

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCIMARA QUINTINO MOREIRA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
ESPÉCIE *Byrsonima intermedia* A. JUSS**

Alfenas/MG

2010

LUCIMARA QUINTINO MOREIRA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
ESPÉCIE *Byrsonima intermedia* A. JUSS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e identificação de compostos bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Alfenas/MG

2010

Moreira, Lucimara Quintino.
Estudo Químico e Biológico da espécie *Byrsonima intermedia*
A.Juss / Lucimara Quintino Moreira. - Alfenas, 2010.
162 f. -

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

1. Antioxidantes. 2. Produtos de ação antimicrobiana.
3. Antiinflamatórios. 4. Extratos Vegetais. I. Título.

CDD: 615.321

LUCIMARA QUINTINO MOREIRA

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA ESPÉCIE *Byrsonima intermedia* A.JUSS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e identificação de compostos bioativos.

Aprovada em: 29/07/2010

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

Prof^a. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro
Instituição: Universidade Federal de São João Del-Rei

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta oportunidade.

Aos meus pais, que apostaram nos meus estudos; pelo amor e dedicação.

Ao meu marido, meu grande companheiro, que me apoiou em todos os momentos.

Aos meus filhos por entenderem minha ausência. Amo vocês!

Ao professor Geraldo Alves da Silva pela oportunidade concedida, amizade e principalmente pela confiança depositada.

A Cláudia Quintino Rocha, Fabiana Cardoso Vilela, Maria do Socorro Melo: Obrigada pela presença, incentivo, auxílio e amizade.

Em especial ao professor Marcelo Aparecido da Silva e Professor Jorge Kleber Chavasco pelo companheirismo, e principalmente pelas valiosas informações na realização dos experimentos.

Aos professores Marcelo Henrique dos Santos, Alexandre Giusti Paiva pela colaboração e atenção dispensada.

Ao professor Eric B. Ferreira e por ter sido tão especial e auxiliador na estatística.

Aos funcionários, professores e alunos que compõem o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL-MG, bem como professores e funcionários do laboratório de fitoquímica e química dos produtos naturais, em particular aos alunos de química, Éderson e Vanessa Gontijo. Aos funcionários Martinha e Toninho da microbiologia.

À professora Terezinha e ao técnico Gabriel do Laboratório de bioquímica, que muito auxiliaram nos experimentos com calos e análises de HPLC.

À funcionária Sílvia Helena e ao mestrando Marcelo José da Silva - laboratório de fitoterápicos e plantas medicinais. Vou sentir saudades de vocês!

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

*“Todas as substâncias são venenos.
Não existe nada que não seja veneno.
Somente a dose certa diferencia o
veneno do remédio”.*

Paracelsus (médico e sábio suíço
1493-1541)

RESUMO

Estudos voltados para identificação de plantas com propriedades curativas presentes no Cerrado ainda são poucos, principalmente quando comparadas a sua grande diversidade e a área que elas ocupam. *Byrsonima intermedia* A. Juss., é um arbusto presente no Cerrado brasileiro, pertencente a família Malpighiaceae, muito utilizada pela população local como antisséptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, cicatrizante, anti-inflamatório, febrífugo e adstringente nas diarreias e disenterias. No entanto são plantas que não apresentam estudos suficientes para que possam ser empregadas de maneira racional. Seu uso popular se dá através das cascas do caule, o que leva ao extrativismo. Um dos problemas que têm limitado a ampla utilização desta espécie é a produção de mudas, pois suas sementes apresentam dormência tegumentar. O objetivo do estudo foi caracterizar biológica e quimicamente o extrato liofilizado das folhas (ELF), bem como avaliar quimicamente os calos produzidos dos explantes foliares. A atividade antioxidante *in vitro*, foi verificada pela capacidade de seqüestrar o radical DPPH, sendo realizado também o teste do poder redutor do ELF e frações. A atividade anti-inflamatória foi avaliada no modelo de edema de pata e tecido granulomatoso comparando os resultados com os grupos controle. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi testada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella typhi* (ATCC 14028); *Proteus mirabilis* (ATCC 25933); *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), utilizando a técnica de difusão em Agar. A caracterização dos constituintes químicos foi obtida através de HPLC-DAD e a determinação quantitativa dos principais metabólitos através de reações colorimétricas de folin-ciocalteau para fenóis totais, reação com $AlCl_3$ para flavonóides e precipitação de proteínas para taninos. O ELF de *Byrsonima intermedia*, frações e calos apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, constituído por catequinas e flavonóides. As amostras apresentaram atividade antioxidante, que pode ter relação direta com a presença destes compostos, tanto para os extratos, como para as frações acetato de etila, butanólica, e aquosa que promoveram uma redução do edema das patas dos ratos nos grupos tratados, em relação aos grupos controles. Observou-se também uma redução considerável na formação do tecido granulomatoso, e atividade antimicrobiana. Os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae* mostraram-se sensíveis. O extrato de folhas de *Byrsonima intermedia* possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

Palavras-chave: 1. Antioxidantes. 2. Produtos de ação antimicrobiana. 3. Anti-inflamatórios. 4. Extratos Vegetais.

ABSTRACT

Studies gone back to identification of plants with present healing properties in the Savannah they are still few, mainly when compared your great diversity and the area that they occupy *Byrsonima intermedia* A. Juss., it is a present bush in the Savannah Brazilian, belonging the family Malpighiaceae, very used by the place population as an antiseptic, antimicrobial, anti-hemorrhagic, healing and anti-inflammatory, febrifuge and astringent in diarrhea and dysentery. However they are plants that don't present enough studies so that they can be used in a rational way. Your popular use feels through the peels of the stem, what takes to the extraction. One of the problems that have been limiting the wide use of this species is the production of seedlings, because your seeds present tegument dormancy. The objective of the study was to characterize biological and chemically the extract lyophilized of the leaves (ELF), as well as to evaluate the produced calluses of the explants chemically foliate. The activity antioxidant *in vitro*, it was verified by the capacity to kidnap the radical DPPH, being also accomplished the test of the power reducer of ELF and fractions. The activity anti-inflammatory was evaluated in the model of paw edema and woven granulomatous tissue comparing the results with the group's control. The activity antimicrobial *in vitro* was tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella tiphy* (ATCC 14028); *Proteus mirabilis* (ATCC 25933); *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), using the diffusion technique in Agar. The chemical representatives' characterization was obtained through HPLC-DAD and the quantitative determination of the principal metabolites through s folin-ciocalteau colorimetric reactions for total phenols, reaction with FeCl₃ for flavonoids and precipitation of proteins for tannins. ELF of *Byrsonima intermedia*, fractions and calluses presented the same profile chromatographic, constituted by catechins and flavonoids. The samples presented antioxidant activity, that can have direct relationship with the presence of these composed, so much for the extracts, as for the fractions etily acetate, butanolic, and aqueous that they promoted a reduction of the edema of the paws of the mice in the treated groups, in relation to the group's controls. It was also observed a considerable reduction in the formation in the formation of the granulomatous tissue, and activity antimicrobial. The microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and *Sacharomyces cerevisiae* were shown sensitive. The extract of leaves of *Byrsonima intermedia* possesses properties antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial.

Keywords: 1. Antioxidant. 2. Antimicrobial products 3. Anti-inflammatory. 4. Vegetable extracts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas de compostos fenólicos isolados de <i>Byrsonima intermedia</i> A. juss. Adaptado de Sannomyia et al (2004).....	23
Figura 2 -	<i>Byrsonima intermedia</i> e calos produzidos de explantes foliares da espécie.....	38
Figura 3 -	Fluxograma de obtenção do ELF de <i>Byrsonima</i> e frações acetato de etila, butanólica e aquosa.....	40
Figura 4 -	Esquema dos ensaios farmacológicos a partir de diferentes amostras de <i>Byrsonima intermedia</i>	47
Figura 5 -	Cromatografia em camada delgada comparativa do extrato bruto e calos liofilizados de <i>Byrsonima intermedia</i> . Amostra 1 - ELF; Amostras de 2 a 17 – calos liofilizados (seqüência – ver tabela 6, pag 67, exceção calos amarelo esbranquiçado); 18- padrão catequina, 19- padrão ácido tânico.....	66
Figura 6 -	Cromatografia em camada delgada comparativa - revelador NP/PEG - Padrões: 1-rutina, 2-catequina, 3-quercetina - Amostras: 1-fração aquosa 2- fração butanólica 3- fração acetato de etila 4- extrato liofilizado das folhas - eluente terciário: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (43:37:20).....	67
Figura 7 -	Cromatografia em camada delgada comparativa - Revelador: Anisaldeído - Padrões: 1-rutina, 2-catequina, 3-quercetina - Amostras: 1-fração aquosa 2- fração butanólica 3- fração acetato de etila 4- extrato liofilizado das folhas - eluente terciário: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (43:37:20).....	68
Figura 8 -	Cromatografia em camada delgada comparativa – Revelador: Cloreto férrico 1,0% - Padrões: 1-rutina, 2-catequina, 3-quercetina - Amostras: 1-fração aquosa 2- fração butanólica 3- fração acetato de etila 4- extrato liofilizado das folhas - eluente terciário: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (43:37:20).....	69
Figura 9 -	Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes no extrato liofilizado das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> . Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2ml.min ⁻¹ , λ =270nm (para condições de eluição ver tabela 1 pag 46).....	72
Figura 10 -	Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> . Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-	73

M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 ml.min⁻¹ λ =270 nm (para condições de eluição ver tabela 1 pág. 46)

-
- Figura 11 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração butanólica obtida das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 ml. min⁻¹ λ =270 nm (para condições de eluição ver tabela 1 pág. 46)..... 74
- Figura 12 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração aquosa obtida das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 ml. min⁻¹ λ =270 nm (para condições de eluição ver tabela 1 pág. 46)..... 75
- Figura 13 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes nos calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 ml. min⁻¹ λ =270nm (para condições de eluição ver tabela 1 pág 46)..... 76
- Figura 14 - Identificação de amido através do teste do iodo - Lugol..... 77
- Figura 15 Identificação de amido através do teste do iodo – Lugol: 1- padrão positivo: amido da batata 2 - amostra de calos sem aquecimento; 3- amostra de calos após aquecimento; 4- padrão negativo: água..... 78
- Figura 16 - Esquema explicativo de como a inserção do halogênio iodo no interior da estrutura helicoidal da molécula de amilose confere ao conjunto uma coloração azul..... 80
- Figura 17 - Cromatografia em Camada Delgada. (A) 1 - Extrato liofilizado da folha; 2 - Fração aquosa; 3- Fração butanólica; 4 - Fração Acetato de etila; 5 - Ácido ascórbico; 6 - Ácido gálico; 7 - Acido tânico; 8 - Rutina. (B) 1- 1^o subcultivo calo marron; 2- 1^o subcultivo calo amarelo; 3- 2^o subcultivo calo marron; 4- 3^o subcultivo calo marron..... 81

Figura 18 -	Capacidade sequestrante de DPPH, em diferentes concentrações no extrato liofilizado das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> , frações e o padrão ácido ascórbico.....	82
Figura 19 -	Poder redutor do extrato liofilizado das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> e suas frações.....	87
Figura 20 -	Atividade anti-inflamatória do extrato bruto liofilizado (ELF) das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle	88
Figura 21 -	Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (FAE) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle	89
Figura 22 -	Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica obtida das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (FBu) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle.....	89
Figura 23 -	Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração aquosa(FAq) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. *p <0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle	90
Figura 24 -	Efeito do ELF de <i>Byrsonima intermedia</i> na formação de granuloma em animais tratados com 30, 100 e 300 mg de extrato liofilizado, com dexametasona ou CMC (1%). **p<0.01 e ***p<0,001em relação ao controle.....	91
Figura 25 -	Efeito da Fração acetato de etila obtido das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). **p<0.01e *** p<0,001em relação ao controle.....	92
Figura 26 -	Efeito da Fração butanólica obtida das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). **p<0.01e *** p<0,001em relação ao controle.....	92
Figura 27 -	Efeito da Fração aquosa obtida das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). **p<0.01e *** p<0,001em relação ao controle.....	93
Figura 28 -	Avaliação da atividade antimicrobiana do ELF e frações de <i>Byrsonima intermedia</i> A. juss contra <i>Staphilococcus aureus</i> e <i>Micrococcus luteus</i> . Halos de inibição de crescimento.....	96
Figura 29 -	Ilustração do método de microdiluição com caldo Mueller Hinton em placa contendo 96 poços, para teste de CIM. 1- ELF; 2- FAE; 3- Fbu; 4- FAq ; 5- controles.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Gradiente binário utilizado nas análises de HPLC-DAD.....	46
Tabela 2-	Rendimentos do extrato bruto liofilizado e das frações da partição	56
Tabela 3-	Resultados da análise fitoquímica preliminar para taninos e flavonóides do ELF e das frações	57
Tabela 4-	Resultados da triagem fitoquímica para taninos e flavonóides presentes nos calos.....	59
Tabela 5-	Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais no extrato aquoso liofilizado das folhas e frações acetato de etila, butanólica e aquosa de <i>Byrsonima intermedia</i>	60
Tabela 6-	Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais dos diversos subcultivos de calos.	62
Tabela 7-	Intervalos com 95% de confiança para o teor médio de metabólitos secundário presentes em calos.....	63
Tabela 8-	Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração acetato de etila.....	75
Tabela 9-	Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração butanólica.....	76
Tabela 10	Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração aquosa.....	77
Tabela 11	Tempo de retenção e área dos picos eluídos nos calos.....	78
Tabela 12	Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais e IC ₅₀ no extrato liofilizado das folhas e frações acetato de etila, butanólica e aquosa de <i>Byrsonima intermedia</i>	83
Tabela 13	Capacidade sequestrante média de radicais DPPH e desvio padrão das amostras obtido das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> e ácido ascórbico utilizado como padrão.....	85
Tabela 14	Média e desvio padrão do poder redutor do extrato e frações obtidas das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	86
Tabela 15	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de folhas e frações de <i>Byrsonima intermedia</i> pela técnica de difusão em Agar (Halos de inibição em mm).....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	97
Quadro 2-	Avaliação da atividade antimicrobiana da fração acetato de etila obtida de folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	98
Quadro 3-	Avaliação da atividade antimicrobiana da fração butanólica obtida de folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	98
Quadro 4-	Avaliação da atividade antimicrobiana da fração aquosa obtida de folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American type culture collection
BHI	Infuso cérebro e coração
BSA	Albumina soro bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMC	Carboximetilcelulose
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DPPH	1,1-difenil, 2-picrihidrazila
ETOH	Etanol
ELF	Extrato liofilizado de folhas
FAE	Fração acetato de etila
FBu	Fração butanólica
FAq	Fração aquosa
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta performance com arranjo diodo
mg	Miligrama
ppm	Partes por milhão
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	GÊNERO <i>Byrsonima</i> (MALPHIGHIACEAE)	20
3.2	DESCRIÇÃO BOTÂNICA E PROPRIEDADES MEDICINAIS.....	20
3.3	ASPECTOS QUÍMICOS de <i>Byrsonima intermedia</i>	22
3.4	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS de <i>Byrsonima intermedia</i>	24
3.5	CULTURA DE TECIDOS.....	25
3.5.1	Calogênese na cultura de tecidos	26
3.5.2	Indução de calos em explantes foliares de <i>Byrsonima intermedia</i>	26
3.6	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS.....	27
3.6.1	Atividade antioxidante	28
3.6.1.1	Radicais livres e estresse oxidativo.....	28
3.6.1.2	Antioxidantes.....	29
3.6.2	Atividade anti-inflamatória	32
3.6.2.1	Inflamação e resposta inflamatória.....	32
3.6.3	Atividade antimicrobiana	35
3.6.3.1	Antimicrobianos e resistência antimicrobiana.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAL ESTUDADO.....	38
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS.....	38
4.2.1	Coleta e identificação	38
4.2.2	Obtenção do Extrato liofilizado da folha e suas frações.....	39
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CALOS	40
4.4	ESTUDO QUÍMICO.....	41
4.4.1	Triagem Fitoquímica.....	41
4.4.2	Determinação de teor de compostos fenólicos em calos, folhas, extratos liofilizados e frações	42
4.4.2.1	Extratos liofilizados e frações	42

4.4.2.2	Calos liofilizados.....	43
4.4.3	Determinação de Flavonóides totais de Calos, de extratos liofilizados e de suas frações	43
4.4.4	Determinação do teor de taninos totais	44
4.4.41	Preparo das amostras	44
4.4.5	Caracterização dos constituintes químicos de calos, de extrato liofilizado e de frações das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i>	44
4.4.5.1	Cromatografia em camada fina (CCD)	44
4.4.5.2	Análises por cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo diodo - HPLC-DAD	45
4.4.6	Determinação do amido nos calos liofilizados	46
4.5	ESTUDO BIOLÓGICO	47
4.5.1	Avaliação da atividade antioxidante	48
4.5.1.1	Análise qualitativa da atividade antioxidante	48
4.5.1.2	Avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH.....	48
4.5.1.3	Avaliação do poder redutor dos constituintes químicos	49
4.5.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória	50
4.5.2.1	Sistema teste <i>in vivo</i>	50
4.5.2.2	Edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina	50
4.5.2.3	Teste do granuloma	51
4.5.2.4	Implante dos pellets de algodão.....	52
4.5.2.5	Tratamento dos animais	52
4.5.2.6	Extração do granuloma	53
4.5.3	Análise estatística	53
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
4.6.1	Microorganismos utilizados nos ensaios	54
4.6.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	56
5.2	TRIAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS, FRAÇÕES E CALOS LIOFILIZADOS	57
5.3	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E TANINOS.....	60

5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS.....	66
5.4.1	Análise dos flavonóides presentes no extrato liofilizado das folhas e frações de <i>Byrsonima intermedia</i> por CCD	66
5.4.2	Perfil cromatográfico dos constituintes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	71
5.5	ANÁLISE DE AMIDO NOS CALOS.....	78
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	80
5.6.1	Avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH.....	81
5.6.2	Avaliação do poder redutor dos constituintes químicos	86
5.7	ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA.....	88
5.7.1	Atividade antiedematogênia	88
5.7.2	Crescimento de tecido granulomatoso induzido por implante subcutâneo de pellets de algodão em ratos	91
5.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	95
6	CONCLUSÃO	101
7	PERSPECTIVAS	102
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

A planta é um laboratório químico único: a célula vegetal, utilizando substâncias químicas simples e fontes de energias naturais, consegue sintetizar substâncias complexas e fundamentais para a vida do homem. Além das substâncias alimentares como açúcar, gorduras, proteínas, vitaminas, as células produzem os metabólitos secundários, chamados princípios ativos, dotados de propriedades terapêuticas.

O emprego das plantas no tratamento das doenças começou de maneira empírica, muitas vezes baseado na forma das folhas, dos frutos, por configurarem partes do corpo humano doente, mas, o uso popular foi selecionando as plantas de maior interesse, e como resultado desse uso, passou de uma geração à outra, pela transmissão oral e, depois descrições deixadas por todas as civilizações que nos precederam (DI STASI, 1996).

Por muito tempo a terapêutica vegetal esteve sob o domínio do povo comum, especialmente do homem do campo. Porém, o acesso a medicamentos sintéticos e o pouco cuidado com a comprovação das propriedades farmacológicas das plantas, tornou o conhecimento da flora medicinal sinônimo de atraso tecnológico.

No final de século XIX e meados do século XX, o estudo das plantas medicinais mostrou uma resistência inicial de acompanhar as grandes revoluções científicas. Os médicos tratavam a botânica farmacêutica como curanderismo ou charlatarismo, porém graças ao progresso das investigações científicas, a medicina vegetal se enquadra dentro da Fitoterapia, cada vez mais apoiada nos aspectos da qualidade, da eficácia e da segurança.

As dificuldades de se identificar corretamente um material botânico e a falta de estudos sobre a segurança e a eficácia de grande parte das plantas medicinais, impedem a prática da fitoterapia segura.

Grandes esforços têm ocorrido, para se estabelecer a eficácia e a qualidade das plantas medicinais, tentando determinar os efeitos tóxicos e adversos que as plantas e produtos vegetais possam ter. O estudo químico, farmacológico, toxicológico e clínico das plantas se faz necessário para referenciá-las quanto a sua eficácia e as possíveis contra-indicações ou efeitos adversos. Destaca-se nestes últimos anos, um aumento do número de ensaios farmacológicos e clínicos que os

medicamentos à base de plantas medicinais têm tido, o que demonstra o interesse crescente deste tipo de terapêutica.

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) é um arbusto do Cerrado, pertencente à família Malpighiaceae, que apresenta ocorrência no Estado de Minas Gerais, e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Várias espécies do gênero *Byrsonima* têm sido utilizadas na medicina popular, com destaque para *Byrsonima intermedia*, porém são plantas que não apresentam os estudos suficientes para que possam ser empregadas de maneira racional. Estudos que forneçam parâmetros de qualidade, eficácia e segurança, bem como os ensaios químicos, biológicos ou farmacológicos, são fundamentais para que cientificamente esta planta seja validada como fitoterápico.

Verifica-se que estudos voltados para validação de plantas medicinais do Cerrado ainda são poucos, principalmente quando comparadas a sua grande diversidade e a área por ele ocupada. Há relatos que cerca de 40% deste bioma já foi devastado e, atualmente, é uma vegetação em maior risco de extinção no Brasil. É preciso considerar que os recursos naturais que ele oferece, uma vez extintos, não estarão disponíveis às gerações futuras. Porém, uma vez manejado de forma correta, ele pode contribuir para população local, além de oferecer insumos para a indústria farmacêutica (NICIOLI, 2006).

O uso popular de murici-pequeno se dá através do chá das cascas do caule, o que leva ao extrativismo e conseqüentemente morte da planta. Um dos problemas que têm limitado a ampla utilização dessa espécie é a produção de mudas, pois suas sementes apresentam baixo índice de germinação, devido à dormência tegumentar (PINTO e BERTOLUCCI, 2002; MONTEIRO, ALBUQUERQUE e ARAÚJO, 2005).

Sendo assim, a técnica do cultivo *in vitro* representa uma importante alternativa para a produção de mudas e a conservação desse recurso genético, com destaque para a micropropagação, que permite obter as plantas com características genéticas idênticas, em larga escala e em curto espaço de tempo.

Os problemas relacionados com a utilização de metabólitos secundários de origem vegetal podem ser resolvidos com as técnicas biotecnológicas. Estas técnicas aumentam e direcionam a produção de metabólitos secundários específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar biológica e quimicamente o extrato de folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss., contribuindo para obtenção de matéria-prima vegetal padronizada e com o uso racional do insumo fitoterápico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar fitoquimicamente os extratos, frações e os calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermédia*;
- Caracterizar os constituintes químicos através de HPLC-DAD;
- Avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória; antimicrobiana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE)

A literatura cita cerca de 6.253 espécies nativas de plantas incluídas em 150-160 famílias na região do cerrado (MENDONÇA et al., 1998). A família Malpighiaceae é uma das maiores famílias em angiospermas (ANDERSON, 1979), e uma das dez mais bem representadas no cerrado, bioma em que há grande carência de estudos. Elas têm sido empregadas popularmente nesta região para tratamento de diversas doenças (ALMEIDA et al.; 1998).

Segundo Joly (1977), a família Malpighiaceae compreende aproximadamente 60 gêneros e 1200 espécies, sendo que 50% são encontradas no Brasil. Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima*, sendo o gênero *Byrsonima* composto de aproximadamente 150 espécies e encontrado principalmente a partir do México, difundindo em toda a América do Sul (AGUIAR et al.; 2005). Felício et al. (1995) descreve *Byrsonima* como sendo essencialmente americana, encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul.

Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no nordeste brasileiro e no Cerrado mineiro, sendo algumas delas intensamente consumidas na forma de sucos, de licores, de geléias e de doces (CACERES et al.; 1993).

3.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E PROPRIEDADES MEDICINAIS de *Byrsonima intermedia*

Byrsonima intermedia são plantas com características típicas das plantas do cerrado. É um arbusto no máximo 1,60 m de altura (OLIVEIRA et al.; 2007). A copa é desuniforme por causa dos galhos que quebram com facilidade, o caule é castanho a acizentado. Possui tronco cilíndrico e quando velho possui fissuras quadriculadas com casca escura (JOLY, 1977). Suas folhas são simples, coriáceas, glabras na face superior e pubescentes na face inferior, com ápice ou ponta

lanceolada (FERRI, 1969).

As flores são bem vistosas, amarelas, mas quando velhas são alaranjadas, cíclicas, formando cachos de 10 a 15 cm, em número de 15 a 35 flores dispostas em pequenos racemos. (JOLY, 1977). A época de florescimento é de outubro a dezembro (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). As flores de *B. intermedia* possuem diversas características que permitem classificá-las como flores contendo óleo, com cinco sépalas dotadas de elaióforos na superfície abaxial, zigomorfia, estames e estiletos voltados para o centro da flor, conservando assim aspectos gerais para a família, como atração e orientação (ANDERSON, 1990).

Segundo Oliveira et al. (2007), as flores são unguiculadas, hermafroditas, zigomorfas, pentâmeras, diurnas e sem odor perceptível. O cálice é amarelado e gamossépalo, cada uma de suas sépalas possui um par de glândulas produtoras de óleo (elaióforos). A corola é dialipétala, apresentando cinco pétalas amarelas e alternadas as sépalas, sendo a superior diferente das demais. O androceu é diplostêmone, constituído por anteras bitecas, basifixas e rimosas que apresentam pólen esbranquiçado e pulverulento, com 89,16% de viabilidade. O gineceu é composto por ovário súpero, tricarpelar, trilocular, com um óvulo por lóculo de placentação apical; possui três estiletos longos (média = 2,2 mm) e terminais, livres entre si e persistentes no fruto.

O fruto apresenta dimensões de 7,70 -11,00 × 7,77- 10,78cm, com massa da matéria fresca de 0,29 - 0,71g (SOUTO E OLIVEIRA, 2005). São frutos adocicados e suculentos que atraem aves. Segundo a classificação de Barroso et al. (1999), os frutos de *B. intermedia* são considerados do tipo drupóide, carnosos com pirênio lenhoso formando três lóculos. Em relação ao número de sementes, são encontrados frutos sem semente madura, com uma, duas ou três sementes, sendo esta última a condição mais freqüente (SOUTO e OLIVEIRA, 2005).

Segundo Lorenzi e Matos (2002), *Byrsonima intermedia* assim como outras espécies como *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbascifolia* apresentam baixa taxa de germinação, a emergência lenta das plântulas e dormência tegumentar das sementes. Porém são plantas de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em solos arenoargilosos, com clima quente e boa ventilação (PIMENTEL GOMES, 2005).

As plantas do gênero *Byrsonima* apresentam várias propriedades medicinais. As folhas são aplicadas contra febre, úlceras, diurético, antiasmático e nas infecções de pele (SILVA, 1969; AGUIAR; DAVID, J. P.; DAVID, J. M., 2005). De um modo

geral, a espécie *Byrsonima intermedia*, possui um perfil botânico bastante semelhante à *Byrsonima crassa*. Baseando-se em estudos etnofarmacológicos, as folhas e o tronco de *Byrsonima* são utilizados popularmente para diarreias, disfunções gástricas e úlceras (SANNOMIYA et al., 2004).

Byrsonima intermedia está sendo utilizada pela população local como, anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, cicatrizante e anti-inflamatória (PINTO; BERTOLUCCI, 2002; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005), além de ser utilizada como febrífugo e adstringente nas diarreias e desinterias na forma de infusão (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

3.3 ASPECTOS QUÍMICOS DE *Byrsonima intermedia*

São poucos os estudos químicos relatados da espécie *Byrsonima intermedia*. Constata-se, no entanto, a presença de taninos, flavonóides e triterpenos com propriedades terapêuticas. Estudos fitoquímicos realizados por Sannomyia et al. (2004) com *Byrsonima intermedia* revelou a presença de catequinas, derivados de quercetina, ácido gálico, galato de metila e outros compostos isolados. A figura 1 mostra a estrutura dos compostos fenólicos isolados do extrato metanólico de *Byrsonima intermedia*, por este grupo de pesquisadores.

Bonzani da Silva (1970a e 1970b) descreveu o isolamento de ácido gálico, pirogálico, pirocatequinas e beta-amirina em raízes de *Byrsonima intermedia*.

Felício et al. (1995), realizando análises com o extrato bruto das folhas secas desta espécie, identificaram a presença de lupeol e de beta amirina. Também foi encontrado no extrato metanólico, catequinas, taninos, derivados do ácido gálico e flavonóides (MICHELINI et al.; 2008).

Reis et al. (2007) evidenciaram a composição química do óleo floral de *Byrsonima intermedia*. Este óleo floral é rico em ácidos graxos livres e o principal constituinte identificado foi o ácido birsônico.

