

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Andira
retusa* (Poir.) Kunth**

VANESSA NEVES CARVALHO SANTOS

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

VANESSA NEVES CARVALHO SANTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Andira
retusa* (Poir.) Kunth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para Saúde.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez, Doutora

MANAUS

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

S237e Santos, Vanessa Neves Carvalho
Estudo fitoquímico e bioatividade de extratos de *Andira retusa* (Poir.)
Kunth / Vanessa Neves Carvalho Santos. - Manaus, AM : UFAM, 2012.
170 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Biotecnologia. Área de concentração:
Biotecnologias para saúde). Universidade Federal do Amazonas.
Orientadora: Profª Drª Cecilia Veronica Nunez.

1. *Andira retusa* – Estudo fitoquímico 2. *Andira retusa* – Bioatividade
3. Química vegetal 3. Antioxidantes 4. Agentes anti-infecciosos I. Nunez,
Cecilia Veronica (Orient.) II. Título

CDU (2007): 582.738(043.3)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Senhor, meu Deus, não tenho palavras para agradecer por cada dia vivido, cada luta, cada vitória, cada benção alcançada...por me dar forças nos momentos em que pensei em desistir de meus sonhos, consolando e confortando meu coração. Obrigada, Senhor!

À minha amada e querida mãe, por ser minha eterna inspiração, meu exemplo da pessoa que quero ser na vida! Não terei como lhe agradecer por tudo o que fez por mim até hoje. Você acreditou em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava mais...torceu por mim e me incentivou mesmo quando isso significou me afastar de você, vivendo longe só pra ver a minha felicidade e realização pessoal e profissional. Obrigada, mãezona!

Aos meus tios Laura e Francisco por me apoiarem e me incentivarem a realizar meus sonhos...só posso orar e clamar para que o Senhor os abençoe imensamente sempre!Já que não há palavras que sejam capazes de expressar a minha gratidão por tudo o que vocês fizeram por mim!

Eu dedico esta dissertação

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Cecilia Veronica Nunez, pelos ensinamentos, confiança e liberdade no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial à minha avó Albertina de Castro Carvalho (*in memoriam*) por ter sido sempre um exemplo na minha vida, e uma das minhas principais incentivadoras desde meus primeiros passos. Eternas saudades! Às minhas irmãs, Bruna Letícia Ramires dos Santos e Gabriela Lais Ramires dos Santos, que mesmo convivendo tão pouco comigo nos últimos anos, se preocupam com cada momento difícil que passo, mas torcem sempre pelo meu sucesso e realização. Ao meu pai, Manoel Candido dos Santos, que mesmo muito distante, mas do seu jeito, torce pela minha felicidade. Ao meu tio Mário Luiz Neves de Carvalho, que apesar da distância e da pouca comunicação que nos separa não se esquece de mim e vibra a cada uma das minhas vitórias.

À minha eterna orientadora e amiga Dra Maique Webber Biavatti por todo o incentivo, apoio, conselhos, por ser meu grande exemplo de profissional e pela amizade ao longo desses oito anos de convivência.

Ao meu querido e também eterno orientador, Dr. Rilton Alves de Freitas por abrir as portas de seu laboratório para que pudesse realizar os testes de citotoxicidade com cultivo celular, por ter me ensinado tudo o que sei de cultivo. Além disso, agradeço pelo incentivo e conselhos, por ser também meu grande exemplo de profissional e orientador.

Aos meus amigos Maria Carolina Scheffer de Souza e Julio César de Souza pela amizade, paciência, carinho e por serem os principais responsáveis pela minha vinda a Manaus realizar o sonho de trabalhar no Inpa e ainda fazer esse mestrado.

Aos meus amigos Cláudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski e Dr. Pierre Alexandre dos Santos pelos inúmeros ensinamentos, conselhos e orientações no início desse trabalho. E também pela amizade, carinho e atenção.

Aos meus amigos do laboratório, em especial, Lorena Mayara de Carvalho Cursino e Nerilson Marques Lima pela amizade, apoio, incentivo, pelas risadas e pela imensurável ajuda no desenvolvimento desse trabalho (principalmente na interpretação dos espectros). Nunca terei palavras suficientes para lhes agradecer!

Agradeço também: Orleyson, Francislane (também pelos testes antioxidantes), David, Jaciara, Daiane, Manoel, Maria Izabel, Kissinara, Giselle, Scarlet, Taís, Paula, Fabianne, Fabiele e aos outros que contribuíram para um ótimo ambiente de trabalho.

Às minhas amigas Jaqueline Inês Alves de Andrade pela amizade, incentivo, apoio e pelos testes de atividade antimicrobiana; Taciane Almeida de Oliveira pela amizade, muitas risadas e momentos de descontração; e Karen Cristina de Souza Lima pelas maravilhosas conversas, conselhos, incentivo, apoio, amizade e também pelos testes de citotoxicidade em *Artemia salina*.

À minha amiga Bruna Lovizutto Protti Wöhlke pelos 10 anos de amizade, por ter acompanhado a minha trajetória desde o início da graduação e agora no mestrado, por nossos momentos de descontração, alegria e por tudo que compartilhamos o longo desses anos.

A todos os amigos que foram o meu suporte e a minha força nos momentos em que precisei ou em que pensei em desistir dos meus sonhos.

Ao Dr. Takeshi Matsuura, da UFAM, pela colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao professor Dr. Andersson Barison e ao técnico Khalil Schwanka Salomé pela realização dos espectros na UFPR.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM pelos ensinamentos e pela atenção ao longo desses dois anos. Obrigada por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional!

À CAPES pela concessão da bolsa que tornou possível a realização desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse sonho.

