato de cobre	+
Reação para taninos condensados	+

Legenda: (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo; EF=Extrato de folhas
Fonte: Dados do autor

Não ficou evidenciada a presença de alcaloides no extrato de folhas de *L. chinensis*, não ocorrendo precipitação com os Reagentes de Mayer, Bouchardat, Dragendorff e Bertrand. A ausência de antraquinonas foi comprovada pelas reações de Bornträger direta e indireta.

A presença de esteroides e/ou triterpenos foram confirmados por meio das reações de Liebermann-Burchard e de Salkowski.

A presença de flavonoides foi detectada através das reações de Shinoda, com o cloreto de alumínio e com o cloreto férrico. Os polissacarídeos foram confirmados no extrato de folhas de *L. chinensis*, tendo os resultados positivos com as seguintes reações: Benedict, Fehling, Tollens, Molish e com a reação com floroglucinol.

O extrato de folhas de *L. chinensis* (EF) não apresentou quantidades significativas de saponinas, evidenciado pelos testes negativos de formação de espuma, de hidrólise ácida e de hemólise.

Foi confirmada a presença de taninos no extrato de folhas de *L. chinensis* (EF), demonstrado através das reações com o cloreto férrico, com o acetato de cobre, através da precipitação com as proteínas e os alcaloides e a reação para os taninos condensados.

Os dados dos constituintes químicos de *L. chinensis* encontrados na literatura se referem principalmente em estudos baseados no fruto e seu pericarpo, onde demonstram grande presença de compostos fenólicos.

Jiang et al. (2007), em um estudo com o pericarpo do fruto, encontraram a presença de substâncias fenólicas como a cianidina-3-rutinosídeo, a cianidina-3-glicosídeo, a quercetina-3-rutinosídeo, a quercetina-3-glicosídeo, a procianidina B4, a procianidina B2 e a epicatequina como também os taninos condensados (proantocianidinas poliméricas). Os taninos condensados foram os compostos mais abundantes encontrados no pericarpo fresco (4 mg/g).

Outros compostos fenólicos também foram encontrados como no estudo de Prasad et al. (2009) que apresentam cinco compostos fenólicos isolados de sementes e identificados como o ácido gálico, a procianidina B2, a galocatequina, a (-)epicatequina e a(-)epicatequina-3-galato. Também Castellain (2010) isolou, a partir de um extrato metanólico de folhas, duas procianidinas identificadas como procianidina A2 e procianidina B2.

5.4 Análise do extrato e frações por espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma valiosa técnica analítica usada para identificar os compostos desconhecidos, quantificar as moléculas conhecidas e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades tão pequenas como 10^{-15} g. As vantagens da espectrometria de massas sobre as demais técnicas são a alta sensibilidade e seletividade combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade de componentes presentes em amostras através de infusão direta. Com a utilização da técnica ESI-IT-MSⁿ, é possível realizar, com o mínimo de preparo da amostra, um *fingerprinting* de amostras bastante complexas (DETTMER, ARONOV e HAMMOCK, 2007).

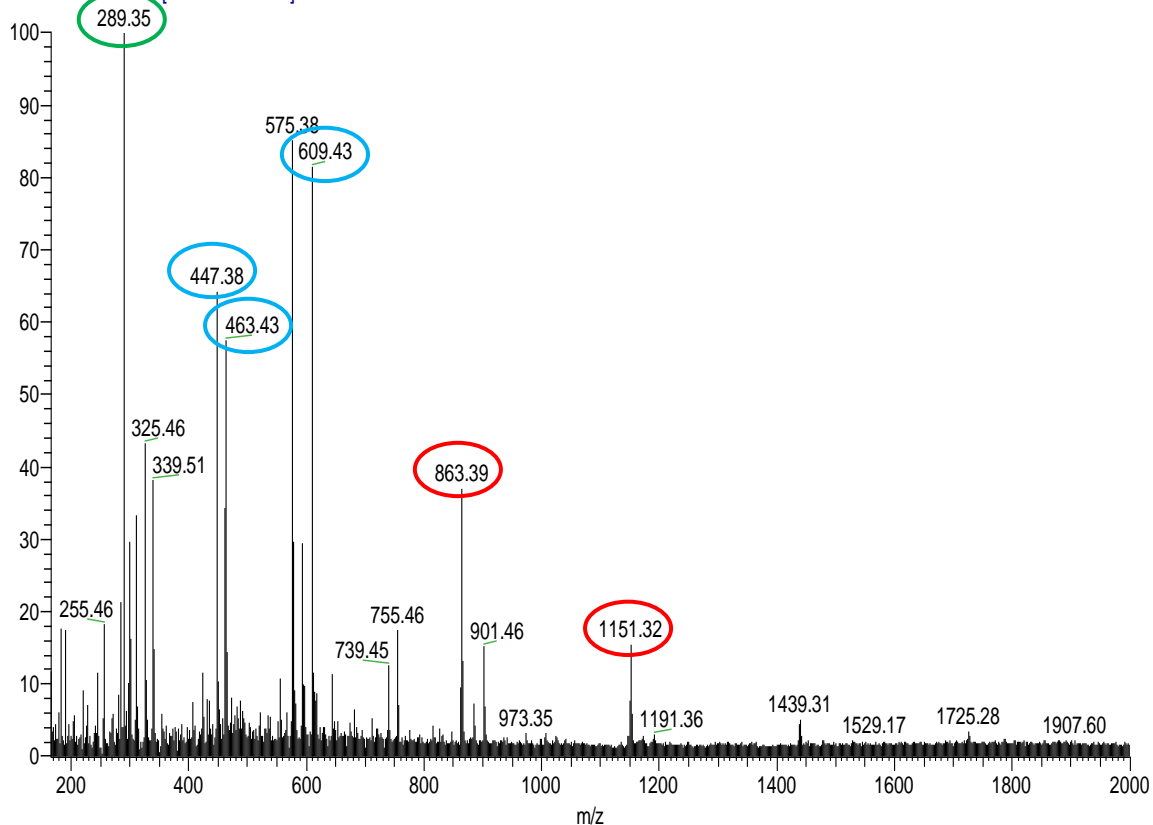
A espectrometria de massas em *tandem*, também conhecida como MS/MS ou MSⁿ é o sistema em que dois analisadores de íons são utilizados em sequência, separados pela câmara de colisão. A amostra é injetada de forma contínua (FIA), eluída e ionizada por electrospray (ESI). Os íons formados são então separados de acordo com suas relações *m/z* no primeiro analisador de íons tipo IT (*ion trap*). Após, são selecionados por um programa de computador e seguem para a câmara de colisão, onde são fragmentados. Os fragmentos formados passam para o segundo analisador onde são identificados de acordo com a massa molecular (CABRAL, 2010).

Com base nos espectros obtidos, o modo negativo foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho por haver um favorecimento da ionização dos compostos fenólicos.

Na Figura 11 é mostrado o perfil do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*, obtido pelo espectro *full scan* em modo negativo. O espectro de ESI-MS mostrou uma mistura complexa de compostos para o extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*, sugerindo a presença de uma série de compostos conhecidos na literatura e possivelmente envolvidos com a atividade antioxidante. O maior pico base (*m/z* 289,35), possivelmente corresponde à catequina e foi circulado em verde. O espectro indicou também a possível presença de flavonoides glicosilados circulados em azul (*m/z* 447, 463 e 609) e as proantocianidinas circuladas em vermelho (*m/z* 863 e 1151).

Figura 11 -Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*.

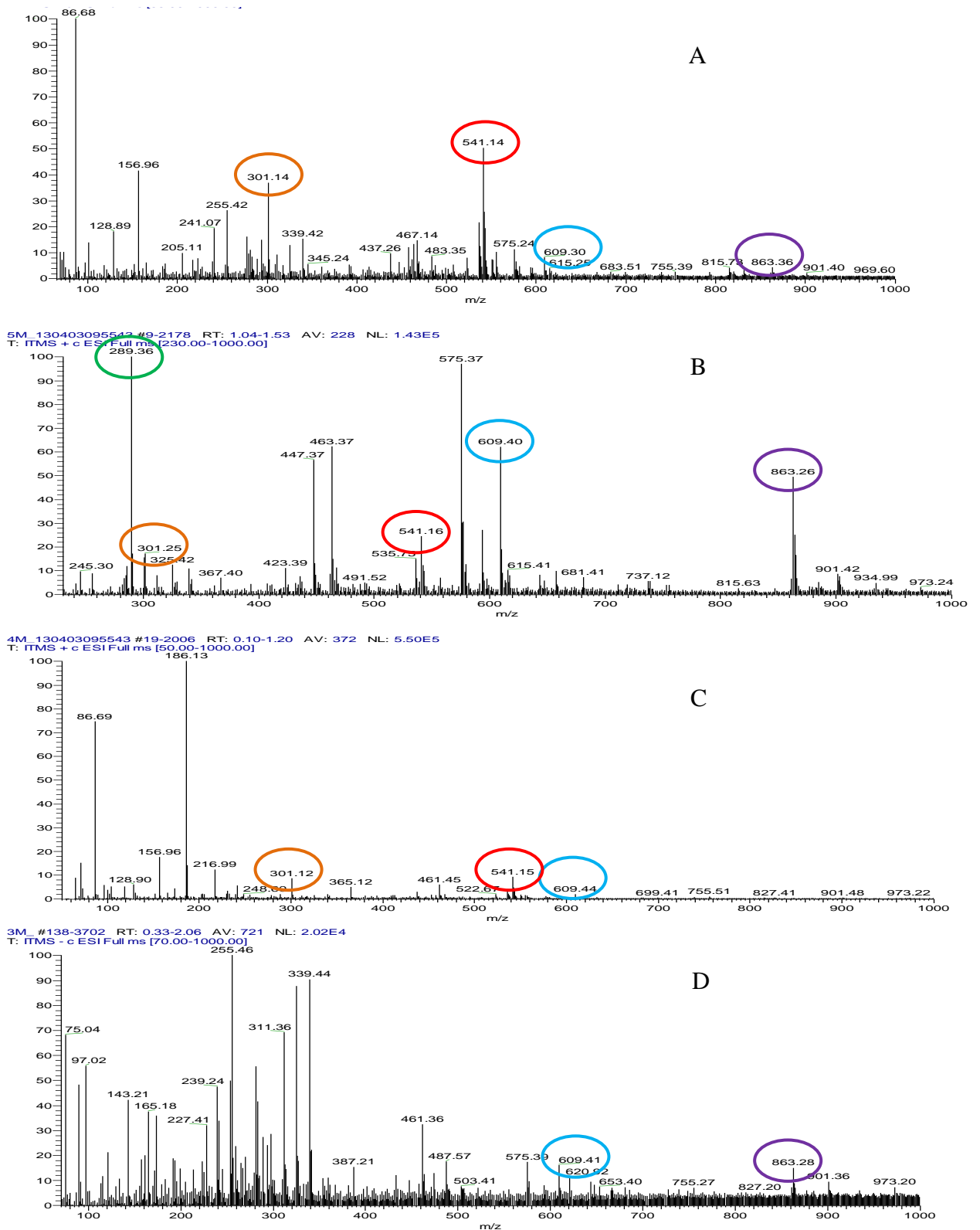
1M_130403095543 #23-1077 RT: 1.53-2.10 AV: 177 NL: 1.94E5
T: ITMS - c ESI Full ms [165.00-2000.00]



Fonte: Do autor

Na figura 12 estão representados os espectros de massas *full-scan* das frações do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*. A averiguação destes espectros revelou a presença de várias substâncias em comum, as quais são representadas pelos íons precursores das moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$) para as frações de *L. chinensis*. Todos os espectros da Figura 12(A-D) apresentaram o pico base m/z 609 em diferentes abundâncias relativas. Sugere-se que este pico seja correspondente à forma heterosídica da quercetina.

Figura 12 Espectro de massas, em modo *full-scan* das frações do extrato de folhas (EF) de *L.chinensis*.