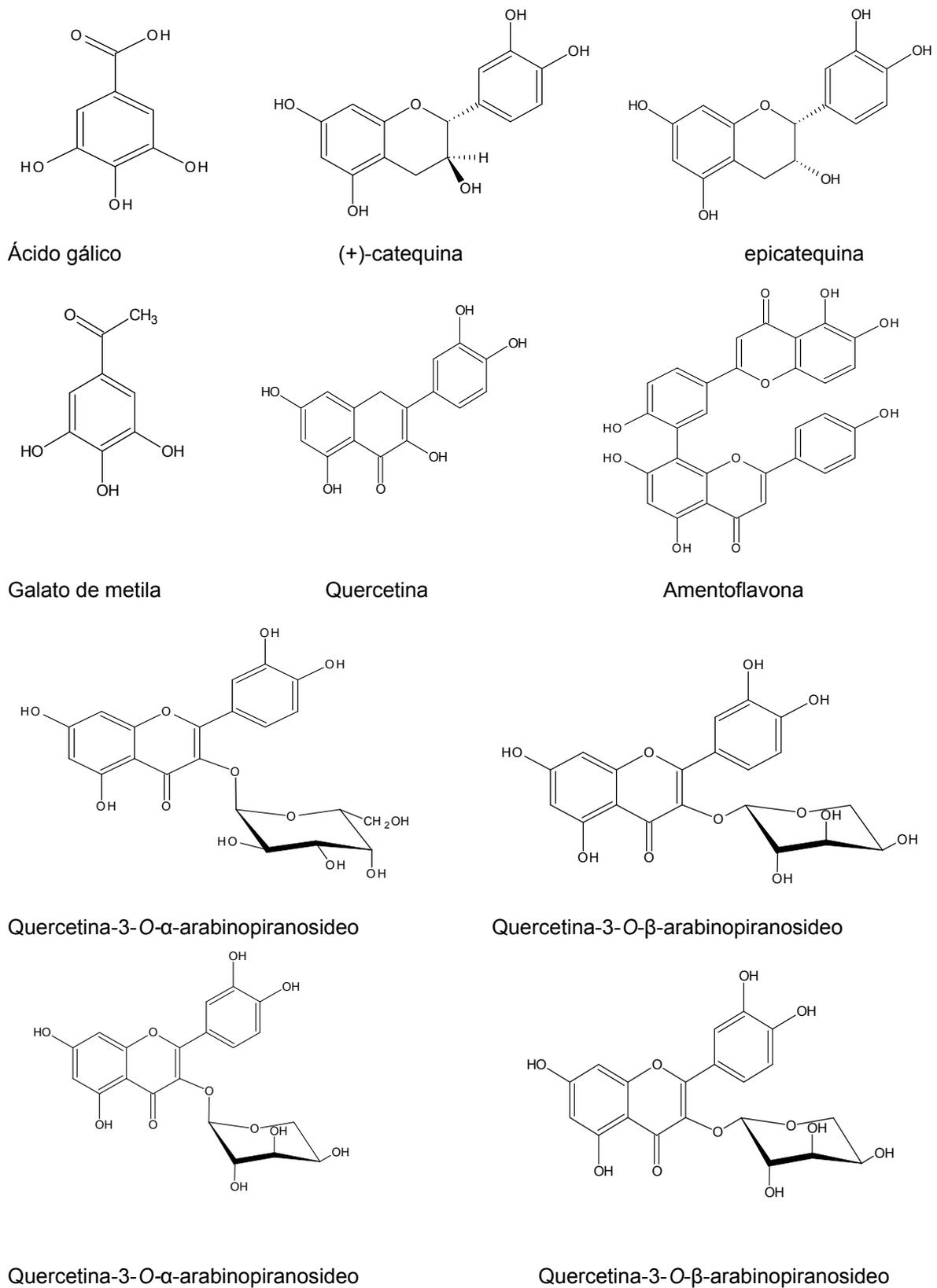


Figura 1 - Estruturas de compostos fenólicos isolados de *Byrsonima intermedia* A. juss. Adaptado de Sannomyia et al. (2004)

Poucas espécies do gênero *Byrsonima* foram estudadas quimicamente, os derivados flavonoidicos e triterpenicos são mais frequentemente encontrados.

3.4. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS *Byrsonima intermedia*

Pouco se conhece a respeito da atividade farmacológica da espécie *Byrsonima intermedia*.

Michelini et al. (2008) estudou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de folhas de *B. intermedia* usando o método de difusão em disco. Os resultados mostraram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. O extrato metanólico bruto das cascas, folhas e flores foram avaliados quanto sua atividade anti-inflamatória por Carvalho, 2010. Foi observado que na concentração de 10 µg mL⁻¹ eles apresentaram atividade anti-inflamatória nas larvas de zibrafish com lesão na nadadeira caudal. (CARVALHO, 2010).

Foi avaliada a ação antiulcerogênica do extrato metanólico obtido das folhas de *Byrsonima intermedia* em modelos experimentais *in vivo*. Resultados apresentaram significativo efeito gastroprotetor (SANTOS et al. 2006). Os mesmos autores avaliaram a atividade analgésica e antiulcerogênica do extrato clorofórmico das folhas desta espécie em modelos experimentais em camundongos. O extrato clorofórmico inibiu significativamente as contorções abdominais em relação ao controle negativo. O aumento das lesões gástricas induzidas pelo extrato clorofórmico, indicou que seus constituintes potencializam o efeito lesivo do piroxicam. Esta hipótese foi comprovada no modelo de contorções abdominais por ácido acético, onde se verificou a presença de um efeito antinociceptivo no extrato clorofórmico de *Byrsonima intermedia* (SANTOS et al. 2006).

Foi avaliado o efeito cicatrizante da partição acetato de etila obtido a partir das folhas de *Byrsonima intermedia*. Concluiu-se que a espécie apresenta intensa proliferação celular que contribuiu para regeneração da mucosa e submucosa lesada, indicando potencial cicatrizante (SANTOS et al. 2007).

Sannomiya et al. (2007) observou sinais de atividade mutagênica em

Byrsonima intermedia nos ensaios com a *Salmonella*, o qual foi relacionado com a presença do biflavonol amentoflavona e quercetina.

O extrato metanólico das folhas foi avaliado quanto ao efeito tóxico, comparado através de efeitos comportamentais (ambulação, sedação) e de toxicidade (morte, peso, entre outros). O extrato metanólico das folhas não apresentou efeito tóxico agudo aparente com administração de uma dose máxima de 5000 mg kg⁻¹ o que certamente evidenciaria qualquer efeito tóxico existente no extrato (SANTOS et al. 2006)

Foi realizada a comparação da ação antiúlcera e atividade gastroprotetora em duas partições do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia*. Resultados mostraram que a fração aquosa e fração acetato de etila reduzem a lesão ulcerativa e tem ação gastroprotetora, além de ter mostrado ação efetiva em doença gástrica crônica, porém as partições apresentaram gastroproteção, de maneiras diferentes, a fração aquosa concentrou maior parte dos constituintes ativos, de modo a apresentar, portanto maior gastroproteção de modos diferentes e em doses inferiores à fração acetato (SANTOS et al., 2009).

3.5 CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos é definida como o cultivo *in vitro* ou, um cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explante) constituída por fragmentos de tecidos, de órgãos ou mesmo de células, em suspensão, introduzidos em meio de cultura sintéticos contendo os nutrientes reguladores de crescimento, sob as condições controladas de temperatura, de umidade e de luminosidade, para gerar uma nova planta. Esta técnica é baseada principalmente na capacidade da célula vegetal dar origem a novas células, conseqüentemente indivíduos, exatamente iguais à célula mãe, uma vez que ela contém todas as informações genéticas no núcleo da mesma. Esta propriedade é chamada de totipotencialidade (PINTO; LAMEIRA, 2001).

A produção de plantas *in vitro* pode ocorrer por organogênese direta ou indireta. Na primeira, tem-se a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias; enquanto que, na segunda, passa-se obrigatoriamente pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ambas as circunstâncias podem

ser de interesse ao cultivo *in vitro*.

3.5.1 Calogênese no cultivo *in vitro*

A calogênese é proveniente de células originadas por sucessivas mitoses, como resposta a estímulos do balanço entre reguladores de crescimento e outros fatores do meio de cultura e ambiente. Calo é definido como sistema obtido *in vitro* caracterizado por um arranjo de células. O calo não é um órgão com tecidos executando funções específicas, mas, sim, um sistema com gradientes nutricionais e de reguladores de crescimento que estão orientados acropetamente (TERMIGNONI, 2005).

Em determinadas condições, centros meristemáticos do tecido calogênico podem diferenciar-se originando raízes, brotos ou embriões somáticos. Este cultivo, capaz de ser realizado tanto em meio de cultura líquido quanto sólido, pode objetivar estudos em diversos campos, como a citologia e a bioquímica (NEUMANN et al., 2009).

Os calos podem ser obtidos a partir de diversos órgãos, dentre eles, merece atenção o uso de explantes foliares. Diversos trabalhos buscam a formação de calos em explantes foliares de espécies florestais como: *Blighia sapida* (WEBSTER et al.; 2006), *Paulowia tomentosa* (CORREDOIRA et al.; 2008), *Salyx humboldtiana* (SANTOS et al.; 2005); *Litchi chinensis* (MA et al.; 2009), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (NICIOLI, 2006); *Byrsonima intermedia* (NOGUEIRA et al. 2003).

3.5.2 Indução de calos em explantes foliares de *Byrsonima intermedia*

O projeto de pesquisa envolvendo os aspectos da propagação *in vitro* de *Byrsonima intermedia* teve início em 2003, onde os pesquisadores estudaram os aspectos da germinação *in vitro* da espécie mediante avaliação do efeito de diferentes meios de cultura (MS e WPM) e diferentes concentrações de BAP. Frutos

maduros foram coletados de populações naturais, dos quais sementes e embriões foram excisados e utilizados como explante. Pelos resultados, inferiu-se que os meios de cultura mais eficientes para a germinação *in vitro* de sementes e embriões foram o MS e WPM 50%, sem sacarose, apresentando 60% e 100% de germinação, respectivamente. Observou-se também que não se faz necessária à adição de BAP na germinação *in vitro* de embriões (NOGUEIRA et al.; 2003).

Posteriormente obtiveram-se calos friáveis em explantes foliares de murici-pequeno para estudos futuros em suspensão celular e metabolismo secundário, assim como embriogênese somática e avaliou-se o efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D e a sua interação com as citocininas TDZ e BAP na calogênese. Os resultados demonstraram que na ausência de 2,4-D não ocorre formação de calo em explantes foliares. A adição de BAP ou TDZ não influencia o processo de calogênese. Para a indução e proliferação de calo em explantes foliares de murici-pequeno, os resultados recomendaram o uso de meio MS, acrescido de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, mantendo os explantes em condição de escuro por 30 dias (NOGUEIRA et al.; 2007).

Em 2008, o estudo voltou-se para a obtenção da Curva de Crescimento e análises fioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), por meio da determinação dos teores de aminoácidos, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e taninos. A curva de crescimento apresentou padrão sigmóide, com seis fases distintas de crescimento. Teores máximos de aminoácidos e açúcares solúveis totais nos calos foram obtidos no dia da inoculação e aos 60 e 70 dias de cultivo, respectivamente. Teores máximos de açúcares redutores foram verificados no dia da inoculação.

3.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS

Plantas bioativas são aquelas que possuem alguma ação sobre outros seres vivos e cujo efeito pode se manifestar tanto pela sua presença em um ambiente quanto pelo uso direto de substâncias delas extraídas, desde que mediante uma intenção ou consciência humana deste efeito. Dentro deste conceito, enquadram-se

as plantas medicinais, aromáticas, condimentares, inseticidas, repelentes, tóxicas, entre outras. Nos últimos anos, os estudos da atividade biológica de plantas têm despertado grande interesse, principalmente devido seu aproveitamento na Agroecologia e, de uma forma mais recente, devido à criação da Política Nacional da Plantas Medicinas e Fitoterápicos (EMATER, 2008).

3.6.1 Atividade antioxidante

3.6.1.1. Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas ou ainda os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida muito curta e quimicamente reativa. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Os radicais livres são produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como os mediadores para transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando as funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de radicais (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Segundo Santos e Cruz (2001), os radicais livres são produzidos por modificações químicas de proteínas, de lipídeos, de carboidratos e de DNA, resultando em uma variedade de consequências biológicas, incluindo a lesão tecidual, a mutação, a carcinogênese, o comprometimento do sistema imunológico, doenças e morte celular. As lesões causadas nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes. Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Quando há uma diminuição nas defesas antioxidantes ocorre o aumento na

formação de radicais livres o que caracteriza o estresse oxidativo. Essas reações deletérias que ocorrem no organismo, devido o efeito tóxico dos radicais introduzidos no interior das células iniciam quando há um desequilíbrio entre a atividade pró-oxidante/antioxidante. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares, o câncer e as doenças neurodegenerativas (MENDEL; YOUDIM, 2004; LIAO et al., 2001; JAVANMARDI et al., 2002; KIM et al., 2003; LU;YEAP; FOO, 2002).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

3.6.1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela a inibição e a redução dos radicais livres e como conseqüência reduz as lesões causadas nas células (BIANCHI; ANTUNES, 1999). São as substâncias que, mesmo presente em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (SANTOS; CRUZ, 2001).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Birch et al. (2001) relata que matérias-primas *in natura* disponíveis em frutas, vegetais e condimentos contêm substâncias com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos, os carotenóides, o ácido ascórbico, e os tocoferóis. Esses compostos apresentam uma significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos.

O interesse em encontrar antioxidantes naturais para o uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm surgido restrição ao uso, devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos males como o aumento do

peso do fígado e a significativa proliferação do retículo endoplasmático (MELO; GUERRA, 2002).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais ativos presentes nos vegetais. Entre eles destacam-se os flavonóides, cujas propriedades benéficas podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres. Esses compostos, de considerável importância na dieta, podem inibir o processo de peroxidação lipídica (HARTMAN; SHANKEL, 1990; HALLIWELL et al., 1995).

Decker (1997) menciona que os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições, como por exemplo, quando reagir com os íons ferro e formar radical hidroxila, que é a espécie radicalar mais reativa que existe.

Muitas das ações biológicas dos flavonóides podem ser atribuídas às suas propriedades antioxidantes, quer através das suas capacidades redutoras, quer através da influência que exercem no estado redox do meio intracelular (WILLIAMS et al., 2004).

As capacidades antioxidantes dos flavonóides aplicam-se, sobretudo, nas espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion peróxido lipídico e hidroperóxido, embora estas também desempenhem uma função preventiva na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Deste modo, anulam os efeitos negativos destas moléculas sobre as células (MARTINEZ-FLORES, 2002).

Existe na literatura muita controvérsia sobre o mecanismo de ação dos flavonóides. Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ARORA; MURALEEDHARAN; STRASBURG, 1998). Os flavonóides mais investigados são a quercetina, a miricetina, a rutina e a naringenina (HARTMAN; SHANKEL, 1990). A quercetina está presente nas frutas e vegetais, sendo o flavonóide mais abundante encontrado no vinho tinto. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante (GASPAR et al., 1993).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. Eles impedem a formação de radicais livres, principalmente pela inibição das

reações em cadeia com o ferro e o cobre, além de serem capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Um outro mecanismo de proteção observado é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (SIES, 1993).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende do tipo de radicais livres formados, onde e como são gerados, a análise e os métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. É possível que um antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe na proteção ou mesmo que aumentem as lesões em outros sistemas ou tecidos (HALLIWELL, 1994).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos são encontradas muitas substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (JACOB, 1995; HERCEBERG et al., 1998).

3.6.2 Atividade anti-inflamatória

3.6.2.1 Inflamação e resposta inflamatória

Inflamação é uma resposta local e específica do organismo a uma invasão por determinado agente infeccioso, antígeno, ou ainda por dano físico, químico ou traumático. Este quadro necessita ser regulado de forma precisa, uma vez que uma resposta deficiente ou excessiva pode levar a morbidade e mortalidade (TRACEY, 2002).

A inflamação é uma reação primária frente à agressão tecidual, seja ela física

ou biológica. É mediada por diferentes mecanismos, e ocorre em três fases distintas, chamadas de fase aguda, de subaguda retardada e de crônica. Estas três fases são desejáveis e podem ser consideradas benignas dentro de padrões em que as atividades celulares e dos mediadores permanecem apropriadamente regulados e podem ser identificados por alterações locais notáveis por sinais e sintomas (SANTOS JÚNIOR, 2003).

Macroscopicamente, a área inflamada exibe características marcantes. A região atingida torna-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração da sua função. O resultado final do processo inflamatório pode ser a cura ou a inflamação crônica. Se a resposta não for suficiente, se o patógeno ou a substância nociva persistirem, o processo vai evoluir (LUENGO, 2005).

A reação inflamatória é um fenômeno estereotipado, cujos sinais rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius em 178 a.C. A esses, Galeno (XU et al., 1994) adicionou a perda de função. Atualmente, sabe-se que estes sinais são expressões na mesma seqüência, da vasodilatação e aumentada permeabilidade da microcirculação possibilitando maior oferta local de nutrientes e de oxigênio, de produção energética, de extravasamento de líquido para o interstício, provocando o intumescimento e o edema, irritação de terminais nervosos com provocação de dor, sendo conseqüências da liberação de mensageiros fisiológicos químicos encontrados no local da lesão, particularmente, as citocinas (SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985).

Luengo (2005) menciona que a resposta inflamatória inicial não é dependente do tipo da agressão. Os eventos que se seguem após essa reação inicial dependem de fatores associados ao agente agressor e ao próprio tecido agredido. Dessa forma, a inflamação pode mostrar uma variedade de quadros clínicos.

A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelas características da área inflamada. Dentre os mediadores da inflamação, encontram-se histamina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (COTRAN et al., 2000; ABBAS et al., 2008).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores da resposta vascular e celular desencadeadas pelo

estímulo inflamatório. Dentre elas, destacam-se as interleucinas (IL-1, IL-6, e IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator cólico estimulante (CSFs) e o fator estimulador de colônias de macrófago e granulócitos (GM-CSF) (SPRINGER, 1994; SPRINGER, 1995; CASSATELLA, 1995).

No decorrer de um processo inflamatório, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular ativados por quimiocinas e outros ativadores químicos da inflamação. A produção e expressão desses mediadores e conseqüente migração antigênicos como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, onde então os leucócitos passam a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida aderem firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso. Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (DEKKER e SEGAL, 2000).

Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenrolar do processo inflamatório: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do endotélio vascular e (3) migração em direção ao estímulo quimiotático (VON ANDRIAN; MACKAY, 2000; DEKKER; SEGAL, 2000).

Recentes estudos têm demonstrado que os mecanismos moleculares que resultam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (VON ADRIAN; MACHAY, 2000). Esses experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (BOKOCH, 1995; DECKER; SEGAL, 2000).

A resposta inflamatória envolve por sua vez, várias etapas com o objetivo maior de recrutar populações celulares distintas, capazes de eliminar o agente causal, com concomitante reparo do tecido lesado. Quando esse processo torna-se exacerbado, ultrapassando os seus efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais dessas etapas (VON ADRIAN e MACHAY, 2000).

As pesquisas recentes no campo de drogas anti-inflamatórias estão direcionadas a favor do desenvolvimento de substâncias potentes com melhor tolerância gastrointestinal e a redução de efeitos colaterais. Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional não só pela sua eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória, mas também pela facilidade de acesso e, principalmente, pelo seu baixo custo (DEKKER; SEGAL,

2000).

Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (RANG et al., 2007).

Segundo Rang et al. (2007) e Kim (2004), a ação anti-inflamatória dos glicocorticóides deve-se, em grande parte, à inibição da transcrição do gene da enzima ciclo-oxigenase-2 e à indução da proteína lipocortina, inibidora da enzima fosfolipase A₂. Além disso, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1.

Os AINEs são os agentes anti-inflamatórios mais utilizados na terapêutica. Atuam inibindo a enzima ciclo-oxigenase (COX), impedindo a formação de prostaglandinas, e de tromboxanos, mediadores do processo inflamatório (RANG et al., 2007). Observa-se que grande parte dos AINEs do mercado possuem efeitos indesejáveis significativos. Daí a necessidade por novos medicamentos anti-inflamatórios para contribuir com o avanço da pesquisa por novas moléculas, mais seguras, eficazes e com menos efeitos colaterais (COTRAN et al., 2000).

Os metabólitos secundários de plantas têm sido usados como fatores de interação com outros organismos, onde muito deles são de interesse biológico ou possuem atividades terapêuticas úteis ao homem (WINK, 1990).

Princípios ativos de estruturas químicas variadas foram isolados de plantas renomadas, apresentando várias atividades biológicas, dentre elas atividade anti-inflamatórias. Os triterpenos possuem atividade anti-inflamatória, uma vez que estes compostos possuem sistema de anéis similares aos encontrados nos esteróides, porém, destituídos de efeitos colaterais (GEETHA; VARALASKSHMI, 2001). Plantas ricas em taninos são empregadas tradicionalmente em processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996) assim como as saponinas (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2000).

Os flavonóides são compostos descritos por suas propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, incluindo provessos crônicos (VAN CAUWENBERGE; FRANCHIMONT, 1968; SANCHEZ de MEDINA et al.; 1996; BOHM et al.; 1998; MIDDLETON et al.; 2000; HAVSTEEN, 2002). Fujita et al. (1998) relatam que os flavonóides são excelentes inibidores de inflamação, pois exterminam radicais livres

e regulam a produção de eicosanóides. Há relatos de que os flavonóides são inibidores da enzima lipoxigenase ou cicloxigenase (KIM et al., 2004). Estas moléculas atuam tanto na inibição de algumas enzimas envolvidas na cascata do processo inflamatório, quanto na migração de leucócitos ao sítio de inflamação (RIEMERSMA et al. 2001). Podem inibir oxigenases e peroxidases, quelando metais Fe^{2+} e Cu^{2+} essenciais para a atividade das enzimas, servindo como substrato para enzima, evitando a oxidação de outras moléculas ou ainda por formar aductos com a enzima, causando alterações covalentes, inativando-as (KOSTYUK et al. 2004).

3.6.3 Atividade antimicrobiana

3.6.3.1 Antimicrobianos e resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre as bactérias inibindo o seu crescimento ou causando sua destruição (KATZUNG, 1998).

São utilizados para fins terapêuticos, visando o tratamento de processos infecciosos diagnosticados clinicamente e de preferência confirmados microbiologicamente, e para fins profiláticos, prevenindo as infecções bacterianas em situações clínicas nas quais já está clinicamente comprovada a sua eficácia (BRASIL, 1998).

A utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antimicrobianos e dos quimioterápicos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana aos fármacos (MONTELLI; SADATSUNET, 2001).

Os antibacterianos têm como alvo as bactérias. As bactérias são organismos procariontes, unicelulares e algumas causam doenças (KATZUNG, 1998). Podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antibacterianos. Normalmente, são classificadas como resistentes, as bactérias que crescem *in vitro*, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis aquelas que não crescem nestas concentrações (TRABULSI;

TOLEDO, 1989).

Mark Abelson e Annie Plumer (2004) relatam que a resistência bacteriana é caracterizada pela capacidade que a bactéria tem de driblar o mecanismo de ataque dos antimicrobianos, e isto ocorre, pois a célula bacteriana adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico.

De acordo com Trabulsi e Toledo (1989), a resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrente de uma alteração genética.

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidos empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN et al.; 1987).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTINÉZ et al.; 1996).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos. Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (AHMAD; BEG, 2001).

Existem vários grupos de pesquisadores que estudam a atividade biológica de plantas medicinais, muitas vezes orientados pelo uso popular das espécies nativas, mas o que vem incentivando muito a procura por antibióticos naturais é o fato de muitos microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estarem se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos (JANSEN et al.; 1987).

Os flavonóides, os taninos, os ésteres fenólicos simples entre outros, podem desempenhar importantes atividades antimicrobianas. É o caso da quercetina, rutina, apigenina (BASILE et al.; 2000) frente a cepas de bactérias gram positivas e gram negativas.

Os estudos da ação antimicrobiana dos compostos responsáveis por este efeito são de extrema importância, pois o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos é cada vez maior, além da ocorrência de efeitos colaterais como diarreias, vômitos e o aparecimento de manchas dentárias. O uso de extratos naturais pode ser de grande valor para combater infecções, com menos efeitos colaterais. Em humanos, muitas plantas vêm sendo utilizadas no tratamento de desordens periodontais e higiene oral através de enxágües orais ou até mesmo com a mastigação rotineira de gravetos ou outras partes dessas plantas, como é feito em alguns países (ADERINOKUN; LAWYOYN; ONYEASO, 1999).

Os flavonóides, por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, têm sido considerados substâncias efetivas em sua ação antimicrobiana frente a vários microorganismos, inclusive microorganismos patogênicos. Esta atividade provavelmente se dá devido à habilidade de complexação com a parede bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos podem romper parede bacteriana (COWAN, 1999).

Foi relatada atividade antimicrobiana para terpenos. Segundo Cowan (1999) o mecanismo de ação de atividade antimicrobiana dos terpenos ainda não é totalmente compreendido. Parece estar envolvidos com a ruptura da membrana celular dos compostos lipofílicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL ESTUDADO

O material foi constituído pelos extratos liofilizados das folhas e calos de *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae), popularmente conhecida como “murici-pequeno”.



Figura 2 – (A) *Byrsonima intermedia* e (B) calos produzidos de explantes foliares da espécie
Fonte: Luciano Coutinho – UFLA –MG

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS

4.2.1 Coleta do material vegetal e obtenção da droga

Partes aéreas de *Byrsonima intermedia* foram coletadas de populações naturais localizadas no município de Ijaci, região sul do Estado de Minas Gerais, localizado a 918,0m de altitude, 21°14'S de latitude e longitude 44,9° W GRW, em março de 2008, de 11 às 13 horas, sendo 36 espécimes amostradas. Amostras do material

vegetal encontram-se depositados no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob o número de registro 17.601.

As folhas foram separadas manualmente dos caules, no laboratório de plantas medicinais e fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (Unifal), sendo submetidas sem rasuração, ao processo de secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 40°C, por três dias, tempo necessário para que as folhas ficassem friáveis. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas, tamisado em tamis abertura 0,84mm, totalizando 1200g de material vegetal que, posteriormente foram armazenados em recipiente fechado e protegido da luz.

4.2.2 Obtenção do Extrato liofilizado da folha e suas frações

Para a obtenção da solução extrativa, foram preparadas as misturas contendo 10% da matéria seca em água destilada, através do processo decocção de acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). Após este processo, foi realizada a filtração a vácuo usando funil de Buchner. A solução extrativa chamada de extrato bruto aquoso (EBAq) foi então levada ao freezer e posteriormente liofilizada no laboratório de Plantas medicinais e Fitoterápicos (Unifal) em liofilizador da marca LABOTEC, obtendo-se assim o extrato liofilizado da folha (ELF).

Foram empregados 1200g do material vegetal, obtendo 12000 mL de solução extrativa e 540 g de material liofilizado. Foi calculado o rendimento para a padronização do extrato.

O extrato liofilizado foi diluído em 400 mL de água destilada e submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Utilizou-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, para obtenção das frações acetato de etila (FAE), butanólica (FBu) e aquosa (FAq) (MENSOR et al., 2001), conforme o esquema apresentado na Figura 3.

No procedimento de partição líquido-líquido, 4,0g do extrato liofilizado da folha (ELF) foram dissolvidos em 400mL de água. Em seguida foi utilizado 600mL de acetato de etila, sendo realizadas três extrações sucessivas com 200mL cada. Houve separação de fases, sendo a fração acetato de etila recolhida. Da mesma forma, porém utilizando 300mL de *n*-butanol, com três extrações sucessivas de

100mL cada, foi obtida a fração butanólica e por último recolhida a fração aquosa. Todas as frações obtidas foram levadas à secura, calculado o rendimento e uma amostra de cerca de 150mg de cada fração, bem como do extrato liofilizado foram encaminhados para os testes biológicos, microbiológicos e avaliação da atividade antioxidante.