“Não temas, porque Eu sou contigo; Não te assombres, porque sou o teu Deus; Eu te fortaleço te ajudo e te sustento com a minha destra fiel.”
(Isaías 41:10)

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico e avaliações dos extratos e fases de *Andira retusa* (Fabaceae) quanto às atividades: antioxidante, citotóxica e antimicrobiana. Este é o primeiro estudo químico e biológico com esta espécie. Foram realizadas duas coletas de material vegetal, e extratos obtidos dos mesmos foram analisados por CCD. Do fracionamento cromatográfico da fase diclorometânica do extrato metanólico das cascas foi possível isolar o lupeol e a mistura de β -sitosterol e estigmasterol. Foram também realizados os fracionamentos: do extrato diclorometânico das flores e das fases diclorometânica e acetato de etila obtida do extrato diclorometânico das cascas e da fase acetato de etila obtida do extrato metanólico das cascas. Os espectros de RMN de ^1H dos extratos e fases mostraram sinais característicos de terpenos (possivelmente esteroides), compostos aromáticos (possivelmente flavonoides e chalconas) e grupos aldeídos, mas não foi possível isolar as substâncias para realizar a identificação estrutural. Os extratos metanólicos das cascas, das folhas e dos galhos, assim como as fases de polaridade intermediária e mais polares dos extratos diclorometânico e metanólicos das cascas, apresentaram um maior potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH. Dos extratos e fases testados para atividade citotóxica frente à *Artemia salina* e sobre as células L929, os que tiveram resultados significativos foram os extratos diclorometânico das flores da 1ª coleta e metanólico das cascas da 2ª coleta. Todos os extratos apresentaram baixa atividade contra *Aeromonas hydrophila*. No entanto, frente a outros micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) foram ativos os extratos: 1 Galho DCM (1000 $\mu\text{g/mL}$), 1 Folha MeOH (1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e 1 Flor MeOH (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus*, 1 Folha MeOH (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra os três micro-organismos e 1 Flor DCM (1000 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* e *E. coli*. Das fases testadas, somente a fase 2 CaM 3.1 (1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentou atividade sobre *S. aureus*. Os resultados das atividades biológicas mostraram que várias das fases que apresentaram atividades provinham de extratos brutos inativos ou com baixa atividade, o que indica a importância do fracionamento de extratos biologicamente ativos e daqueles quimicamente interessantes.

Palavras-chave: *Andira retusa*, lupeol, β -sitosterol, estigmasterol, antioxidante, antimicrobiano, toxicidade.

ABSTRACT

In this work was realized a phytochemical study and evaluations of extracts and phases of *Andira retusa* (Fabaceae) regarding activities such as antioxidant, cytotoxic and antimicrobial. This is the first chemical and biological study with this species. There was realized two collects of vegetal material, whose extracts were analyzed by TLC. From chromatographic fractionation of dichloromethane phase of barks methanolic extract resulted in the isolation of lupeol and the mixture of β -sitosterol and stigmasterol. There were also fractionated: the flowers dichloromethane extract; the dichloromethane and ethyl acetate phases from the barks dichloromethane extract and the ethyl acetate phase from the barks methanolic extract. The NMR ^1H spectrum of these extracts and phases showed signs characteristic of terpenes (possibly steroids), aromatic compounds (likely flavonoids and chalcones) and aldehydes groups were observed, but were not possible to isolate the compounds to realize the structural identification. The barks, leaves and branches methanolic extracts, as well as the ethyl acetate and butanolic phases from the barks dichloromethane and methanolic extracts, showed a major antioxidant potential against free radical DPPH. The extracts of 1 DCM Flower and 2 MeOH Bark showed high cytotoxic potential against *Brine shrimp* Lethality and on cells L929. All extracts showed low activity against *Aeromonas hydrophila*. However, when analyzed for antimicrobial activity against other microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), there were observed the activity for the extracts: 1 DCM Branches (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1 MeOH Leaves (1000 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 1 MeOH Flowers (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against *S. aureus*, 1 MeOH Leaves (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against all three microorganisms assays and 1 DCM Flowers (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against *S. aureus* and *E. coli*. Of all phases tested, only phase 2 CaM 3.1 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed antimicrobial activity against *S. aureus*. The results of biological activities showed that many of the phases whose demonstrated biological activities came from inactive or with low activity crude extracts, which indicated the importance of fractionating biologically active extract as well as those chemically interesting ones.

Key-words: *Andira retusa*, lupeol, β -sitosterol, stigmasterol, antioxidant, antimicrobial, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários	6
Figura 2: Rota biossintética básica dos produtos naturais	7
Figura 3: Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina (1), tirosina (2) e triptofano (3)	9
Figura 4: Diferentes fases de desenvolvimento da <i>Artemia salina</i> : 1) cistos entrando no período de eclosão; 2) eclosão das larvas após a imersão em solução salina; 3) larva após 48 horas	15
Figura 5: Mapa de distribuição da família Fabaceae	19
Figura 6: Foto da <i>Andira retusa</i> (Kunth) coletada. Fonte: Cecilia Veronica Nunez	24
Figura 7: <i>Andira surinamensis</i> (Bondt) Splitg. ex Amshoff – A) ramo com inflorescência; B) fruto evidenciando cálice e andorceu persistentes; C) peça da carena; D) peça da ala; E) cálice e androceu; F) flor; G) gineceu; H) cálice; I) vexilo. A, C-I de J. M. Pires & N.T. da Silva 4224 (IAN); B de C. S. Rosário & I. C.B. Lobato 1405 (MG)	25
Figura 8: Fluxograma da preparação dos extratos	29
Figura 9: Fluxograma da partição líquido-líquido dos extratos de <i>Andira retusa</i>	31
Figura 10: Fluxograma geral dos fracionamentos	34
Figura 11: Béquer contendo larvas de <i>Artemia salina</i> com 48 horas	38
Figura 12: Organograma do teste de citotoxicidade em L929	39
Figura 13: Análise em CCDC dos extratos DCM. Flor, Folha, Galho, Casca (1 ^a coleta), Casca (2 ^a coleta). Eluição em Hex/AcOEt (2:8). Reveladores: 1 – sulfato de cério IV; 2 – DPPH; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 – cloreto de ferro III	41
Figura 14: Análise em CCDC dos extratos MeOH. Flor, Folha, Galho, Casca (1 ^a coleta). Eluição em DCM/AcOEt (4:6) e DCM/MeOH (9:1). Reveladores: 1 – cloreto de ferro III; 2 – DPPH; 3 – UV 365 nm; 4 – anisaldeído sulfúrico	42
Figura 15: Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico das flores de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	44
Figura 16: Análise em CCDC das frações do extrato DCM das flores. Eluição em Hex/DCM (2:8) e revelada com UV 254 nm (1), UV 365 nm (2), sulfato de cério IV (3) e anisaldeído sulfúrico (4)	44
Figura 17: Espectro de ¹ H da fração 8-12 do extrato DCM das flores (60 MHz)	45
Figura 18: Análise em CCDC das fases do extrato metanólico das cascas. Eluição em DCM/AcOEt (3:7) e revelada com: 1 - visível; 2 - UV 254 nm; 3 - UV 365 nm; 4 - sulfato de cério IV	45
Figura 19: Fluxograma do fracionamento das fases DCM dos extratos metanólicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	46
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H da fração 1/2 CaM 1.2	47