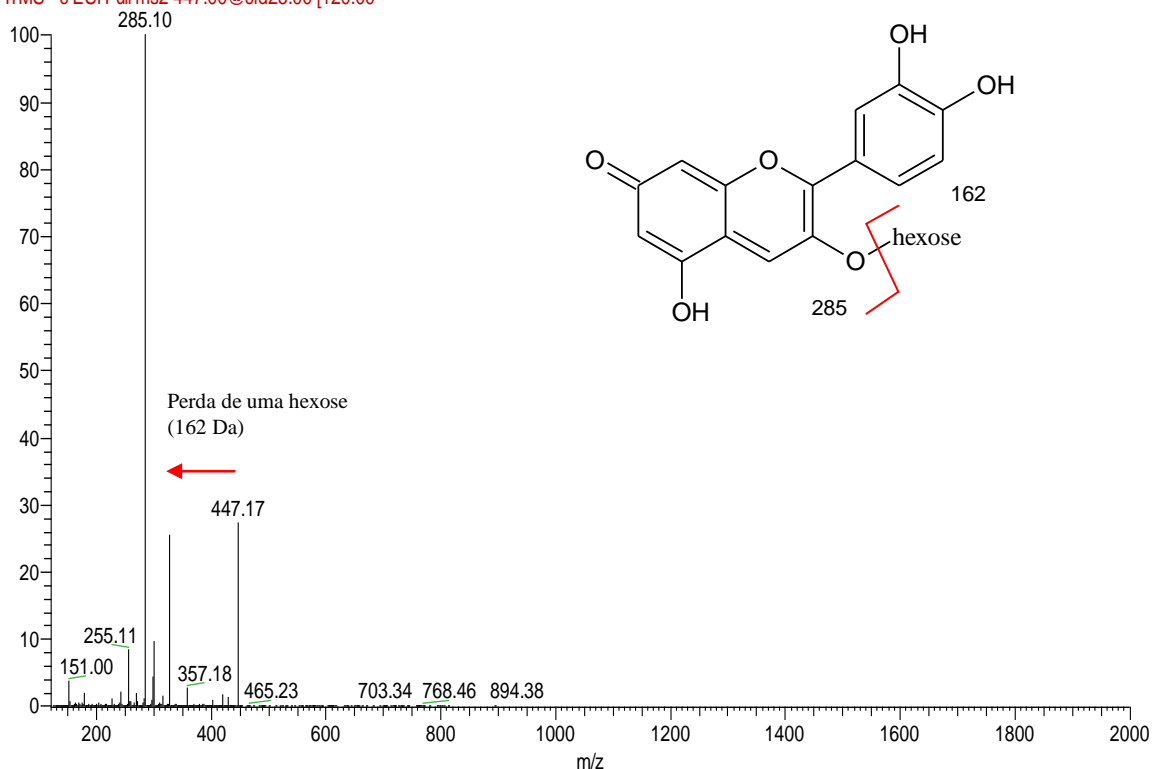
Nota: A) Fração hexânica; B) Fração acetato de etila; C) fração butanólica; D) Fração aquosa
Fonte: do autor

Foram realizados espectros de segunda-ordem dos principais picos encontrados nos espectros *full scan* do extrato de folhas (EF) e frações para sugerir as estruturas das moléculas a seguir, tendo como base dados encontrados na literatura (ROUX et al., 1998; DUAN et al, 2007; LI e JIANG, 2007; LIU et al., 2007; PRASAD et al. 2009; LI et al., 2012; WANG, 2011; GUO et al., 2012 e YANG et al.,2012).

Na Figura 13, o espectro de MS² do íon de *m/z* 447, proveniente do extrato de folhas (EF) mostrou um fragmento de *m/z* 285, que pode ser devido à perda de uma hexose de massa 162 Da, gerando a aglicona da catequina.

Figura 13 - Espectro MS² do íon de *m/z* 447 proveniente do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*.

1M_130403095543 #15-994 RT: 3.06-3.31 AV: 47 NL: 2.26E4
F: ITMS - c ESI Full ms2 447.00@cid25.00 [120.00-

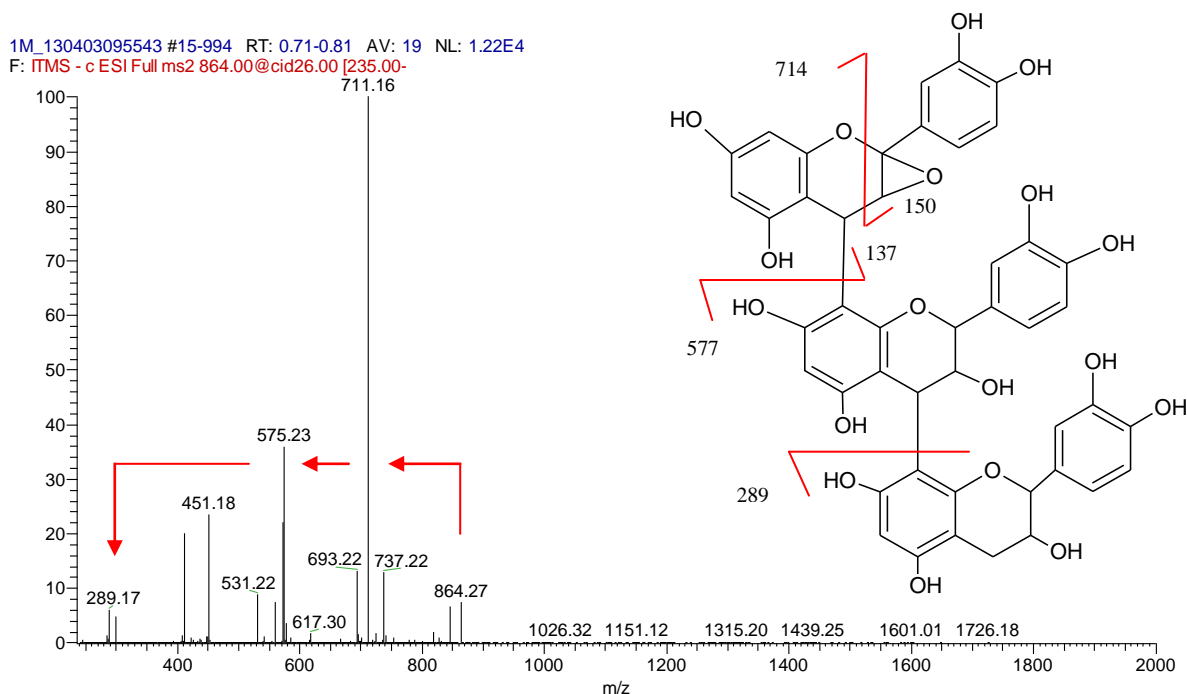


Fonte: Do autor

O espectro de MS² do íon de *m/z* 864 proveniente do extrato de folhas (EF) é apresentado na Figura 14 e está de acordo com os resultados apresentados por Wang et al. (2011). Esta espécie iônica indica ser uma proantocianidina do tipo B, ou seja, aquela onde ocorre uma ligação carbono-carbono entre C-4 da unidade “superior” e o C-8 ou C-6 da unidade “inferior” (SIMÕES, 2004). Para o íon de *m/z*

289 sugere-se que seja o da aglicona da catequina, o monômero básico desta classe de taninos condensados (prociandinas).

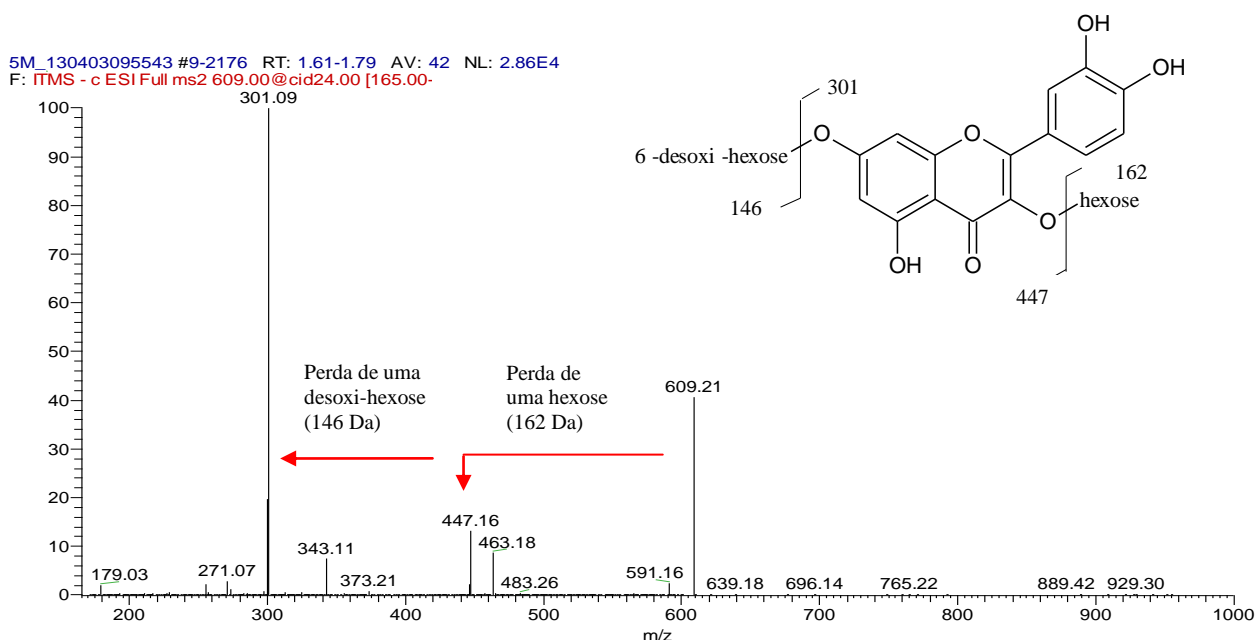
Figura 14 - Espectro MS² do íon de m/z 864 proveniente do extrato de folhas (EF).



Fonte: Do autor

O espectro do íon de m/z 609 (FIGURA 15) proveniente da fração acetato de etila mostra a perda de duas unidades de açúcar, a hexose (162 Da) e da desoxi-hexose (146 Da), resultando, como sugestão, no íon da aglicona da quercetina (m/z 301). Em um trabalho de Duan et al. (2007) foram também encontradas moléculas de quercetina glicosiladas. O pico relativo a este íon aparece com a maior abundância relativa na fração acetato de etila em relação às outras frações.

Figura 15 - Espectro MS² do íon de m/z 609 proveniente da fração acetato de etila.



Com exceção da fração aquosa (Figura 12D), os demais *fingerprints* ESI-MS das frações (FIGURA 12A,B,C) apresentaram íons característicos em m/z 301 e 541. O pico de m/z 301 possivelmente trata-se da aglicona da quercetina, conforme demonstrado pelo fragmento da figura 15 acima, e esta substância aparece em nível de abundância relativa em torno de 4 vezes maior na fração hexânica em relação à fração butanólica, e cerca de duas vezes maior em relação à fração acetato de etila.

O pico base de m/z 541 (FIGURA 12 A,B,C) se propõe ser da procianidina A2 baseado no trabalho de Roux et al. (1998). A presença desta substância é detectada em todas as frações com exceção da fração aquosa e em diferentes níveis de abundância relativa, sendo a maior abundância na fração hexânica. Esta mesma substância foi encontrada por Liu et al., 2007.

O fragmento que apresenta o pico base em m/z 863 (FIGURA 12 A,B,D) está presente em todas as frações, exceto na fração butanólica (FIGURA 12 C). Este íon foi apresentado nos espectros de massas *full-scan* do extrato de folhas (FIGURA 11) e na fração acetato de etila este íon aparece em maior abundância relativa, sendo relacionado a uma proantocianidina. Na figura 14 é apresentado o espectro de MS² deste íon proveniente do extrato de folhas (EF). Várias substâncias pertencentes a esta classe já foram identificadas nos trabalhos de DUAN et al, 2007; LIU et al., 2007; PRASAD et al. 2009; LI et al., 2012 e YANG et al.,2012.

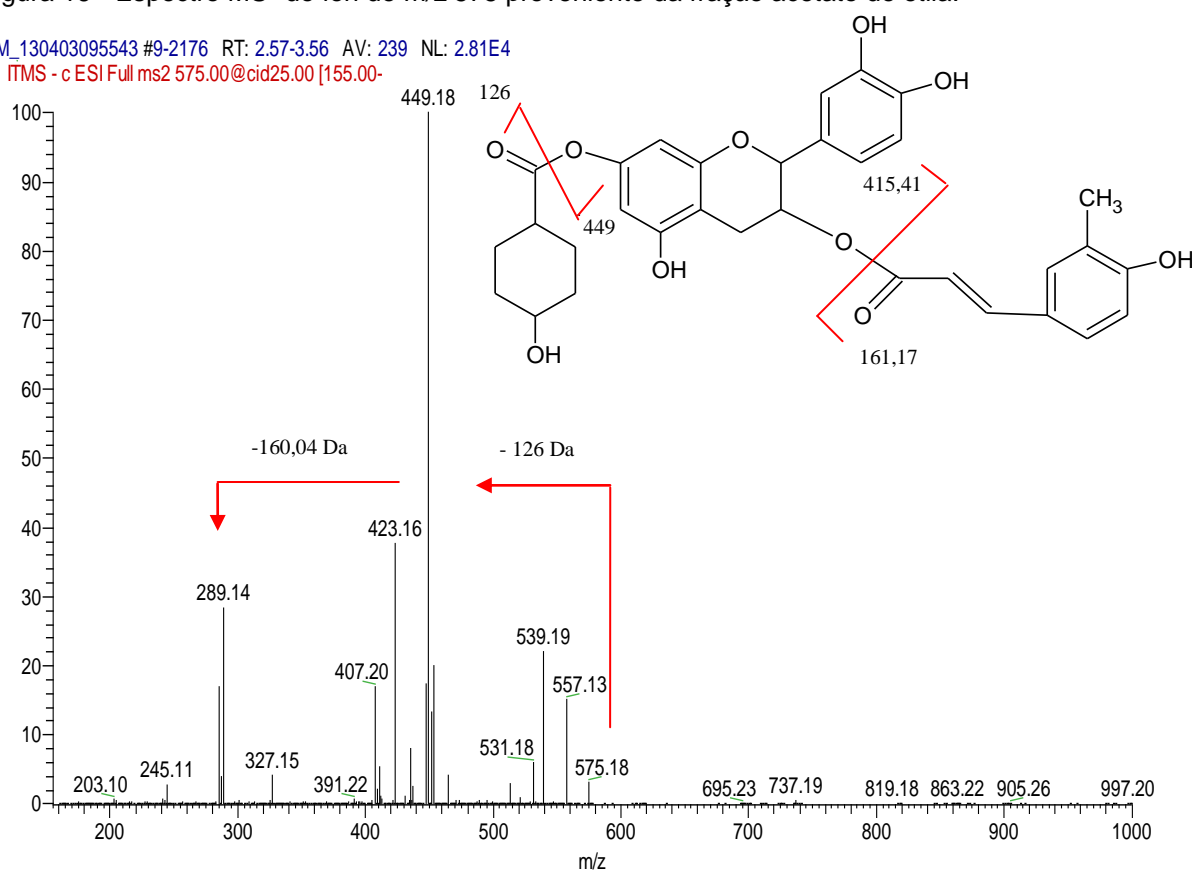
No espectro de massas *full scan* da fração acetato de etila (FIGURA 12B) aparecem picos de íons com abundância relativa alta de m/z 447 e 575. O íon de

m/z 447 já foi apresentado no espectro de MS^2 proveniente do extrato de folhas (EF) (FIGURA 13), onde se sugere, baseado no trabalho de revisão de Li e Jiang (2007), um composto glicosilado da catequina. Este íon aparece na fração acetato de etila com abundância relativa maior em comparação ao extrato de folhas (EF).