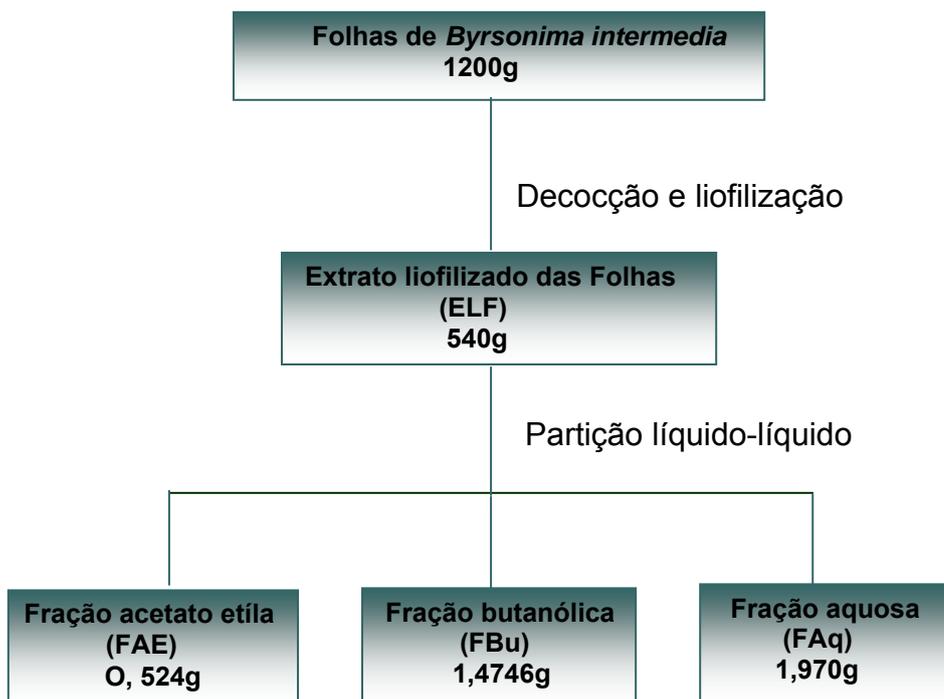


Figura 3 - Fluxograma de obtenção do extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* e fração acetato de etila, fração butanólica e fração aquosa através da partição líquido-líquido.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CALOS

Os calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia* foram produzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras – UFLA, segundo metodologia estabelecida por NOGUEIRA (2003). Dezesete amostras de diversos subcultivos foram disponibilizadas para o estudo químico. Os calos foram retirados do meio de cultura, lavados com água destilada, congelados em freezer para posterior liofilização utilizando liofilizador da marca LABOTEC e após liofilizados, foram acondicionados em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz e

do calor e mantidos em dessecadores.

4.4 ESTUDO QUÍMICO

Esta etapa experimental foi realizada no laboratório de Plantas medicinais e fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (Unifal) no período de agosto/08 à novembro/08 . Estes estudos visam primordialmente elucidar os constituintes do metabolismo secundário do vegetal, por meio de sua caracterização. Procedeu-se triagem fitoquímica e a determinação dos teores de fenóis, taninos e flavonóides totais. A caracterização dos constituintes químicos das amostras foi realizada através de cromatografia em camada delgada e cromatografia de alta eficiência com arranjo diodo (HPLC-DAD)

4.4.1 Triagem Fitoquímica

O procedimento para extração e a identificação dos principais constituintes químicos foi adotado em função da classe química de interesse. Do extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia*, das frações e dos calos liofilizados foram obtidas amostras que foram diluídas em etanol sob sonicação. Após evaporação do solvente, o resíduo foi submetido a testes fitoquímicos segundo protocolos estabelecidos por Matos (1988), Marini-Bettolo (1980), Dominguez (1973), Farmacopéia Brasileira (1988) e Costa (1986).

A prospecção fitoquímica foi desenvolvida por avaliações qualitativas para os taninos, as catequinas, os flavonóides, os derivados benzoquinonas, as naftoquinonas e as fenantreno-quinonas, além de glicosídeos cardíacos, de esteróides e triterpenóides, dos derivados de cumarina, saponina, alcalóides e antraquinonas.

4.4.2 Determinação de teor de compostos fenólicos em calos, folhas, extratos liofilizados e frações.

A determinação dos teores de fenóis totais presentes nas amostras de extrato liofilizado de folhas, frações e calos liofilizados foram realizados por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927), o qual utiliza o reagente folin-ciocalteau e baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelos compostos fenólicos em meio básico, produzindo coloração azul que é medida espectrometricamente a 740 nm.

A concentração de polifenóis totais foi mensurada utilizando o ácido gálico como padrão de referência, a partir da equação da reta obtida pela curva de calibração. Pela equação obtemos a concentração da solução de extrato expressa em $\mu\text{g GAE/mL}$. Para obtenção da concentração em mg GAE/g de extrato foi necessário seguir a seguinte fórmula:

$$m(\text{mg GAE/g}) = \frac{C_1 \text{ obtida } (\mu\text{g GAE/mL})}{C_2 \text{ solução do extrato}}$$

Onde:

m = concentração de polifenóis expresso em mg de ácido gálico/ grama de extrato.

C_1 = concentração obtida no eixo x, pela equação.

C_2 = concentração da amostra em mg/mL .

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE) / g de extrato vegetal.

4.4.2.1 Extratos liofilizados e frações

Amostras de extrato liofilizado das folhas (ELF) e as frações acetato de etila (FAE), butanólica (FBu) e aquosa (FAq) utilizadas na determinação de fenóis totais e flavonóides, foram preparadas com auxílio de balão volumétrico e emprego de etanol absoluto em ultrasson por 15 minutos, na concentração de 43,75 mg, em 10

mL de solução.

4.4.2.2 Calos liofilizados

As amostras de calos liofilizados (43,75 mg) foram dissolvidas em etanol, com auxílio de ultrasson, por aproximadamente 25 minutos, e transferidas para um balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume final completado com etanol.

5.4.3 Determinação de Flavonóides totais de Calos, de extratos liofilizados e de suas frações.

A determinação de flavonóides totais nos extratos, frações e calos liofilizados de *Byrsonima intermedia* foram realizados para três réplicas, por meio de espectrometria no UV, utilizando $AlCl_3$ e uma substância padrão, como a quercetina. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em etanol ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma 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 nos tecidos vegetais. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em etanol (WOISKY; MARCUCCI; SALATINO, 1998).

Uma curva de calibração de quercetina como padrão externo foi obtido, e a concentração de flavonóides totais foram calculados com base em quercetina, a partir da equação da reta, e a fórmula descrita na metodologia para fenóis totais. Os resultados foram expressos em mg de quercetina equivalente por grama de amostra.

4.4.4 Determinação do teor de taninos totais.

A determinação dos teores de taninos foi realizada por meio do “Método de Difusão Radial”, segundo Hagerman (1987), em que o extrato é aplicado em cavidades feitas com um gel de agarose adicionado de proteína (BSA). À medida que o tanino difunde-se no gel, vão se complexando com a albumina, desenvolvendo um halo de precipitação. A área do halo é proporcional à quantidade de taninos no extrato. A área obtida é comparada com uma curva padrão, preparada a partir de soluções de ácido tânico, de concentrações conhecidas.

4.4.4.1 Preparo das amostras

Aproximadamente 500 mg de calos liofilizados, extrato e frações pulverizados, foram extraídos com 10 mL de uma mistura de metanol/água (1:1). Após 4 horas em maceração, sob agitação à temperatura ambiente, foram filtradas e o volume completado com metanol/água (1:1). Posteriormente, as amostras foram concentradas em banho-maria e após, retomadas com 500 µL de metanol/água (1:1). Uma alíquota de 15 µL de cada amostra foi utilizada para as determinações, que foram feitas em triplicata. O resultado foi expresso em porcentagem de tanino, por miligrama de amostra seca.

4.4.5 Caracterização dos constituintes químicos de calos, de extrato liofilizado e de frações obtido das folhas de *Byrsonima intermedia*.

4.4.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) dos calos, bem como do extrato liofilizado de folhas e frações, foram realizados em placas cromatográficas de 0,25

milímetros de espessura (sílica gel Merck 60 F₂₅₄) usando adequado sistema de solventes, constituídos por misturas de CHCl₃/metanol/água ou CHCl₃/metanol/*n*-propanol/água e reagentes de detecção especial, como cloreto férrico, anisaldeído e NP/PEG (MERCK 1980; WAGNER; BLADT, 1996; WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

A amostra foi preparada por meio de agitação com 0,5g do extrato liofilizado ou frações e 0,5g de calos com 5 mL de metanol em ultrasson, posteriormente o extrato foi filtrado, evaporado à secura sob pressão reduzida. O resíduo foi redissolvido em 1 mL de metanol, em seguida, aplicado 3 µl em placa de sílica, percorrendo 10 cm em dois tipos de eluentes, constituído por CHCl₃/metanol/água (43:37:2v/v/v) e CHCl₃/metanol/*n*.propanol/água (5:6:1:4v/v/v/v), respectivamente. A revelação foi feita com NP/PEG, revelador específico para flavonóides e detectados em zonas fluorescentes para flavonóides existentes em UV-365nm, cloreto férrico 1% e com anisaldeído, comparado à substância referência (C) catequina (1:1 v/v). Foram também utilizados como padrões, (Q) quercetina, (AG) ácido gálico, (AT) ácido tânico e (R) rutina.

4.4.5.2 Análises por cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo diodo - HPLC-DAD

O extrato metanólico foi preparado por agitação utilizando 1,0 mg de extrato liofilizado das folhas (ELF) em 20 mL de solução metanólica, com 0,1%(v/v) de ácido acético, mesmo eluente utilizado como fase móvel nos experimentos de HPLC. Para os calos liofilizados, foram utilizados 1,0 mg em 30mL de solução metanólica com 0,1%(v/v) de ácido acético. Esta diferença na quantidade de solução preparada se deve ao fato dos calos apresentarem precipitado no fundo do recipiente, necessitando de maiores quantidades de solvente para solubilizarem. Os extratos foram filtrados através de uma membrana filtrante de "nylon" e transferidos para uma seringa antes de submetê-los a injeção.

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), consistindo de um injetor automático Shimadzu SIL-20A/PROMINENCE, um detector Shimadzu SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo de diodos (DAD). Os

testes foram realizados a 30° C, com uma coluna C₁₈ Shimadzu CLC-ODS (M) de 0,4 x 25 cm, fornecido com uma pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6. A fase móvel foi composta de solução metanólica com 0,1% de ácido acético (A) e de 0,5% de ácido acético aquoso (v/v) (B) com um gradiente de eluição. O volume de injeção foi de 25 µl. Todas as soluções antes de serem injetadas foram filtradas em filtros de membrana com poros de 0,45 µm (Millipore). A análise foi realizada em fluxo constante de 1.2 mL.min⁻¹.

Para obtenção de uma boa resolução cromatográfica, foi utilizado um gradiente binário, solução metanólica com 0,1% (v/v) de ácido acético – solução aquosa de ácido acético 5mmol. L⁻¹ e pH = 3,8. O gradiente está representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente binário utilizado nas análises de HPLC-DAD

Tempo (min)	Solução metanólica 0,1% (v/v) de ácido acético (%)*	Solução aquosa de ácido acético 5mmol. L ⁻¹ (%)
0,0	70	30
5,0	100	0
20,0	100	0

*A transição de um percentual ao outro é linear.

4.4.6 Determinação de amido nos calos liofilizados

A detecção de amido foi realizada através da metodologia descrita por Romeiro (2001) com modificações, através do teste de iodo – solução de Lugol. Na presença de iodo, o amido forma um complexo de cor azulada, de composição incerta. Esse complexo se desfaz sob aquecimento, perdendo a cor azul, mas é refeito quando é resfriado. Os resultados foram obtidos, por observação visual usando um controle negativo e um controle positivo como referência.

4.5 ESTUDO BIOLÓGICO

Os testes biológicos foram realizados a partir de amostras de folhas e frações de acetato de etila, butanólica e aquosa.

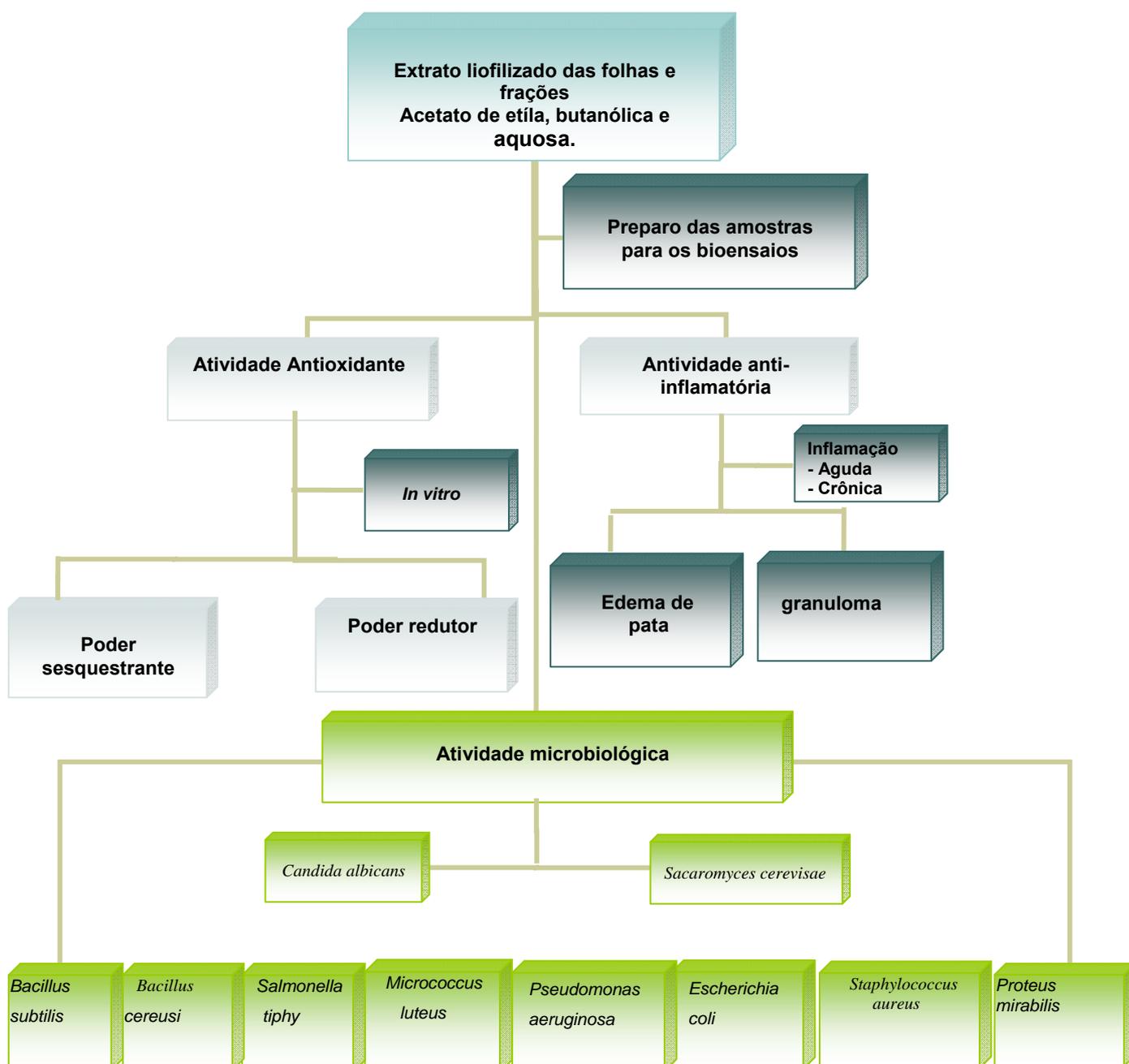


Figura 4 - Esquema dos ensaios farmacológicos a partir de diferentes amostras de *Byrsonima intermedia*

4.5.1 Avaliação da atividade antioxidante

Os testes de atividade antioxidante *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química de Produtos Naturais (Departamento de Farmácia - Unifal-MG).

4.5.1.1 Análise qualitativa da atividade antioxidante

Os extratos foram analisados por CCD usando ácido ascórbico como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas em CHCl_3 /metanol/*n*.propanol/água (5:6:1:4v/v/v/v), e, após secagem, foram nebulizadas com solução a 0,4 mmol/L do radical DPPH em etanol (SOLER-RIVAS, 2000). As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante.

4.5.1.2 Avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen, Chang e Duh. (2005) com modificações. Foi utilizado o extrato liofilizado e frações acetato de etila, butanólica e aquosa, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 ppm em etanol.

Para a avaliação da atividade antioxidante, o extrato liofilizado e as frações reagiram com o radical DPPH, padrão Sigma Aldrich em solução de etanol e foi mensurada através da capacidade do extrato e frações descolorar soluções diluídas do radical DPPH (1,1-difenil, 2-picrihidrazila) (0,5mM). A quantificação da descoloração foi obtida mediante leitura em ultravioleta a 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu-UV-1201), onde o radical apresenta o máximo de absorção. Fez-se também a comparação dos resultados com o padrão ácido ascórbico, nas mesmas concentrações das amostras.

O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo para determinar a capacidade sequestrante seguiu a equação:

$$\% \text{ Capacidade sequestrante} = \frac{\text{A branco} - \text{A teste}}{\text{A branco}} \times 100$$

Onde: A teste é a absorbância da fração e do extrato bruto; A branco é a absorbância das frações e do extrato bruto sem adição do DPPH.

Para expressar a atividade antioxidante utilizou-se o IC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação.

4.5.1.3 Avaliação do poder redutor dos constituintes químicos

Avaliação do poder redutor das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yildirim, Oktay e Bilalog (2001), citado por Yildirim, Mavi e Kara (2001) com modificações.

Para a realização do teste, foi preparado o reagente tampão fosfato 0,2 M pH 6,6; ferricianeto de potássio a 1% (m/v); ácido tricloroacético a 10% (m/v) e FeCl₃ a 0,1% (m/v). O teste foi realizado em triplicata com a solução do extrato liofilizado de folhas e frações de *Byrsonima intermedia*. Concentrações crescentes dessas soluções (25ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm) e do padrão ácido ascórbico, foram submetidas à reação de redução na presença dos reagentes. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Uma elevada absorbância indica grande poder redutor.

A atividade redutora do extrato e frações foi expressa como porcentagem de redução em comparação ao ácido ascórbico, usado como padrão.

4.5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia – Departamento de Ciências Biológicas da Unifal-MG, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

O projeto de pesquisa foi apreciado e aprovado pelo Comitê de ética registrado sob o nº 221/2009. Todos os procedimentos foram realizados segundo recomendações do Comitê Internacional para os cuidados dos animais e estão em acordo com os regulamentos nacionais estabelecidos para a experimentação animal.

4.5.2.1 Sistema teste *in vivo*

Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Unifal-MG e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (160-170g) aclimatados às condições do laboratório por sete dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais submetidos a jejum de 12 horas.

4.5.2.2 Edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo edema de pata, foi utilizada a metodologia descrita por Castro (2000).

Neste experimento, foram utilizados seis ratos *Wistar* machos adultos (160-170g), por grupo. Os extratos de *Byrsonima intermedia* foram administrados por via oral (v.o) em concentrações variadas; outro grupo recebeu solução de carboximetilcelulose (1%), 10 mL/Kg (v.o) e um controle positivo com indometacina (10mg/Kg) (v.o). Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção

subplantar de 0,1 mL de carragenina 1% em solução fisiológica na pata traseira esquerda. O volume da pata do animal foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidroleptimômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália). As patas esquerdas posteriores dos animais, foram submergidas até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução de extrato neutro 2,5% em salina 0,9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão da pata no recipiente maior, foram numericamente registradas no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção do agente flogístico..

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão da média, para cada grupo de tratamento.

4.5.2.3 Teste do granuloma

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória no modelo indução de tecido granulomatoso foi utilizada a metodologia descrita por (MEIER; SCHULER; DESAULLES, 1950; NIEMEGEERS et al., 1975).

Grupos de seis animais foram divididos em grupo tratado com extrato 30 mg/kg; grupo tratado extrato 100 mg/kg; grupo tratado 300 mg/kg; grupo controle positivo tratado com dexametasona 5 mg/Kg; e grupo controle negativo administrado com água. Estes foram mantidos sete dias, e durante o desenvolvimento do estudo, a uma temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e umidade relativa 50-70% em ciclo de claro e escuro de 12/12 h. Tiveram livre acesso ao alimento (dieta padrão para roedores) e água.

4.5.2.4 Implante dos pellets de algodão

Os pellets de algodão com peso aproximado de 40 ± 5 mg foram secos a 60°C , durante 18 horas em estufa, posteriormente foram anotados os pesos e esterelizados em autoclave. Utilizando a metodologia descrita por Bayle (1982), os animais, foram pesados e em seguida, injetados tiletamina (50mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg) por animal, por via IM. A região abdominal do rato foi lavada com sabão. Posteriormente foi raspada e desinfetada com solução antisséptica PVPI. Fez-se uma incisão em torno de 6 mm na linha média da zona ventral, separando-se cuidadosamente a derme da parede do peritônio. Com o auxílio de uma pinça hemostática reta realizou-se túneis até as laterais, de uma amplitude aproximada de 1 cm e longitudinalmente de 5 cm, pela qual se introduziu o pellet de algodão.

Uma vez situado o pellet no final do túnel, o mesmo foi fechado com um ponto externo para que não se deslocasse. Repetiu-se o procedimento anterior para as quatro extremidades do abdômen do rato, sendo implantados quatro pellets de algodão em cada animal. Ao final dos implantes, suturou-se a incisão inicial com pontos de seda cirúrgica. Em seguida, aplicou-se nitrofurazona (ungüento) para proteger os animais de possíveis infecções.

Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados imediatamente em incubadora a 37°C durante 3 horas (recuperação da anestesia). Posteriormente foram colocados no local de permanência nas condições padrão de trabalho. Para evitar infecções foram mantidos em viruta estéril.

4.5.2.5 Tratamento dos animais

Administrou-se por via oral, através de sonda intragástrica respectivamente durante sete dias para os grupos tratados com extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* 30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg, e para os grupos tratados com as frações acetato de etila, butanólica e fração aquosa as dosagens de 10, 30 e 100 mg/kg, para o grupo controle positivo tratado com dexametasona 5 mg/kg e para o grupo controle negativo água, administrando os mesmos volumes em todos os

animais.

4.5.2.6 Extração do granuloma

Sete dias depois da implantação do pellet de algodão, os animais foram novamente pesados, e procedeu-se a eutanásia para a extração dos granulomas. Após serem cuidadosamente extraídos, os mesmos foram lavados com solução fisiológica e colocados em placas de petri. Os granulomas foram secos em estufa a 60°C por 18 horas, e em seguida pesados em balança analítica.

4.5.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados usando o software programa Graphpad Versão 4.0, expressando como mean \pm S.E.M. Estatisticamente as diferenças significativas entre grupos foram calculadas pela aplicação de uma análise de discrepância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. p - valores menores que 0.05 ($p < 0.05$) foram considerados significativos.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios foram realizados no laboratório de microbiologia - Unifal-MG sob responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizada a metodologia descrita por Bauer et al. (1966).

Os extratos foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, contra leveduras e bactérias. Utilizou-se o método de difusão em agar, recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003) com modificações. Foram preparadas placas de ágar Mueller-Hinton para bactérias e ágar Mueller-Hinton com 1,0 % de glicose para leveduras e, posteriormente foram feitos poços de 4 mm de

diâmetro na superfície do ágar com auxílio de um tubo de metal. Foram preparadas suspensões microbianas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Esta suspensão foi inoculada na superfície do ágar com auxílio de “swab”. Após secagem do inoculo, foi colocado nos poços 40 µl do extrato liofilizado das folhas, e frações acetato de etila, butanólica e aquosa. Um controle positivo com solução de gluconato de clorexidina a 0,2% e um controle negativo com água destilada foram preparados do mesmo modo. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após a incubação foi feita a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano em volta dos poços.

4.6.1 Microrganismos utilizados nos ensaios

Os microrganismos utilizados para a realização da pesquisa foram cepas-padrão ATCC (*American Type Culture Colection*) mantidas no Laboratório de Microbiologia Básica da UNIFAL-MG e recomendadas para testes de suscetibilidade à antimicrobianos (CLSI, 2009). Foram os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella tiphy* (ATCC 14028); *Proteus mirabilis* (ATCC 25933); *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Candida albicans* (ATCC 10231) , *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601)

4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima foi determinada nos extratos que apresentaram atividade inibitória no teste de difusão em agar. Os testes foram realizados em microplacas nas quais foram colocados 100 µL do caldo Mueller Hinton concentrado duas vezes e 100 µL de concentrações decrescentes do extrato. O extrato liofilizado das folhas e as frações acetato de etila, butanólica e aquosa foram utilizadas na concentração inicial de 20 mg/mL.

Foram inoculados nos poços, 10 μ L da suspensão microbiana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Também foram realizados os seguintes controles: controle de esterilidade do caldo Mueller Hinton; controle da promoção do crescimento de cada microrganismo avaliado, controle da esterilidade do extrato e das frações. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi feita a partir do último tubo onde não houve turvação

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DO EXTRATO E DAS FRACÇÕES

Após a liofilização, o rendimento do extrato seco em relação à quantidade de material vegetal empregado, foi calculado. Da mesma forma, foi calculado o rendimento das frações obtidas. A Tabela 2 mostra os rendimentos obtidos com extrato liofilizado de folhas e com as frações.

Tabela 2 - Rendimentos do extrato liofilizado de folhas e das frações obtidas na partição líquido-líquido.

	Rendimento (g)	Rendimento (%)
ELF	540,00g	45,00%
FAE	0,52g	13,10%
FBu	1,47g	36,86%
FAq	1,97g	49,25%

ELF = extrato liofilizado das folhas; FAE = fração acetato de etila; FBu = fração butanólica; FAq = fração aquosa.

Os dados mostram rendimentos maiores para as frações butanólica e aquosa, indicando a predominância de constituintes polares no extrato liofilizado de folhas (ELF).

As folhas secas de *Byrsonima intermedia* após a extração com água pelo processo de decocção, e após a filtração forneceram um extrato líquido, que levado a resíduo pelo processo de liofilização, obteve-se uma porcentagem de material sólido (sem adição de excipientes) de 45%. Segundo Gregório et al. (2006), os rendimentos variam de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo a solubilidade dos seus constituintes. Com base no exposto, foi excelente o rendimento obtido com a liofilização, indicando que, a relação pó de planta-extrato é de aproximadamente 2:1, ou seja, são necessários aproximadamente 2 quilos de planta seca para fornecer 1 quilo de extrato seco (GREGÓRIO et al., 2006).

5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DO EXTRATO LIOFILIZADO DAS FOLHAS, FRAÇÕES E CALOS LIOFILIZADOS.

Os resultados qualitativos das análises para taninos e flavonóides, realizadas com o extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* e frações encontram-se dispostos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da triagem fitoquímica para o extrato liofilizado de folhas de *Byrsonima intermedia* e suas frações

TRIAGEM FITOQUÍMICA						
	BRANCO	FAq	FBu	FAE	ELF	PADRÃO
Taninos - Presença/Ausência	-	+++	++	+++	+++	+++
Taninos - Condensados X Hidrolisáveis	-	++	+++	++	+++	+++
Taninos - Hidrolisáveis	-	-	-	-	+	+++
Taninos - Condensados	-	++	++	+	+++	+++
Catequinas	-	+	++	+	+++	+++
Flavonóides - Presença/Ausência	-	++	+	++	++	+++
Flavonóides - Flavonas, Flavonóis e Xantonas						
1 - pH 3,0	-	-	++	+	+	+++
2 - pH 8,5	-	-	+++	++	+	+++
3 - pH 11,0	-	-	+++	++	+	+++

FAq = fração aquosa; FBu = fração butanólica; FAE = fração acetato de etila; ELF = extrato liofilizado de folhas. + resultado positivo; - resultado negativo; +++muita presença; ++ pouca presença.

A triagem fitoquímica indicou a presença de polifenóis em todas as amostras analisadas, observado pelo aparecimento de colorações preta e verde, quando reagido com FeCl_3 , sugerindo a presença de taninos. O desenvolvimento de coloração vermelha intensa na presença de solução aquosa de vanilina 1% com ácido clorídrico concentrado, a presença de catequinas.

A coloração rósea detectada nas respectivas amostras, quando em contato com ácido clorídrico concentrado, o metanol e a fita de magnésio sugerem presença de flavonóides. Quando a solução hidroetanólica das amostras foram basificadas a pH 8,5 e 11, foi possível verificar o aparecimento de coloração laranja, indicando possível presença de flavonas, flavonóis e xantonas.

No teste para diferenciação de taninos hidrolisáveis e taninos condensados, observou-se no ELF, coloração azul na presença de sais de ferro e precipitado esbranquiçado na reação com acetato de chumbo em meio ácido, característico de taninos hidrolisáveis. Mas quando foi realizada a reação para identificação de

taninos condensados, observou-se coloração verde. Com base no exposto, sugere-se a presença de taninos hidrolisáveis e taninos condensados no extrato liofilizado de folhas de *Byrsonima intermedia*.

Nas frações acetato de etila, butanólica e aquosa, foram possíveis observar a presença de taninos e flavonóides em todas elas. Algumas em maior, outras em menor intensidade, quando comparado com o padrão e um branco (água). Porém as frações parecem não apresentar taninos hidrolisáveis. Observou-se a possível presença de núcleo flavona, flavonol ou xantona em maior intensidade nas FAE e FBu, pelo aparecimento de coloração laranja quando na presença de NaOH.