Figura 21: Estrutura básica de um Flavonol	48
Figura 22: Espectro de RMN de ^1H da fração 1/2 CaM 1.5-7	50
Figura 23: Fluxograma do fracionamento da fração 12-15 das fases DCM dos extratos metanólicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	51
Figura 24: Análise em CCDC das frações da coluna da fase DCM dos extratos metanólicos das cascas. Eluição em Hex/DCM (4:6) e revelada com: 1 – UV 365 nm; 2 - UV 254 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV	52
Figura 25: Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9)	55
Figura 26: Expansão do espectro de RMN de ^1H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9) – Região dos hidrogênios olefínicos	56
Figura 27: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9) – Região dos hidrogênios olefínicos	57
Figura 28: Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.16-22	58
Figura 29: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.16-22	59
Figura 30: Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.24-32	62
Figura 31: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.24-32	63
Figura 32: Fluxograma do fracionamento da fase DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	64
Figura 33: Análise em CCDC das frações da coluna da fase DCM dos extratos metanólicos das cascas. Eluição em Hex/DCM (2:8) e revelada com: 1 – UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV	65
Figura 34: Espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)	66
Figura 35: Espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(7-8)	67
Figura 36: Fluxograma do fracionamento da fração 1/2 CaD 1.1 (5-6) das fases DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	68
Figura 37: Espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(3)	69
Figura 38: Expansão do espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(3)	70
Figura 39: Espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(4)	71
Figura 40: Expansão do espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(4)	72
Figura 41: Análise em CCDC das frações da coluna da fração 1/2 CaD 1.1.(5-6). Eluição em Hex/DCM (4:6) e revelada com: 1 – UV 365 nm; 2 - UV 254 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV	73
Figura 42: Fluxograma do fracionamento da fração 1/2 CaD 1.1 (7-8) das fases DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	74

Figura 43: Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt dos extratos diclorometânicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	75
Figura 44: Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth – 1ª coleta	76
Figura 45: Porcentagem de mortalidade dos extratos de <i>Andira retusa</i> frente a <i>Artemia salina</i> , em diferentes concentrações	81
Figura 46: Porcentagem de mortalidade dos extratos de <i>Andira retusa</i> frente a <i>Artemia salina</i> , em diferentes concentrações	83
Figura 47: Esquemas das placas de 96 poços utilizadas nos experimentos e demonstração da disposição das amostras testadas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	84
Figura 48: Absorbância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth. O controle negativo (C-): 200 μL de meio D-MEM, o controle do solvente (Cs): 180 μL de meio D-MEM + 20 μL de solução diluente e o controle positivo (C+): Triton X-100 1%	85
Figura 49: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com os extratos 2 Casca MeOH (A) e 2 Casca DCM (B)	86
Figura 50: Absorbância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) das fases diclorometânica (1/2 CaD 1.1) e acetato de etila (1/2 CaD 1.2) dos extratos diclorometânicos das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	86
Figura 51: Absorbância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) das fases diclorometânica (1 CaM 2.1) e acetato de etila (1 CaM 2.2) do extrato metanólico das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	87
Figura 52: Absorbância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) das fases butanólica (1 CaM 2.3) e diclorometânica (2 CaM 3.1) do extrato metanólico das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	87
Figura 53: Absorbância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) das fases acetato de etila (2 CaM 3.2) e butanólica (2 CaM 3.3) do extrato metanólico das cascas de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	87
Figura 54: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com as fases diclorometânica dos extratos diclorometânicos das cascas (1/2 CaD 1.1) - (A) e acetato de etila dos extratos diclorometânicos das cascas (1/2 CaD 1.2) - (B)	88
Figura 55: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com as fases acetato de etila do extrato metanólico das cascas (1 CaM 2.2) - (A) e butanólica do extrato metanólico das cascas (2 CaM 2.3) - (B)	89

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Microrganismos a serem testados e suas condições de crescimento	35
Tabela 2: Referência de resultados de atividade (halo de inibição – em mm)	36
Tabela 3: Coletas realizadas e características do material vegetal coletado	40
Tabela 4: Extratos preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/ COTI-Inpa	40
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.5-7 (mistura ainda não identificada)	49
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9) comparados com a literatura (SILVA, 2004, em CDCl_3 , 300 MHz)	54
Tabela 7: Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.24-32	61
Tabela 8: Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos brutos de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	77
Tabela 9: Resultados dos testes de atividade antioxidante das fases das partições dos extratos brutos de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	78
Tabela 10: Resultados dos testes de atividade antibacteriana contra <i>Aeromonas hydrophyla</i> dos extratos brutos de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	90
Tabela 11: Resultados dos testes de atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa), <i>Escherichia coli</i> (Ec) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) dos extratos brutos de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	91/92
Tabela 12: Resultados dos testes de atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa), <i>Escherichia coli</i> (Ec) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) das fases de <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila

BuOH – Butanol

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CL_{50} – Concentração Letal de 50% dos indivíduos

CMB – Concentração Mínima Bactericida

COTI – Coordenação de Tecnologia e Inovação

CLSI – Clinical Laboratory and Standards Institute

\emptyset – Diâmetro

d – Dupleto

dd – Duplo dupleto

DCM – Diclorometano

D-MEM – meio de cultura DULBELCCO MEM

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

dt – Duplo tripleto

h – Altura

Hex – Hexano

Hz - Hertz

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

J – Constante de acoplamento

LDL – Low-density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

L-Glu – L-Glutamina

m - Multipleto

MeOH – Metanol

MTT – 3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 il) - 2,5 - difeniltetrazolium bromide

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

ppm – Partes por milhão

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Singleto

SFB – Soro Fetal Bovino

t – Tripleto

TMS - Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Produtos Naturais Bioativos	5
2.2. Atividade Antioxidante	8
2.3. Atividade Antimicrobiana	11
2.4. Atividade Citotóxica	14
2.4.1. <i>Artemia salina</i>	14
2.4.2. Cultivo Celular	16
2.5. Família Fabaceae	19
2.6. Gênero <i>Andira</i>	22
2.7. <i>Andira retusa</i> (Poir.) Kunth	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Equipamentos e Materiais Utilizados	27
4.2. Metodologia	28
4.2.1. Coleta e Preparação dos Extratos	28
4.2.2. Análises Cromatográficas e Fracionamento dos Extratos	29
4.2.3. Atividade Antioxidante	35
4.2.4. Ensaio Biológico	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Coleta e Preparação dos Extratos	40
5.2. Análises Cromatográficas e Fracionamento dos Extratos	41
5.3. Atividade Antioxidante	77

5.4. Ensaio Biológicos	79
5.4.1. Atividade Citotóxica	79
5.4.1.1. <i>Artemia salina</i>	79
5.4.1.2. Cultivo Celular Animal	84
5.4.2. Atividade Antimicrobiana	90
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS	98
8. ANEXOS	112

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas com fins medicinais desde os primórdios da civilização, sendo suas ações terapêuticas repassadas por gerações. No primeiro século da era cristã já eram conhecidas cerca de 600 plantas medicinais pelo botânico grego Pedânios Dioscórides, estas descritas em cinco livros (*De materia medica libri cinque*). Este tratado foi seguido durante cerca de quinze séculos, e por muitos era considerada a primeira farmacopéia da história. Como as plantas estão presentes na natureza em abundância e são de fácil acesso, tornaram-se fonte de recursos na busca de cura de diversas doenças. Sendo assim, desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. E o emprego de plantas no controle das mais diversas doenças e pragas talvez seja tão antigo quanto o próprio aparecimento da humanidade (ROBBERS, SPEEDIE & WARRS, 1997; ELDIN & DUNFORD, 2001; LIMA, 2001; FRANÇA, 2001).

Esse conhecimento adquirido sobre os benefícios obtidos pelo uso empírico das plantas no tratamento de diversas doenças levou à descoberta e ao desenvolvimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna, como ácido acetil-salicílico (AAS), digitálicos, morfina, quinina, atropina, artemisinina (um anti-malárico isolado de *Artemisia annua*), vincristina e vimblastina (alcaloides de *Catharanthus roseus* que são usados em determinadas neoplasias), dentre outros (CORRÊA, 2001; SIMÕES, 2004).

Sendo assim, as plantas constituem uma das mais importantes fontes de substâncias orgânicas, com uma variedade de classes químicas que despertam o interesse científico devido às suas propriedades biológicas e químicas. Então, na busca por novos fármacos, as plantas têm se mostrado uma fonte potencial importante na prospecção de novas substâncias bioativas (GIORDANI, 2008).

Além de seu uso na medicina popular de forma direta, como chás, infusões e extratos, com finalidades terapêuticas, o uso de extratos vegetais com fins terapêuticos tem se difundido bastante, mas somente uma pequena porcentagem tem sido investigada quimicamente e menos ainda farmacologicamente (BARREIRO, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; BORGES & BRANDEBURGO, 2003).

Cada vez mais a indústria farmacêutica vem se interessando pela produção de medicamentos obtidos de plantas medicinais, já que a medicina moderna vem

usufruindo dos produtos de origem natural há muitos anos. Segundo Robbers, Speedie & Warrs (1997), a busca de novas substâncias bioativas em produtos naturais é vantajosa porque os fármacos obtidos são menos custosos do que os produzidos por via sintética. Além disso, podem ser utilizados como estrutura básica na obtenção de novos medicamentos, e com pequenas modificações estruturais tornarem-se mais ativos ou menos tóxicos. (HEINRICH et al., 2004; REIS, MARIOT & STEENBOCK, 2004).

Mas a obtenção de fármacos de produtos naturais tem suas desvantagens, como a falta de reprodutibilidade dos experimentos. O que pode ser considerado um grande problema enfrentado pelos pesquisadores, já que o perfil fitoquímico da planta em estudo pode ser alterado por diversos fatores, como: local de coleta, sazonalidade, temperatura, radiação ultravioleta, índice pluviométrico, estágio de desenvolvimento da planta, polinizadores diferentes, entre outros, sendo necessária a realização de triagens em diferentes coletas, em diferentes períodos do ano, buscando conhecer os efeitos desses fatores sobre a produção dos metabólitos secundários que serão os princípios ativos desses fármacos (RASKIN *et al.*, 2002; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Atualmente, novas tendências globais de preocupação com a manutenção da biodiversidade e desenvolvimento sustentável trouxeram novas perspectivas ao estudo de plantas medicinais brasileiras, que geraram um interesse geral em fitoterapia. Novas linhas de pesquisas foram estabelecidas nas universidades brasileiras com o intuito de buscar bases sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais. Segundo Lima (2001), a tendência atual nas pesquisas de produtos naturais consiste na busca da obtenção de princípios ativos oriundos de plantas, devido ao elevado percentual de diversidade molecular, fato essencial para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (LORENZI; MATOS, 2008).