Na figura 16 apresenta-se o espectro de M^2 do íon de m/z 575 proveniente da fração acetato de etila. O fragmento mais estável apresentado neste espectro é o íon de m/z 449 e o pico de m/z 289 possivelmente corresponde à aglicona da catequina.

Figura 16 - Espectro MS^2 do íon de m/z 575 proveniente da fração acetato de etila.

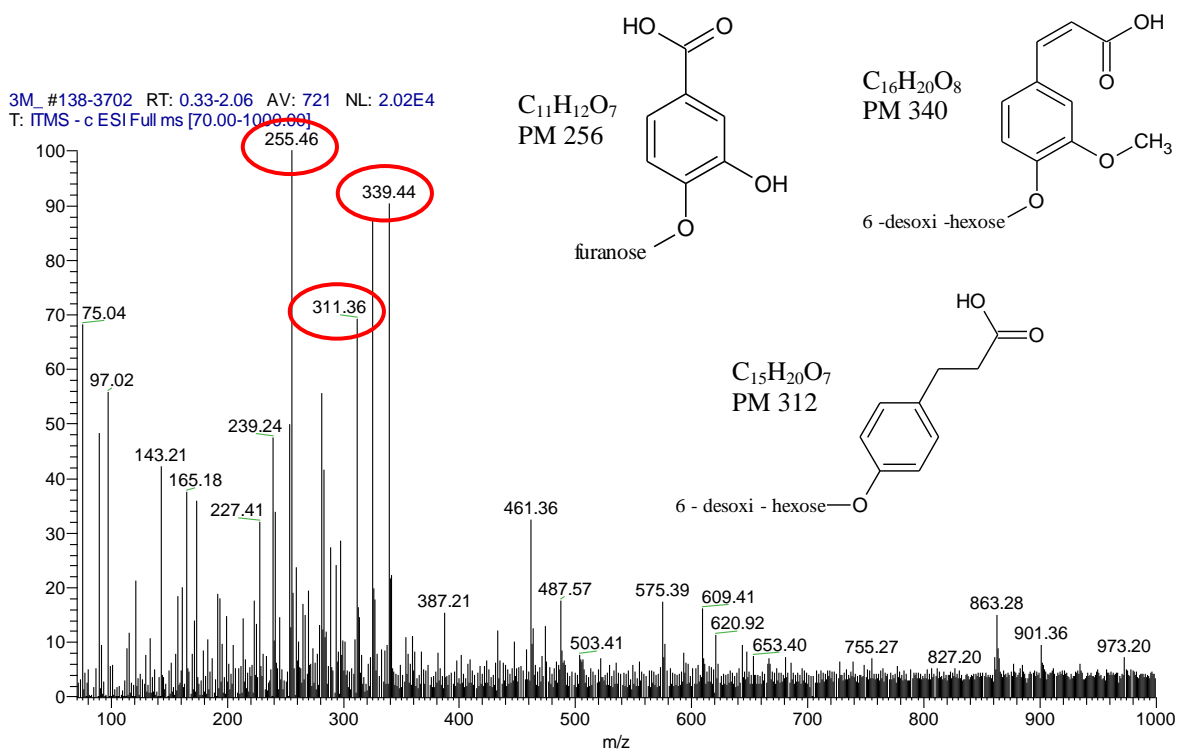
5M_130403095543 #9-2176 RT: 2.57-3.56 AV: 239 NL: 2.81E4
F: ITMS - c ESI Full ms2 575.00@cid25.00 [155.00-



Fonte: Do autor

O espectro de massas *full scan* da fração aquosa obtida do extrato de folhas apresentou os picos com alta abundância relativa com m/z de 255, 311 e 339, apresentados na Figura 17. Para estes íons sugere-se que sejam heterosídeos de ácidos fenólicos baseado nos estudos de Wang et al. (2011) e Guo et al. (2012). Possivelmente trata-se de heterosídeos do ácido protocatequínico (PM 256), do ácido cinâmico (PM 312,3) e do ácido ferúlico (PM 340).

Figura 17 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta da FrAq do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis*.



Fonte: Do autor

5.5 Determinação quantitativa de constituintes químicos

Os constituintes químicos que foram analisados quantitativamente neste trabalho foram os compostos fenólicos totais e os flavonoides.

5.5.1 Determinação quantitativa de fenóis totais

Os compostos fenólicos de plantas englobam diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

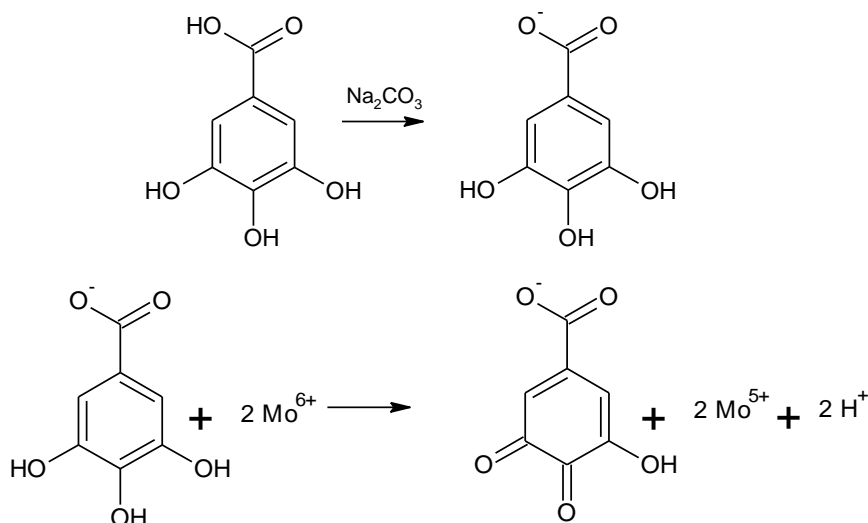
Os compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais são os principais compostos bioativos conhecidos com benefícios para a saúde. Estes compostos são comumente encontrados em partes tanto comestíveis e não comestíveis das plantas e tem sido associados a múltiplos efeitos biológicos, incluindo as atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-trombótico, e ações vasodilatadoras (BABBAR et al., 2011).

A atividade dos compostos fenólicos nos processos oxidativos ocorre devido às suas propriedades redox, o que lhes permite atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, exibindo forte atividade antioxidante. A ação dos compostos antioxidantes está relacionada à atenuação de eventos oxidativos que podem contribuir com o início e a progressão do câncer e de muitas doenças como as cardiovasculares, as metabólicas, as inflamatórias e as neurodegenerativas (CARVALHO; ISHIKAWA; GOUVÊA, 2012).

Desta forma, o potencial destes componentes químicos de materiais vegetais para a manutenção da saúde e da proteção principalmente contra as doenças coronárias e o câncer está aumentando o interesse entre os pesquisadores e os fabricantes de alimentos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* e possuírem atividade antioxidante forte (YANG et al., 2006; DUAN et al., 2007; CHAVES et al., 2010; CHEN et al., 2011; LI et al., 2013).

Segundo Sousa et al. (2007), um dos métodos mais utilizados para a determinação dos fenóis totais utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se o molibdênio azul e o tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5^+ e 6^+ e cuja a coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 -Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Oliveira et al., 2009

A curva de calibração para este ensaio foi elaborada utilizando o ácido gálico como padrão. As soluções de concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 60 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas em etanol absoluto e as absorvâncias lidas para a construção da curva. O conteúdo total de polifenóis nas amostras foi calculado em equivalentes de ácido gálico (EAG) utilizando a seguinte equação da reta obtida na curva de calibração: $y = 75,257x + 0,9334$, onde y = concentração do ácido gálico e x = absorvância a 750 nm. O coeficiente de correlação (R^2) entre X e Y no valor de 0,9995 comprovou a adequação de precisão.

Na Tabela 4 observa-se a concentração total de polifenóis expressos como EAG (mg equivalente de ácido gálico/ g amostra) para as amostras do extrato de folhas e frações de *L. chinensis*.

Tabela 4 - Valores em mg de equivalente de ácido gálico por g de cada amostra analisada.

EXTRATO E FRAÇÕES	TEOR DE FENÓIS TOTAIS (mg/g)
EF	393,14 \pm 6,6 ^b
FrHex	239,37 \pm 3,0 ^d
FrAcOEt	541,15 \pm 2,4 ^a
FrBuOH	269,97 \pm 4,1 ^c
FrAq	119,63 \pm 0,6 ^e

Legenda: EF = Extrato de follhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa. Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott $p < 0,05$)

O teor de fenóis totais encontrado no extrato de folhas de *L. chinensis* no presente estudo foi de $393,14 \pm 6,6$ mg EAG/g de amostra. Em relação aos teores de fenóis totais entre as frações, o maior valor foi encontrado na fração acetato de etila ($541,15 \pm 2,4$ mg EAG/g de amostra) e o menor valor foi encontrado na fração aquosa ($119,63 \pm 0,6$ mg EAG/g de amostra). Estes valores estão em conformidade com os resultados encontrados nos espectros de massas *full scan*, onde foi observado que o perfil dos espectros das frações indicam a ocorrência de compostos fenólicos, tais como flavonoides (agliconas e heterosídeos), procianidinas e taninos condensados. Também observa-se, tanto nos espectros como nos resultados da dosagem, uma abundância relativa alta destes compostos na fração acetato de etila.

Estudo semelhante foi realizado por Yang et al.(2012), que realizaram a partição líquido-líquido do extrato de flores de *L. chinensis* utilizando a acetona como líquido extrator. Esta partição foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano, acetato de etila, butanol e água. Os valores encontrados para os teores de fenólicos totais foram: fração hexânica $59,84 \pm 4,18$ mg EAG/g de amostra; fração acetato de etila $550,32 \pm 40,22$ mg EAG/g de amostra; fração butanólica $448,52 \pm 33,45$ mg EAG/g de amostra e fração aquosa $370,21 \pm 30,62$ mg EAG/g de amostra.

Em estudo de Brat et al. (2006) sobre a dosagem da ingestão diária de polifenóis a partir de frutas e vegetais, a lichia (variedade 'Kway May Pink') apresentou o conteúdo total de polifenóis no valor de 222,3 mg equivalente de ácido gálico/ 100g de amostra, sendo a mais rica nestes compostos em comparação com as frutas tropicais estudadas.

Yang et al. (2010) realizaram o doseamento de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados, antocianinas, proantocianidinas e ácido ascórbico em extratos aquosos de flores de *L. chinensis* nas concentrações de 2,5 e 5% p/v e encontraram as concentrações de compostos fenólicos totais de $78,29 \pm 2,75$ e $160,72 \pm 5,51$ mg de EAG/100 mL de extrato, respectivamente.

Em estudo com extrato hidrometanólico (70%) das sementes e do pericarpo de *L. chinensis*, de casca de banana e das sementes de uva, Babbar et al. (2011) encontraram valores de fenólicos totais de $17,9 \pm 0,19$ mg EAG/g para a amostra de sementes e $24,6 \pm 0,08$ mg EAG/g para a amostra de pericarpo de *L. chinensis*. Este trabalho demonstra que resíduos de frutas podem ser uma fonte potencial de

recursos nutracêuticos, capazes de oferecer suplementos alimentares nutricionais de baixo custo.

Chen et al. (2011) quantificaram o teor de compostos fenólicos em flores de *L. chinensis* utilizando como solventes nas extrações: a acetona, o etanol e a água quente (98°C por 30 minutos). Os resultados encontrados demonstram que os extratos acetônicos alcançaram os maiores teores de fenólicos totais ($120,48 \pm 5,69$ mg/g de amostra), seguido pelo extrato etanólico ($64,55 \pm 3,36$ mg/g de amostra). Os menores teores quantificados foram da extração aquosa à quente ($48,67 \pm 3,32$ mg/g de amostra).

Os compostos fenólicos presentes nas formas livres (aglicona) ou heterosídicas foram identificados e quantificados nos mais diferentes frutos e vegetais, apresentando alta correlação com a atividade antioxidante demonstrado pelos mesmos. Entretanto, há grande variação no conteúdo de fenólicos encontrado em diferentes frutos ou vegetais, ou até para os mesmos frutos ou em vegetais avaliados em diferentes estudos. Estas diferenças podem ser devido à complexidade desse grupo de compostos, aos métodos de extração e/ou à metodologia de quantificação empregada. Além disso, o conteúdo de fenólicos de plantas depende de fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (condições ambientais, cultivo, manejo e condições de armazenamento) (ROCKENBACH et al., 2008).