Os calos obtidos no estabelecimento e nos diversos subcultivos, também foram submetidos a testes fitoquímicos baseado em técnicas colorimétricas e de precipitação para detectar constituintes bioativos. Os resultados para taninos e flavonóides encontram-se dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da triagem fitoquímica para taninos e flavonóides presentes nos calos.

subcultivos -2008-	Tipo de calos	Taninos	Taninos condensados	Taninos hidrolisáveis	Flavonóides	Flavona Flavonol ou xantona
Estabelecimento	Calo Marrom	+	-	±	++	-
Estabelecimento	Calo Amarelo	+	-	-	+	+
Estabelecimento	Calo Branco	+	±	-	+	+
1º Subcultivo	Calo Marrom	+	+	-	+++	+
1º Subcultivo	Calo Amarelo	+++	+	-	++	+
1º Subcultivo	Calo Amarelo	+++	-	±	++	+
1º Subcultivo	Calo Marrom	+++	-	±	++	-
1º Subcultivo	Calo Amarelo	+	+	-	+++	+
1º Subcultivo	Calo Amarelo/ Marrom	++	±	-	++	±
1º Subcultivo	Calo Marrom	++	+	-	+	+
2º Subcultivo	Calo Duro Marrom	+	-	±	+++	-
2º Subcultivo	Calo Amarelo	-	±	-	++	+
2º Subcultivo	Calo Marrom	+	+	-	++	+
2º Subcultivo	Calo Amarelo Esbranquiçado	+	+	-	+	+
2º Subcultivo	Calo Amarelo	+	+	-	++	+
2º Subcultivo	Calo Marrom	++	±	-	+	-
3º Subcultivo	Calos Amarelo	++	+	-	+++	+
3º Subcultivo	Calo Marrom	+++	+	-	+++	+

+ resultado positivo; - resultado negativo; +++muita presença; ++ pouca presença; ± duvidoso.

Praticamente todos os cultivos e subcultivos apresentaram flavonóides e taninos, podendo inferir que os calos mantiveram os componentes presentes nas folhas.

Neste estudo observou-se que alguns calos, quando submetidos à reação com cloreto férrico, desenvolveram-se coloração azul, característica de taninos hidrolisáveis, mas na presença de sais de chumbo não houve a formação de precipitado, o que confirmaria a presença de taninos hidrolisáveis; houve calos que

apresentaram a coloração verde, e outros, resultados duvidosos nestas reações, mas positivos para catequinas, um tanino condensado. Pelo exposto, sugere-se apenas presença de taninos condensados nos calos.

A triagem fitoquímica do ELF, frações e calos também foram desenvolvidos por avaliações qualitativas para derivados benzoquinonas, naftoquinonas, glicosídeos cardíacos, esteróides e triterpenóides, derivados de cumarina, saponina espumídica, alcalóides e antraquinonas.

O extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia*, e frações, revelou a presença de saponinas pela formação de espuma estável em tubo de ensaio após agitação vigorosa. Nos calos, a reação foi negativa. Não foi observada nas amostras analisadas, a presença de cumarinas, derivados benzoquinonas, naftoquinonas, glicosídeos cardíacos e antraquinonas. Quanto aos esteróides e triterpenóides, as amostras de calos apresentaram-se negativas, porém extrato liofilizado e frações, a reação foi positiva.

Os reativos de Mayer; de Bertrand; de Bouchard e de Dragendorff C apresentaram resultados negativos na identificação de alcalóides.

5.3 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E TANINOS.

A tabela 5 mostra o teor de fenólicos totais no ELF e frações. É possível observar que na fração menos polar concentra-se a maior quantidade destes constituintes. Isto é coerente com o fato de que o conteúdo de fenólicos totais é significativamente dependente dos solventes empregados.

Tabela 5 - Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais no extrato aquoso liofilizado das folhas e frações acetato de etila, butanólica e aquosa de *Byrsonima intermedia*.

Extrato/Frações	Fenóis (mg AG/g AM)	Flavonóides (mg Querc/g AM)	Taninos (mg AT/g AM)
ELF	67,54± 1,3	42,60 ±0,65	2,48 ±0,18
FAE	73,91 ±0,53	60,83 ±0,13	0,18 ±0,13
FBu	64,53 ±0,64	29,20 ±0,07	0,94 ±0,01
FAq	58,46±0,14	24,40 ±0,19	1,93± 0,01

AG= Ácido gálico. Querc=Quercetina. AT= Ácido tânico. AM = amostra

Para a extração foram utilizados solventes com polaridades diferentes (acetato de etila, *n*-butanol e água). Quando se utiliza solvente um pouco menos polar, como acetato de etila, ele permite recuperar as agliconas livres pouco polares, tais como flavonas, flavonóides, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Aumentando a polaridade do solvente, chegando até água, é possível extrair as agliconas poli hidroxiladas, as flavonas e flavonóis mais polares, auronas, chalconas, sendo que com a utilização de água aquecida ela arrastará as catequinas e procianidinas (SIMÕES et al., 2004).

Cada espécie vegetal está associada a uma determinada família de polifenóis, sintetizada por diferentes rotas metabólicas, cujos teores não podem ser estimados quantitativamente de modo absoluto, já que variam à medida que o vegetal se desenvolve e diversifica seu metabolismo. Os valores obtidos podem diferir pela influência de fatores como clima, solo e condições de cultivo das espécies vegetais. No entanto, a quantificação dessas substâncias é fundamental para a compreensão de seus benefícios potenciais à saúde humana, principalmente quando é possível avaliar a bioatividade concentração-dependente dos constituintes fenólicos individuais de uma amostra vegetal (SOUZA et al., 2007).

Simões et al. (2004) mencionam que o modo de preparo do material vegetal tem causado erros na determinação dos metabólitos secundários, muito maiores que a análise em si, alertando a necessidade de estudos e otimização dos métodos de preparo do material. Isto indica que nas etapas de extração e quantificação de princípios ativos de origem vegetal, a fase de preparo das amostras é mais importante no desenvolvimento dos métodos analíticos.

Neste estudo optou-se pela extração de polifenóis utilizando etanol/água 90:10 em ultrasson. Alguns trabalhos relatam os efeitos do ultrasson na obtenção dos extratos, embora seja uma técnica que ainda está sendo explorada. No estudo comparativo sobre a eficiência de métodos de extração dos polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*) realizado por Lago, Paula e Bara (2007) foi observado que o método de extração sob sonicação por 15 minutos mostrou-se vantajoso na quantificação dos polifenóis do chá verde quando comparado ao método analítico de Hagerman e Butler, para o doseamento de fenóis totais, descrito por Waterman e Mole (1994), devido oferecer menor tempo de extração e maior praticidade e eficiência.

Foram quantificados os teores de compostos fenólicos, flavonóides e taninos

nos calos obtidos de vários cultivos e subcultivos. Os calos apresentaram teores variáveis dos fitoconstituintes analisados, nos diferentes subcultivos. Em todos, detectou-se a presença de fenóis e flavonóides, porém nem todos subcultivos produziram taninos. A Tabela 6 apresenta os resultados referentes ao teor de fenólicos totais (mg de ácido gálico/grama calo liofilizado), flavonóides (mg de quercetina/grama calo liofilizado) e taninos totais (mg de ácido tânico/100g de calo liofilizado), nos calos analisados.

Tabela 6 – Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais dos diversos subcultivos de calos.

Fase	amostra	cor do calo	Fenólicos mg ac. Gálico/g calo	Flavonoides mg quercetina/g calo	Taninos mg ac. tânico/ g calo
estabelecimento	1	marrom	27,86	26,54	0,00
estabelecimento	2	amarelo	43,68	44,60	0,00
estabelecimento	3	branco	14,06	6,02	0,00
1o subcultivo	1	marrom	60,37	28,61	0,32
1o subcultivo	2	amarelo	63,80	21,26	0,40
1o subcultivo	4	marrom	56,60	23,60	0,32
1o subcultivo	5	amarelo	73,60	74,40	0,00
1o subcultivo	6	amarelo/marrom	48,03	26,52	0,16
1o subcultivo	7	marrom	70,30	20,76	0,32
1o subcultivo	8	marrom	37,64	18,26	0,16
2o subcultivo	9	duro amarelo	44,32	26,06	0,00
2o subcultivo	10	duro marrom	52,58	49,04	0,00
2o subcultivo	11	amarelo	54,40	51,84	0,00
2o subcultivo	12	marrom	49,74	49,23	0,00
2o subcultivo	13	amarelo esbranq.	13,95	10,76	0,00
3o subcultivo	14	amarelo	32,34	15,82	0,16
3o subcultivo	15	marrom	68,20	47,38	0,17

Os teores de fenólicos totais variaram de 13,95 mg/g a 73,60 mg/g nos diversos subcultivos de calos. Flavonóides variaram de 6,02 mg/g a 74,40 mg/g. Taninos, de 0,16 a 0,40 mg/g de calos, porém muitos subcultivos não produziram este metabólito. Nosso grupo de pesquisa preocupou-se em avaliar a composição química dos calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia*, verificando se os mesmos produzem metabólitos secundários similares àqueles produzidos na folha da planta mãe. Neste contexto, pode-se afirmar que os calos e extrato

liofilizado de folhas apresentam os mesmos constituintes. O reconhecimento da constituição química se faz necessário para tal comparação. A quantificação foi realizada com intuito de verificar se os calos possuem atividade promissora, porém, observaram-se teores baixos para tal afirmação.

Foram calculados os intervalos de confiança para a estimativa dos teores de compostos fenólicos, flavonóides e taninos, possibilitando analisar estatisticamente os teores encontrados para os metabólitos secundários presentes nos estabelecimentos e diversos subcultivos de calos. Os resultados estão dispostos na tabela 7.

Tabela 7 - Intervalos com 95% de confiança para o teor médio de metabólitos secundário presentes em calos

	Metabólito	LI	Media	LS
Estabelecimento	Fenólicos	-8,29	28,53	65,35
	Flavonóides	-22,23	25,72	73,67
	Taninos	0,00	0,00	0,00
1o subcultivo	Metabólito	LI	Media	LS
	Fenólicos	47,00	58,62	70,24
	Flavonóides	12,28	30,49	48,69
	Taninos	11,18	24,00	36,82
2o subcultivo	Metabólito	LI	Media	LS
	Fenólicos	22,29	43,00	63,71
	Flavonóides	14,81	37,39	59,96
	Taninos	0,00	0,00	0,00
3o subcultivo	Metabólito	LI	Media	LS
	Fenólicos	-177,55	50,27	278,09
	Flavonóides	-168,90	31,60	232,10
	Taninos	10,15	16,50	22,85

LI - limite inferior; LS – limite superior.

Estatisticamente, pode-se observar que, no estabelecimento a quantidade média de fenólicos foi 28,53 mg equivalentes de ácido gálico/g de calos e 25,72 mg equivalentes de quercetina/g de calos para flavonóides, e não houve produção de tanino. O número de estabelecimentos amostrados foi pequeno, o erro de estimação foi alto, e, portanto não houve intervalo de confiança. Sabe-se que houve produção de compostos fenólicos, entre eles flavonóides.

No 1º subcultivo pode-se afirmar, com 95% de confiança, que o teor de fenólicos totais foi de 47,00 mg equivalentes de ácido gálico/g de calo liofilizado; o

teor de flavonóides é de 12,28 mg equivalentes de quercetina/g de calo liofilizado e o teor de taninos 11,18 mg equivalentes de ácido tânico em 100g de calos liofilizados.

No 2º subcultivo não foram encontrados taninos, porém pode-se afirmar com 95% de confiança, que o teor de fenólicos foi de 22,29 mg equivalentes de ácido gálico/g de calos liofilizados e o teor de flavonóides é de 14,81 mg/g equivalentes de quercetina/g de calo liofilizado.

No 3º subcultivo, as amostras foram insuficientes para analisar estatisticamente o teor de metabólitos secundários presentes nos calos. Sabe-se que há produção, porém em pequena quantidade.

Observou-se que todos os subcultivos foram realizados 60 dias após a inoculação, porém as repicagens não seguiram a curva de crescimento dos calos. O nº de subcultivos amostrados, enviados para testes fitoquímicos foram iinsuficientes, impossibilitando afirmar estatisticamente a presença de metabólitos secundários em alguns deles. Pode ser que os maiores valores de metabólitos secundários encontrados sejam devidos ao seu acúmulo na fase de estabilização. No entanto não podemos afirmar, pois os subcultivos foram aleatórios.

Nogueira (2003) realizando análises bioquímicas em calos de murici-pequeno, verificou valores de 0,142 e 0,133% de compostos fenólicos na matéria fresca de calos, para as fases linear e estacionária, respectivamente. Valores baixos, segundo os autores, comparados aos teores de 22% encontrados por Queiroz, Morais e Nascimento (2002) com aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*).

O presente estudo vem corroborar com os estudos de Nogueira (2003) no sentido de confirmar que os baixos teores de taninos totais verificados nos experimentos indicam a necessidade de se aperfeiçoar o protocolo para a indução de calos, para que haja uma maior produção de fenóis e taninos totais nos calos de *Byrsonima intermedia*, mas cabe lembrar também que novos estudos devem ser realizados, envolvendo até outras formas de extração, para uma melhor avaliação do rendimento do processo.

Segundo Lameira (1997), a maior produção de metabólitos secundários no cultivo de calos, geralmente, ocorre quando este atinge a fase estacionária da curva de crescimento. Esta fase varia de espécie para espécie, sendo este período, em algumas espécies, superior a 60 dias, como é o caso do ingá (SOARES, 2003) e o próprio murici-pequeno estudado por (Nogueira, 2003).

Através da literatura consultada, (PINTO; LAMEIRA, 2001), constatou-se que

há várias vantagens em produzir um produto secundário em cultura de tecido. A produção *in vitro* elimina a barreira política e geográfica para a produção da espécie. Estes mesmos autores mencionam que o metabólito secundário pode ser produzido durante todo o ano, com uma produção segura e previsível independente da estação do ano, e que a extração do tecido proveniente da cultura de tecido é muito mais simples do que da planta.

Os três exemplos clássicos de metabólitos secundários de produção comercial são saponina, através da cultura de raiz de Ginseng e a produção de cultura altamente coloridas de Shikonina e Berberina (PINTO; LAMEIRA, 2001).

Segundo Miachir (1992) um dos problemas-chaves da cultura de células de plantas como fonte de compostos químicos é que as culturas, uma vez estabelecida, normalmente apresentam baixa produtividade, inviabilizando a produção comercial. Uma variedade de fatores químicos e físicos tem sido testada. Estes fatores incluem componentes do meio de cultura, hormônios, valor de pH, luz, temperatura, aeração, agitação, etc.

A produção de compostos fenólicos tais como taninos nos calos, parece ser muito mais complexa do que se pensa, mas segundo Nogueira et al.; 2007 o meio de cultura pode ser otimizado para a produção em larga escala deste composto, uma vez que foi obtido *in vitro* a partir de segmentos foliares e, na forma convencional, é extraído a partir da casca da planta *in vivo*. Testando 2,4-D e ANA na produção de tanino em calos de *Cornus officinalis* (YAZAKI; OKUDA, 1993) concluíram que explantes cultivados em presença de 2,4-D produziram as maiores quantidades desse composto, corroborando a possibilidade de otimização do meio nutritivo para sua produção *in vitro*.

Vários fatores ambientais influenciam a produção de flavonóides nas plantas, como, por exemplo, infecção, temperatura, nutrição, injúria, metabolismo do açúcar e do nitrogênio e qualidade de radiação (BLANK, 1947). A radiação solar é um dos fatores que, via de regra, está relacionada à variação quantitativa. Muitos trabalhos demonstraram que há um aumento quantitativo de flavonóides em órgãos expostos à luz, em comparação com aqueles que estão à sombra (HILLIS; SWAIN 1959; HOLST, 1977).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS

5.4.1 Análise dos flavonóides presentes no extrato liofilizado das folhas e calos de *Byrsonima intermedia* por CCD

Foram realizadas as cromatografias em camada delgada de sílica-gel com os calos, e o extrato liofilizado. A comparação entre extrato liofilizado, calos e padrões podem ser observados na Figura 5.

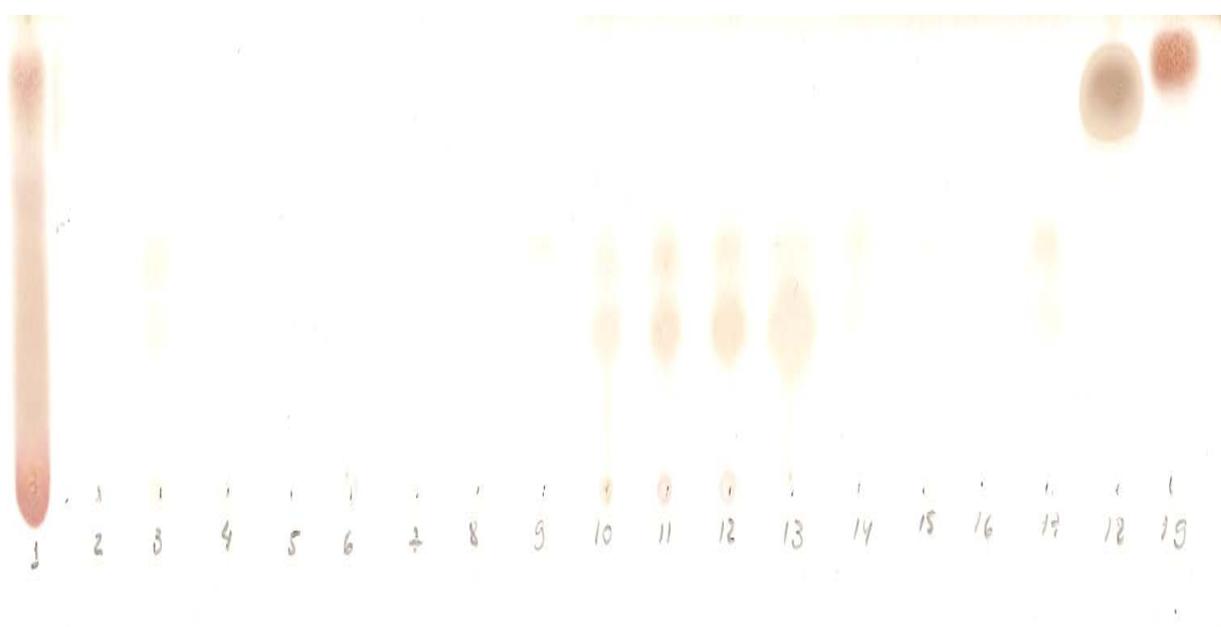


Figura 5 – Cromatografia em camada delgada comparativa do extrato bruto e calos liofilizados de *Byrsonima intermedia*. Amostra 1 - ELF; Amostras de 2 a 17 – calos liofilizados (sequência – ver tabela 6, pag 62, exceção calos amarelo esbranquiçado); 18- padrão catequina, 19- padrão ácido tânico.

Partindo-se de cromatografia em camada delgada, observou-se que a amostra de nº 1, representada pelo extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia*, apresentou mancha mais evidente, porém, mostraram-se bastante carregada, pressupondo vários constituintes presentes.

Analisando o perfil cromatográfico dos calos, observa-se 2 substâncias diferentes nas amostras de nº 10 (1º subcultivo calo marron); nº 11 (2º subcultivo calo duro amarelo) ; nº 12 (2º subcultivo calo duro marron) ; nº 13 (1º subcultivo calo amarelo). As manchas apresentaram $R_f \sim 0,3$ e $R_f \sim 0,4$, porém não

corresponderam a nenhum dos dois padrões utilizados.

Com a partição líquido-líquido, segundo literatura, há separação das agliconas livres de hetrosídeos, além da remoção dos taninos. Foram obtidas as frações, acetato de etila, butanólica e aquosa e testados dois sistemas de solvente para a análise por CCD, sendo o primeiro uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$, na proporção 5:6:1:4 (v/v/v/v), fase orgânica, e o segundo uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ na 43:37:20 (v/v/v/v), fase orgânica. Os cromatogramas do extrato ELF, frações acetato de etila, butanólica e aquosa, comparados com os padrões, rutina (flavonóide glicosilado), catequina (flavona), quercetina (aglicona) revelados NP/PEG estão amostrados na Figura 6.

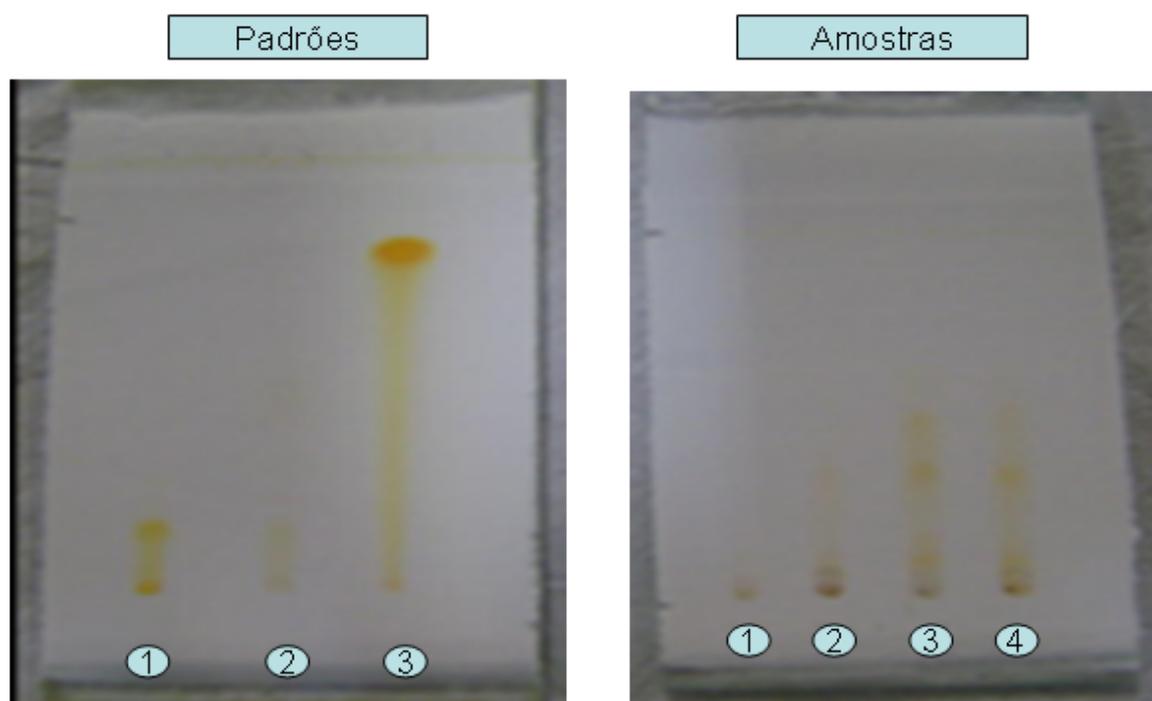


Figura 6 - Cromatografia em camada delgada comparativa - revelador NP/PEG - Padrões: 1-rutina, 2-catequina, 3-quercetina - Amostras: 1-fração aquosa 2- fração butanólica 3- fração acetato de etila 4- extrato liofilizado das folhas - eluente terciário: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20)

Ao revelar com NP-PEG (ácido-etilaminadifenilbórico), observou-se que as bandas tomaram coloração laranja avermelhada. Segundo Wagner, Blatt e Zgainski (1984), são derivados da quercetina. As bandas pertencentes à fração acetato de etila e extrato foram as mais evidentes, porém observam-se rastros na fração butanólica e em todas elas, material retido no ponto de aplicação. O eluente constituído por $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20) proporcionou melhor corrida.

Na Figura 7 as placas cromatográficas foram reveladas com anisaldeído.

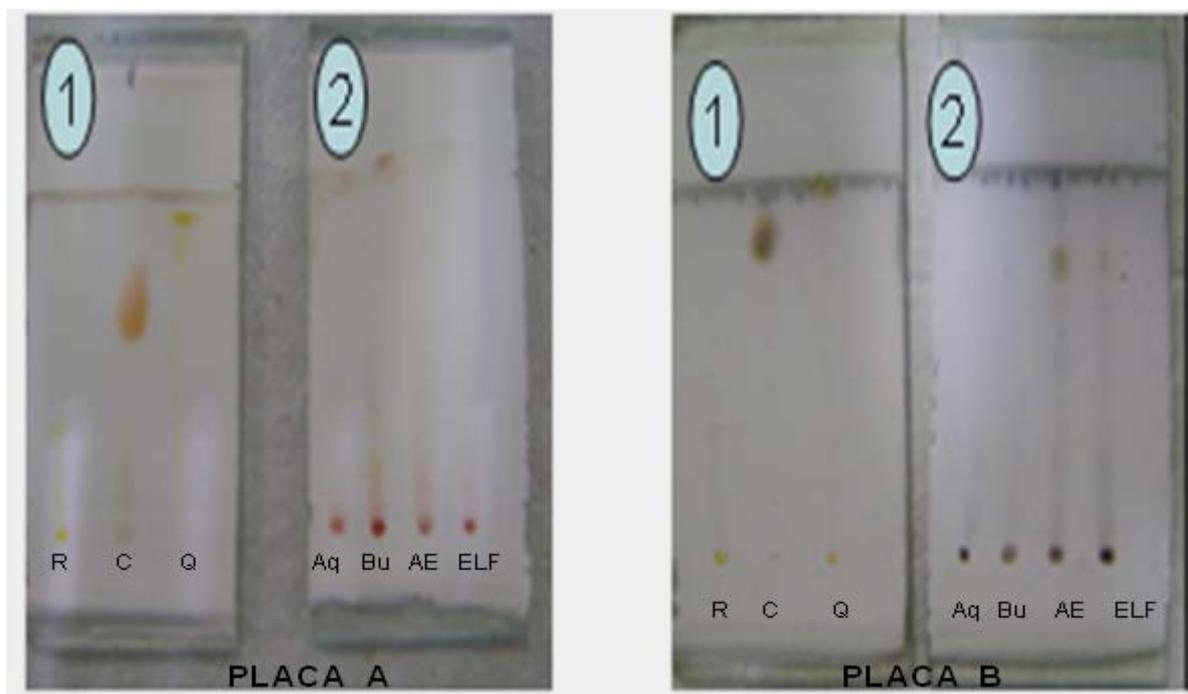


Figura 7 - Cromatografia em camada delgada comparativa – Revelador: Anisaldeído
 PLACA A: Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20) ; PLACA B: Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:6:1:4) ; nº 1 Padrões: R= rutina; C = catequina; Q= quercetina ; nº 2: Amostras: FAq = fração aquosa; FBu = fração butanólica, FAE = fração acetato de etila; EFL = extrato liofilizado da folha

A placa visualizada com anisaldeído mostrou bandas de coloração marron avermelhada nas frações acetato de etila e extrato bruto com R_f mais próximo da catequina. Porém observou-se, material retido no ponto de aplicação. De acordo com Wagner, Bladt e Zgainski (1984) ao pulverizar-se a placa cromatográfica com o revelador anisaldeído e, após aquecimento, podem ser observadas manchas roxas para terpenos, avermelhadas para saponinas e catequinas, marron para taninos e amarelas para flavonóides.

As placas cromatográficas reveladas com solução de cloreto férrico 1% em etanol, mostraram substâncias retidas no ponto de aplicação (Figura 8), enquanto o padrão catequina, na forma de monômeros eluiu satisfatoriamente. As bandas apresentaram coloração escura com cloreto férrico, típica de taninos com ($R_f \sim 0,85$ e $0,87$).

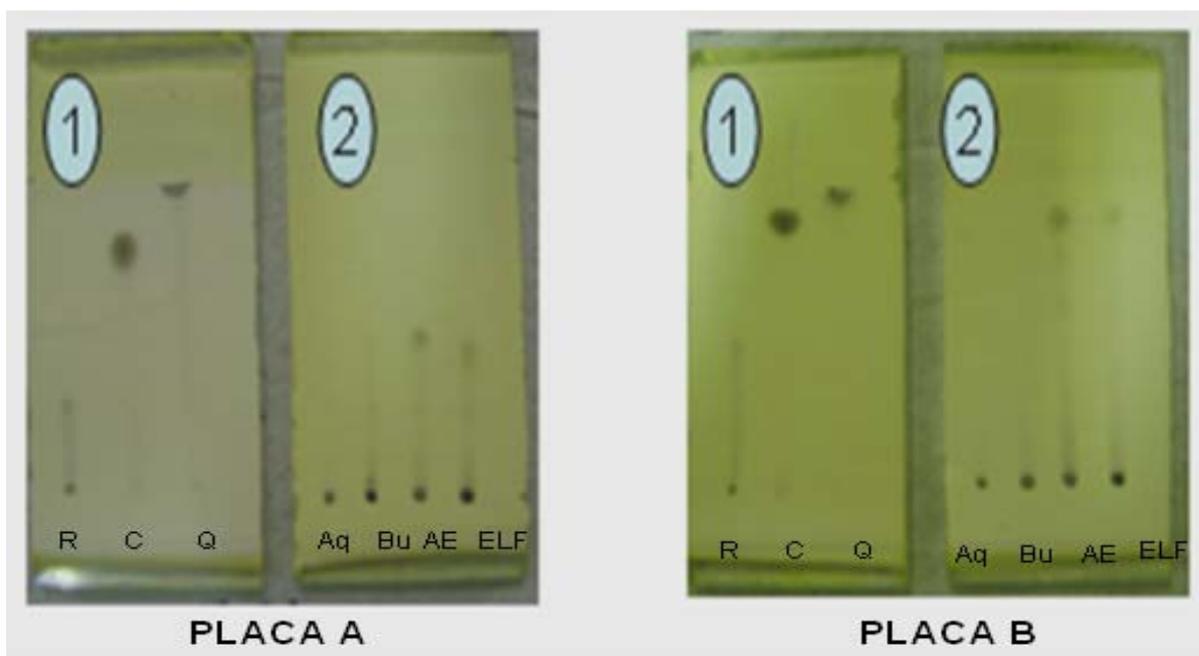


Figura 8 - Cromatografia em camada delgada comparativa – Revelador: Cloreto férrico 1% em etanol. PLACA A: Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20) ; PLACA B: Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:6:1:4) ; nº 1 Padrões: R= rutina; C = catequina; Q= quercetina ; nº 2: Amostras: FAq = fração aquosa; FBu = fração butanólica, FAE = fração acetato de etila; EFL = extrato liofilizado da folha

Pelos cromatogramas apresentados, a substância analisada pertence à classe dos flavonóides, devido à coloração amarelo alaranjado com NP/PEG, sendo que duas substâncias podem estar presentes na fração acetato de etila. Um flavonóide glicosilado e uma flavan-3-ol, tipo catequina.