A fitoterapia e outras práticas farmacológicas tradicionais têm seu uso difundido em todo o mundo. Essa ampla utilização sugere, mas não assegura que os remédios tradicionais apresentem uma relação risco-benefício favorável. Assim, estes podem ser considerados como um potencial e atraente recurso terapêutico. Ao contrário dos medicamentos convencionais, os fitoterápicos são misturas de constituintes, ao menos em parte delas, sem caracterização química, e por serem constituídos por uma mistura fornecem vantagem terapêutica, pois os componentes desconhecidos podem combinar entre si e com aqueles já determinados de maneira

sinérgica resultando em maior eficácia do que aquela apresentada pelo constituinte conhecido puro (OMS, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera 300 fármacos como essenciais para a manutenção da saúde da população de um país, 11% dos quais são obtidos exclusivamente a partir de plantas superiores, número representativo da importância da pesquisa em produtos naturais (OMS, 2011; RASKIN *et al.*; 2002, CORDEIRO *et al.*, 2005).

Esses produtos naturais apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas, dentre elas: atividade cardiovascular, antibacteriana, antifúngica, antirreumática, atividade no sistema nervoso central, antitumoral etc. (NIERO *et al.*, 2003). Sendo que, aproximadamente 60% dos agentes antitumorais e anti-infecciosos que estão atualmente disponíveis comercialmente ou em estudos finais de triagem são de origem natural (SHU, 1998; HEINRICH *et al.*, 2004).

A grande diversidade de plantas constitui uma fonte muito rica para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos. São mais de 30.000 as espécies vegetais identificadas na região amazônica, e estas representam 10% de todas as conhecidas no mundo. Essas plantas podem conter princípios ativos com diversos potenciais terapêuticos contra várias doenças (CECHINEL FILHO & YUNES, 2001; ALBAGLI, 2001; MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI, 2009).

Segundo Cechinel Filho & Yunes (2001), o Brasil apresenta um potencial importante e decisivo quando se considera sua grande riqueza vegetal ainda sem estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos. Dentre os biomas brasileiros, a Floresta Amazônica destaca-se pela biodiversidade, sendo considerada a maior reserva florística do planeta, apresentando uma grande variedade de espécies vegetais que não foram estudadas anteriormente sob a óptica da fitoquímica, nem quanto às suas potenciais aplicações em diferentes áreas da ciência, como o desenvolvimento de produtos para aplicação agrícola ou florestal. Com mais de cinco milhões de quilômetros quadrados, a Amazônia estende-se por nove estados brasileiros, ocupando 60% do território nacional (GUERRA & NODARI, 2001; BORGES *et al.*, 2004).

No entanto, a grande diversidade da flora, principalmente no Brasil, pode ser mais bem estudada e explorada tanto na busca de novas substâncias com potencial terapêutico quanto na elucidação de inúmeras substâncias que são utilizadas pela população sem o conhecimento de suas propriedades, efeitos farmacológicos e tóxicos (TAVARES, 1996).

Dentre as famílias vegetais encontradas na região Amazônica, com reconhecido potencial terapêutico destaca-se a Fabaceae. É a mais importante na composição da vegetação amazônica segundo Huber (1909), compreendendo três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae), 36 tribos, 727 gêneros e 19.325 espécies. Diversas espécies desta família são descritas na literatura com atividades biológicas, tais como anticonvulsivante em *Bauhinia outimouta*, antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, antitumoral, hepatoprotetora e laxativa em *Senna occidentalis*, moluscicida em *Tetrapleura tetraptera*, antibacteriana em *Erythrina velutina* e *Derris malaccensis*, antimicobacteriana em *Derris indica*, toxicidade para insetos em *Deguelia amazonica* (ENGLER, 1964; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002; TAKASHIMA *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 2005; VIRTUOSO *et al.*, 2005; KOYSOMBOON *et al.*, 2006; ALÉCIO, 2007; LOMBARDO *et al.*, 2009).

Fabaceae possui grande interesse econômico, com espécies utilizadas na alimentação como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o grão de bico (*Cicer arietinum*), entre outras. Outra aplicação de Fabaceae é seu uso na adubação verde, principalmente pela associação com bactérias do gênero *Rhizobium* (fixadoras de nitrogênio). Além disso, apresentam grande valor para a indústria madeireira, como os angelins (gênero *Andira*). (SOUZA & LORENZI, 2008; BHAKTA *et al.*, 1999; ASSELEIH *et al.*, 1990; TIWARI & MISRA, 1985).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico de extratos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth, bem como avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica dos extratos desta espécie. Já que esta se encontra numa área de relevância nacional no presente momento, onde está sendo construída uma usina hidrelétrica (Belo Monte). Assim, esta e outras espécies serão impactadas com o alagamento de uma grande área de terras, o que pode causar uma diminuição significativa do número de indivíduos da espécie em estudo e conseqüentemente seu uso pela população, que foi um dos principais motivos para o início do presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produtos Naturais Bioativos

Desde os primórdios da civilização, o Homem busca na natureza recursos para aprimorar suas condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência. Além da utilização das plantas como fonte de alimento, foi incorporada uma busca de matérias-primas para a confecção de roupas, ferramentas e como combustível. Nessa busca, o Homem descobriu os efeitos causados por algumas plantas que foram inadvertidamente consumidas através de ingestão acidental ou propositalmente consumidas. Rapidamente plantas com propriedades alucinógenas foram incorporadas aos rituais religiosos. Populações indígenas de norte a sul das Américas incluíam o tabaco em seus rituais, devido seus efeitos narcóticos, hábito transferido aos colonizadores europeus. Em todas as épocas e nas mais diferentes culturas, o Homem aprendeu a explorar e tirar proveito dos recursos naturais locais. Ao longo dos anos, o conhecimento adquirido sobre o uso de plantas foi repassado oralmente através de gerações, sendo que algumas dessas plantas usadas na medicina tradicional desde aquela época ainda fazem parte do tratamento habitual de diversos males (ROBBERS, SPEEDIE & WARRS, 1997; HEINRICH *et al.*, 2004; DUARTE, 2005; LORENZI, MATOS, 2008).