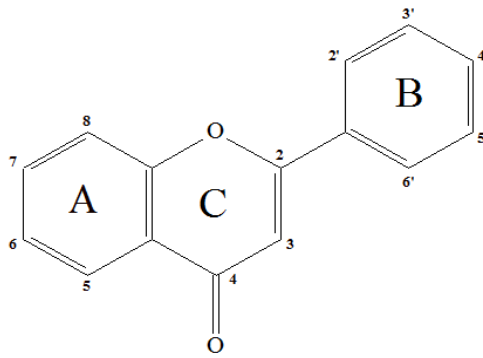
Diante do exposto, observa-se que, no presente estudo, foram encontrados teores bem mais significativos quanto à dosagem de compostos fenólicos totais em relação aos resultados reportados na literatura, embora não tenha sido encontrado nenhum estudo relativo à folha.

5.5.2 Determinação quantitativa de flavonoides totais

De acordo com Shohaib et al. (2011) esta classe de compostos naturais está se tornando cada vez mais objeto de pesquisas e muitos grupos já foram isoladas e suas estruturas identificadas. A estrutura básica dos flavonoides consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três

anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (FIGURA 19).

Figura 19 - Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Dornas et al., 2007

Os flavonóides estão presentes na maioria das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores, sendo subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides. Estes compostos participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DORNAS et al., 2007).

Em sua estrutura química possuem um número variável de grupos hidroxifenólicos que são quelantes de ferro e outros metais de transição, apresentando uma grande capacidade antioxidante que depende das propriedades redox de seus grupos hidroxifenólicos e da ação inibitória dos radicais hidroxila e superóxido, altamente reativos na cadeia de peroxidação lipídica (RUSSO e SANCHÉZ, 2006).

Os flavonóides tem despertado grande interesse, uma vez que a cada dia novas descobertas tem associado estes compostos e suas propriedades de combater radicais livres à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como as cardiovasculares, o diabetes, as nefropatias e a carcinogênese (ZHAO et al., 2007; KROON et al., 2010; YANG et al., 2010; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; RODRIGUES et al., 2013).

A maneira mais precisa e exata de identificar e de quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto, devido à necessidade da introdução de alternativas mais simples, baratas e rápidas,

surgiram outras técnicas viáveis. Entre as técnicas que se enquadram bem nesse contexto encontra-se a determinação de flavonóides totais por espectrometria no UV. O método se baseia no uso do cloreto de alumínio, onde se observa a formação de complexo envolvendo o cátion alumínio com os flavonóides em metanol ou etanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, o desvio para maiores comprimentos de onda e a intensificação da absorção. Dessa maneira é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides. Sendo assim, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante (CAMARGO; VILEGAS, 2010).

Para a quantificação do teor de flavonoides totais presentes nas amostras de *L. chinensis* foi construída a curva padrão de quercetina utilizando as concentrações de 10 µg/mL a 80 µg/mL, cuja equação da reta $y = 138,92x - 0,3596$ foi utilizada para o cálculo do conteúdo total de flavonoides nas amostras, onde y = concentração de quercetina e x = absorbância a 415 nm. O coeficiente de correlação (R^2) entre X e Y no valor de 0,9997 comprovou a adequação de precisão.

Na Tabela 5 observa-se a concentração total de flavonoides expressos em mg de equivalente de quercetina (EQ)/g de amostra para o extrato de folhas e frações de *L. chinensis*.

Tabela 5 - Valores em mg de equivalente de quercetina por g de cada amostra analisada.

EXTRATO E FRAÇÕES	TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (mg/g)
EF	19,99 ± 0,7 ^c
FrHex	21,98 ± 0,7 ^b
FrAcOEt	31,06 ± 0,5 ^a
FrBuOH	16,71 ± 0,3 ^d
FrAq	3,00 ± 0,1 ^e

Legenda: EF = Extrato de follhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa.
Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott $p < 0,05$)
Fonte: Dados do autor

O teor de flavonoides para o extrato de folhas de *L. chinensis* foi de 19,99 ± 0,7 mg de equivalente de quercetina/g de amostra. O maior valor dos teores de

flavonoides totais entre as frações foi encontrado na fração acetato de etila ($31,06 \pm 0,5$ mg EQ/g de amostra) e o menor valor foi encontrado na fração aquosa ($3,00 \pm 0,1$ mg EQ/g de amostra).

A fração hexânica apresentou um valor menor do teor de flavonoides ($21,98 \pm 0,7$ mgEQ/g de amostra) em relação à fração acetato de etila ($31,06 \pm 0,5$ mg EQ/g de amostra), sendo superior ao teor encontrado na fração butanólica ($16,71 \pm 0,3$ mgEQ/g de amostra). A presença de flavonoides na fração hexânica pode ser justificada devido aos flavonoides na forma aglicona, que possuem polaridade mais baixa e formam quelato com o alumínio dando origem ao complexo flavonóide-Al. À vista das análises do perfil da fração hexânica pelos espectros de massas, foi sugerida a presença da aglicona da quercetina nesta fração, sendo que esta substância aparece em nível de abundância relativa quatro vezes maior na fração hexânica em relação à fração butanólica, e duas vezes maior em relação à fração acetato de etila.

Em um trabalho de Dias, Souza e Rogez (2010) com a espécie *Inga edulis*, através da partição líquido-líquido utilizando o hexano, também foram encontrados valores significativos de compostos fenólicos na fração hexânica (378,9 mg EAG/g) como também alguns flavonóis e proantocianidinas que apresentam baixas polaridades.

Segundo Simões et al. (2004), os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, nas raízes e nos frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra. Em flores, ocorre grande concentração de antocianinas responsáveis pela coloração e ainda com funções biológicas de atração de insetos polinizadores. Na literatura são encontrados vários trabalhos com o doseamento de flavonoides nas flores da espécie *L. chinensis*.

Yang et al. (2010) realizaram o doseamento de flavonoides em extratos aquosos de flores de *L. chinensis* nas concentrações de 2,5 e 5% p/v, e encontraram as concentrações de $31,20 \pm 0,46$ e $58,32 \pm 1,22$ mg de equivalente de catequina/100 mL de extrato, respectivamente.

No trabalho de Chen et al. (2011) utilizando as flores de *L. chinensis* em extração com os solventes acetona, etanol e água quente (98°C por 30 minutos), eles encontraram os seguintes resultados: os extratos acetônicos alcançaram os maiores teores de flavonoides ($205,02 \pm 11,21$ mg/g de amostra), seguido pelo

extrato etanólico ($109,82 \pm 4,86$ mg/g de amostra). Os menores teores quantificados foram da extração aquosa à quente ($50,37 \pm 3,62$ mg/g de amostra).

Yang et al.(2012) realizaram uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: hexano, acetato de etila, butanol e água com o extrato acetônico de flores de *L. chinensis*, onde estes compostos estão presentes em maiores quantidades. Os valores encontrados por estes autores para os teores de flavonoides foram: fração hexânica $14,02 \pm 1,15$ mg de equivalente de catequina(EC)/g de amostra; fração acetato de etila $522,34 \pm 37,39$ mg EC/g de amostra; fração butanólica $380,26 \pm 29,84$ mg EC/g de amostra e fração aquosa $252,51 \pm 22,15$ mg EC/g de amostra.

5.6 Avaliação do poder antirradicalar

O poder antirradicalar do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* foram avaliados pelos métodos do poder sequestrante de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e do poder redutor.

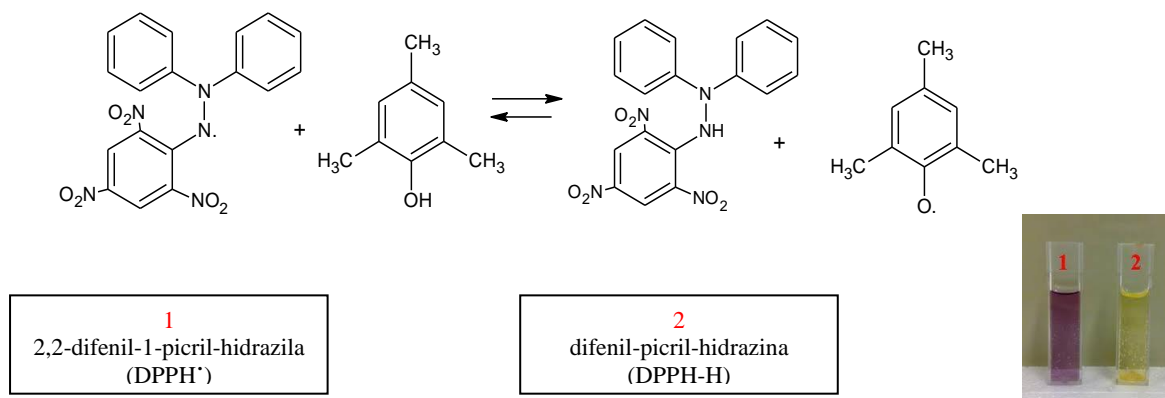
5.6.1 Avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH

Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antirradicalar de um composto em capturar radicais livres, o método do poder sequestrante de radicais DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável (KUSKOSKI et al., 2006).

Este método consiste basicamente na capacidade de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) pelo antioxidante presente na amostra, ocorrendo uma reação de oxi-redução. A mudança na coloração de violeta para o amarelo ocorre quando o elétron desemparelhado do radical DPPH emparelha-se com o hidrogênio do antioxidante estabilizador de radical livre, formando a hidrazina (DPPH-H, reduzido e estável), conforme demonstrado na Figura 20. Neste método, os radicais de DPPH, que absorvem a 515 nm são, em parte, neutralizados pelos

compostos antioxidantes, o que resulta na redução da absorvância do sistema reacional (ALVES et al., 2010).

Figura 20 - Reação química entre o radical DPPH e o BHT.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2009

Os resultados do percentual da atividade antirradicalar obtidos pelo método do poder sequestrante de radicais DPPH para o extrato de folhas e frações de *L. chinensis* na concentração de 100 µg/mL e a CE₅₀ estão apresentados na Tabela 6 .

Tabela 6 - Percentual da atividade do poder sequestrante de radicais DPPH do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* Sonn..

EXTRATO E FRAÇÕES	% Sequestro de radical DPPH (a 100 µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)
EF	39,18 ± 0,6 ^f	102,51
FrHex	90,39 ± 0,1 ^b	23,80
FrAcOEt	93,62 ± 0,1 ^a	3,45
FrBuOH	93,88 ± 0,2 ^a	16,28
FrAq	61,81 ± 0,1 ^e	64,71
Quercetina	81,44 ± 0,2 ^c	4,57
Ácido Ascórbico	90,43 ± 0,3 ^b	6,49
BHT	63,7 ± 0,1 ^d	70,11

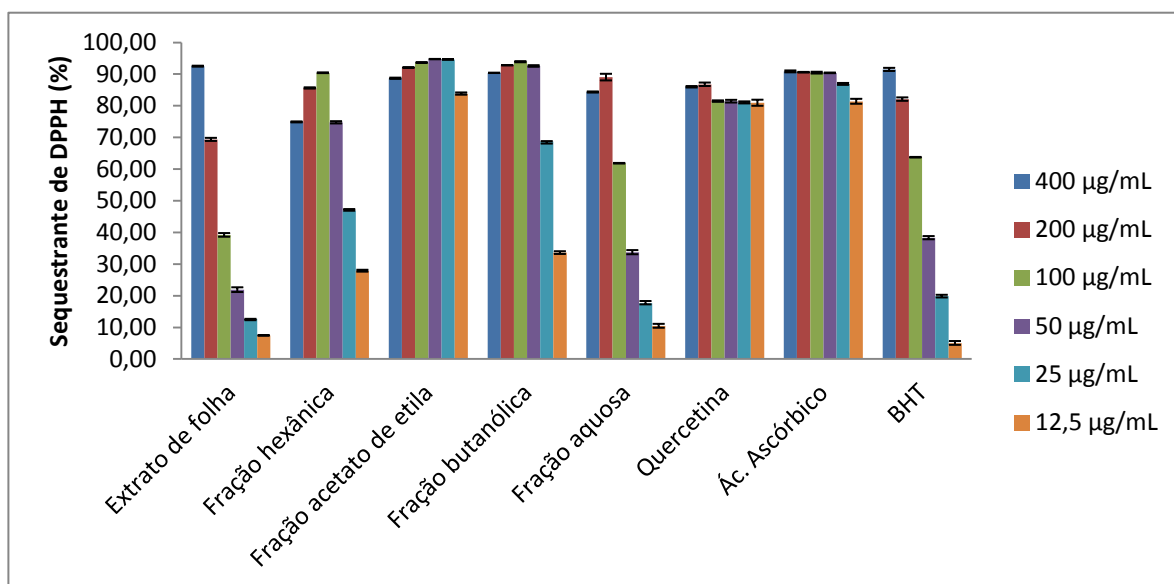
Legenda: EF = Extrato de follhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa.

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott p<0,05)

Fonte: Dados do autor

Na figura 21 apresenta-se o gráfico da porcentagem de sequestro de radicais DPPH nas concentrações testadas usando quercetina, ácido ascórbico e BHT como padrões.