Inicialmente pensou-se no isolamento e identificação dos compostos orgânicos, utilizando as técnicas tradicionais de isolamento. Empregou-se a técnica de cromatografia em coluna para o isolamento dos constituintes presentes na fração acetato de etila, pois além dos cromatogramas apresentados, esta fração resultou em maiores quantidade de compostos fenólicos totais, entre eles flavonóides, além ter mostrado promissora atividade antioxidante. A cromatografia em coluna foi realizada primeiramente com sílica, porém houve interação entre os componentes, inviabilizando o isolamento. Tentando contornar este problema passou-se a trabalhar com a coluna preenchida com Sephadex LH 20. Este tipo de adsorvente proporciona boa separação de compostos polares, porém resultou na obtenção de frações impuras, não permitindo espectro de RMN satisfatório.

Como as catequinas se polimerizam, epimerizam e oxidam com muita facilidade, o estudo fitoquímico mais aprofundado nos calos e extratos de folhas de *B. intermedia*, seria inviabilizado com a utilização das técnicas tradicionais de

isolamento. Diante dos resultados obtidos com as análises de prospecção fitoquímica e CCD, foi possível observar que as folhas de *Byrsonima intermedia* possuem constituintes polares como taninos, catequinas, flavonóides e seus glicosídeos.

No presente estudo, observou-se que devido às condições que as amostras foram preparadas, a exposição à luz, a permanência nas bancadas de trabalho, o longo período de tempo entre o preparo dos extratos, a liofilização, preparo das frações e dos calos e sua avaliação cromatográfica, que os constituintes polares como as catequinas poderiam estar comprometidas devido à estabilidade, uma vez que se observou que estes constituintes ficaram muito retidos na base, estando este material distribuído ao longo das frações. Este fato acontece devido à polimerização.

Mueller-Harvery (2001) concordam que mesmo utilizando outras técnicas de isolamento, como cromatografia de permeação de gel (GPC) não seria eficiente no isolamento deste tipo de substância. Desta maneira optou-se por analisar as amostras por HPLC-DAD na tentativa de caracterizar os metabólitos secundários presentes, não só na fração acetato de etila, como também fração butanólica, aquosa, extrato liofilizado e calos, comparando com padrões autênticos e dados obtidos na literatura, por ser uma técnica bastante viável e uma alternativa eficiente e rápida, comparada a outros métodos químicos.

O objetivo do presente estudo, não era de obter substâncias inéditas, uma vez que o grupo de pesquisa BIOTA da UNESP já havia caracterizado quali e quantitativamente os metabólitos secundários em extratos de varias espécies do gênero *Byrsonima*, entre eles *B. intermedia* estando presente em comum nas espécies, flavonóides e catequinas (RODRIGUES 2007).

Sannomiya et al. (2005); Hiruma-Lima. (2006); Rinaldo et al. (2006) tem verificado nos estudos realizados que após longas tentativas de obter substâncias ativas, os resultados não revelam substâncias novas, na maioria das vezes já são conhecidas, como flavonóides glicosilados simples contendo uma ou duas unidades de açúcares, alguns terpenos, ácidos fenólicos, derivados do ácido cinâmico e principalmente catequinas.

Com o reconhecimento dos componentes, há possibilidade de uma possível correlação entre composição química e atividade biológica observada, validando a planta como medicinal. Sendo assim, para que se pudesse estabelecer uma possível relação entre a composição química e a atividade biológica observada nas

folhas e frações, a quantificação dos componentes detectados se fazia necessário, tal como foi realizado neste estudo, uma vez o perfil qualitativo não é suficiente para tal correlação; Porém cabe salientar que nem sempre a substância que foi isolada é aquela responsável pela atividade biológica e às vezes não é isolada a substância presente em maior quantidade, mas aquela cujo líquido extrator foi capaz de extraí-la ou ainda aquela cuja metodologia permitiu o seu isolamento (RODRIGUES et al.; 2007).

5.4.2 Perfil cromatográfico dos constituintes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para realização das análises em HPLC, inicialmente foram pesquisados sistemas eluentes descritos na literatura, para uma melhor resolução cromatográfica de catequinas e flavonóides. Os trabalhos relatam que para análise de catequinas normalmente segue-se um gradiente linear, sendo eluente (A) constituído por água milli-q: acetonitrila (1:1) e eluente (B) formado por água milli-q, ambos acidificados com ácido ortofosfórico a pH 3,48 para eluente A e 3,43 para eluente B (REVILLA et al., 2001; TSANOVA-SAVOVA; RIBAROVA, 2002, com modificações). Pelillo et al. (2004) utilizaram misturas ternárias, em que a fase móvel foi composta por: (A) H₂O: MEOH: ácido fórmico (74,7: 25: 0,3; v/v/v); (B) acetonitrila: ácido fórmico (99,7: 0,3; v/v).

Houve tentativas de realizar a separação cromatográfica dos constituintes presentes no ELF, frações e calos de *Byrsonima intermedia* utilizando estes sistemas, porém não houve boa resolução cromatográfica. Talvez a constituição química da espécie em estudo fosse muito diferente daquelas reportadas na literatura, em que a maioria das vezes se avalia catequinas monoméricas, normalmente encontradas em chás verdes ou chás pretos (RODRIGUES et al., 2007) e até em uvas.

Para uma boa resolução cromatográfica, optou-se pela utilização de um gradiente binário, constituído pela mistura de solução metanólica com 0,1% (v/v) de ácido acético (RIBANI; DUTRA, 2010). Para definir a condição cromatográfica, inicialmente utilizou-se soluções contendo os padrões catequina, ácido tânico, rutina,

quercetina, ácido gálico, pirocatecol, obtendo-se assim o perfil cromatográfico dos padrões, que seriam utilizados como base para definir os constituintes de *Byrsonima intermedia*.

O cromatograma da Figura 9 mostra o perfil do extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* (ELF) e o espectro de UV dos picos eluídos. Através das análises por HPLC-DAD, varredura em 270 nm, do ELF pode-se observar três picos, sendo o 1º pico com $t_r = 2,22$; o 2º pico com $t_r = 14,43$ e o 3º pico com $t_r = 17,44$. O espectro de UV, para os picos eluídos no cromatograma, mostra bandas com comprimento de onda em 278 nm e 275 nm.

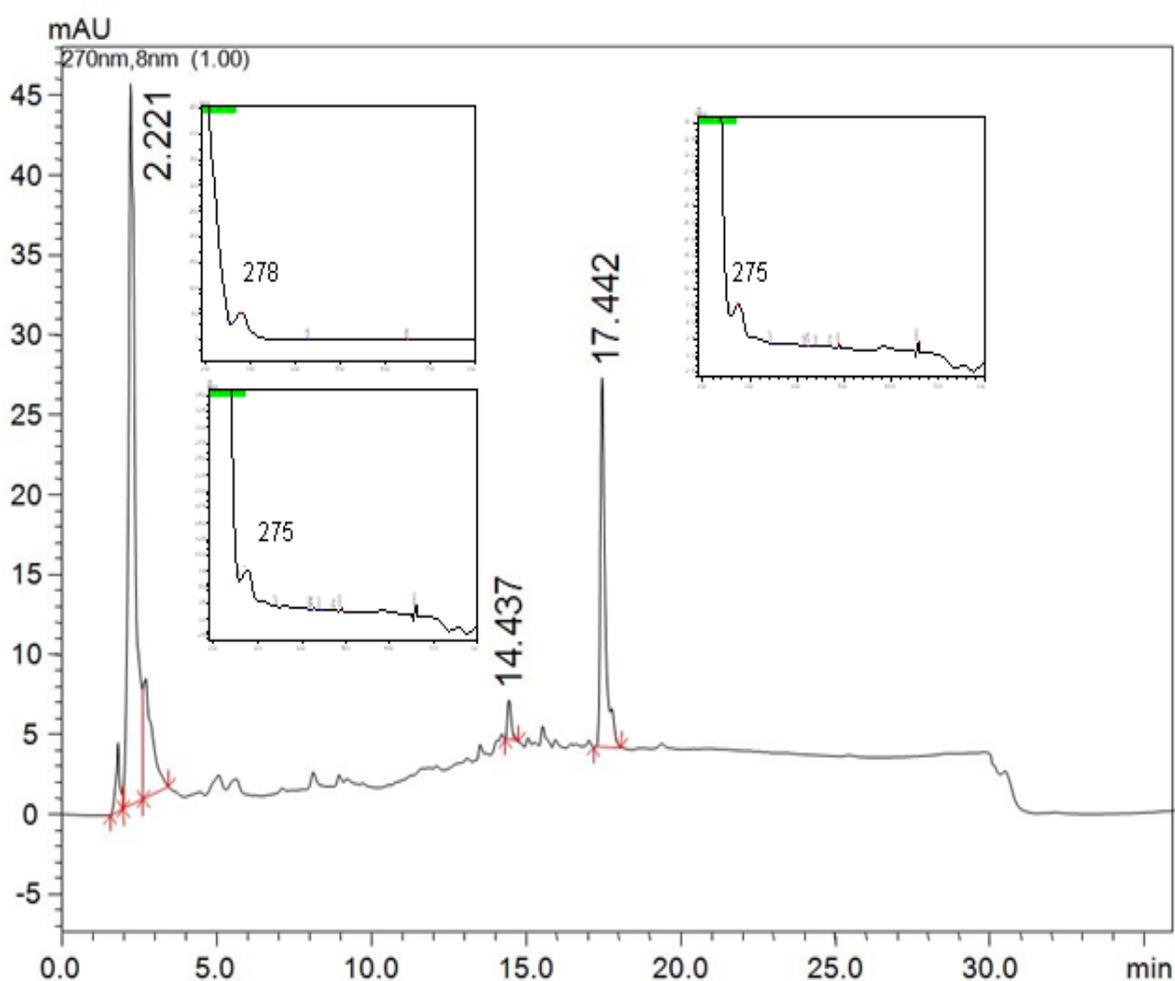


Figura 9 – Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes no extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 mL.min⁻¹, $\lambda = 270$ nm e os espectros no UV das substâncias presentes (para condições de eluição ver tabela 1 pág. 46)

Comparando com o cromatograma obtido com a catequina, padrão Sigma Aldrich, existente em nosso laboratório, monitorada em 270 nm, observa-se tempo de retenção ($t_r = 2,28$) e no espectro UV, banda com comprimento de onda em 280 nm (Figura 10).

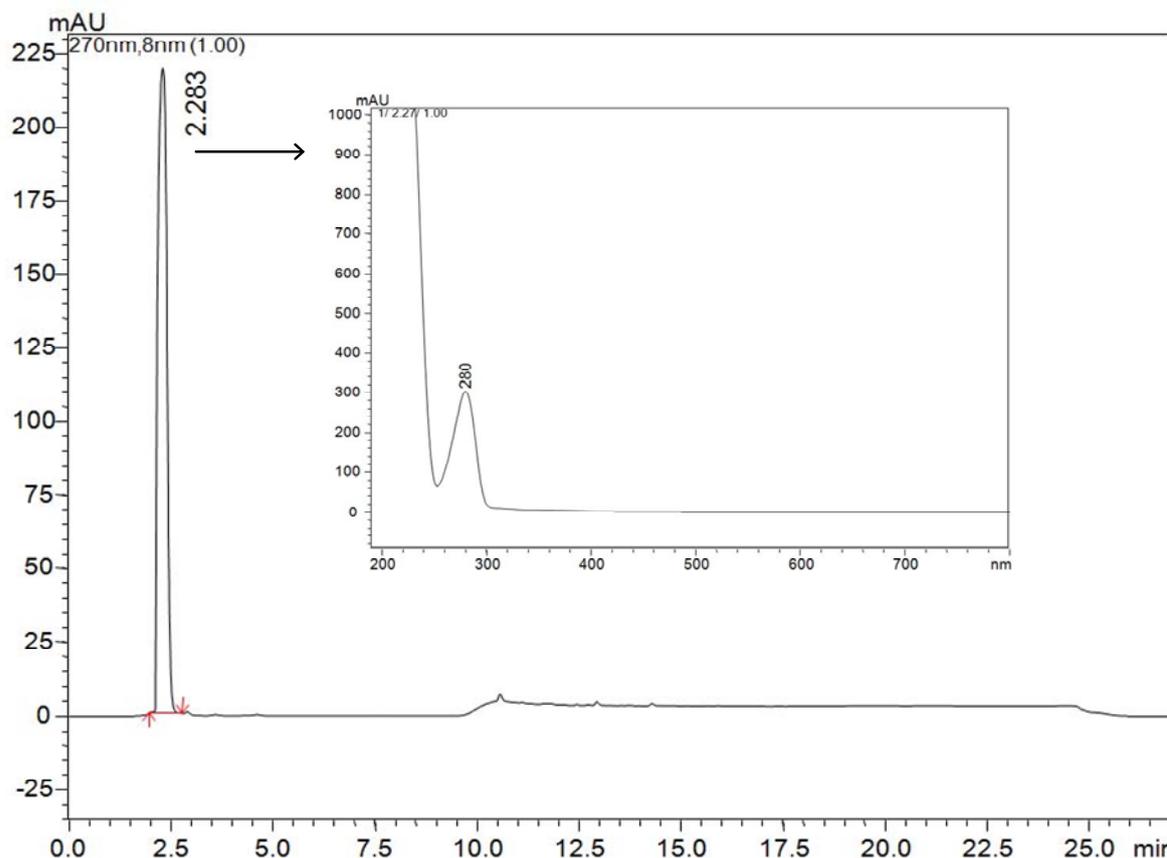


Figura 10 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD do padrão catequina. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 mL.min⁻¹, $\lambda = 270$ nm e os espectros no UV (para condições de eluição ver tabela 1 pág. 46)

Segundo Rohr, Meier, Sticher (2000); Wang e Helliwell (2000) catequinas exibem bandas intensas na faixa espectral de 190-220 nm e bandas fracas em 270-280 nm. Com base no exposto, sugere-se que as catequinas estejam presentes no extrato liofilizado das folhas. Wang e Helliwell (2000) mencionam que os taninos presentes nos extratos podem sofrer polimerização ou transformações químicas como oxidação ou epimerização pela ação de íons metálicos presentes na água e apresentar um perfil bem polar. Os monômeros podem formar dímeros, trímeros, etc. Tendo em vista, que os três picos apresentaram o mesmo espectro, apenas um composto está presente. Pode ser catequina, que uma vez polimerizada, formou catequinas diméricas e triméricas eluindo em tempos diferentes.

Na seqüência, foi realizada a comparação dos perfis cromatográficos das frações acetato de etila (FAE), butanólica (FBu) e aquosa (FAq).

O cromatograma da fração acetato de etila apresentou picos semelhantes àqueles apresentados no extrato liofilizado das folhas, com mesmo tempo de retenção e bandas na faixa espectral de 275 a 280 nm, porém revelou a presença de um constituinte com $t_r = 8,96$ min. Este pico não está presente no extrato liofilizado das folhas e fração butanólica (FIGURA 11).

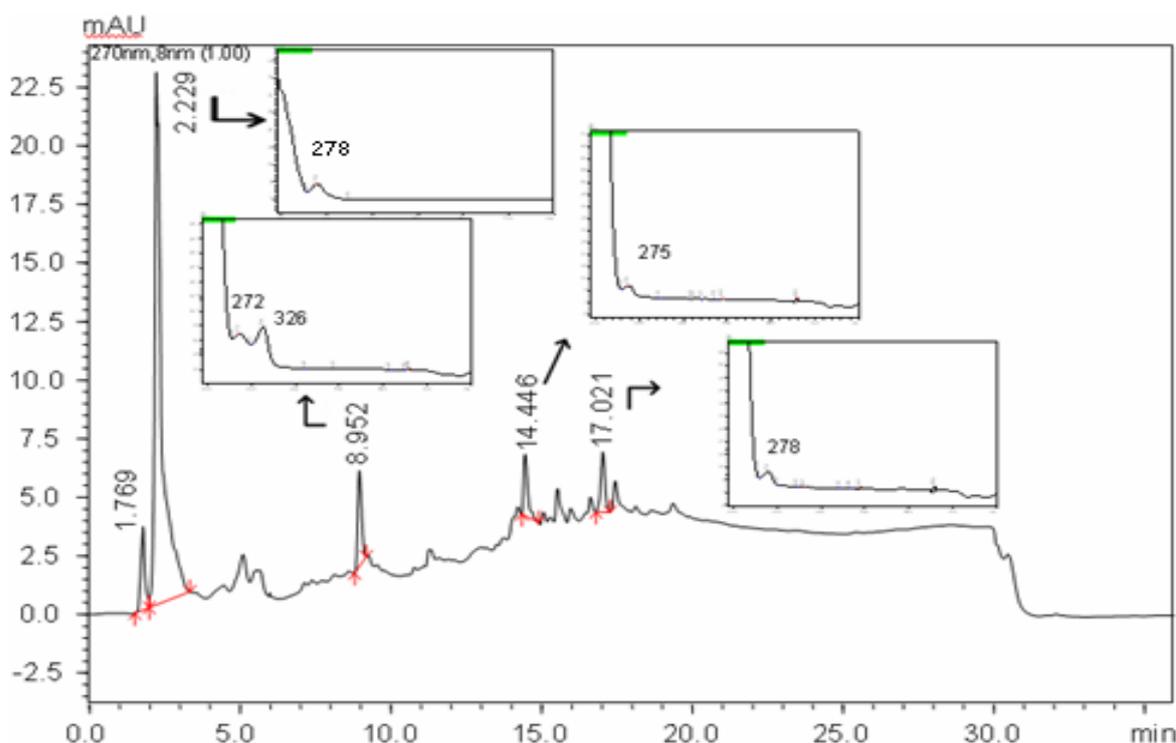


Figura 11 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração acetato de etila obtida das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2mL.min⁻¹, $\lambda = 270$ nm e os espectros no UV (para condições de eluição ver tabela 1 pag 46).

Na Figura 11 ainda podem ser observados os espectros no UV-visível dos picos eluídos no cromatograma da fração acetato de etila. O espectro UV-Visível do composto com tempo de retenção 8,96min, mostra bandas com comprimento de onda em 272 nm e 326 nm. Segundo Merken e Beecher (2000), duas bandas referentes aos anéis A e B do núcleo flavonoídico, compatível com flavonóides. A tabela 8 mostra área dos picos eluídos, podendo inferir presença de catequinas como composto majoritário e um flavonóide na fração acetato de etila.

Tabela 8 - Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração acetato de etila.

Tempo de Retenção	Área	Área%
1.769	34144	6.7527
2.229	384690	76.0798
8.952	35967	7.1131
14.446	26589	5.2584
17.021	24375	4.2584

A fração butanólica (FBu) foi analisada em HPLC-DAD, apresentando perfil flavonoídico semelhante ao extrato bruto, porém um pico em $t_r = 3,33$ min. Este perfil encontra-se na Figura 12. Com auxílio do espectro em UV-visível e em comparação com tempo de retenção e máximo de absorção dos padrões analisados, o 2º pico $t_r = 3,33$ min, apresenta duas bandas, uma em 326 nm e outra em 276 nm e máximo de absorção em 212 nm, compatível com flavonóides. De acordo com Bobin et al. (1994), o espectro de absorção dos flavonóides, apresenta-se tipicamente com dois picos, sendo um entre 240 a 280nm e o outro nos comprimentos de 300 a 550nm.

Os demais picos eluídos no cromatograma da Figura 12, possuem perfil espectral semelhantes àqueles observados nas amostras anteriores, compatíveis com catequinas.

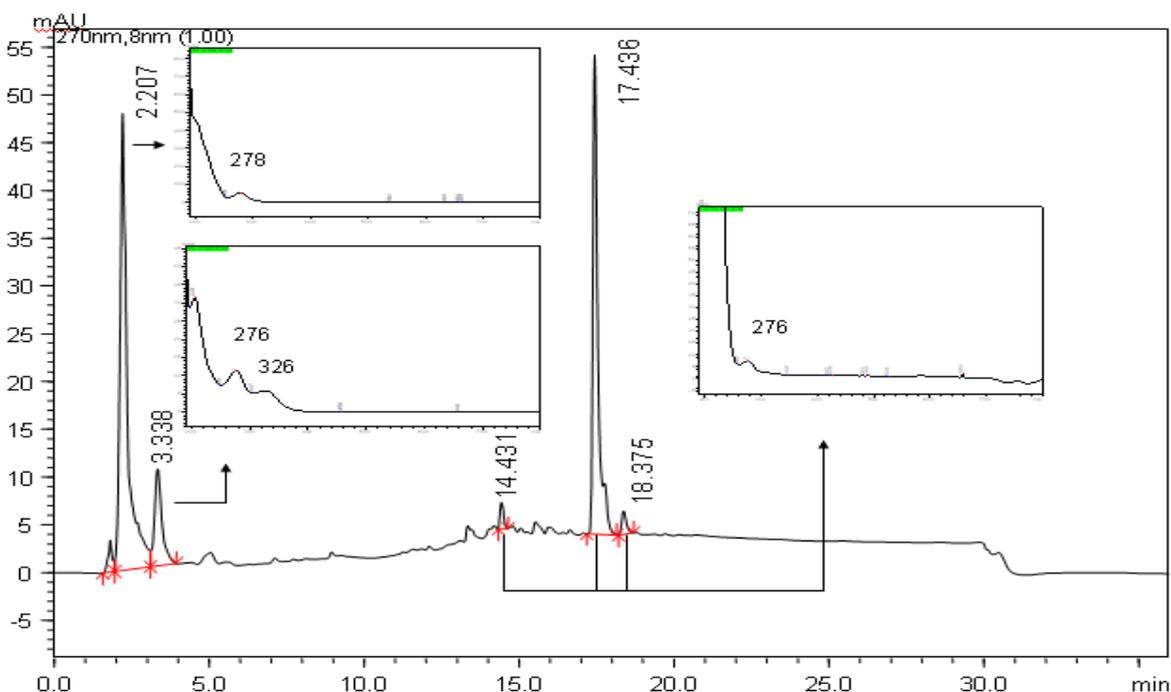


Figura 12 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração butanólica obtida das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2 mL.min⁻¹, $\lambda = 270$ nm e os espectros no UV(para condições de eluição ver tabela 1 pag 46).

Pelo tempo de retenção, máximo de absorção no UV e área dos picos eluídos, sugere-se que na fração butanólica contém um flavonóide, mas as catequinas estão presentes como composto majoritário (tabela 9).

Tabela 9 - Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração butanólica.

Tempo de Retenção	Área	Área%
1.824	31212	1.9354
2.207	789657	48.9660
3.338	172687	10.7082
14.431	22873	1.4183
17.436	570366	35.3680
18.375	25867	1.6040

No presente estudo pôde-se observar que, as catequinas estão presentes no extrato liofilizado das folhas e ao longo das três frações analisadas. A figura 13 mostra um pico $t_r = 8,25$ min presente na fração aquosa, que também está presente na fração acetato de etila $t_r = 8,96$.

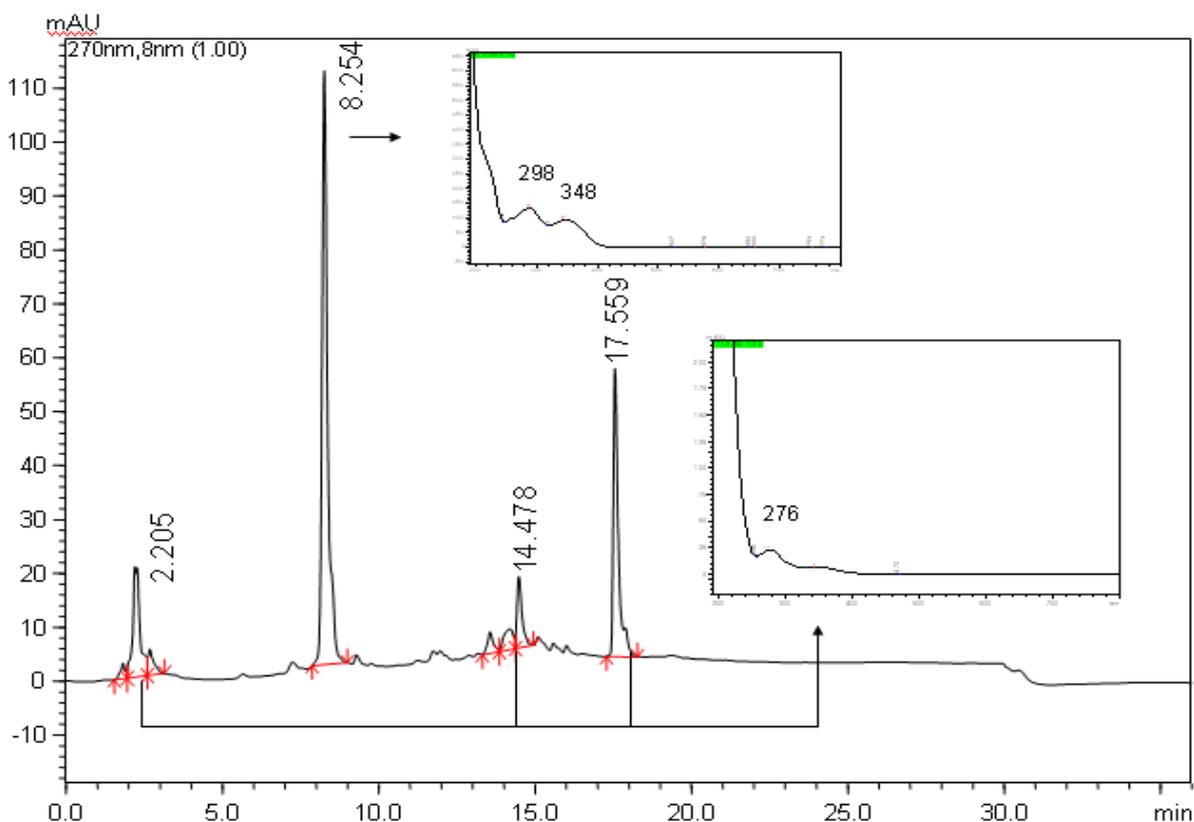


Figura 13 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes na fração aquosa obtida das folhas de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2ml.min⁻¹, $\lambda = 270$ nm (para condições de eluição ver tabela 1 pag 46).

Porém analisando tempo de retenção, espectro de absorção no UV,

comparados com dados na literatura, é um flavonóide. Etapas de purificação, futuramente poderão ser desenvolvidas para obtenção das substâncias ativas e posterior execução de NMR para se chegar a uma proposta estrutural. A área correspondente aos picos eluídos na fração aquosa encontra-se na tabela 10.

Tabela 10 - Tempo de retenção e área dos picos eluídos na fração aquosa.

Tempo de Retenção	Área	Área%
1.824	30413	1.1360
2.205	336570	12.5711
2.688	61943	2.3136
8.254	1369868	51.1652
13.554	51239	1.9138
14.112	82373	3.0767
14.478	150653	5.6270
17.559	594282	22.1967

Observando a porcentagem da área ocupada pelo composto de tempo de retenção 8.254 e comparando com as demais áreas dos picos eluídos nesta fração, pode-se inferir que na fração aquosa a catequina não é o composto majoritário.

Finalmente, o perfil flavonoídico dos calos foi observado em HPLC-DAD, fazendo a varredura na faixa espectral 270 nm, Este perfil pode ser visualizado no cromatograma exibido pelos calos na Figura 14.