Os primeiros relatos da utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos são encontrados no código de Hamurabi (2.000 a.C), no manuscrito egípcio *Ebers Papyrus* (1.500 a.C) e na coletânea de cinco livros sobre cerca de 600 plantas medicinais do botânico grego Pedânios Dioscórides, datada do primeiro século da era cristã, e que foi seguida por cerca de quinze séculos. Toda a história da medicina se encontra ligada às plantas medicinais, pois somente em 1928, Friedrich Wohler sintetizou a uréia (substância orgânica) a partir de matéria-prima inorgânica (cianato de amônio), fato que revolucionou o conhecimento da época o qual dizia que matéria orgânica só podia ser obtida de vegetais e animais. Isso impulsionou a farmacologia moderna na elaboração de medicamentos sintéticos (CORRÊA, 2001; ELDIN & DUNFORD, 2001; SIANI, 2003; DUARTE, 2005).

O potencial terapêutico dos vegetais é conhecido e utilizado por diferentes culturas, especialmente nas áreas rurais de países em desenvolvimento, onde muitas vezes é o único recurso como tratamento de diversas enfermidades. Entre as aplicações empíricas mais antigas de produtos naturais estão o uso do molho de soja para o tratamento de furúnculos, carbúnculos e outras infecções cutâneas na

China (2.500 a.C), a utilização de mel em feridas infectadas no Egito (2.000 a.C) entre outras (ARAÚJO & LEON, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; ACUÑA, 2003; COUTINHO *et al.*, 2004).

Plantas medicinais são aquelas que possuem em sua composição, substâncias químicas, sintetizadas a partir de nutrientes, água e luz que provocam no organismo reações que podem variar entre o abrandamento de doenças e a cura, através do teor da ação de princípios ativos (FETROW & ÁVILA, 1999).

Princípios ativos são metabólitos secundários que exercem efeito farmacológico ou terapêutico. Em plantas, estes podem ser encontrados em flores, folhas, raízes, frutos, caules e cascas. Sua concentração não é homogênea, variando com vários fatores abióticos e bióticos (Figura 1), como: sazonalidade, temperatura, herbivoria e ataque de patógenos, radiação UV, índice pluviométrico, parte da planta, competição, estágio de desenvolvimento da planta etc. (SIMÕES *et al.*, 2004; SANTOS, 2004; NOLDIN, *et al.*, 2003; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

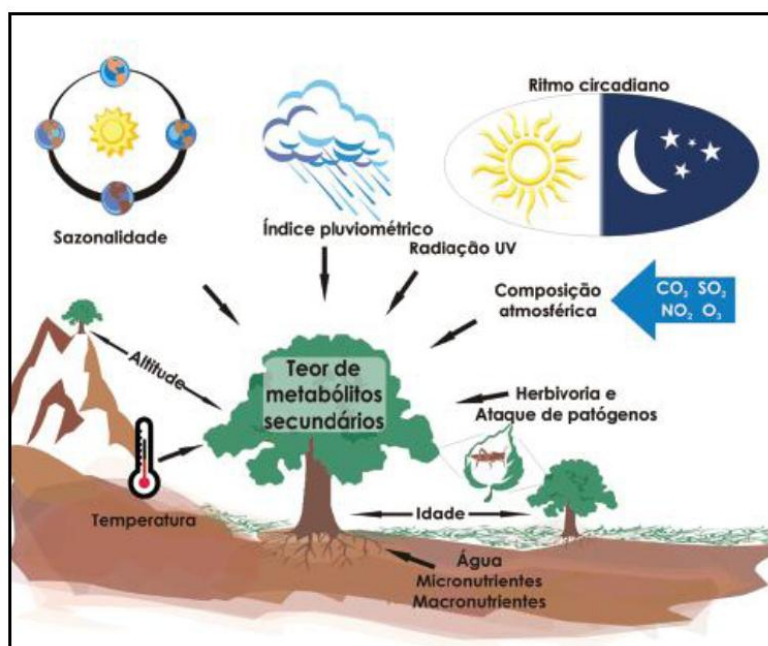


Figura 1: Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários.
Fonte: Gobbo-Neto & Lopes, 2007.

Portanto, se um estudo visa encontrar substâncias bioativas de vegetais, ou padronização de extratos com utilização terapêutica, deve considerar todos os fatores que possam influenciar a produção ou o acúmulo da(s) substância(s) de interesse, tendo cuidado especial com relação à época e local da coleta, secagem, transporte etc. (CALIXTO, 2001).

Muitos princípios ativos, mesmo não sendo necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da sua espécie no ambiente em que vive. Estas substâncias pertencem a vários grupos, entre estes estão: flavonoides, terpenoides, taninos, compostos fenólicos, alcaloides, antraquinonas, cumarinas etc. (VERPOORTE & MARASHIN, 2001; SANTOS, 2004).

Esses metabólitos têm como precursor comum a glicose, que através de dois intermediários principais de seu metabolismo, o ácido chiquímico e o acetato, que posteriormente serão os precursores dos principais grupos de metabólitos secundários. A rota biossintética básica dos produtos naturais está esquematizada na Figura 2 (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997; SIMÕES *et al.*, 2004).