Figura 21- Capacidade de sequestrar o radical DPPH (% de sequestro) do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* nas concentrações testadas.



Fonte: Dados do autor

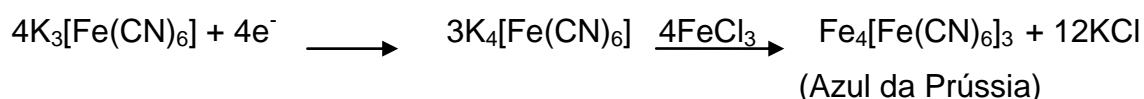
A porcentagem de sequestro de radicais DPPH do extrato de folhas de *L. chinensis* na concentração de 100 µg/mL foi de $39,18 \pm 0,6$. Observa-se que, com a partição líquido-líquido realizada, a capacidade de sequestro de radicais DPPH sofreu um acréscimo considerável em relação à esta mesma capacidade no extrato bruto (EF). O melhor valor de CE_{50} apresentado é o da fração acetato de etila (3,45 µg/mL), sendo considerável quando comparado aos padrões quercetina (4,57 µg/mL), ácido ascórbico (6,49 µg/mL) e BHT (70,11 µg/mL), sendo a fração acetato de etila cerca de duas vezes mais potente que o ácido ascórbico e vinte vezes mais potente que o BHT.

Yang et al. (2006) realizaram a extração aquosa do pericarpo de lichias extraíndo os polissacarídeos que foram posteriormente submetidos à filtração em gel em Sephadex G-50. As frações de polissacarídeos purificados foram submetidos aos ensaios antioxidantes e apresentaram o percentual de capacidade antioxidante pelo método do DPPH forte: $40,6 \pm 0,9$ e $54,1 \pm 1,5$ para as concentrações de 50 e 100 µg/mL da fração F01.

Duan et al. (2007), analisando as propriedades antioxidantes das antocianinas extraídas e purificadas do pericarpo de lichia, obtiveram resultados dose-dependentes surpreendentes quando comparados aos padrões BHT (butil-hidroxitolueno) e o ácido ascórbico. Na concentração de 50 µg/mL, a atividade sequestrante do radical DPPH, para as antocianinas, o BHT e o ácido ascórbico foram de 91,3; 20,1 e 9,73%, respectivamente.

5.6.2 Avaliação do poder redutor

No ensaio do poder redutor, a presença de agentes redutores, ou seja, antioxidantes, provoca a redução do íon ferricianeto (Fe^{3+}) à forma ferrosa, o ferrocianeto (Fe^{2+}). Assim, a formação de Azul da Prússia, medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe^{2+} . Ao contrário do método anterior, neste ensaio, verifica-se o aumento de absorbância que indica o maior poder redutor, devido à maior concentração do Azul da Prússia formado na reação, conforme demonstrado abaixo:



A cor amarelada das soluções testadas muda para vários tons de verde e de azul, dependendo do poder redutor de cada extrato.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade redutora do extrato foi expressa como a porcentagem de redução em comparação ao ácido ascórbico, usado como padrão. Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos para o extrato de folhas e frações de *L. chinensis* na concentração de 100 µg/mL submetidos ao método do poder redutor, expresso em porcentagem de atividade redutora de íon Fe^{3+} .

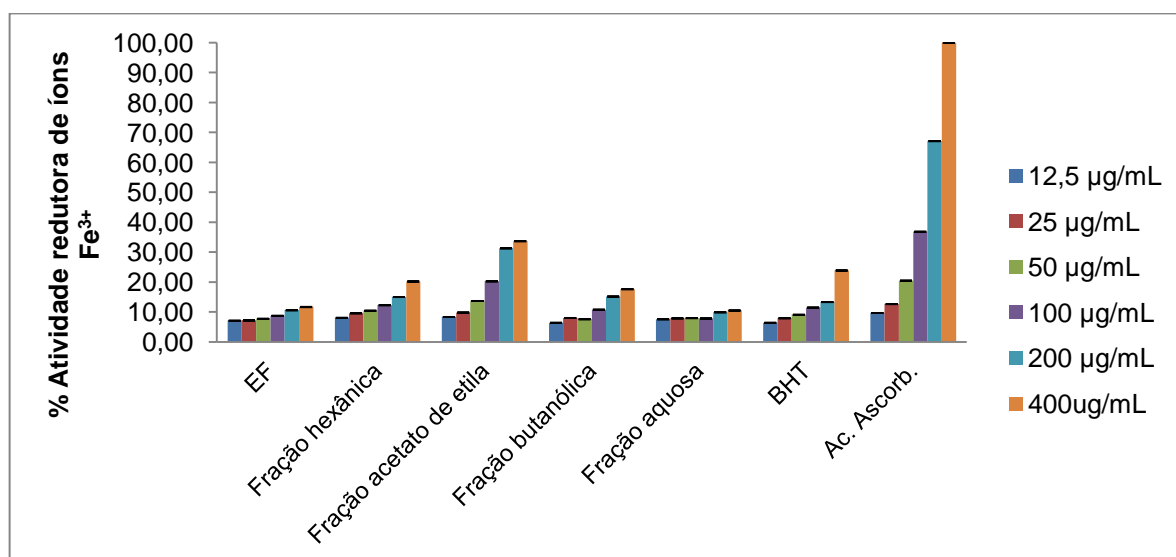
Tabela 7 - Tabela do poder redutor do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* Sonn. na concentração de 100 µg/mL

EXTRATO E FRAÇÕES	% Atividade redutora de íons Fe ³⁺ 100 µg/mL
EF	8,74 ± 0,03 ^e
FrHex	12,30 ± 0,08 ^c
FrAcOEt	20,27 ± 0,11 ^b
FrBuOH	10,80 ± 0,31 ^d
FrAq	7,85 ± 0,15 ^f
BHT	11,50 ± 0,17 ^d
Ácido Ascórbico	36,85 ± 0,14 ^a

Legenda: EF = Extrato de follhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa.
Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott p<0,05)
Fonte: Dados do autor

A Figura 22 apresenta o gráfico do poder redutor do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* Sonn. e os padrões BHT e ácido acórbico nas concentrações testadas.

Figura 22 - Gráfico do poder redutor do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* Sonn. e padrões BHT e ácido acórbico nas concentrações testadas.



Fonte: Dados do autor

Foi encontrada a seguinte ordem decrescente de poder redutor: FrAcOEt (20,27) > FrHex (12,30) > FrBuOH (10,80) > EF (8,74) > FrAq (7,85).

Neste trabalho foi observado que o resultado do poder redutor foi maior para a fração acetato de etila, seguida da fração hexânica e da fração butanólica, ocorrendo da mesma forma com a dosagem de flavonoides, sendo que o esperado era que, pelas características de polaridade dos flavonoides, o teor maior fosse encontrado na fração acetato de etila, seguida pela butanólica. Este fato pode ser devido à detecção da presença de compostos fenólicos como os flavonoides na forma de aglicona na fração hexânica, que apresentam baixa polaridade e provocam a redução do íon ferricianeto. A sugestão da presença da aglicona da quercetina com m/z 301 na fração hexânica indicou uma abundância relativa quatro vezes superior em relação à fração butanólica, como relatado anteriormente com a dosagem dos flavonoides.

É conhecido que, quanto maior o número de hidroxilas fenólicas presentes na substância, maior é a capacidade antioxidante, como observado, principalmente, com as substâncias diméricas. Os compostos fenólicos já bem conhecidos, como os pertencentes à classe flavan-3-ol, tais como a catequina, a epicatequina e seus dímeros, as procianidinas pertencentes à classe dos taninos, exibem forte atividade antioxidante, além de serem também agentes cardioprotetores, antimutagênicos e anticarcinogênicos (PESSUTO, 2009).

A presença de substâncias como a catequina, a epicatequina e seus dímeros e polímeros já foi relatada anteriormente em diversos estudos com a espécie *L. chinensis*, principalmente as procianidinas poliméricas (DUAN et al, 2007; LIU et al., 2007; PRASAD et al. 2009; LI et al., 2012; YANG et al.,2012). No presente trabalho foram sugeridas as presenças da procianidina A2 e da procianidina B2 na fração hexânica por meio da análise dos espectros de massas. O íon que apresenta maior abundância relativa nesta fração é a procianidina A2.

Os resultados da determinação dos fenólicos totais e dos flavonoides demonstraram que existe a maior concentração destes compostos na fração acetato de etila em relação ao extrato bruto e a avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH e do poder redutor demonstra que esta fração também apresentou maior atividade antioxidante que o extrato de folhas (EF), evidenciando assim a possível correlação entre estes compostos e a atividade antioxidante.

Apesar de não ser possível inferir com precisão quais são os compostos responsáveis pela ação antioxidante da fração acetato de etila, os flavonóides podem ser parcialmente responsáveis por esta atividade, tendo em vista os diversos trabalhos que relatam as diferentes atividades exibidas por esta classe de compostos, os quais são descritos preponderantemente como potentes antioxidantes (YAO et al, 2004; DUTRA, LEITE e BARBOSA, 2008; ROSA et al., 2010; SILVA et al. 2010).

5.7 Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro*

A estratégia de pesquisa por novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas passa por ensaios *in vitro* e *in vivo* que são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o candidato a fármaco deve ser submetido primeiramente a ensaios *in vitro* de atividade biológica e de citotoxicidade. Realizada essa primeira triagem, os resultados são analisados para definir a possibilidade de ensaios *in vivo* (DIAS et al., 2009; SANTOS et al., 2013).

Observa-se que as plantas podem ser uma fonte valiosa de compostos importantes e farmacologicamente ativos e, segundo Sharma e Sarkar (2012) as pesquisa específicas de plantas tem muito a contribuir frente às necessidades farmacêuticas atuais.

Nesse contexto, os estudos das atividades biológicas *in vitro* de extratos de plantas, conforme executado neste trabalho, tem por objetivo alimentar a base de dados da triagem de plantas medicinais que exercem atividades biológicas e contribuir na identificação de potenciais fontes vegetais para terapias futuras, buscando substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra microrganismos patogênicos.

5.7.1 Ensaio de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar é o método físico e qualitativo no qual o microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. Este ensaio tem como objetivo realizar a triagem para os estudos posteriores mais aprofundados e contribuir significativamente no desenvolvimento do estudo de atividades antimicrobianas de produtos naturais (OSTROSKY, 2008).

Os resultados da susceptibilidade aos extratos vegetais foram expressos pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, em milímetros. O extrato de folhas (EF) de *L.chinensis* e as frações foram testados na concentração de 50 mg/mL. A Tabela 8 apresenta os resultados para o ensaio da difusão em ágar testando o extrato de folhas e frações de *L. chinensis* contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Serratia mercenscens* (LMI-UNIFAL), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Enterobacter cloacae* (LMI-UNIFAL); em fungos *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e em micobactérias (*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*), utilizando como controles positivo a rifamicina (30µg) para micobactérias, a clorexidina 0,12% para as demais bactérias e como controle negativo a água destilada.

Tabela 8 - Média do diâmetro dos halos de inibição das frações do EF de *L. chinensis*.

Extrato e frações/ Controle	EF	FrHex	FrAcOEt	FrBuOH	FrAq	Controle positivo	Controle negativo
Microrganismo	Média* dos halos (mm) ± desvio padrão						
Gram-positivos							
<i>Bacillus subtilis</i>	10,67±1,15 ^c	7,67±0,58 ^c	9,33±0,58 ^c	7,33±0,58 ^c	5,00±4,36 ^c	15,67±2,08 ^b	0,00±0,00 ^d
<i>Bacillus cereus</i>	12,67±0,58 ^c	6,67±0,58 ^c	13,67±1,53 ^b	9,33±1,15 ^c	9,33±0,58 ^c	12,34±0,58 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Micrococcus luteus</i>	14,67±3,79 ^b	9,00±2,00 ^c	16,67±4,04 ^b	16,33±4,04 ^b	18,00±2,65 ^b	21,00±9,54 ^a	0,00±0,00 ^d
<i>Enterococcus faecalis</i>	9,67±0,58 ^c	0,00±0,00 ^d	10,33±0,58 ^c	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	16,00±1,73 ^b	0,00±0,00 ^d
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,00±0,00 ^b	5,33±4,73 ^c	12,33±0,58 ^c	6,67±5,86 ^c	9,00±1,00 ^c	16,00±4,36 ^b	0,00±0,00 ^d
Gram-negativos							
<i>Escherichia coli</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	12,67±2,52 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Serratia mercrescens</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	12,34±3,21 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	12,34±1,53 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Proteus mirabilis</i>	13,00±2,64 ^b	5,67±4,93 ^c	14,33±3,79 ^b	11,33±2,08 ^c	12,33±0,58 ^c	9,67±0,58 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	12,67±2,08 ^c	0,00±0,00 ^d
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	11,67±3,06 ^c	0,00±0,00 ^d
Fungos							
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	15,34±0,58 ^b	0,00±0,00 ^d
<i>Candida albicans</i>	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	15,67±6,03 ^b	0,00±0,00 ^d
Micobactérias							
<i>Mycobacterium bovis</i>	0,00±0,00 ^d	NT	NT	NT	NT	20,00±1,50 ^a	0,00±0,00 ^d
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,00±0,00 ^d	NT	NT	NT	NT	20,00±1,50 ^a	0,00±0,00 ^d

Legenda: EF= Extrato de folhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa; NT=não testado. * Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott p<0,05)

Fonte: Dados do autor

O extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e à bactéria Gram-negativa *Proteus mirabilis*.