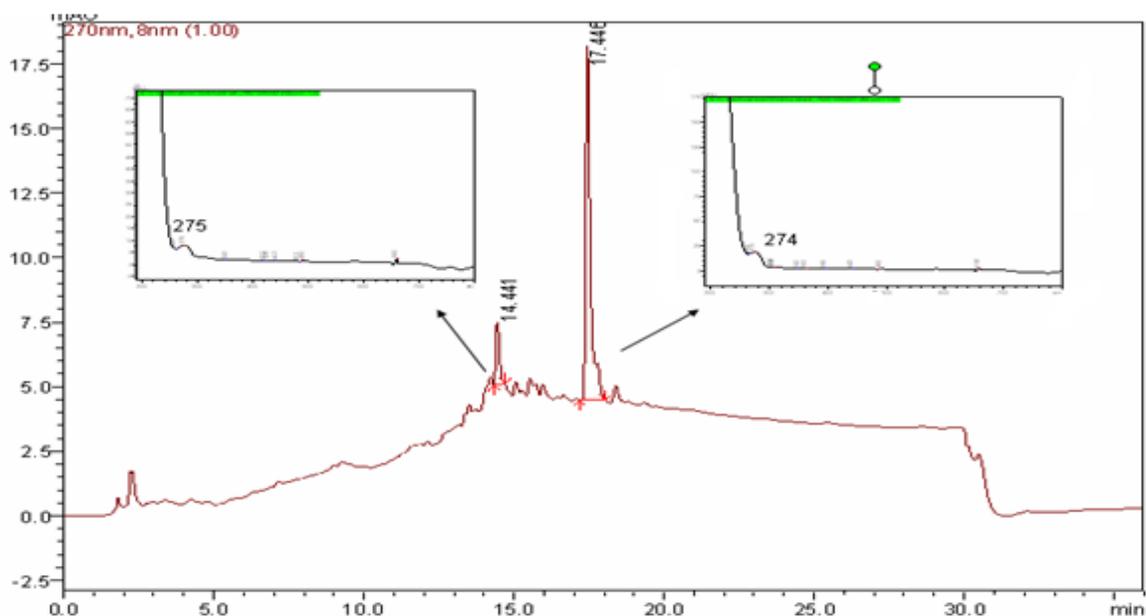


Figura 14 - Separação cromatográfica por HPLC-DAD dos constituintes presentes nos calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia*. Injetor automático SHIMADZU SIL-20A/PROMINENCE; detector SHIMADZU SPD-M20A/PROMINENCE detector de arranjo diodo (DAD); coluna 18 SHIMADZU CLC-ODS(m) de 0,4 x 25 cm; pré-coluna SHIMADZU GVP-ODS 10 x 4,6; fluxo 1,2ml.min⁻¹, λ =270nm (para condições de eluição ver tabela 1 pag 46).

Pelas análises realizadas neste estudo, foi constatado que os calos produzem os mesmos metabólitos secundários presentes nas folhas, possivelmente as catequinas. A área dos picos eluídos, encontra-se na tabela 5.

Tabela 11 - Tempo de retenção e área dos picos eluídos nos calos.

Tempo Retenção	Área	Área%
14.441	21066	11.9732
17.446	154881	88.0268

5.5 ANÁLISES DE AMIDO NOS CALOS.

A Figura 15 mostra os testes realizados para identificação do amido.

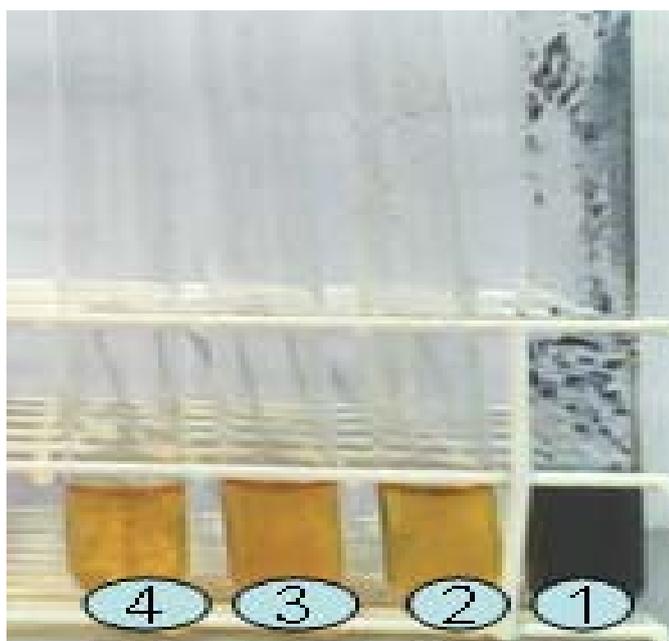


Figura 15 – Identificação de amido através do teste do iodo – Lugol: 1- padrão positivo: amido da batata 2 - amostra de calos sem aquecimento; 3- amostra de calos após aquecimento; 4- padrão negativo: água.

Observa-se que os calos não contêm amido, ou seja, polissacarídeos com cadeia longa, pois a reação com o iodo foi negativa.

O amido, polissacarídeo de extrema importância em alimentos, é produzido em grande quantidade nas folhas dos vegetais como forma de armazenamento dos produtos da fotossíntese, e é constituído por dois outros polissacarídeos

estruturalmente diferentes: amilose e amilopectina (ROMEIRO, 2001).

Cangahuala-Inocente et al., (2004) mencionam em seus estudos, que as células com competência para embriogênese somática apresentam grãos de amido e compostos fenólicos. A presença de compostos fenólicos seria uma característica notável de centros meristemáticos que produzem embriões somáticos para inibir hiper-hidricidade dos tecidos. Neste contexto, nossos estudos com calos, se limitaram em analisar os compostos fenólicos presentes nos calos e identificar ou não a presença de amido.

O amido é um carboidrato complexo. Aquecendo-se grânulos de amido em água, eles aumentam de volume e a amilose se dissolve na água ao passo que a amilopectina permanece insolúvel. Ambos os polissacarídeos são formado de subunidades de glicose, sendo que no caso da amilose, as subunidades se unem através de ligações tipo α -1,4 e, na amilopectina, as ligações glicosídicas são dos tipos α -1,4 e α -1,6 (ROMEIRO, 2001).

Moléculas de alto peso molecular (como a amilose e a amilopectina) podem sofrer reações de complexação, com formação de compostos coloridos. Um exemplo importante é a complexação da amilose e da amilopectina com o iodo, resultando em complexo azul e vermelho-violáceo, respectivamente (CORSINO, 2010).

O mecanismo de ação da α -amilase ainda não está totalmente esclarecido, talvez devido à complexidade do amido, muito variável em função da origem, no que tange a composição, peso molecular, isomeria, conformação molecular, dimensão de cadeia, grau de ramificação, etc. A amilopectina, ao se combinar com o iodo origina uma cor vermelho-violeta, mas, aparentemente, a cor azul que se observa na reação do amido com iodo é atribuível à fração amilose, supondo-se ser ela que absorve o iodo e o posicionamento das moléculas do halogênio no interior da hélice formada pelas subunidades de glucose confere ao complexo uma coloração azul (BLAZEVIC; EDERER, 1975; KADO, 1977; KIRALY et al., 1970), conforme ilustrado na Figura 16.

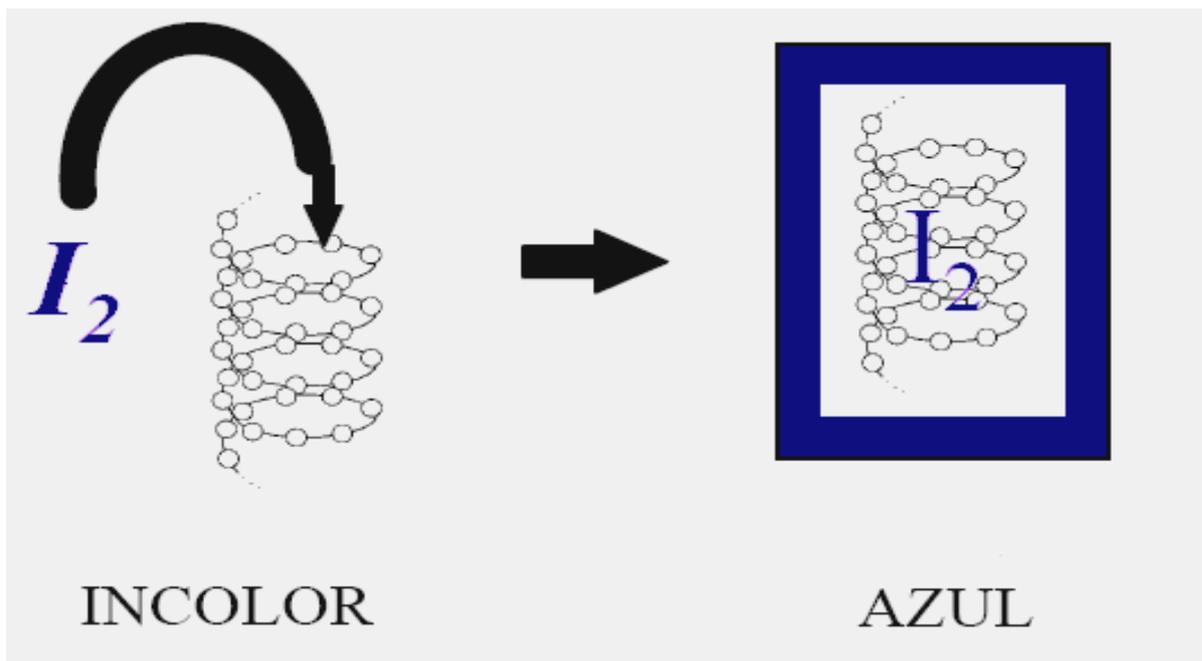


Figura 16 Esquema explicativo de como a inserção do halogênio iodo no interior da estrutura helicoidal da molécula de amilose confere ao conjunto uma coloração azul.

Fonte: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni14.pdf/>

Na presença de iodo, o amido forma um complexo de cor azulada, de composição incerta. Esse complexo se desfaz sob aquecimento, perdendo a cor azul, mas é refeito quando é resfriado. Assim o experimento foi realizado sem aquecimento e com aquecimento. Verificando que em ambos os procedimentos os calos não contém amido.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação preliminar qualitativa do extrato, frações e calos por CCD em gel de sílica, revelada com solução etanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas nas cromatoplaças pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

A figura 17 (A) mostra a revelação autográfica da placa de sílica para o extrato liofilizado das folhas, frações e padrões utilizados para comparação. A figura 17 (B), o ensaio cromatográfico para os calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia*.

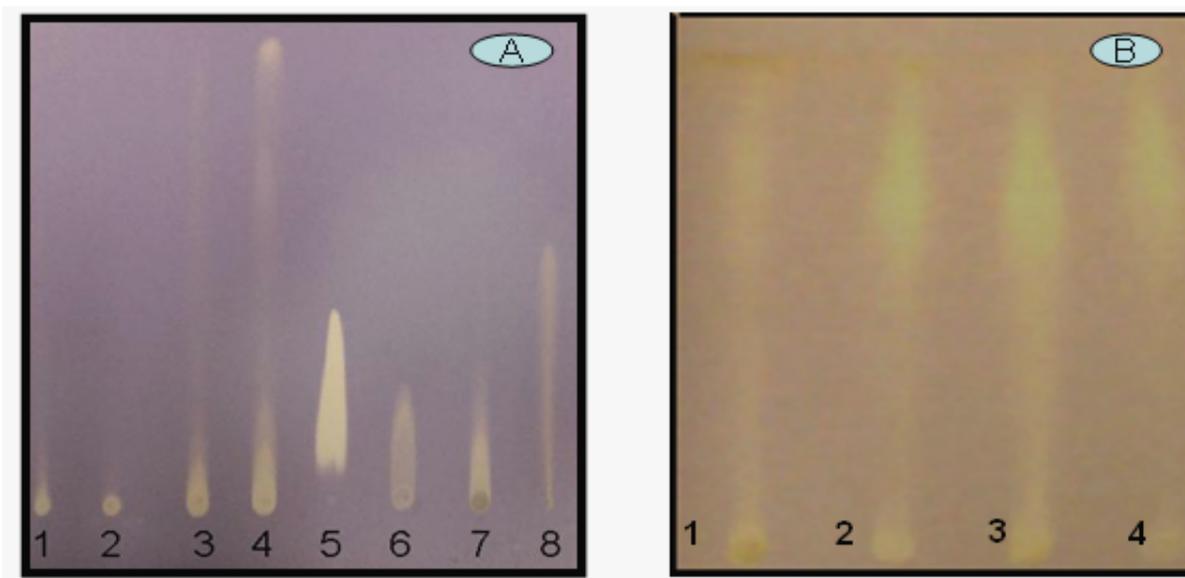


Figura 17 - Cromatografia em Camada Delgada. (A) 1 - Extrato liofilizado da folha; 2 - Fração aquosa; 3- Fração butanólica; 4 - Fração Acetato de etila; 5 - Ácido ascórbico; 6 - Ácido gálico; 7 - Ácido tânico; 8 - Rutina. (B) 1- 1º subcultivo calo marron; 2- 1º subcultivo calo amarelo; 3- 2º subcultivo calo marron; 4- 3º subcultivo calo marron.

Como critério de avaliação da atividade antioxidante do extrato e frações obtidos da folha de *Byrsonima intermedia* foram realizados, o teste da capacidade seqüestrante de DPPH e o teste do poder redutor. Segundo Arnao (2000), entre os testes que utilizam compostos cromógenos para avaliar a capacidade antioxidante, o DPPH é muito utilizado, pois possui excelente estabilidade.

5.6.1 Avaliação do poder seqüestrante de radicais DPPH

Os testes foram realizados com o extrato liofilizado da folha (ELF), fração acetato etílica (FAE), fração butanólica (Fbu), fração aquosa (FAq), o padrão (ácido ascórbico – AA), em 7 concentrações (100, 50 ,25 ,12,5,6,25 ,3,125 ,1,56 ppm), e o branco. Amostras de calos liofilizados foram analisadas somente por cromatografia em camada delgada.

O radical livre DPPH é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio etanólico e sua solução possui coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO, 2000). Nesse ensaio à medida que o radical DPPH sofre redução pelos componentes presentes

na solução teste, observa-se a mudança de coloração violeta intensa original da solução para amarela, cuja intensidade é proporcional a concentração da substância com potencial antioxidante presente (BLOIS,1958).

Podem-se expressar os resultados como a capacidade de reduzir o radical DPPH, em porcentagem e pelo valor de IC₅₀ (CHOI et al. 2002).

Na figura 18 encontra-se os resultados obtidos quanto à capacidade sequestrante de DPPH, em diferentes concentrações no extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* e suas frações.

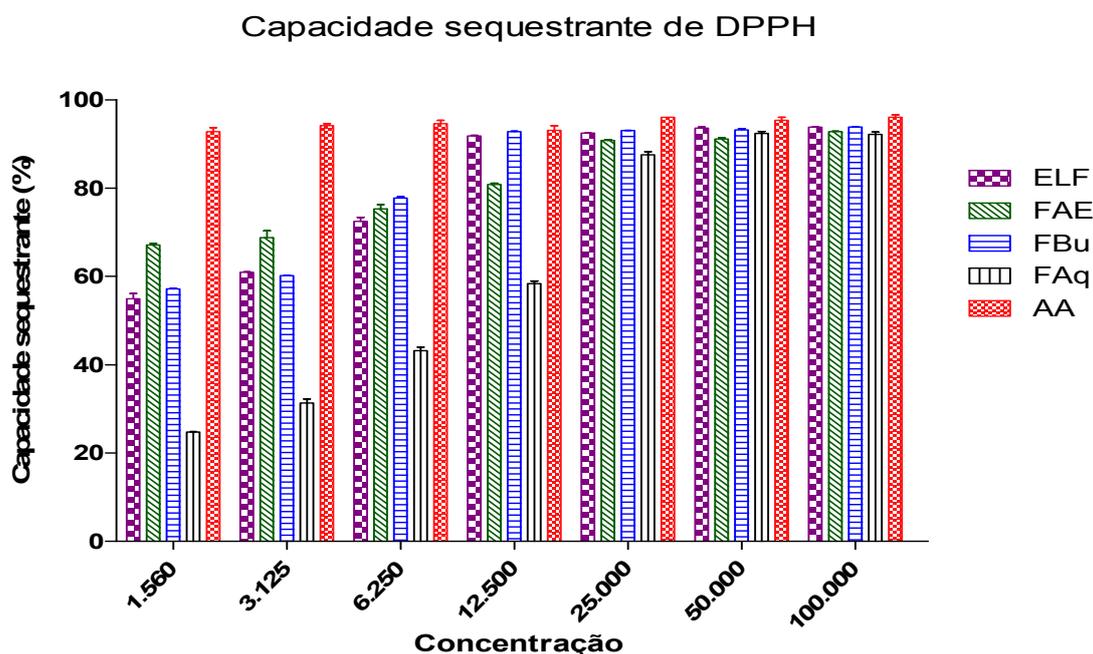


Figura 18 - Capacidade sequestrante de DPPH, em diferentes concentrações no extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia*, frações e o padrão ácido ascórbico.

Neste estudo foi encontrado concentrações de 93,86%, 92,76% de inibição do DPPH na concentração de 100µg/mL, para as frações butanólica e acetato de etila respectivamente. O extrato liofilizado apresentou perfil semelhante às frações citadas. Extrato e frações possuem perfil semelhante em 100µg/mL e 50µg/mL.

Com exceção da fração aquosa, as amostras apresentaram uma atividade rápida e forte, uma vez que, na menor concentração (1,56 ppm) foi significativa essa atividade, representando 54,93% de inibição para ELF, 57,20% de inibição para a FBu e 67,10% para FAE, o que não ocorreu com a fração aquosa, que na menor concentração apresentou uma inibição de 24,57%. Segundo Tseng et al. (1997) é nas frações que apresentam compostos com propriedades polares que se verificam maiores porcentagens de inibição do radical DPPH. Tseng et al., 1997, ao avaliar a

atividade antioxidante em extratos de folhas de *Hibiscos sabdariffa*, pelo método (DPPH), e testando amostras de várias polaridades constatou que a fração acetato de etila apresentava maior porcentagem no índice de inibição. Estudos realizados com variedades de frutos de *Eugenia uniflora L.* (pitanga), pertencente à família Myrtaceae foi observado elevado potencial antioxidante nas variedades com elevados teores de fenólicos (LIMA, V. L. A.; MÉLO; LIMA, D. E. S., 2002).

Tendo em vista a atividade antioxidante demonstrada no extrato ELF e nas frações, o IC₅₀ (índice que descreve a concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%), foi calculado por regressão linear para as amostras e para o ácido ascórbico utilizado como padrão. Esse ensaio muitas vezes é usado como parâmetro para avaliar o poder antioxidante de extratos de plantas *in vitro*, e pode ser relacionados a compostos fenólicos e flavonóides presentes (RICE-EVANS et al., 1996). Sendo assim, foi realizada a comparação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante, demonstrados na tabela 12.

Tabela 12 - Teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos totais e IC₅₀ no extrato liofilizado das folhas e frações acetato de etila, butanólica e aquosa de *Byrsonima intermedia*.

Extrato/Frações	Fenólicos (mg AG/g AM)	Flavonóides (mg Querc/g AM)	Taninos (mg AT/g AM)	IC ₅₀ (ppm)
ELF	67,54± 1,3	42,60 ±0,65	2,48 ±0,18	1,42
FAE	73,91 ±0,53	60,83 ±0,13	0,18 ±0,13	1,16
FBu	64,53 ±0,64	29,20 ±0,07	0,94 ±0,01	1,36
FAq	58,46±0,14	24,40 ±0,19	1,93± 0,01	3,15

IC₅₀ = índice que descreve a concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%

Vários trabalhos mostram a maior potência nos extratos de fração butanólica e acetato de etila em testes de atividade antioxidante (TSENG et al.; 1997), como o observado neste estudo.

Os resultados obtidos com ELF e frações acetato de etila, butanólica e aquosa mostraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado na fração acetato de etila, o que explicaria a elevada atividade antioxidante demonstrada pelo IC₅₀ em baixas concentrações. Os resultados indicam que a concentração destes compostos foi FAE > ELF > FBu > FAq. É bem documentada a concentração superior de fenólicos nas (FAE) e (FBu), quando os extratos são fracionados com solventes de polaridade crescente (WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, 1964).

Diversos estudos realizados com extratos de planta descrevem uma correlação positiva entre conteúdos fenólicos e atividade antioxidante usando DPPH e Folin-Ciocalteu para as análises (TUNG et al., 2007; WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, 1964; SHYAMALA et al., 2005). No presente estudo, também foi possível estabelecer uma correlação positiva entre compostos fenólicos das frações com a atividade antioxidante destas.

Essa relação pode ser explicada pelo fato de que as substâncias com núcleo fenólico, como taninos e flavonóides, apresentam destaque especial como antioxidantes, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica, com isso estes compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase in vitro (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; NAHAR; SARKER, 2005; DELAZAR et al., 2005).

As amostras evidenciaram uma menor capacidade de retirada do radical em relação ao padrão utilizado – ácido ascórbico, cuja atividade antioxidante é bastante documentada, e que apresentou um IC₅₀ de 0,84 ppm. Entre elas, o que apresentou melhor atividade na menor concentração foi à fração acetato de etila, porém esta fração não apresentou diferença significativa relativamente ao extrato bruto e à fração butanólica. Os baixos valores de IC₅₀ evidenciados no extrato bruto e nas (FBu) e (FAE) de *Byrsonima intermedia*, sugerem a presença de compostos com forte atividade antioxidante. A presença de catequinas nas amostras analisadas comprova o elevado poder antioxidante desta espécie. Elas são as substâncias que mais protegem o organismo humano contra formação de radicais livres, logo estas substâncias podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos ou pode ainda estar correlacionada a capacidade antimutagênica e retardo do envelhecimento nos humanos (HASLAN, 1996; SOUZA et al., 2007; WANG; LEE, 1996).

As comparações entre a atividade de retirada do radical DPPH demonstrada pelos padrões e amostras foram realizadas pelo método Tukey (TABELA 13).

Observou-se pelo método de Tukey, que as concentrações de 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm são estatisticamente iguais. Isto significa que aumentando a concentração, a atividade antioxidante permanece a mesma. A atividade antioxidante é maior nas menores concentrações. Não adianta aumentar a

concentração, pois em doses menores terá a mesma atividade. Para as amostras que apresentaram letra (a) com números diferentes, podemos falar em dose resposta ou dose dependente, ou seja, quanto menor a dose maior a atividade.

Tabela 13 - Capacidade sequestrante média de radicais DPPH e desvio padrão das amostras obtido das folhas de *Byrsonima intermedia* e ácido ascórbico utilizado como padrão.

Capacidade sequestrante de radical DPPH (%)							
Amostra	1,56 ppm	3,25 ppm	6,25 ppm	12,5 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
ELF	54,95 ± 1,32 a ₁	60,93 ± 0,24 a ₂	72,49 ± 0,53 a ₃	91,80 ± 0,62 a ₄	92,42 ± 0,53 a ₄	93,56 ± 0,87 a ₄	93,78 ± 0,95 a ₄
FAE	67,12 ± 0,78 a ₁	68,76 ± 0,50 a ₁	75,29 ± 0,45 a ₂	80,77 ± 0,23 a ₃	90,78 ± 0,1 a ₄	91,13 ± 0,62 a ₄	92,78 ± 0,53 a ₄
FBU	57,17 ± 0,93 a ₁	60,18 ± 0,92 a ₂	77,77 ± 0,65 a ₃	92,75 ± 0,32 a ₄	93,03 ± 0,42 a ₄	93,19 ± 0,21 a ₄ a ₅	93,32 ± 0,31 a ₅
FAq	24,77 ± 0,96 a ₁	31,33 ± 0,65 a ₂	43,19 ± 0,42 a ₃	58,34 ± 0,51 a ₄	87,51 ± 0,10 a ₅	92,37 ± 0,31 a ₆	92,78 ± 0,44 a ₆
AA	93,12 ± 0,86 a ₁	93,72 ± 0,45 a ₂	93,89 ± 0,32 a ₂	94,06 ± 0,18 a ₂	96,0 ± 0,15 a ₃	96,0 ± 0,10 a ₃	96,0 ± 0,09 a ₃

Médias seguidas por letra (a) e números diferentes diferem entre si pelo teste de tukey em 5% de probabilidade de erro. ELF = extrato liofilizado FAE = fração acetato de etila FBU = fração butanólica FAq = fração aquosa AA = ácido ascórbico.

Normalmente a capacidade antioxidante dos flavonóides é determinada pela sua estrutura, principalmente devido à presença de anéis aromáticos, que permitem o suporte de um elétron desemparelhado como resultado da deslocalização do sistema eletrônico. A presença de grupos hidroxila é outro aspecto determinante na estrutura dos flavonóides. Vários estudos têm relatado que flavanóis (catequina e epicatequina) e as proantocianidinas exibem um elevado poder antiradicalar. No entanto, esta propriedade biológica depende do tamanho da molécula: monómeros e dímeros de flavanóis apresentam uma maior eficiência biológica, enquanto que os compostos mais polimerizados possuem um menor potencial antiradicalar (BOLIGONI et al., 2009).

Os resultados encontrados neste estudo indicam que esta espécie possui catequinas que são capazes de capturarem radicais livres, e assim sendo são compostos promissores na busca de fármacos antioxidantes que previnem doenças decorrentes do estresse oxidativo. No entanto, o teste do DPPH não permite uma precisa definição dos efeitos antioxidantes por se tratar de uma metodologia *in vitro* (URSINI et al., 1994). Sabendo-se que a atividade de extratos de plantas não pode ser avaliada somente por um método (CHOI et al., 2002), torna-se necessário um estudo *in vivo* para determinar se esta planta medicinal poderá ser utilizada industrialmente.

5.6.2 Avaliação do poder redutor dos constituintes químicos

O teste de avaliação do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3), forma o azul da Prússia (SANTOS et al. 2007). A redução é dada tomando-se o ácido ascórbico como 100%. As médias dos valores obtidos na análise do poder redutor do extrato liofilizado de folhas e frações de *Byrsonima intermedia* amostradas estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14: Média e desvio padrão do poder redutor do extrato e frações obtidas das folhas de *Byrsonima intermedia*

Amostra	Formação do complexo azul da prússia (Absorbância)			
	Concentração (ppm)			
	200	100	50	25
Extrato bruto	1,227±0,005 a ₄	0,698±0,014 a ₃	0,404±0,003 a ₂	0,225±0,006 a ₁
Fr. Acetato etílico	1,138±0,007 a ₂	1,193±0,003 a ₂	0,476±0,004 a ₁	0,284±0,003 a ₁
Fr. butanólica	1,448±0,008 a ₄	0,863±0,002 a ₃	0,483±0,006 a ₂	0,253±0,007 a ₁
Fr. Aquosa	0,257±0,038 a ₂	0,165±0,011 a ₁	0,105±0,031 a ₁	0,082±0,011 a ₁
Ácido ascórbico	5,000±0,007 a ₃	2,244±0,061 a ₂	0,813±0,041 a ₁	0,235±0,009 a ₁

Médias seguidas por letra (a) e números diferentes diferem entre si pelo teste de tukey em 5% de probabilidade de erro. São estatisticamente diferentes. Letra (a) em vermelha melhor atividade redutora.

O poder redutor dos compostos pode ser expresso através da absorbância do complexo formado; uma vez que, quanto maior a absorbância maior será a concentração do Azul da Prússia formado, conseqüentemente maior será o poder redutor do composto.

Os dados da Tabela 14 e da Fig.19 mostram uma significativa formação do complexo para o padrão, em relação ao ELF e frações nas concentrações indicadas. A 200 ppm nota-se que a atividade redutora foi melhor para ELF, FBu, FAq e mesmo o padrão. Porém, a FAE não mostrou diferença estatisticamente significativa em 200 e 100 ppm, indicando que bons resultados são encontrados em 100 ppm. A fração acetato de etila neste estudo mostrou-se como principal fonte de compostos fenólicos, nota-se neste teste uma correlação positiva de atividade redutora. Já com relação à FAq, observou que o poder redutor é menor.

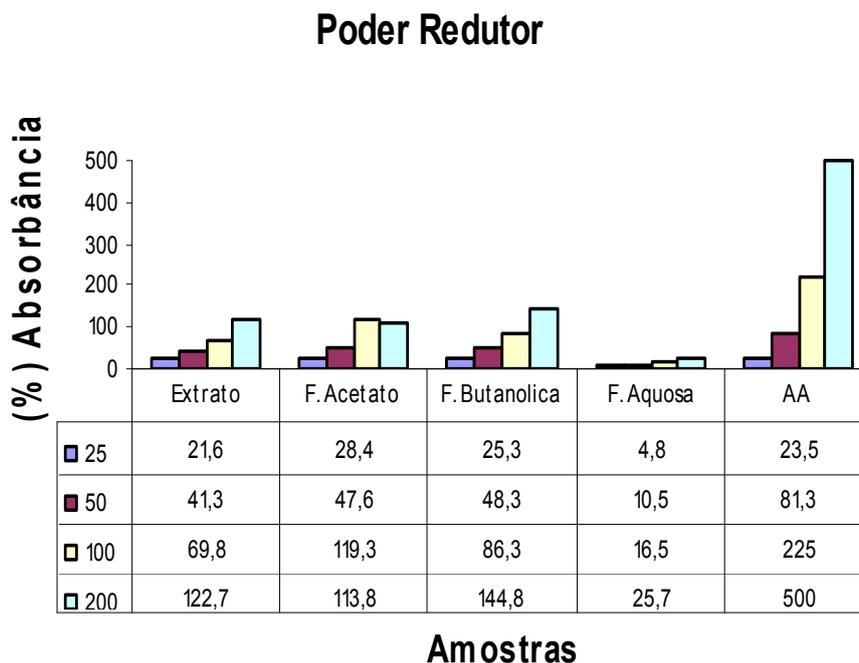


Figura 19: Poder redutor do extrato liofilizado das folhas de *Byrsonima intermedia* e suas frações.