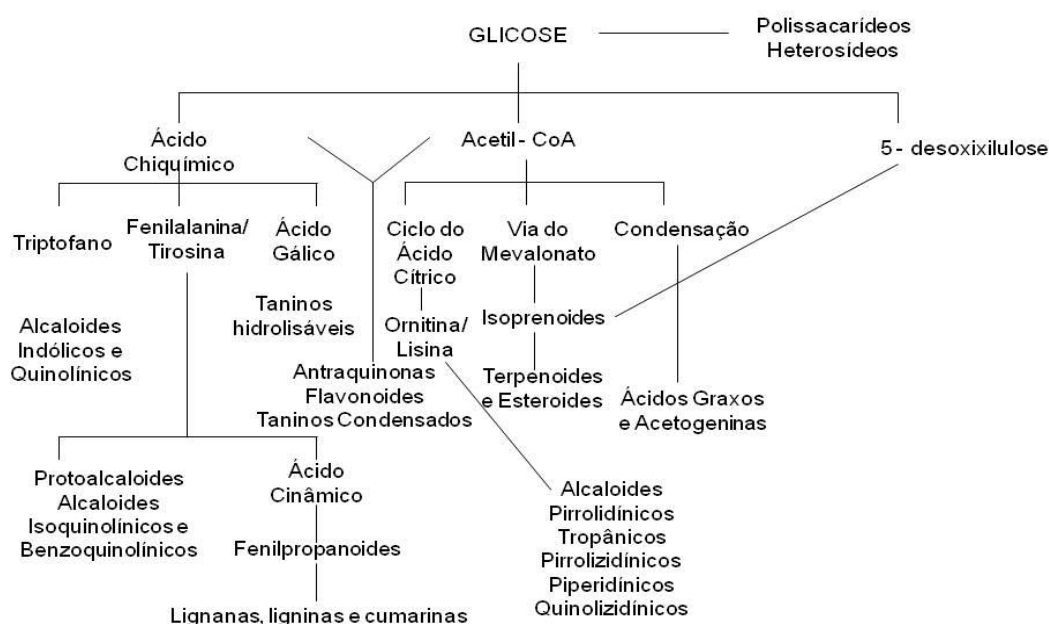


Figura 2: Rota biossintética básica dos produtos naturais. Fonte: SIMÕES *et al.*, 2004; DEWICK, 2002.

Os metabólitos secundários produzidos por plantas foram essenciais para o desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, tal desenvolvimento ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, utilizados como medicinais. (MONTANARI & BOLZANI, 2001; DEWICK, 2002).

O desenvolvimento de diversos medicamentos parte de um produto natural, geralmente extraído de um vegetal, passa por várias modificações até chegar a um produto que, aparentemente, tem pouca relação com o seu precursor natural (ROBBERS, SPEEDIE & TYLER, 1997).

Na prospecção de novos fármacos, os vegetais são excelentes fontes de matéria-prima, pois apresentam uma diversidade molecular de produtos naturais muito superior àquela derivada dos processos de síntese química. E como é essa diversidade estrutural um dos pontos cruciais nas pesquisas que visam atingir diferentes alvos biológicos, o estudo de produtos naturais tem buscado esse objetivo, já que durante os milhões de anos da evolução biológica, a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável (NOBRE, 2008; BARREIRO, 2001; CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001).

No Brasil, as pesquisas voltadas para a descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitoterápicos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando-se em consideração que a diversidade de metabólitos produzidos nos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada do ponto de vista farmacológico (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Entre esses biomas, a Floresta Amazônica destaca-se no fator biodiversidade, ainda pouco estudado do ponto de vista da fitoquímica, e considerando a grande diversidade de plantas que podem constituir uma fonte muito rica para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos (CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001).

2.2. Atividade Antioxidante

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (PIETTA, 2000; RICE-EVANS, 1996).

A atividade antioxidante está relacionada com o número de grupos hidroxilas livres e com o tamanho da cadeia carbônica com ligações duplas conjugadas. Os extratos que possuem atividade antioxidante frequentemente contêm substâncias fenólicas derivadas dos aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 3), como as cumarinas, os flavonoides e as catequinas. Os ácidos orgânicos,

carotenoides, tocoferóis, proteínas, taninos também podem estar presentes, e terem atividade como antioxidantes ou ter um efeito sinérgico com substâncias fenólicas (MOSADDIK *et al.*, 2004; DAPKEVICIUS *et al.*, 1998).

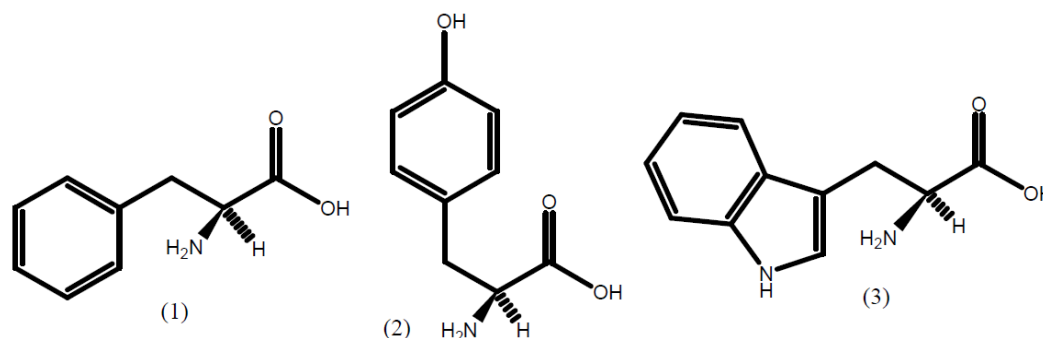


Figura 3: Estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina (1), tirosina (2) e triptofano (3).