Tanto o extrato de folhas como as frações de *L. chinensis* testados neste estudo não apresentaram atividade contra as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae*. Também não foi observada atividade contra as duas leveduras testadas: *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*. O extrato de folhas (EF) não se mostrou ativo contra as micobactérias: *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Observa-se um predomínio de atividade contra as bactérias Gram-positivas e este fato pode ser devido à parede celular destas bactérias serem menos complexas e apresentar maior permeabilidade quando comparada às bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas, devido à presença da membrana externa, apresentam uma barreira à penetração de numerosas moléculas e, além disso, o espaço periplasmático contém enzimas capazes de quebrar moléculas estranhas (TORTORA et al., 2005).

Os estudos sobre a atividade antimicrobiana para a espécie *L. chinensis* são bastante escassos na literatura. Shawar et al. (2010), estudaram a atividade antimicrobiana do extrato hidrometanólico da casca do caule e das frações obtidas com o éter dietílico, o acetato de etila e o butanol e estes foram testados contra seis cepas de bactérias: *Proteus mirabilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus licheniformis*, *Nocardia asteroides*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*. Neste estudo os extratos e as frações apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas.

Os resultados encontrados no presente estudo, através da extração hidroetanólica foram semelhantes aos resultados encontrados por Shawar et al. (2010), diferindo apenas no resultado relativo à bactéria *Salmonella typhimurium*, para a qual estes autores indicam haver atividade. Entretanto, o extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* e frações testados no atual trabalho não apresentaram nenhuma atividade contra esta bactéria.

5.7.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM)

O método da determinação da CIM consiste de diluições sucessivas do antimicrobiano testado, semeando em cada diluição o inóculo microbiano em número de células padronizado e, após a incubação, verifica-se a menor concentração que inibiu a multiplicação bacteriana. Este método possui a vantagem de ser quantitativo.

A seguir são apresentados os resultados da CIM para o extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* (TABELA 9).

Tabela 9 - Tabela comparativa das CIM (mg/mL) do extrato de folhas de *L. chinensis*.

Microrganismo	EF
<i>B. subtilis</i>	0,4
<i>B. cereus</i>	0,05
<i>M. luteus</i>	0,025
<i>E. faecalis</i>	0,1
<i>S. aureus</i>	0,05
<i>E. coli</i>	nd
<i>S. marcescens</i>	nd
<i>P. aeruginosa</i>	nd
<i>P. mirabilis</i>	0,05
<i>S. typhimurium</i>	nd
<i>E. cloacae</i>	nd
<i>S. cerevisiae</i>	nd
<i>C. albicans</i>	nd

Legenda EF=Extrato de folhas; nd = Não detectado à máxima concentração utilizada (12,5 mg/mL).

Fonte: Dados do autor

Os resultados da CIM para as frações do extrato de folhas (EF) estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Tabela comparativa das CIM (mg/mL) das frações do extrato de folhas de *L. chinensis*.

	Concentração inibitória mínima (mg/mL) das frações do EF			
	FrHex	FrAcOEt	FrBuOH	FrAq
<i>B. subtilis</i>	nd	0,05	1,56	1,56
<i>B. cereus</i>	nd	0,05	0,2	0,8
<i>S. aureus</i>	nd	0,05	0,8	1,56
<i>P. mirabilis</i>	nd	0,4	1,56	0,8

Legenda: FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa; nd = Não detectado à máxima concentração utilizada (12,5 mg/mL).

Fonte: Dados do autor.

A fração acetato de etila (FrAcOEt) apresentou o melhor desempenho, exibindo os menores valores de CIM contra *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* e *P. mirabilis*. A fração hexânica não apresentou nenhuma atividade contra os microrganismos testados neste ensaio.

Segundo Yunes e Calixto (2001), solventes com média a alta polaridade são responsáveis pela extração de compostos fenólicos em geral como: flavonóides, ácidos triterpênicos, xantonas e taninos. Estas moléculas têm recebido grande atenção nos últimos anos devido às suas funções biológicas, incluindo a atividade antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, imunomoduladora e antimicrobiana.

Os flavonoides como as flavonas e os flavonóis são sintetizados pelas plantas como protetores contra raios UV nas folhas e em resposta à infecções microbianas, e tem sido constatado *in vitro* que estas substâncias apresentam atividades antimicrobianas contra uma ampla variedade de microrganismos. Sua atividade deve-se, provavelmente, devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e proteínas das paredes das células bacterianas, possuindo a capacidade de romper as membranas microbianas (COWAN, 1999).

A atividade antimicrobiana dos taninos é conhecida e segundo Scalbert (1991), o mecanismo desta ação se daria por três hipóteses: a primeira pressupõe os taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Desta forma, torna-se justificável que as melhores atividades antimicrobianas tenham sido apresentadas pelas frações de média polaridade tanto para os ensaios da difusão em ágar como para a concentração inibitória mínima, sendo que o melhor resultado para ambos os ensaios foi exibido pela fração acetato de etila.

Conforme analisado no perfil dos espectros de massas do extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* e frações várias substâncias bioativas foram observadas, tais como os da classe dos taninos (proantocianidinas poliméricas e procianidinas) e da classe dos flavonóis (quercetina), sendo estes os possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada.

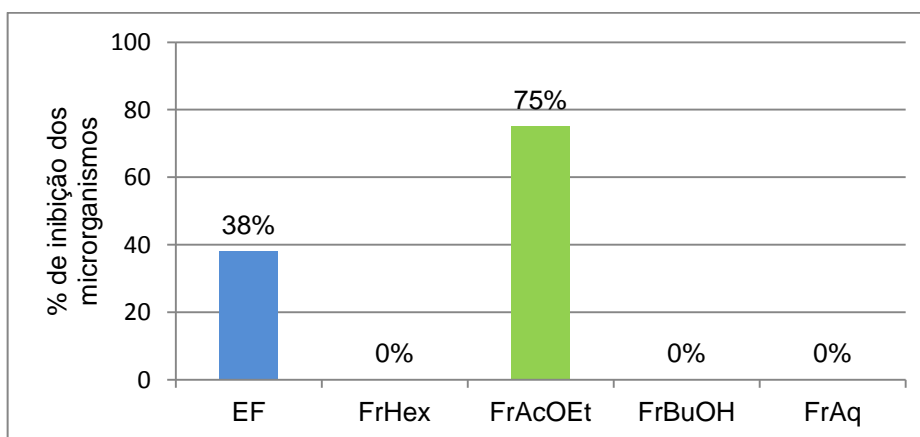
5.8 Quantificação da atividade antimicrobiana do extrato e frações com CIM menores ou iguais a 0,1 mg/ml

Segundo Fabry, Okemo e Ansorg (1998); Dall'Angol et al., (2003); Rios e Recio (2005) e Tanaka et al., (2005), os extratos vegetais que apresentam concentração inibitória mínima (CIM) igual ou inferior a 0,1 mg/mL são considerados bastante promissores quanto ao potencial inibitório de crescimento microbiano. Neste trabalho, portanto, apenas para o extrato e frações de *L. chinensis* que apresentaram CIM menor ou igual a este valor, foram calculados o percentual de atividade (%), o índice de susceptibilidade microbiana-ISM (%) e a atividade total.

5.8.1 Percentual de atividade

O percentual de atividade avalia o potencial antimicrobiano dos extratos de *L. chinensis* 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 CIM menor ou igual a 0,1 mg/ml e determinar o(s) mais ativo(s). A Figura 23 demonstra os resultados para o extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* e frações testadas.

Figura 23 - Percentual de atividade do extrato de folhas de *L. chinensis* e frações com CIM iguais ou inferiores a 0,1mg/ml.



Legenda: EF = Extrato de folhas; FrHex = Fração hexânica; FrAcOEt = Fração acetato de etila; FrBuOH = Fração butanólica; FrAq = Fração aquosa.

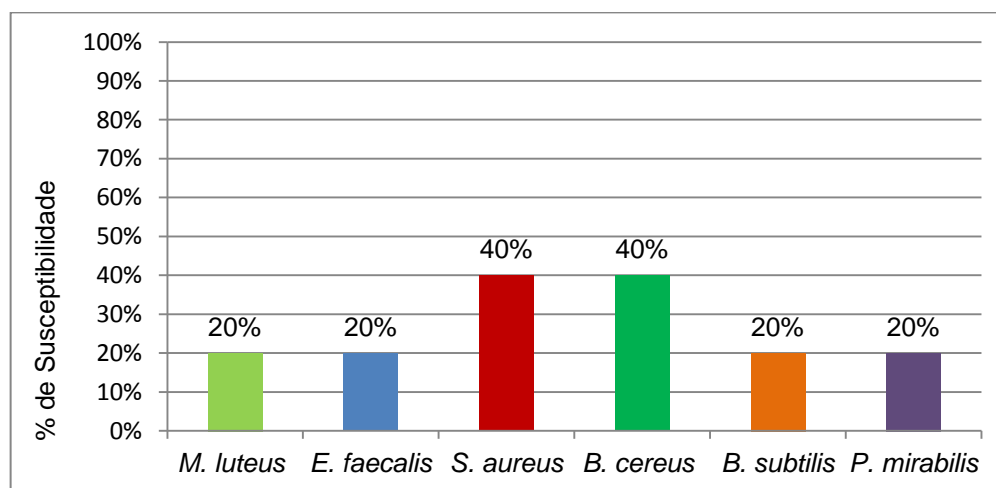
Fonte: Dados do autor

O extrato de folhas (EF) apresentou o percentual de atividade de 38% e para a fração acetato de etila (FrAcOEt) este índice aumentou para 75%. As frações hexânica, butanólica e aquosa não apresentaram atividade satisfatória contra os microrganismos testados na avaliação pelo método de microdiluição em caldo (CIM > 0,1 mg/ml).

5.8.2 Índice de susceptibilidade microbiano (ISM)

O índice de susceptibilidade microbiano (ISM) compara a susceptibilidade relativa entre os microrganismos testados com o extrato de folhas (EF) e frações de *L. chinensis*. Seu valor varia entre '0' (crescimento microbiano frente a todos os extratos) e '100' (inibição do crescimento microbiano frente a todos os extratos). Os resultados estão demonstrados na Figura 24 .

Figura 24 - Índice de susceptibilidade microbiano (ISM,%) frente o extrato de folhas de *L. chinensis* e frações com CIM iguais ou inferiores a 0,1 mg/ml.



Fonte:Dados do autor

Os resultados demonstram que *S. aureus* e *B. cereus* foram os microrganismos mais susceptíveis, sendo que houve inibição do crescimento microbiano frente a 40% do extrato de folhas (EF) e frações de *L. chinensis* com concentração inibitória mínima (CIM) inferior ou igual a 0,1 mg/ml, seguido por *M. luteus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* e *P. mirabilis* (20%).

5.8.3 Atividade total do extrato e frações de *L. chinensis* com CIM iguais ou inferiores a 0,1 mg/ml.

O uso dos valores da atividade total permite comparar a bioatividade de diferentes partes da planta, ou entre diferentes plantas, em uma base mais racional e padronizada, permitindo a melhor interpretação dos resultados. (ELOFF, 2004).

Os resultados da atividade antimicrobiana total do extrato de folhas e frações de *L. chinensis* são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade total do extrato e frações provenientes das folhas de *L. chinensis* com CIM inferiores a 0,1 mg/ml.

Extrato/ Fração	Rendimento (p/p) *	Microrganismo	CIM (mg/mL)	Atividade total (mL/g)
EF	26,92%	<i>B. cereus</i>	0,05	5384
EF	26,92%	<i>M. luteus</i>	0,025	10768
EF	26,92%	<i>S. aureus</i>	0,05	5384
EF	26,92%	<i>P. mirabilis</i>	0,05	5384
EF	26,92%	<i>E. faecalis</i>	0,1	2692
FrAcOEt	12,88%	<i>B. subtilis</i>	0,05	2576
FrAcOEt	12,88%	<i>B. cereus</i>	0,05	2576
FrAcOEt	12,88%	<i>S. aureus</i>	0,05	2576

Legenda: EF= Extrato de folhas; FrAcOEt = Fração acetato de etila;

*Com relação à droga vegetal.

Fonte: Dados do autor

Para a atividade total, o extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* mostrou excelente atividade total (AT) para *M. luteus*, haja vista que os prováveis componentes com a ação antimicrobiana presentes neste extrato, por grama da planta, podem ser diluídos 10.768 vezes e ainda inibir o crescimento deste microrganismo. Somente a fração acetato de etila do extrato de folhas (EF) apresentou os valores de CIM menores ou iguais a 0,1 e possivelmente nesta fração encontram-se os compostos bioativos com o melhor desempenho da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Os bons valores da atividade total observados para a fração acetato de etila indicam que esta é a fração mais promissora como fonte para bioprospecção de candidatos a substâncias com ação antimicrobiana para estes microrganismos, segundo o trabalho apresentado por Eloff (2004).