Tal como se verificou para a capacidade antiradicalar, seria de esperar que na fração onde se concentre moléculas de maior complexidade estrutural, ou fração onde houve maior polimerização das catequinas, houvesse uma diminuição do poder redutor, ou de qualquer outra atividade biológica. Os polifenóis têm a capacidade de quelar íons metálicos ao nível do grupo *orto*-catecol. Com o aumento da complexidade estrutural, cada vez é mais difícil o acesso a este grupo, o que se reflete na perda gradual de capacidade de complexação de íons metálicos (GAULEJAC et al., 1999). Foi observado que a catequina está presente em todas as amostras. Levando-se em consideração que ela apresenta instabilidade química, podendo sofrer transformações químicas, como oxidação, epimerização pela ação dos íons presentes na água, seria de esperar que na fração aquosa as catequinas estariam comprometidas, pois foram extraídas com água. Polimerização, epimerização e oxidação são fatores importantes, quando se pensa em atividade biológica.

Stach e Schmitz (2001) observaram um decréscimo de até 21% na concentração de catequinas em chá verde. Neste aspecto, cuidados devem ser tomados para proteger amostras e padrões, visto que o desenvolvimento de uma

análise depende da estabilidade da substância analisada. Estes problemas podem ter alterado a atividade redutora, não só da fração aquosa, como das outras amostras analisadas.

5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.7.1 Atividade antiedematogênica

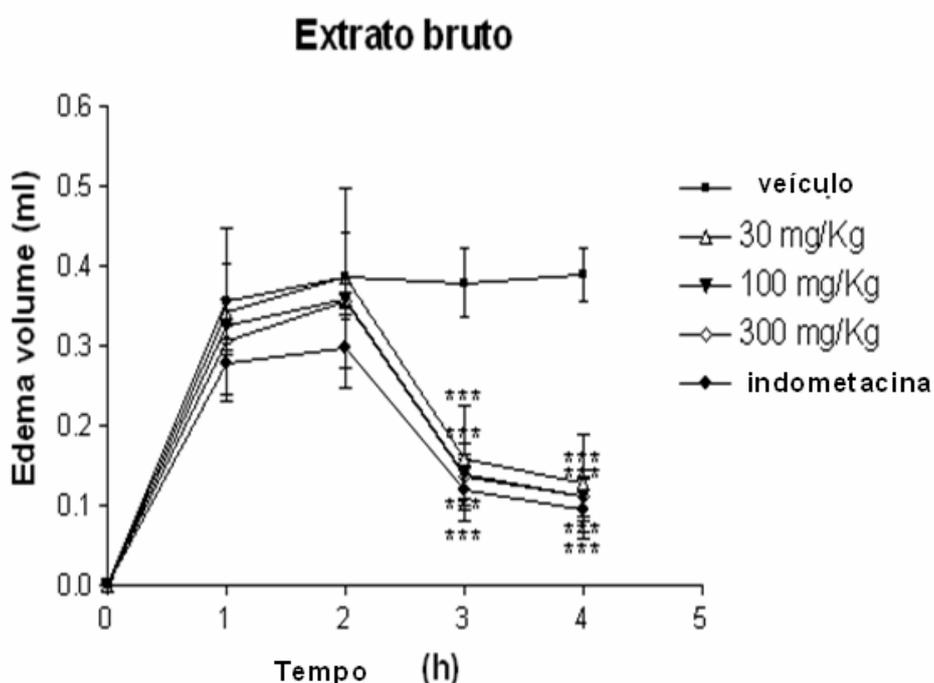


Figura 20 - Atividade antiinflamatória do extrato bruto liofilizado (ELF) das folhas de *Byrsonima intermedia* no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 20 mostra que o ELF inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina 3 horas e 4 horas após sua administração. Os valores de inibição do edema 3 horas pós-carragenina foram de 58%, 64,10% nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg, respectivamente e 4 horas após, valores de inibição de 60,42%, 71,79% respectivamente. Indometacina (10 mg/kg) inibiu 69,23% 3 horas após e 75,64% 4 horas depois. Nota-se que a dose de 100 mg/kg é suficiente para inibir o edema de pata em relação ao controle. O aumento na dose para 300 mg/kg não resultou em maiores valores de inibição.

Os resultados dos testes de edema de pata induzido por carragenina (1%

i.pl.) com a administração das frações acetato de etila, butanólica e aquosa nas doses de 10, 30, 100 mg/kg (v.o) e indometacina (dose 10 mg/kg v.o) como controle positivo podem ser verificados nas figuras abaixo.

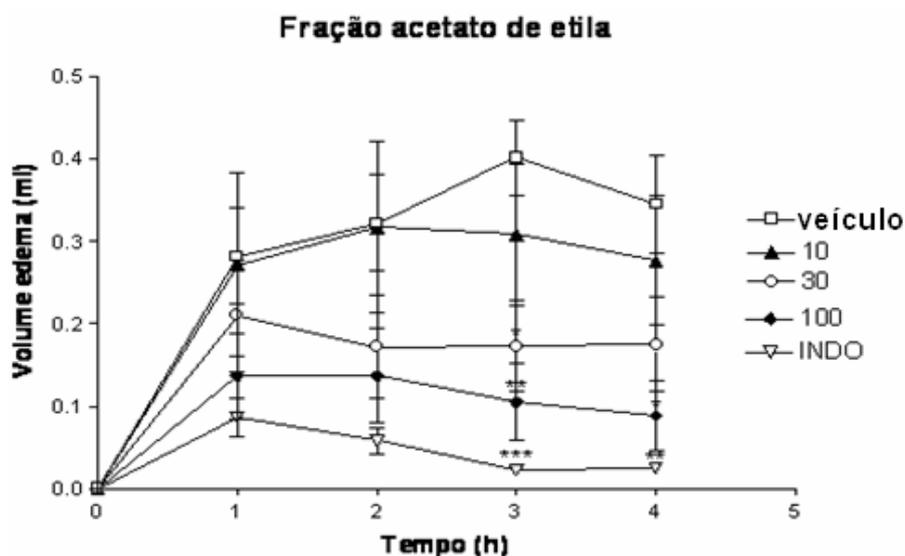


Figura 21 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração acetato de etila obtida das folhas de *Byrsonima intermedia* (FAE) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A fração acetato de etila, nas doses de 30 e 100 mg/kg reduziram o volume do edema de pata quando comparado com o grupo controle, assim como a indometacina. A partir da 3ª hora a redução se tornou mais acentuada, inibindo 57,5 % e 72,5 % respectivamente, enquanto indometacina inibiu 95,0 % (Figura 20).

A Figura 22 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (1%; i.pl.) com a fração butanólica.

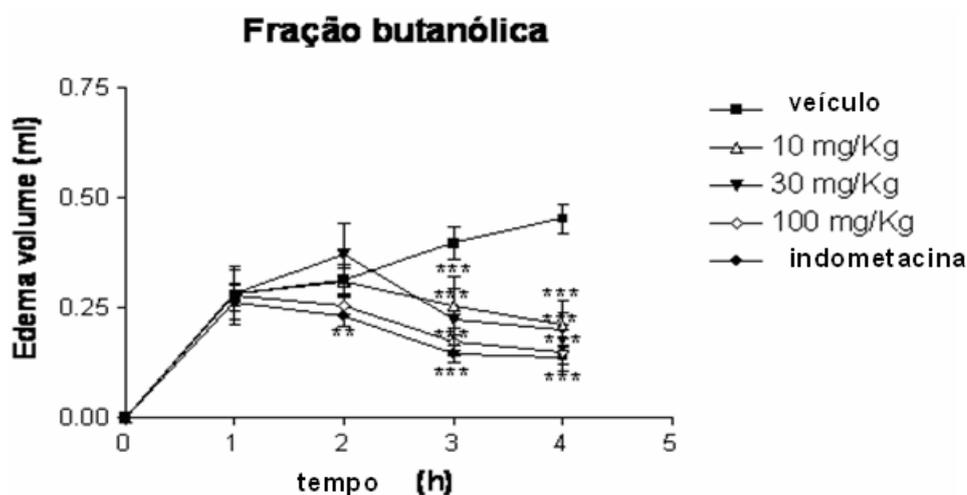


Figura 22 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica obtida das folhas de *Byrsonima intermedia* (FBu) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle .

A fração butanólica inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina 3 horas e 4 horas após sua administração. O valor de inibição a partir da 3ª hora foi de 37,5%, 40,0% e 57,5% nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg respectivamente, enquanto indometacina resultou em inibição de 65%. A partir da 4ª hora não foi observado valores de inibição muito acima daqueles observados na 3ª hora. Estes valores foram de 46,66%, 44,44% 66,66% e 68,88% para as doses de 10, 30 e 100 mg/kg e indometacina (10 mg/kg) respectivamente.

A figura 23 apresenta os resultados obtidos no teste edema de pata utilizando a fração aquosa.

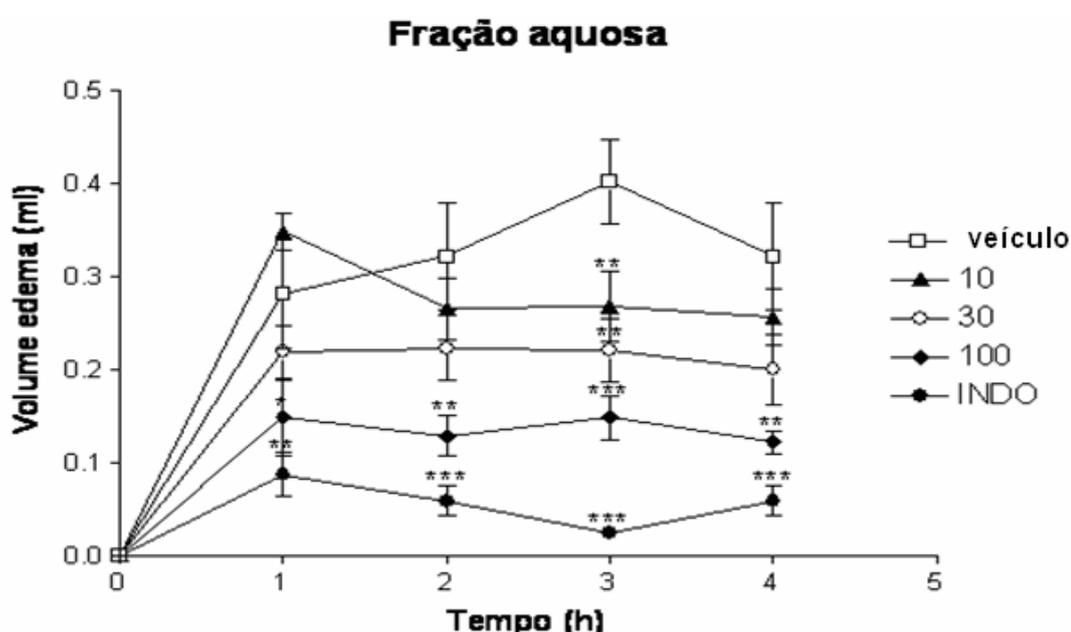


Figura 23 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração aquosa (FAq) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle.

Nos testes de edema de pata induzidos por carragenina (1%; i.pl.) com a fração aquosa obtida das folhas de *B. intermedia* (FAq; 10, 30 e 100 mg/kg; v.o.), usando indometacina (D; 10mg/kg; v.o.) como controle positivo, foi observado que nas doses de 10 e 30 mg/Kg, houve redução do volume de edema 3 horas e 4 horas após a injeção de carragenina. A dose de 100 mg/kg foi significativa nas 4 horas, diminuindo a formação do edema.

5.7.2. Crescimento de tecido granulomatoso induzido por implante subcutâneo de pellets de algodão em ratos

No modelo de inflamação crônica, usando pellets de algodão para induzir o crescimento de tecido fibrovascular em ratos, o ELF inibiu significativamente a formação do tecido granulomatoso. Neste modelo, as doses de 30, 100 e 300 mg/kg de ELF produziram 44,98, 45,28 e 58,00 % respectivamente, de inibição no peso do granuloma, enquanto dexametasona produziu 60,28% de inibição (Figura 24).

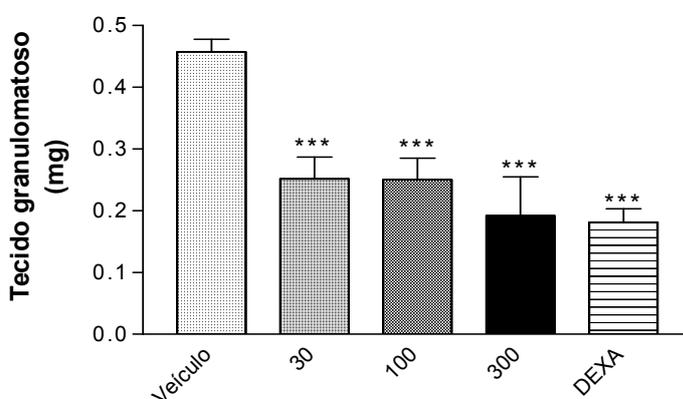


Figura 24 - Efeito do ELF de *Byrsonima intermedia* na formação de granuloma em animais tratados com 30, 100 e 300 mg/kg de extrato liofilizado, com dexametasona ou CMC (1%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Além do ELF, foram avaliadas neste modelo, a fração acetato de etila, fração butanólica e fração aquosa. A figura 25 apresenta os resultados obtidos com a fração acetato de etila no modelo indução de tecido granulomatoso. A fração acetato de etila nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg reduziram a formação do tecido granulomatoso em 42,33%, 45,18% e 50,58% respectivamente, porém a dose de 100 mg/kg foi a que mais se assemelhou ao efeito da dexametasona que apresentou 55,44% de inibição.

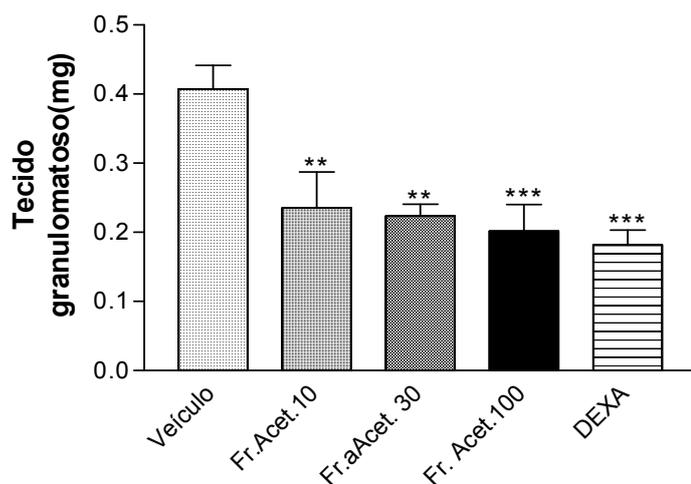


Figura 25 - Efeito da Fração acetato de etila obtido das folhas de *Byrsonima intermedia* na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). ** $p < 0.01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 26 apresenta os resultados obtidos com a fração butanólica.

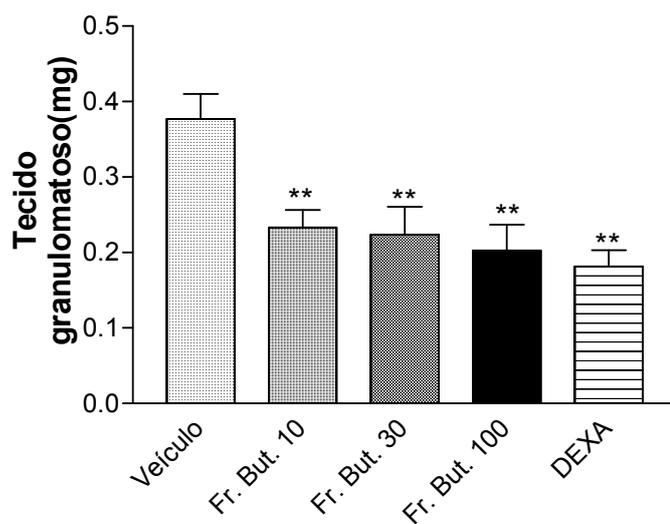


Figura 26 - Efeito da Fração butanólica obtida das folhas de *Byrsonima intermedia* na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). ** $p < 0.01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A fração butanólica nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg também reduziram a formação do tecido granulomatoso, em 38,13%, 40,73% e 46,19% respectivamente, quando comparado com o controle que apresentou inibição de 51,81%.

Na figura 27, estão os resultados obtidos com o tratamento dos ratos, durante sete dias com a fração aquosa.

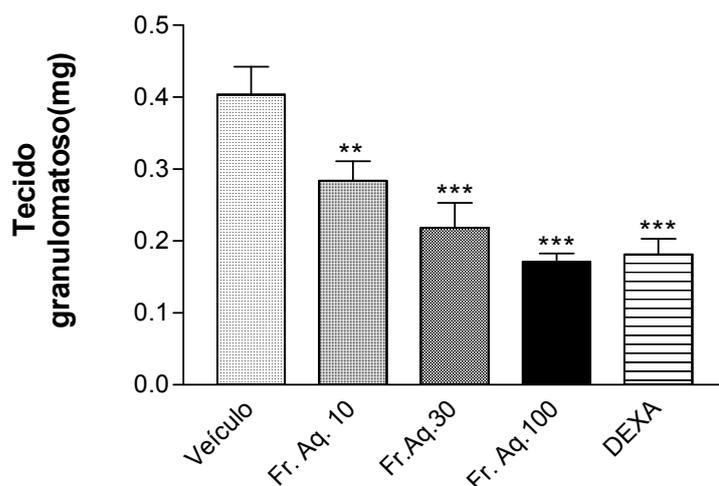


Figura 27 - Efeito da Fração aquosa obtida das folhas de *Byrsonima intermedia* na formação de granuloma em animais tratados com 10, 30 e 100 mg/Kg da fração, com dexametasona ou CMC(1%). ** $p < 0.01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Observa-se que os animais tratados com a fração aquosa nas doses de 10, 30, 100 mg/kg tiveram a formação do tecido granulomatoso diminuído quando comparado ao controle. Verifica-se que esta fração se sobressaiu no teste do granuloma, uma vez que as doses de 30 e 100 mg/kg o perfil biológico foi similar a dexametasona.

Várias plantas e seus metabolitos secundários têm revelado potencial farmacológico e continuamente são fontes para a descoberta de novos produtos com valor medicinal. Estas plantas medicinais têm papel fundamental no acesso primário para a saúde em muitas comunidades brasileiras, como murici-pequeno encontrado no município de Ijaci – Lavras, Sul do Estado de Minas Gerais. O uso popular e mesmo tradicional, não são suficientes para validar as plantas eticamente como medicamentos efetivos e seguros.

Tesk e Trentini (1995) mencionam que uma planta é considerada validada quando ela respondeu positivamente à aplicação de um grupo de ensaios capaz de provar a existência de propriedade terapêutica que é atribuído a ela, como também seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com o emprego medicinal. Sendo assim, avaliou-se a base científica para o uso tradicional de *Byrsonima intermedia* usando modelos inflamatórios *in vivo*.

Spiller (2004) menciona que mediadores inflamatórios estão envolvidos com a geração do edema de pata induzida por carragenina, uma substância capaz de

provocar uma reação inflamatória e irritante reprodutível, sendo utilizada em análises de inflamação aguda de drogas anti-inflamatórias (WINTER et al., 1962). A inflamação induzida pela carragenina desenvolve imediatamente após injeções subcutâneas, resultantes da ação combinada de prostaglandinas, bradicinina, histamina, taquicininas e espécies reativas de oxigênio.

Os neutrófilos migram facilmente para os locais de inflamação. A resposta inflamatória é geralmente quantificada pelo aumento do tamanho das patas (edema) e é modulada por inibidores ou moléculas específicas dentro da cascata inflamatória (MORRIS, 2003). Winter et al. (1962), demonstrou que, durante o desenvolvimento da resposta edematogênica neste teste, na primeira hora da formação do edema os mediadores derivados de aminas biológicas, como histamina e serotonina estão envolvidos, na segunda hora há a liberação de bradicinina e taquicinina e, depois de 3 horas de indução, acontece a participação de eicosanoides como o prostaglandinas na fase final do edema (OSADEB; OKOYE, 2003).

De acordo com os resultados obtidos, depois da administração do extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* (v.o), verificou-se que nos tempos avaliados, as doses de 30 , 100 e 300 mg/Kg foram efetivas inibindo a formação do edema, e para as frações, as doses de 30 e 100 mg/Kg, sendo sua efetividade maior no período de 3 horas a partir da formação do edema. Este resultado sugere que as substâncias presentes no extrato e frações, inibem os mediadores inflamatórios em suas três fases: agindo, primeiramente, nas aminas biológicas, histamina e serotonina, depois na liberação de bradicinina e taquicininas e, na fase final do edema, depois de 3 horas de indução, na formação do prostaglandinas, por inibir enzimas do grupo do cicloxigenase (LINDHAL; TAGESSON, 1997).

Os resultados demonstrados neste estudo, para o ELF e frações foram similares ao previamente observados para os animais tratados com Indometacina, o que pode sugerir o mesmo mecanismo de ação anti-inflamatória. Indometacina é considerada inibidor de cicloxigenase, capaz de inibir o processo inflamatório. Sugere-se que o mecanismo de ação dos componentes presentes (catequinas e flavonóides) estejam relacionados à inibição de síntese de prostaglandinas, como acontece no mecanismo anti-inflamatório da Indometacina, no processo inflamatório induzido por carragenina (DI ROSA; PAPADIMITRIOU; WILLOUGHBY, 1971).

A proposta que os efeitos biológicos evidenciados no presente estudo, possam ser decorrentes a ações dos flavonóides, encontram suporte em vários

estudos, que demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios destes compostos não está relacionados com alterações gastrointestinais, ao contrário, alguns deles agem protegendo a parede gástrica(BORRELI; IZZO, 2000; JANBAZ; SAEED; GILANI., 2002; COELHO; DI STASI, VILEGAS, 2003).

Resultados similares à indometacina, foram observados para a dexametasona, um fármaco anti-inflamatório esteróidal, que inibe a expressão de citocinas e produção de prostaglandina. O granuloma inflamatório é uma característica típica do processo inflamatório crônico. O pellet de algodão granulomatoso tem sido amplamente utilizado para avaliar as fases transudativas, exudativas, proliferativas e os componentes de uma inflamação crônica, porque o peso seco dos pellets correlaciona bem com o montante de tecido granulomatoso (SWINGLE; SHIDEMAN, 1972). Neste estudo, o ELF e frações *Byrsonima intermedia* diminuiu os pesos dos pellets de algodão implantados, verificado após a secagem em estufa, indicando que pode inibir as fases de proliferativa da inflamação.

5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato liofilizado de folhas e frações de *Byrsonima intermedia* A. juss apresentaram atividade antimicrobiana no teste de difusão em Agar. Os resultados obtidos com extrato e frações após a realização dos ensaios de difusão em ágar, revelaram inibição microbiana (FIGURA 28). Estes dados são apresentados na Tabela 15

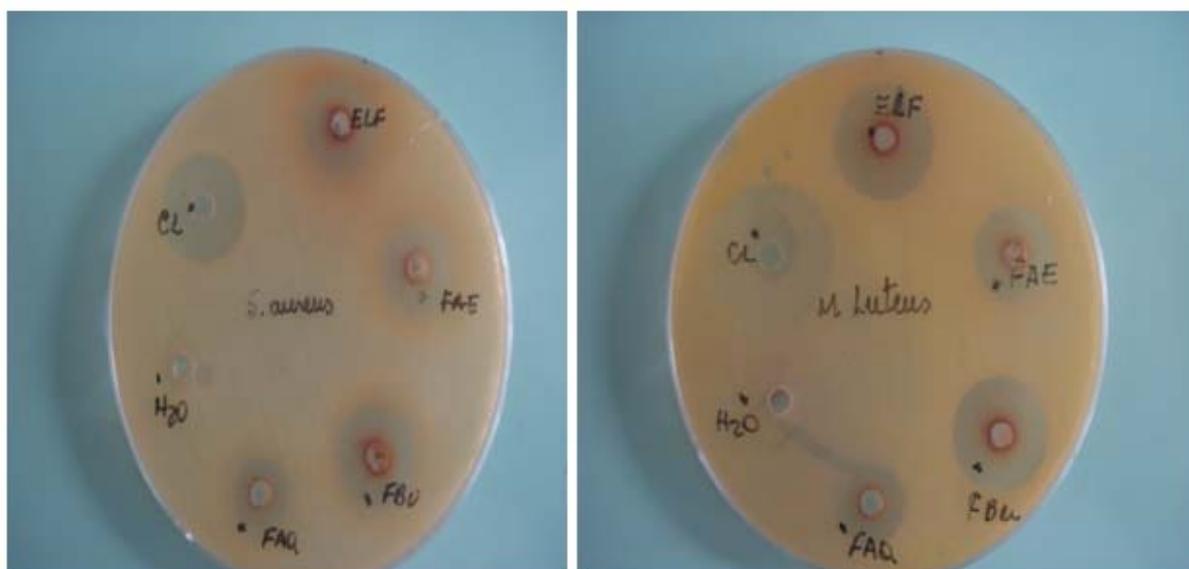


Figura 28 - Avaliação da atividade antimicrobiana do ELF e frações de *Byrsonima intermedia* A. juss contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Halos de inibição de crescimento.

Tabela 15 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de folhas e frações de *Byrsonima intermedia* pela técnica de difusão em Agar (Halos de inibição em mm).

Microorganismos	ELF	FAE	FBU	FAq	Clorexedina 0,2%	Água destilada
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	12	12	11	11	15	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15	12	12	10	20	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	16	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12	20	18	11	21	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	12	10	15	0	9	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	0	0	0	15	0
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	0	0	0	0	11	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	15	12	10	10	20	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	0	0	10	15	0
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	12	12	11	7	21	0

ELF= Extrato liofilizado da folha; FAE= Fração Acetato etila; FBU = Fração butanólica
FAq = Fração aquosa

A figura 29 apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração inibitória mínima para o extrato liofilizado de folhas e frações de *Byrsonima intermedia*, com os controles de esterelidade do meio, esterelidade das amostras e controle de crescimento dos microrganismos.

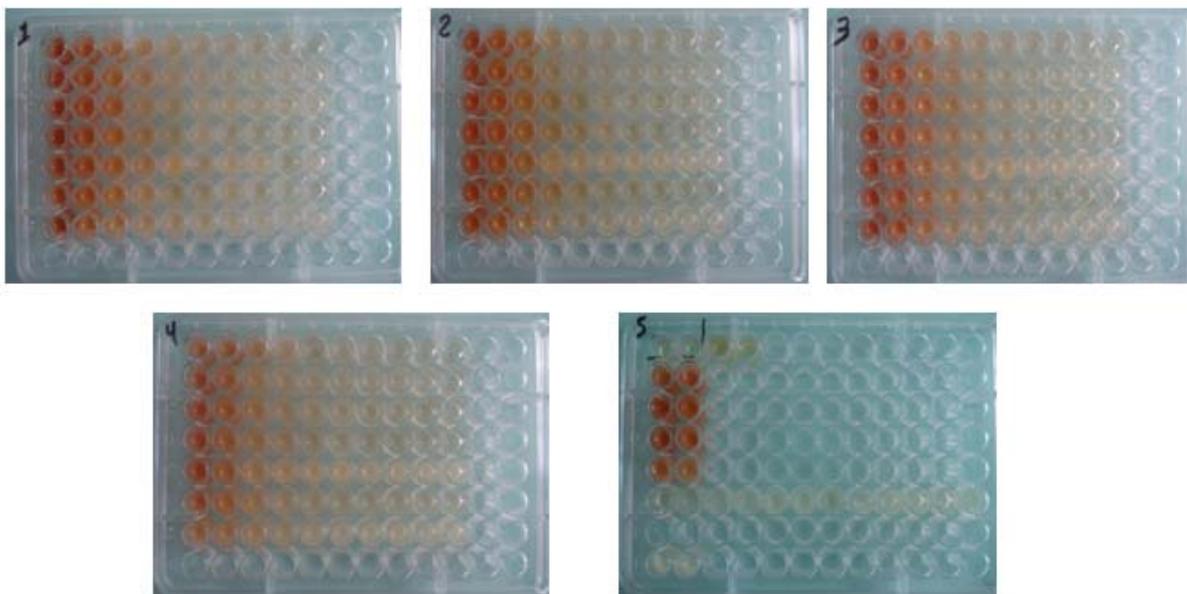


Figura 29 - Ilustração do método de microdiluição com caldo Mueller Hinton em placa contendo 96 poços, para teste de CIM. 1- ELF; 2- FAE; 3- FBu; 4- FAq ; 5- controles

Em relação à avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizados apenas os microrganismos que inicialmente mostraram-se sensíveis aos extratos e às frações. Os quadros abaixo mostram a avaliação da atividade antimicrobiana de *Byrsonima intermedia* frente aos microrganismos testados.