5.9 Correlação entre os teores quantitativos dos compostos e as atividades antioxidante e antimicrobiana

Atualmente, as atividades antioxidante e antimicrobiana de várias fontes vegetais têm sido avaliadas em muitos experimentos. Acredita-se que os compostos fenólicos sejam os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em muitas plantas e a correlação entre a concentração total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante tem sido amplamente estudada em diferentes gêneros alimentícios, tais como os frutos, os vegetais e os produtos apícolas (SOARES et al., 2002; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; BABBAR et al., 2011; SÁ et al., 2012; ESCUREDO et al., 2013; RAHIM et al., 2013).

A atividade antimicrobiana exercida por compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos podem ser atribuídas à sua atuação nas membranas celulares e tem sido alvo de interesse e pesquisa (ÖZÇELİK et al., 2008; TSUCHIYA, 2010; MILANI et al., 2012). Muitos autores avaliam possíveis correlações entre compostos orgânicos de origem vegetal e atividades biológicas como antioxidante e antimicrobiana.

O coeficiente de correlação de Spearman é a medida do grau de relação linear entre as duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1, onde o valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica a relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta e a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis.

Desta forma, neste trabalho foram determinados, através dos coeficientes de Spearman, a correlação entre o conteúdo total de fenóis e de flavonoides e as atividades: antioxidante, mensurada pela porcentagem de sequestro de radicais DPPH a 100 µg/mL de cada extrato de *L. chinensis* e do ensaio do poder redutor e antimicrobiana, por meio da concentração inibitória mínima, conforme demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficiente de correlação (r) entre o teor quantitativo dos compostos e as atividades antioxidante e antimicrobiana para o extrato e frações de *L. chinensis*.

Determinações quantitativas	Coeficiente de correlação (r)		
	DPPH	Poder redutor	CIM
Fenóis totais	0,40	0,60	0,75
Flavonoides totais	0,80	0,90	0,50

Fonte: Dados do autor

Segundo Callegari-Jacques (2003), o coeficiente de correlação pode ser avaliado qualitativamente da seguinte forma: se $0,00 < r < 0,30$, existe fraca correlação linear; se $0,30 \leq r < 0,60$, existe moderada correlação linear; se $0,60 \leq r < 0,90$, existe forte correlação linear; se $0,90 \leq r < 1,00$, existe correlação linear muito forte.

Sendo assim, a melhor correlação observada para a atividade antioxidante mensurada pelos métodos do DPPH e do poder redutor corresponde ao teor de flavonoides encontrados no extrato e frações de *L. chinensis* ($r=0,80$ e $r=0,90$). Para a concentração inibitória mínima, houve melhor correlação com os compostos fenólicos totais ($r=0,75$).

5.10 Avaliação da atividade leishmanicida na forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

As dificuldades em relação à terapêutica atual têm conduzido a investigações com as plantas, que são importantes fontes para a investigação de produtos biologicamente ativos. O principal grupo de compostos isolados de plantas com atividade leishmanicida são os alcaloides, mas em um trabalho de revisão elaborado por Rocha et al. (2005) foi avaliado que os flavonoides também podem desempenhar esta atividade. Estes autores relacionaram 101 plantas, suas famílias, a distribuição geográfica, a parte utilizada, os tipos de extratos e o microrganismo testado. Também relacionaram 288 compostos isolados de plantas superiores, classificados em grupos químicos apropriados e os microrganismos testados. Dos compostos isolados foi observado o predomínio de alcaloides (68), triterpenos (29), sesquiterpenos (19), lactonas (18), quinóides (16), flavonóides (13), dentre outras classes de compostos isolados de plantas superiores.

O mecanismo de ação leishmanicida dos alcaloides está relacionado com a habilidade deste grupo em se intercalar com o DNA do parasita (TEMPONE et al., 2005) e o dos flavonoides, possivelmente com a habilidade de ativação dos macrófagos (ODA et al., 2011).

O extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* e as frações foram testados na faixa de concentração de 0,05 a 40 µg/mL para determinar as concentrações inibitórias de 50% de crescimento (CI₅₀), que seriam as concentrações suficientes para inibir 50% da população da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

O extrato de folhas de *L. chinensis* (EF) e as frações (FrHex, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq) não se mostraram citotóxicos na maior concentração avaliada (40 µg/mL), apresentando ser inativos contra a forma promastigota de *L. amazonensis* nas condições experimentais desse estudo.

Nos ensaios com a forma promastigota o extrato entra em contato direto com o parasita e com a forma amastigota é necessário que as moléculas presentes no extrato ultrapassem a membrana dos macrófagos para atingir o parasita. À vista disso e avaliando que os resultados encontrados nos ensaios com a forma promastigota não foram promissores, os extratos de *L. chinensis* não seguiram para o ensaio com a forma amastigota deste protozoário.

5.11 Avaliação da citotoxicidade

A dosagem da citotoxicidade é um importante ensaio a ser realizado para determinar a margem de segurança para o extrato em relação às suas atividades biológicas.

No trabalho de Velloso et al.(2011) foram avaliadas as ações citotóxicas de três importantes flavonoides: canferol, quercetina e isoquercitrina (quercetina-3-O-glicosídeo). Apesar de flavonoides serem amplamente descritos como antioxidantes e esta atividade estar geralmente relacionada a efeitos benéficos para a saúde humana, eles foram capazes de promover hemólise. Portanto, apesar de apresentarem ação *scavenger* de espécies reativas, esses compostos podem ser lesivos aos seres vivos agindo sobre os eritrócitos e talvez sobre outros tipos celulares.

Desta forma, os extratos de *L. chinensis* foram avaliados em relação ao potencial citotóxico frente aos macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO₂.

O extrato de folhas de *L. chinensis* (EF) e as frações (FrHex, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq) não se mostraram citotóxicos na maior concentração avaliada (160 ug/mL).

Entretanto, em vários estudos reportados na literatura, a espécie *L. chinensis* mostra desempenhar atividade citotóxica em células de câncer, como nos trabalhos apresentados a seguir.

Em estudo de Chiang et al. (2004), através de extração com água quente de sementes de *L. chinensis*, foram testados em células de leucemia das linhagens K562 e U937 e avaliada pelo método colorimétrico utilizando o hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio (XTT), tendo como resultados de CI₅₀ para estas células os valores de 480,37±10.0 µg/mL e 490,97±34.1 µg/mL, respectivamente.

Wang et al. (2006a) e (2006b) em seus estudos objetivando avaliar a atividade anti-câncer *in vitro* e *in vivo* para o carcinoma hepatocelular e câncer de mama humano, concluíram que os extratos de lichia exibem uma grande inibição da proliferação e indução à apoptose das células cancerígenas.

Dessa forma, sugere-se a necessidade de estudos adicionais com a espécie *L. chinensis* em relação à citotoxicidade para avaliar seu efeito tanto em células saudáveis como cancerígenas.

6 CONCLUSÕES

O extrato de folhas e frações apresentaram compostos fenólicos como principais constituintes químicos, tais como flavonoides (agliconas e heterosídeos) e taninos condensados.

Os resultados da determinação dos fenólicos totais e flavonoides demonstraram que existe uma maior concentração destes compostos na fração acetato de etila em relação ao extrato de folhas (EF) e às outras frações.

A avaliação do poder sequestrante de radicais DPPH e do poder redutor demonstra que a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* em comparação ao extrato de folhas (EF) e às outras frações.

O extrato de folhas (EF) de *L. chinensis* e frações testados neste trabalho apresentaram atividade antimicrobiana contra as seguintes bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e frente à bactéria gram-negativa *Proteus mirabilis*.

O extrato de folhas (EF) e as frações de *L. chinensis* não apresentaram atividade contra *L. amazonensis* até a concentração testada de 40 µg/mL.

O extrato de folhas (EF) e as frações de *L. chinensis* não apresentaram toxicidade aos macrófagos murinos até a concentração testada (160 µg/mL).

A fração acetato de etila do extrato de folhas (EF) apresentou os melhores resultados quanto ao teor de fenóis totais, flavonoides totais, a melhor atividade antioxidante e os menores valores de concentração inibitória mínima, evidenciando assim a viabilidade desta fração do extrato de folhas como fonte potencial de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-0422010001000033&script=sci_arttext> Acesso em: 05 jan. 2013.

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

ALVES, J. A. et al. Chemical, physical–chemical, and sensory characteristics of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn) Wines. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 330-336, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417449>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

BABBAR, N. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, p. 391–396, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910003625>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001. 19 p.

BESRA, S. E.; SHARMA, R. M.; GOMES, A. Antiinflammatory effect of petroleum ether extract of leaves of *Litchi chinensis* (Sapindaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p. 1-6, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014407>>. Acesso em: 05 maio. 2012.

BHOOPATA, L. et al. Hepatoprotective effects of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.): A combination of antioxidant and anti-apoptotic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 55–66, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111002121>>. Acesso em: 12 set. 2012.

BONJAR, G.H.S. New approaches in screening for antibacterials in plants. **Asian Journal of Plant Science**, v. 3, p. 55-60, 2004. Disponível em: <<http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajps/2004/55-60.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2013.

BRAT, P. et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2368–2373, 2006. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/136/9/2368.full>>. Acesso em: 11 nov. 2012.

CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais**. 2010. 144 p. Tese de Doutorado – Instituto de química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.

CAMARGO, E. E. S., VILEGAS, W. Controle de qualidade dos extratos polares de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 228-232, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2010000200015&script=sci_arttext> Acesso em: 13 jun. 2012

CARVALHO, C. M.; CUNHA, R. J. P.; RODRIGUES, J. D. Enraizamento de estacas semilenhosas de lichieira utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 95-97, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v27n1/24575.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2012.

CARVALHO, A. J. S.; ISHIKAWA, T.; GOUVÊA, C. M. C. P. Aqueous extract of *Plinia edulis* leaves: Antioxidant activity and cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 81, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629912000415>> Acesso em: 02 jan. 2013.

CASTELLAIN, R. C. da Luz. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto, frações e uma substância pura obtidos das folhas de *Litchi chinensis* Sonn.** 2010. 121p. Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Rosana%20Custodio%20da%20Luz%20Castellain.pdf>> Acesso em: 02 mar. 2012.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106-112, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-95X2010000100021> Acesso em: 18 out. 2012.

CHEN, Y. C. et al. Composition of flavonoids and phenolic acids in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flower extracts and their antioxidant capacities estimated with human LDL, Erythrocyte, and Blood Models. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. C724-C728, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2011.02164.>>> Acesso em: 15 dez. 2012.

CHIANG, L. C. et al. *In vitro* evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**., v. 37, p. 539–544, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643803002147>> Acesso em: 05 jan. 2013.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed., Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CHYAUUA, C. et al. Free and glycosidically bound aroma compounds in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) **Department of Nutrition**, v. 80, p. 387-392, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602002789>> Acesso em: 18 out. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – M7-A6**. 6. ed.. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003. Disponível em: <<http://isoforlab.com/phocadownload/csl/M7-A6.pdf>> Acesso em: 03 abr. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard –M27-A3**. 3. ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008. Disponível em: <<http://freepdfdb.org/pdf/m27-a3-method>> Acesso em: 04 abr. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved Guideline- M44-A2**. 2. ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009. Disponível em: <www.springer.com/.../9781588298478-c1.pdf?> Acesso em 04 abr. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard - M24-A2**. 2. ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011. Disponível em: <<http://www.techstreet.com/products/1280769>> Acesso em: 04 abr. 2012.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p.564-582, 1999. Disponível em:
< <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.long>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

DALL' AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some Hypericum species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678236>> Acesso em: 03 jun. 2013.

DEL AGUILA, S. J. **Conservação pós-colheita de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.)** 2009. 162p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em:
< <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-10032009-102132/pt-br.php>>. Acesso em: 02 mar. 2012.

DETTMER, K.; ARONOV, P.A.; HAMMOCK, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrom Rev.**, v.26, n. 1, p. 51-78, 2007. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904337/pdf/nihms21280.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2013.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900038> Acesso em: 02 jun. 2012.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, 2010. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 dez. 2013.

DUAN, X. et al. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1365-1371, 2007. Disponível em: < <http://www.aseanbiotechnology.info/Abstract/21020569.pdf>> Acesso em: 02 out. 2012.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 606-614, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325773>> Acesso em: 18 nov. 2013.

ELOFF, J.N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, v.11, p. 370-371, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15185853>> Acesso em: 06 nov. 2012.

EMBRAPA. Lichia. **Rede Regional de Agroecologia**. Viçosa: setembro, 2009. Disponível em: <<http://redeagroecologia.cnptia.embrapa.br/boletins/frutiferas/Lichia.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2012.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, p. 851–856, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411187>> Acesso em: 29 jun. 2013.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533435>>. Acesso em: 09 mar. 2013.

FÄH, J.; WÜTHRICH, B.; VIETHS, S. Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profiling. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, n. 10, p. 1018-1023, out, 1995. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2222.1995.tb00405.x>>. Acesso em: 23 jun. 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FAYSAL, M. M. Justification of use of some medicinal plants to treat various diseases in Khulna, Bangladesh. **Ethnobotanical Leaflets**. v. 12, p. 1231-1235, 2008. Disponível em: <<http://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1200&context=ebi>> Acesso em: 09 abr. 2012.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf/pdf2011/23Dec/Ghasemzadeh%20and%20Ghasemzadeh.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

GONTIER, E. et al. *Litchi chinensis* fatty acid diversity: occurrence of the unusual cyclopropanoic fatty acids. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, n.6, p. 578-580, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171131>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

GUO, J. et al. Pharmacological mechanism of Semen Litchi on antagonizing insulin resistance in rats with type 2 diabetes. **Zhong Yao Cai**, v. 27, n. 6, p. 435-438, jun, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524300>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

GUO, J. et al. Five chemical constituents of the ethyl acetate fraction from ethanol extract of semen litchi. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 6, p. 168-170, jan. 2012. Disponível em: < <http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf/pdf2012/9Jan/Guo%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

HADDOUCHI, F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria, **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 253-258, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768355>> Acesso em: 15 jul. 2013.

HOPPE, S. et al. The influences of cultivar and thermal processing on the allergenic potency of lychees (*Litchi chinensis* Sonn.). **Food Chemistry**, v. 96, p. 209–219, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605001718>>. Acesso em: 25 abr. 2012.

HOUGHTON, P. J.; OSIBOGUN, I. M. Flowering plants used against snakebite. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 39, p. 1-29, 1993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874193900479>>. Acesso em: 13 abr. 2012.

JIANG, G. et al. Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. **Food Chemistry**, v. 136, p. 563–568, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122098>>. Acesso em: 9 maio 2013.

JOSHI, R. et al. *In vitro* cytotoxicity, antimicrobial, and metal-chelating activity of triterpene saponins from tea seed grown in Kangra valley, India. **Medicinal Chemistry Research**, v..22, n. 8, p.4030-4038, 2013. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00044-012-0404-4>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21 p. 10129-10134, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841977>>. Acesso em: 05 ago. 2012.

KROON, P. A. The cardiovascular nutraceutical pharmacology of resveratrol: pharmacokinetics, molecular mechanisms and therapeutic potential. **Current Medicinal Chemistry**, v.17,n. 23, p. 2442-2455, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491649>> Acesso em: 25 jan. 2013.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n4/a37v36n4.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2012.

LI, J.; JIANG, Y. Litchi Flavonoids: isolation, identification and biological activity. **Molecules**, v.12, p.745-758, 2007. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/12/4/745>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

LI, S. et al. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. **Food Chemistry**, v. 135, p. 31–38, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612006760>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

LI, S. et al. Absorption and urinary excretion of A-type procyanidin oligomers from *Litchi chinensis* pericarp in rats by selected ion monitoring liquid chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1536–1542, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612015816>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

LIMA, R. A. Z. et al. Embalagens e recobrimento em Lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) armazenadas sob condições não controladas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 914-921, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542010000400017>. Acesso em: 15 jun. 2012.

LIMA, F. V. et al. Pós-colheita de lichia 'Bengal' tratada com etileno e 1-metilciclopropeno. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. .7, p. 1143-1149, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542010000400017>. Acesso em: 17 ago. 2012.

LINS, L. C. R. et al. Quitosana no retardamento do escurecimento do pericarpo em lichia. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 1, p. 61-67, 2012. Disponível em: <http://www.rbas.com.br/pdf/revista_1_artigo_9.pdf>. Acesso em: 12 out. 2012.

LIU, L. et al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1446–1451, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607004669>>. Acesso em: 20 maio 2012.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n3/9337.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

MARTINS, A. B. G. Lichia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 349-520, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452005000300001&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 abr. 2012.

MARTINS, A. B. G.; BASTOS, D. C.; SCALLOPI JÚNIOR, E. J. **Lichieira (*Litchi chinensis* Sonn)**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2001. 48p.

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000400024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 de abril de 2013.

MILANI, L. I. G. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cv. Rama Forte. **Brazilian Journal of food technology**, v.15, n.2, p. 118-124, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjft/v15n2/aop_2411.pdf> Acesso em: 14 de de dez. 2013.

MOTTA, E. L. da. **Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de *Litchi chinensis* Sonn. (“Lichia”) cultivada no Brasil**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009. Disponível em: < <http://teses2.ufrj.br/59/teses/725620.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2012.

ÖZÇELİK B. et al. Antimicrobial activity of flavonoids against extended-spectrum β -Lactamase (ES β L)-Producing *Klebsiella pneumonia*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.7, n.4, p.1151-1157, 2008. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf?pr08038>> Acesso em 14 de dez. 2013.

ODA, J. M. M. et al. Ação do extrato de própolis na leishmaniose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 111-121, 2011. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/4860/8820>>. Acesso em: 18 dez. 2013.

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

OLIVEIRA et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=42>>. Acesso em: 14 dez. 2012.

ORWA, C. et al. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. **World Agroforestry Centre**, Kenya, 2009. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/resources/databases/agroforestry>> Acesso em: 12 abr. 2012.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200026>. Acesso em: 22 jan. 2013.

PAULY, G.; DANOUX, L.; HENRY, F. Use of extracts of the plant *Litchi chinensis* Sonn. **United States 20040101508**, 2004. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2004/0101508.html>> Acesso em: 24 jan. 2013.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n.5, p. 339-45, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309001949>>. Acesso em: 27 abr. 2013.

PESSUTO, M. B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 05 dez. 2013.

PICOLI, P. R. F. **Aceria litchii (Keifer) em lichia: ocorrência sazonal, danos provocados e identificação de possíveis agentes de controle biológico**. 2010. 75f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2009. Disponível em:

< <http://www.acervodigital.unesp.br/handle/123456789/59318>>. Acesso em: 16 abr. 2012.

PRASAD, K. N. et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1-7, 2009. Disponível em: http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=03088146&issue=v116i0001&article=1_iopcaaafllsss>. Acesso em: 17 nov. 2012.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1991.

RAHMATULLAH, M. et al. A comparative analysis of medicinal plants used by folk medicinal healers in villages adjoining the Ghaghot, Bangali and Padma rivers of Bangladesh. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 70-85, 2010a. Disponível em: << <http://www.aensiweb.com/aejsa/2010/70-85.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

RAHMATULLAH, M. et al. A pharmacological evaluation of medicinal plants used by folk medicinal practitioners of station purbo para Village of Jamalpur Sadar Upazila in Jamalpur District, Bangladesh. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 170-195, 2010b. Disponível em: < <http://www.aensiweb.com/aejsa/2010/170-195.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

RAHMATULLAH, M. et al. A survey on the use of medicinal plants by folk medicinal practitioners in three areas of Pirojpur District, Bangladesh. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 247-259, 2010c. Disponível em:< <http://aensiweb.com/aejsa/2010/247-259.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

RAHIM, G. et al. Phytochemical analysis and antioxidant properties of *Teucrium stocksianum* flower from Malakand Division, Pakistan, **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 2, p. 377-381, 2013. Disponível em: < http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_15_NO_2/32.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2013.

REN, S. et al. Two flavanone compounds from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α -glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1760–1763, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461100313X>>. Acesso em: 23 mar. 2012.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003247>> Acesso em: 05 abr. 2013.

ROCHA et al. A review of natural products with antileishmanial activity.

Phytomedicine, n.12, p. 514–535, 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711305000358>>. Acesso em: 10 out. 2012.

ROCKENBACH, I. I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alim. Nutr.**, Araraquara , v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.

Disponível em:

< <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/630/528>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

RODRIGUES, A. M. G. et al. Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. **Brain research**, v. 1503, p. 53-61, 2013.

Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23370003>>. Acesso em: 15 maio 2013.

ROSA, E. A. da et al . Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000400004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 05 dez. 2013.

ROUX et al. A-Type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis*.

Phytochemistry, v. 48, n.7, p. 1251-1258, 1998. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297010704>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

ROY, S. et al. Induction of apoptosis in human leukemic cell lines U937, K562 and HL-60 by *Litchi chinensis* leaf extract via activation of mitochondria mediated caspase cascades. **The Open Leukemia Journal**, v. 1, p. 1-14, 2008. Disponível em:

<<http://www.benthamscience.com/open/toleukemiaj/articles/V001/1TOLEUKEMIAJ.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

RUSSO, R. O.; SÁNCHEZ, M. S. Los flavonoides en la terapia cardiovascular.

Revista Costarricense de Cardiología, v. 8, n. 1, jan.-abril, 2006. Disponível em:

< http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-41422006000100003&script=sci_arttext>. Acesso em: 18 dez. 2012.

SÁ, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012. Disponível em: <http://serv-ib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2179/1333>. Acesso em: 05 jan. 2013.

SALLES, C. Muito prazer, Lichia. **Viva Saúde online**. São Paulo: Editora Escala, v. 40, 2007. Disponível em: <<http://revistavivasauade.uol.com.br/Edicoes/40/artigo42636-1.asp/>>. Acesso em: 03 ago. 2012.

SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L. de; PEREIRA, M. E. C. Macro and micronutrients accumulation in inflorescences and fruits of the litchi 'Bengal'. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 793-800, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n3/a11v36n3.pdf>>. Acesso em 30 de março de 2012.

SANTOS, K. K. A. et al. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2013. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2397/1360>. Acesso em: 11 jun. 2013.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229183426L>>. Acesso em 12 jun. 2013.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974. Disponível em: <<http://www.ime.usp.br/~abe/lista/pdfXz71qDkDx1.pdf>>. Acesso em; 18 dez. 2012.

SHAHWAR, D. et al. Comparative study on the antioxidant and antimicrobial activities of stem-bark extract of *Litchi chinensis* and its organic fractions. **J. Chem. Soc. Pak.**, v. 32, n. 3, p. 357-362, 2010. Disponível em: <<http://jcsp.org.pk/ArticleUpload/758-3249-1-PB.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2012.

SHARMA, V.; SARKAR, I. N. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. **Briefings in bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 238-250, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589384>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant

activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/6510/0>> Acesso em: 12 jun. 2013.

SILVA, M. A. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 319 - 324, 2007. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/246/242>. Acesso em: 02 maio 2012.

SILVA, D. F. P. et al. Prevenção do escurecimento do pericarpo de lichia através do uso de ácidos e filmes. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, Volume Especial, E. p. 519-527, out., 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a70v33nspe1.pdf>>. Acesso em; 23 abr. 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 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**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>>. Acesso em; 18 jan. 2013.

SHOHAIB, T. et al. Importance of flavonoides in therapeutics. **Hygeia.J.D.Med.**,v.3, n.1, p.1-18, 2011. Disponível em: <<http://www.hygeiajournal.com/downloads/editorial/1269345149flavonoides.pdf>> Acesso em: 19 de fev. 2014.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732002000100008&script=sci_arttext>. Acesso em: 25 ago. 2012.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/20.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

SOUZA, A. V. de. **Tratamento térmico na manutenção da qualidade de Lichias armazenadas sob refrigeração**. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado Ciências

Agronômicas). Botucatu: UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, 2009. Disponível em: < <http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0365.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 5, p. 834-837, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500020>. Acesso em: 25 já. 2013.

TAKATA, W. H. S. et al. Alporquia em Lichieira, *Litchi chinensis* (Sapindaceae), submetida a diferentes doses de ácido naftaleno acético. **Acta Biol. Par.**, Curitiba, v.40, p. 109-117. 2011. Disponível em: < <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/acta/article/viewFile/25208/16903>>. Acesso em: 27 mar. 2012.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. **Phytomedicine**, v.12, p. 382-390, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957374>> Acesso em 18 dez. 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005. 894p.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, v. 120, p.1089–1096, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609013673>>. Acesso em: 15 de dez. 2013.

VELLOSA, J. C. R. et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética química**, v. 36, n. 2, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-46702011000200001&script=sci_arttext>. Acesso em: 13 jul. 2012.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006. Disponível em: < <http://quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2006/vol29n2/24-DV04373.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2012.

WANG, X. et al. Potential anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Letters**, v. 239, p. 144-150, 2006a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16300877>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

WANG, X. et al. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 215, p. 168–178, 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16563451>>. Acesso em: 09 mar. 2012.

WANG, L. et al. Chemical constituents with antioxidant activities from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1081–1087, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610015529>>. Acesso em: 05 abr. 2012.

XIONG, J. et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. Leaves. **Food Chemistry**, v.138, n. 1, p. 327-333, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265495>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

XU, X. et al. A novel cyclopropyl-containing fatty acid glucoside from the seeds of *Litchi chinensis*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 485–488, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11000207>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

YANG, B. et al. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 634–638, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621506000097>>. Acesso em: 11 jun. 2012.

YANG, D. J. et al. Protective effect of a litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)-flower-water-extract on cardiovascular health in a high-fat/cholesterol-dietary hamsters. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1457–1464, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609010711>>. Acesso em: 22 jun. 2012.

YANG, D. J. et al. Antioxidant effect and active components of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3056–3061, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2008.01768.x/pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2012.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113–122, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11130-004-0049-7#page-1>> Acesso em: 12 jun. 2013.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, n.3, p. 193-200, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643804001434>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

YILDIRIM, A.; OKTAY, M.; BILALOGLU, V. The antioxidant activities of the leaves of *Cydonia vulgaris*. Turk J. Med. Sci. v.31, p. 23-27, 2001 *apud* YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **J. Agric. Food Chem.** v.49, p. 4083-4089, 2001. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-01-31-1/sag-31-1-3-9910-2.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2012.

YUNES, R. A., CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ZHAO, M. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 162–166, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178382>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

ZHOU, Y. et al. Effects of *Litchi chinensis* fruit isolates on prostaglandin E2 and nitric oxide production in J774 murine macrophage cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 2-8, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-12-12.pdf>> Acesso em: 16 abr. 2013.