Quadro 1: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado de folhas de *Byrsonima intermedia*

		Determinação da concentração inibitória mínima do extrato em mg/mL											
		10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,08	0,04	0,02	0,001	0,0005
Teste de difusão em agar	Microrganismos												
Halo em mm													
15	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- inibição do crescimento

+ crescimento

Quadro 02: Avaliação da atividade antimicrobiana da fração acetato de etila obtida de folhas de *Byrsonima intermedia*

Determinação da concentração inibitória mínima da FAE em mg/mL													
Teste de difusão em agar Halo em mm	Microorganismos	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,08	0,04	0,02	0,001	0,0005
		15	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
15	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

- inibição do crescimento

Quadro 03: Avaliação da atividade antimicrobiana da fração butanólica obtida de folhas de *Byrsonima intermedia*

Determinação da concentração inibitória mínima da FBu em mg/mL													
Teste de difusão em agar Halo em mm	Microorganismos	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,08	0,04	0,02	0,001	0,0005
		15	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>M. luteus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- inibição do crescimento

+ crescimento

Quadro 04: Avaliação da atividade antimicrobiana da fração aquosa obtida de folhas de *Byrsonima intermedia*

Determinação da concentração inibitória mínima da fração aquosa em mg/mL													
Teste de difusão em agar Halo em mm	Microorganismos	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,08	0,04	0,02	0,001	0,0005
		15	<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>P. mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

- inibição do crescimento

+ crescimento

Este estudo confirma os resultados de Michelini et al. (2008), que relata atividade antimicrobiana do extrato metanólico de folhas de *Byrsonima intermedia* contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* e *Candida albicans*.

Os efeitos observados parecem estar relacionados com os compostos fenólicos presentes na planta. Os flavonóides são substâncias hidroxiladas fenólicas conhecidas por serem sintetizadas pelas plantas em resposta a infecções microbianas e não é surpresa seu efeito antimicrobiano *in vitro* contra diversas

bactérias. Esta atividade é provavelmente devida a sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular (COWAN, 1999).

Não foi observada atividade contra bactérias gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, com exceção para *Proteus mirabilis*). Este fato pode ser explicado porque a membrana externa das bactérias Gram negativas é conhecida por apresentar uma barreira a penetração de numerosas moléculas de antibióticos, e o espaço periplasmático contém enzima, as quais são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas neste espaço (SCHAECHTER et al.; 2002)

Muitos microorganismos Gram negativos também exibem alto nível de resistência intrínseca à grande número de agentes antimicrobianos e reforça a hipótese sobre a membrana externa e atividade de bomba de efluxo como barreira aos antibióticos (BAMBEKE; MICHOT; TULKENS, 2003).

No presente estudo, verificou-se que *B. subtilis*, *B. cereus* e *M. luteus* são inibidos em média em concentração de 2500 µg/mL. *S. aureus* em média em concentração de 1250 µg/mL. *C. albicans* é inibida pelo ELF em concentração de 1250 µg/mL e *P. mirabilis* em concentração de 2500 µg/mL. Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores. Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL.

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Além disso, a maioria dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma

região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

Infecções humanas, particularmente aquelas envolvendo a pele e mucosas constituem um sério problema, especialmente em países desenvolvidos tropicais e subtropicais, sendo os fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp os patógenos mais freqüentes (PORTILLO et al.; 2001). *Candida albicans* é uma levedura oportunista que causa infecções sistêmicas em pessoas predispostas, comumente pacientes com o sistema imunológico comprometido ou que foram submetidos a tratamento prolongado com antibióticos (ZHANG et al.; 2002).

Entretanto, as informações disponíveis sobre plantas medicinais ativas contra esta espécie ainda não resultaram em formulações efetivas para uso humano ou animal, exceto no caso de algumas patentes envolvendo plantas da família do alho (*Allium* spp) (PLUMMER, 1992), da genciana (*Radix gentianae*) (CHEN, 1996) e cinco extratos estudados por Lee et al. 2003.

6 CONCLUSÃO

Os estudos químicos possibilitaram identificar um constituinte da classe dos flavonóides e catequinas nas folhas de *Byrsonima intermedia* bem como mostrar a similaridade com o perfil flavonoídico dos calos, com predominância de catequinas.

Os estudos biológicos confirmam a importante ação anti-inflamatória e antimicrobiana dos flavonóides, bem como a ação antiradicalar das catequinas na proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, além de retardo do envelhecimento nos humanos.

7 PERSPECTIVAS

Ao término deste trabalho, ficam algumas propostas para estudos futuros mais aprofundados:

O extrato liofilizado de folhas de *Byrsonima intermedia*, bem como os calos pode ser avaliado profundamente, com comprovação dos constituintes químicos através de análises utilizando espectrometria de massas (FIA-ESI-MS). Uma vez comprovados poder-se-á fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e suas atividades biológicas;

Realizar ensaios da atividade antiinflamatória e antinociceptiva, empregando ensaios mais específicos, contribuindo ainda mais para a validação da espécie;

A citotoxicidade poderá ser avaliada em cultura sobre linhagens de células normais e/ou transformadas;

Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* para determinar se esta planta medicinal poderá ser utilizada industrialmente.

Otimizar as técnicas de cultura de tecidos e cultivo de calos para aumentar o teor de compostos fenólicos, particularmente as catequinas, oferecendo mais nutrientes, hormônios ao meio de cultura e, principalmente monitorar a curva de crescimento dos calos, realizando repicagens de acordo com seu crescimento e momento certo de acúmulo destes metabólitos secundários, para futuramente incentivar a indústria de fitoterápicos e conseqüentemente, maior demanda de mão-de-obra para a produção de cultivos desta planta medicinal no estado de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ADERINOKUN, G. A.;LAWOYIN, J. O.; ONYEASO, C. O. Efect do two cammon nigerian chewing on gengival health and oral higiene. **Odontostomol Trop**, v. 22, n.87, p.13-8, 1999.
- AGUIAR, R. M., DAVID, J. P., DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- AHMAD I. AND BEG A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **J. of Ethnopharmacol.** 74: 113-123.
- ALIGIANIS N., KALPOUTZAKIS E., MITAKU S., CHINOUI I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem** v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutricional Research**. v. 22, p.1041-1047, 2002.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado**: espécies vegetais úteis: 38-9, Planaltina: EMBRAPA, 1998. 465p,
- ANDERSON, W. R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, v. 11, p. 219-223, 1979
- ANDERSON, W. R. The origin of the Malpighiaceae - the evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 64, p. 210-224, 1990.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Foods Science & Technology**, v.11, p. 419-421, 2000.
- ARORA, A., MURALEEDHARAN, G.N., STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.
- BAILEY, P.J. Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines tandardisierten Kiefernrrindenextraktes Biochem, **Pharmacol.** v. 31, p. 1213-1222, 1982.
- BAMBEKE, F. V.; MICHOT, J. M.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impacto on antibiotic cellular parmackinetics,

pharmacodynamics and toxicodynamics. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 51, p. 1067-1077, 2003.

BARBUCH, R.J. et al. The use of thermospray LC/MS/MS for the class identification and structural verification of phytoestrogens in soy protein preparations. **Biomed Environ Mass Spectrom**, v. 18, p. 973-7, 1989.

BARROSO, G.M., MORIM, M.P., PEIXOTO, A.L. & ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999.

BASILE, A.S. et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves, **Fitoterapia**, v. 71 Suppl a, Aug, p.S110-6, 2000.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of clinical Pathology**, v. 45. p. 493-496, 1966.

BEJAR, E. et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy** 33,25-32, 1995.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free Radicals and ten main dietary antioxidants. **Nut.**, v. 12, p. 110-18, 1999.

BIRCH, A.E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v. 49, p. 4502-4507, 2001.

BLANK, F. The anthocyanin pigments of plants. **Bot. Rev.**, v. 13, p. 241-317, 1947..

BLAZEVIC, D. J.; EDERER, G. M. *Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology*, **John Wiley & Sons**, New York, 1975, 136 p

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, 1958.

BOBIN, M.F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M.C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmet Toiletries**, v.109, p. 63-78, 1994.

BOHM, B. A. Intraspecific flavonoid variation. **Bot. Rev.**, v. 53, p. 197-279, 1987.

BOHM, H.; BOEING, H.; HEMPEL, J.; RAAB, R.; KROKE, A. Flavonols, flavone and anthocyanin as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. **Z. Ernährungswiss**, German, v. 37, p. 147-163, 1998.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leuKocyte activation. **Blood**, v. 86, n. 5, Sep a, p. 1649-60, 1995.

BONZANI DA SILVA, J, β -Amyrin in roots of *Byrsonima intermdia*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 53-67, 1970b.

BONZANI DA SILVA, J. Gallic acid, pyrogallol, and pyrocatequine in *Byrsonina*

intermedia latifolia. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 8, 187-192, 1970a.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-91, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos**. Brasília, Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, 1998.

CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases. 2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, n. 1, p.77-82, 1993.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 3, p.2 432-2433, 1916.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. et al. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40, 2004.

CARVALHO, M. A. F. **In vitro culture, cryopreservation and medicinal properties of *Byrsonima intermedia***. UFLA, 2010. 196p. Thesis (Ph.D. in Agronomy/ Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.□

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol Today**, v. 16, n.1, Jan, p.216, 1995.

CASTRO, M. S. A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosil-dihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *C. regium* (“algodãozinho”)**. Universidade de São Paulo, SP, 2000.

CHEN Y. Method of treating *Candida* and *Cryptococcus* fungal infections by administering gentian, U.S. Patent US 5837254 A, 1996.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma aprovada –sexta edição – M27A2 CLSI (ISBN 1-56238-469-4)**, 2003.

COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* comparison with *Maytemus* species. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 47-52, 2003.

CONCEIÇÃO, H. E. O. Cultivo in vitro, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp.). 2000. 191p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade

Federal de Lavras, Lavras - MG.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Thidiazuron – induced highfrequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 2, p. 197 - 208, nov. 2008.

CORSINO, J. Bioquímica prática. Disponível em:<
<http://www.fes.br/disciplinas/fis/bioquimica/Apostila%20Bioqu%EDmica%202008.doc>
> Acesso em 20 maio 2010.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1986.

COTRAN, R. S. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2000.

COWAN, M. M. Pant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n.4, p.564-582, 1999.

DECKER, E. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DEKKER, L. V.; SEGAL, A. W. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. **Science**, v. 287, n. 5455. Feb II, p. 982-3, 985, 2000.

DEMEULE, M. et al. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1478, n. 1, p. 51-60. 2000.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D. A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol**. v. 105, n. 4, p. 239-256, 1971.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. UNESP, p. 9-14, 1996.

DOMÍNGUEZ, X. A.. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Limusa, 1973.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**, v.7, out. 2006. Disponível em: <
http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf >. Acesso em: 23 jun. 2010.

EMATER, 2008 3ª reunião técnica Estadual sobre Plantas Bioativas disponível em <

<http://www.embrapa.br/eventos/3o-reuniao-tecnica-estadual-sobre-plantas-bioativas/>> Acesso em: 26 jun. 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FELÍCIO, J. D. et al. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 62, p. 91-92, jan. /dez. 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Assoc. Med. Bras.**, 43: 61-8, 1997.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil – espécies do cerrado**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 239 p.

FOLIN, C.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **J Biol Chem**, v. 73, p. 627-650, 1927.

FUJITA, Y.; UEHARA, I.; MORIMOTO, Y.; NAKASHIMA, M.; HATANO, T.; OKUDA, T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation. **J. Pharm. Soc. Jpn.** v.108, p. 129-135, 1988.

GARCÍA-ALONSO, M. et al. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p.13-18, 2004.

GASPAR, J. et al. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, Oxford, v. 8, n. 1, p.51-55, 1993.

GAULEJAC, N. S. C. et al. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. **J. Sci. Food Agric.**, 79, 1081-1090, 1999.

GEETHA, T.; VARALASKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal os Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice**. Somerset: Exegetics, 1996. 758p.

GINER-CHAVES, B. I. **Condensed tannins in tropical forages**. 1996. 196 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Cornell University, Ithaca, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Ministério da Agricultura, v. 1, p. 183-242, 1998.

GREGÓRIO, G. et al. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. **Phytociência**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2006.

HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.3, p.437-449, Mar. 1987.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 26, p. 809-812, 1978.

HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 3226-3232, 2003.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p.253-265, 1994.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 15, n.3, p.145-182, 1990.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther**, v.96, p. 67-202, 2002.

HERCECBERG, S. et al. Background and rationale behind the SU.VI.MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases, 1998.

HILLIS, W. E.; SWAIN, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II. The analysis of tissues of the Victoria plum tree. **J. Sci. Food Agric**, v. 10, p. 135-144, 1959.

HIRUMA-LIMA, C. A. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1/2, p. 215-224, 2006.

HOLST, R.W. Anthocyanins of *Azolla*. **Amer. Fern J**, v. 67, p. 99-100, 1977.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, New York, v.15, n. 5, p.755-766, 1995.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, H. Protective effect of rutin on paracetamol and CC14-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557-5563, 2002.

JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie**, v. 45, p. 70, 1987.

JANZEN, D. H. Tropical blackwater rivers, animals, and mast fruiting by the Dipterocarpaceae. **Biotropica**, v. 6, p. 69-103, 1974.

JAVANMARDI, J. et al. Chemical characterization of basit (*Ocimum brasiliam* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.50, p.5878-5883, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4.ed. São Paulo: Nacional, 1977, 778p.

KADO, C. I. Methods in Plant Bacteriology. **Department of Plant Pathology**, University of California-Davis, p. 86, 1977.

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. 10129-134, 2008.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 528, 1998.

KIM, D. O. et.al. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food chemistry**. v. 81, p. 321-326, 2003.

KIM, H. P. et al. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 96, p. 229, 2004.

KING, A. R.D.; YOUNG, G. E.de D. Characteristics and occurrence of Phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KIRALY, Z. et al. **Methods in Plant Pathology**. 509 vols, Akademiai Kiadó, Budapest. 1970.

KOSTYUK, V.A.; POTAPOVICH, A.I.; STRIGUNOVA, E.N.; KOSTYUK, T.V.; AFANASEV, I.B. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. **Arch Biochem. Biophys**, v.428, p. 204-208, 2004.

LAGO, D. F. do; PAULA, J. R. de.; BARA, M. T. F. Estudo comparativo sobre a eficiência de métodos de extração dos polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*). **Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007. n.p.

LAMEIRA, O. A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de rescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva – baleeira**, 1997, 88p. (Tese doutorado). (Cordia verbenaceae L.) Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1997,Lavras – MG.

LEE H., KIM S., PARK B., AHN Y. Composition useful for the treatment of bacterial infections e.g. athlete's foot comprises plant extracts or their compounds. U.S. Patent WO2003035093-A1, 2003.

LIAO, S. et al. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. **Vitamins and hormones**, v. 62. p. 1-94, 2001.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agrícola**. v. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as Phospholipase A2 Inhibitors: Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II Phospholipase A2. **Inflammation**, v. 21, n. 3, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002, 512p.

LU, Y.; YEAP. FOO, L. Polyphenolics of Salvia – a review. **Phytochem**, v. 59. p. 117-140, 2002.

LUENGO, M. B. **Rev. Eletrôn. Farm.** V. 2, n.64, 2005.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970.

MARINI-BETTOLO, G. B. Preliminary Chemical Screening of Medicinal Plants in Field Conditions. In: **World Health Organization**. WHO, DPM/80.5, 1980.

MARK ABELSON e ANNIE PLUMER Adaptado do artigo "Bacterial Resistance: The Ubiquitous Menace", **Review of Ophthalmology**, novembro de 2004.

MARTÍNEZ M.J., BETANCOURT J., ALONSO-GONZÁLEZ N., JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, **J. of Ethnopharmacol.** v.52, n.3, p. 171-174, 1996.

MARTINEZ-FLORES, S. Y. et al. **Nutr. Hosp.**, v. 17(6), p.271-278, 2002.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. 1988, 126p.

MEIER, R.; SCHULER, W.; DESAULLES, P. L. Usnic Acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. **Experimentia**, v. 6, p. 46, p. 469-471, 1950.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B., Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos, In: **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.36, n.1, p. 1-11, 2002.

MENDEL, S.; YODIM, M. B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**,

v.37. p. 304-317, 2004.

MENDONÇA, R. C. et al. **Flora vascular do cerrado**. In: SANO, S.M, ALMEIDA, S.P.,(Eds.). **Cerrado ambiente e flora**. Brasília: EMBRAPA, p.286-556, 1998.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 127-130, 2001.

MERCK, E. **Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**, 1980.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.48, n.3, p. 577-599, 2000.

MIACHIR, J. I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para a produção de compostos secundários para *Cumuma zedoária* Roscoe**, Piracicaba: ESALQ, 1992, 126p (Dissertação – Mestrado em Ciências e Bioquímicas de plantas).

MICHELIN, D. C. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, p. 690-695, 2008.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol. Rev**, v.52, p. 673-751, 2000.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTELLI. A. C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o clínico**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, p. 7-53, 2001.

MONTORO, P.; CARBONE, V.; PIZZA, C. Flavonoids from the leaves of *Cyclanthera pedata*: two new malonyl derivatives. **Phytochem. Anal**, v. 16, n. 3*/, p. 210- 216, 2005.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse In: WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols. **Humana Press Inc.**, Totowa, NJ, v. 225, p.115-121, 2003.

MUELLER-HARVERY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1/2, p.3-20, 2001.

NAHAR, L.; SARKER, S.D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 279-282, 2005.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture: a toll in**

biotechnology: basics and application. Berlin: Springer Verlang, 2009. 333 p.

NICIOLI, P. M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]**. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

NIEMEGGEERS, C. J. et al. The activity of suprofen on nystatin – induced paw oedema in rats. **Arzneimittel- Forrschung**, v. 23, p. 1519, 1975.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**, 2003, 88 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2003.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E.C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMBRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M. S, SOARES.F.P; CASTRO ,A.H.F; PAIVA, P.D. O. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

OLIVEIRA, M.I.B.; POLIDO, C.A.; COSTA, L.C.; FAVA, W.S. Sistema reprodutivo e polinização de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 756-758, jul. 2007.

OSADEB, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, vol. 89, p. 19 – 24, 2003.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. *In* Cell culture and somatic cell genetics of plants. Edited by Indra K. Vasil. **Academic Press**, Inc. v. 2. Cap.4. p 129-142, 1985.

PANIZZA, S. et al. *Stryphnodendron barbadetiman* (vellozo) *martius*: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, p.101-106, 1988.

PARMAR, N. S.; GHOSH, M. N. Gastric antiulcer activity of (+) cyanidol-3, a histidine descarboxilase inhibitor. **Euro J Pharmacol**, v. 69, p.25-32, 1981.

PELILLO, M. et al. Na investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 465-470, 2004.

- PIMENTEL, G. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Livraria Nobel, 2005.
- PINTO, E. B. P. et al. **Cultivo de plantas medicinais aromáticas e codimentares**. Brasil, 1. ed. Lavras-MG: FAEPE. 2001. 185p
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos: cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169p.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 102p.
- PLUMMER, N. New antimicrobial compositions which colonise the small intestine – contain non-pathogenic microorganisms and *Allium* plant material; for treating gastrointestinal and urogenital disease. U.S. Patent EP554319-A, 1992.
- POMPELLA, A. biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 289- 297, 1997.
- PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T. CANIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plant used in traditional medicine, **J of Ethnopharmacology**, v.76, p. 93-98, 2001.
- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S.A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n.4, p. 485-92, 2002.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- REIS, M.G.; FARIA, D. A.; SANTOS, I. A.; et al. Byrsonic acid – the clue to floral Mimicry Involving Oil-producing flowers and oil-collecting bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 7, p. 1421-1429, 2007.
- REVILLA, E. et al. Value of high-performance liquid chromatographic análisis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 53-60, 2001.
- RIBANI, R. H.; DUTRA, G.L. F. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Rev. Química nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**. v. 8, p. 797-807, 2001.
- RIEMERSMA, R.A.; RICE-EVANS, C.A.; TYRRELL, R.M.; CLIFFORD, M.N.; LEAN.

M.E. Tea Flavonoids and cardiovascular health. **QJM**, v.94, p. 277-282, 2001.

RINALDO, D. et al. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. By high-speed counter-current chromatography. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.947-949, 2006.

RODRIGUES, C. M. et al. High-Performance liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, 2007 (no prelo).

RODRIGUES, C.M. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. UNESP, 2007, 197P. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química - Araraquara –SP, 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode array and electrochemical detection. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 106-112, 2000.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFC. 2001.

SANCHEZ DE MEDINA, F.; GALVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.278, p. 771-779, 1996.

SANNOMIYA, M. et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**. v. 1035, p. 47–51, 2004. doi:10.1016/j.chroma. 2004.02.050.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 319–326, 2007.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 1–6, 2005. doi:10.1016/j.jep.2004.09.053.

SANTOS JUNIOR, J. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista brasileira coloproctologia**, v. 23, n.3, p.206-210, 2003.

SANTOS, B.R. PAIVA, R. MARTINOTTO, C; NOGUEIRA, R.C.N; PAIVA, P.D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510 - 514, mai/jun, 2005.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303–308, 2001.

SANTOS, R. C. SANNOMIYA, M.; PELLIZZON, C.H.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Avaliação do efeito cicatrizante da partição acetato de etila de *Byrsonima intermedia* A.Juss. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 39.,2007, **Resumos...**Salvador:favesp, 2007. CD-ROM

SANTOS, R. C. SANNOMIYA, M.; PELLIZZON, C.H.; VILEGAS, W.; LIMA, C.A.H. Aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae): indication of gastroprotective and healing action of a medicinal plant from Brazilian Cerrado. **Planta Medica**. v. 75, n. 9, 2009.p.B24, jul, 2009.

SANTOS, R.C. SANNOMIYA, M.; VILEGAS. W. LIMA, C.A.H. Avaliaçãodo efeito tóxico e antiulcerogênico do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 19.,2006, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: UNESP, 2006. CD-ROM

SANTOS,R.C.;SANNOMIYA,M.; VILEGAS.W.; HIRUMA-LIMA,C.A. h. Evaluation of the antiulcerogenic potencial of the aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA, 3.,2008, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: FCRP/USP, 2008. CD-ROM.

SANTOS, M.H. BATISTA, B.L. DUARTE, S, M, S. ABREU, C.M.P. GOUVEA, C.M.C. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*coffea arábica*). **Química Nova**, vol.30, Nº 3,604-610, 2007.

SCHAECHTER, M. et al. Microbiologia: **Mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 642p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, p. 597-622, 2000.

SEDGWINCK, R. E D.; WILLOUGHBY. Initiation of the inflammatory response and its prevention, In: (Ed).- Handbook of inflammation (ed. By Bonta, IL; Bray, MA & Parnham, MJ). New York: Elsevier. **Initiation of the inflammatory response and prevention**, p. 27-47, 1985.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Nutr.**, v. 17, p. 227-36, 2004.

SHIN, k. M. et al. In vitro anti-inflammatory activity of 23-hydroxyarsolic acid acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Planta Medica**, v. 70, n. 9, p. 803-807, 2004.

SHYAMALA, B. N.; GUPTA, S.; LAKSHMI, A.; PRAKASH J. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability of heated Oils. **Innovative Food Science & Emerging Technologie**, v. 6, p. 239-245, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Review. European journal of Biochemistry**. Berlin, v. 215, n. 2. p. 213-219, 1993.

SILVA, J.B. Contribuindo ao estudo farmacognóstico da raiz de *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu. forma *latifolia* Grisebach. **Rev. Fac. Farm. Bioquím.** São Paulo, v. 7, n.2, p.322. 1969

SILVA, M. Brief history of inflammation. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H. **Handbook of experimental pharmacology**. New York: Springer Verlag, 1978. v. 1, p.6-25,

SIMÕES, C. M. O. et al. (org.). **Farmacognosia da planta do medicamento**. Florianópolis. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004. p. 221-258

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS, 1999. p. 1102

SMITH, R. H. Plant tissue culture: techniques and experiments. **San Diego: Academic**, 1992. 171p.

SMTH, M. A. L. et al. Nondestructive machine vision analysis of pigment-producing cell cultures. **J. Biotechnol**, v. 40, p.1-11, 1995.

SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.]**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J.; **Phytochem. Anal.** v.11, n.1, 2000.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, mar./abr. 2007.

SOUTO, L.S.; OLIVEIRA, D.M.T. Fruto e semente de *Byrsonima intermédia*. **Revista Brasil. Bot.**, v.28, n.4, p.697-712, out.-dez. 2005

SOUTO.S.L; OLIVEIRA. T.M.D. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Jus (Malpighiaceae). **Revista Brasil**, Botucatu, v.28, n.4. p.697-712, 2005.

SPILLER, R. C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. **Best Practice and Research Gastroenterology**, vol. 18, n. 4, p. 641-661, 2004.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n.2, jan 28, p.301-14. 1994.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu Rev. Physiol**, v. 57, p. 827-72. 1995.

STACH, D.; SCHMITZ, O. J. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 924, n. 1/2, p.519-522, 2001.

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F. E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 13, 226–234, 1972.

TAESOTIKUL, T. et al. Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive activities of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 31-35, 2003.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

TESKE, M; TRENTINI, A. M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. Resistência bacteriana a droga. In TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. cap.13, p. 86-89.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, Dec 19-26, p. 853-9, 2002.

TSANOVA-SAVOVA, Silvia; RIBAROVA, Fany. Free and conjugated myricetin, quercetin, and kaempferol in Bulgarian red wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.639-645, 2002.

TSENG, T. H. et al. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. Against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35,n.2, p. 1159-1164, 1997.

TUNG, Y. T. et al. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p.1120-1123, 2007.

URSINI, F. et al. A novel antioxidant flavonoid (idb 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n.5, p. 547-553, 1994.

VAN CAUWENBERGE, H.; FRANCHIMONT, P. Study of the antiphlogistic properties of trihydroxyethylrutoside. **Zentraibi. Phleb**, German, v.7, p. 110-121, 1968.

VANISREE, M. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 1-22, 2004.

VON ANDRIAN, U. H. E. C. R.; MACKAY, T. Cell function and migration. Two sides of the same coin. **N Engl J Med**, v. 343, n.14, p.1020-34, oct. 2000.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

WANG, C. K.; LEE, W. H. Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 44, p. 2014, 1996.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 337-344, 2000.

WASICKY R, WASICKY M, JOACHIMOVITS R. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. **Planta Medica**, v. 12, p. 13-25, 1964.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1994.

WEBSTER, S.A. MICHELLI.S.A; REID. W. A; AHMAD,M.H. Somatic embryogenesis from leaf and zygotic embryo explants of *Blighia sapida* “cheese” ackee. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 5, p. 467 - 472, sep-oct, 2006.

WENIGER, B. et al. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 1, p.75-77, 2005.

WILLIAMS, R. J. et al. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n.7, p.838-849, 2004.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendron Press, 1990. P.23.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan- induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOISKY, R. G.; MARCUCCI, M.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Revista Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 24 maio, 1998.

WOISKY, R.G.; MARCUCCI, M.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Revista Mensagem Doce**, v.46, p.3-8, 24 maio 1998.

XU, H., J. A. et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. **J Exp Med**, v.180, n.1, p. 65-109, jul. 1994

YARIWAKE, J. H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.2, p. 162-168, 2005.

YAZAKI, K.; OKUDA, T. *Cornus officinalis*: in vitro culture and production of gallotannins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlim: Springer-Verlag, v.21, p.104-14, 1993.

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.

YILDIRIM, A.; OKTAY, M.; BILALOG L. U.V. The antioxidant activities of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk. J. Med Sei.* 2001, 31, 23-27 apud YILDIRI, 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.

ZHANG Z., ELSOHLY H.N., JACOB M.R., PASCO D.S., WALKER L.A., CLARK A.M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. *Planta Med.* v.68, p. 49-54, 2002.

ZHANG. W. J. et al. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-KappaB activation and adhesion molecule expression. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 90, n.5, p. 904-914, 2002.

ZHONG, J. J. Engineering of plant secondary metabolite heterogeneity in cell cultures. **Journal of Biotechnology**. p. S12-S13, 2008. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.07.1807