Entre as diversas atividades biológicas dos metabólitos secundários produzidos por vegetais, inclui-se a atividade antioxidante, que tem sido amplamente explorada na área de cosmetologia e produção de alimentos (DE LIMA, MELO & LIMA, 2002).

O consumo de frutas e hortaliças tem aumentado principalmente em decorrência do seu valor nutritivo e efeitos terapêuticos. Estes alimentos contêm diferentes fitoquímicos, muitos dos quais possuem propriedade antioxidante que pode estar relacionada com o retardo do envelhecimento e a prevenção de certas doenças. Estudos têm demonstrado que outras substâncias antioxidantes, além dos bem conhecidos β -caroteno, vitamina C e vitamina E, têm contribuído para a total capacidade antioxidante desses vegetais (RICE-EVANS; MILLER & PAGANGA, 1996; WANG, CAO & PRIOR, 1996).

Foi evidenciado em pesquisas que substâncias fenólicas exibem ação antioxidante. Pearson *et al.* (1999) demonstraram que os fenólicos presentes em suco comercial e extrato fresco de maçãs (casca, polpa e fruta inteira) inibiram, *in vitro*, a oxidação de LDL humana. A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo frutos, folhas, sementes e plantas medicinais, está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais. Os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante de diversos vegetais (VELIOGLU *et al.*, 1998; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999).

Existe uma tendência mundial em usar pigmentos naturais como corantes para alimentos e entre eles destacam-se as antocianinas. Esse interesse é também influenciado pelas observações promissoras de seu potencial benéfico à saúde decorrente de sua ação antioxidante (DE LIMA, MELO & LIMA, 2002).

A acerola apresenta grandes concentrações de ácido ascórbico enquanto que em morango, amora e açaí, predominam determinados grupos de flavonoides como antocianinas, flavonóis e flavonas (ASSIS, *et al.*, 2001; CORDENUNSI *et al.*, 2005; MAATTA-RIIHINEN, *et al.*, 2004; POZO-INSFRAN *et al.*, 2004).

Os antioxidantes de origem vegetal pertencem a diferentes classes de metabólitos, mas os flavonoides constituem o grupo mais representativo, sendo encontrado com elevada diversidade de formas (WILHEM-FILHO *et al.*, 2001).

O uso de produtos que tem em sua composição as chamadas espécies químicas antioxidantes tem por objetivo retardar ou inibir esse processo, prolongando assim a vida da célula. A busca por um estilo de vida benéfico à saúde do indivíduo tem impulsionado as pesquisas científicas em busca de novos antioxidantes, principalmente de origem natural, que possam ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética entre outras (FRAGA FILHO, 2003; MELO, 1989; KIM *et al.*, 1997; MATIUCCI, 1998; MENSOR, 1999; MOREIRA, 1999; FREITAS, 2000).

Várias pesquisas indicam que diversos tipos de danos teciduais, inclusive em tecidos vitais, são causados por radicais livres, que são grupos de substâncias químicas produzidas naturalmente em grandes quantidades no organismo, muitas vezes em decorrência do próprio metabolismo. Assim, tem se desenvolvido o conhecimento sobre o papel dos radicais livres na produção de doenças, e na busca de meios de intervir, minimizando os danos causados pelos mesmos. Essas intervenções dão-se na forma de um ataque aos radicais livres pela utilização de substâncias com atividade antioxidante (YOUNGSON, 1996; BALESTRIN, 2006).

O aumento de radicais livres está relacionado com o processo de envelhecimento do corpo humano, assim como o aparecimento de tumores e o dano tecidual (WILHEM-FILHO *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa do organismo. EROs em excesso podem originar no organismo, através de falha na respiração mitocondrial, ativação de polimorfismo nuclear, ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos, e catálise da ligação de ferro ou cobre (fatores endógenos) (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Os produtos antioxidantes eficazes são os que impedem o excesso de EROs, através da estimulação do mecanismo de reparo antioxidante ou da doação ou captura de elétrons para a estabilização do radical livre (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

Segundo Roginsky e Lissi (2005), a atividade antioxidante é a capacidade de um componente (ou composição) de inibir a degradação oxidativa. E no intuito de realizar uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante para a prevenção de doenças crônico-degenerativas, tem sido desenvolvidas diversas técnicas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* dessas substâncias e/ou misturas. Para avaliar a atividade antioxidante tem sido utilizados largamente métodos de sequestro de radicais livres, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila). Este método baseia-se na descoloração de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta. Quando da adição de substâncias antioxidantes (sequestrantes de radicais livres) que podem ceder um átomo de hidrogênio, ocorre a redução das mesmas, dependendo da quantidade de hidroxilas disponíveis. Com essa reação, ocorre uma mudança de coloração do DPPH que se torna amarelo. Esta reação é amplamente utilizada para testar a habilidade de compostos em sequestrarem radicais livres ou doadores de hidrogênio, e assim, avaliar a atividade antioxidante de alimentos e extratos vegetais (HUANG *et al.*, 2005; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; YAMAGUCHI *et al.*, 1998 apud GAMA, 2008).

Alguns metabólitos secundários, como os flavonoides, além de atuarem como antioxidantes naturais, também apresentam outras atividades biológicas como, por exemplo, inibidores de importantes enzimas virais, como a transcriptase reversa e protease, e também como antimicrobianos (HAVSTEEN, 2002).

2.3. Atividade Antimicrobiana

O Homem e os micróbios partilham uma vida em comum. Provavelmente desde a pré-história os micro-organismos provocam doenças no Homem. Assim, a saúde dos seres vivos em geral sofre constantes ameaças ocasionadas por infecções de micro-organismos, principalmente pelos que são resistentes aos agentes antimicrobianos. Tal resistência a medicamentos e a substâncias específicas ocorre em resposta da evolução dos mesmos. Dentre as medidas que podem ser tomadas para evitar ou diminuir essa resistência, está o uso racional de antibacterianos e o desenvolvimento de novos medicamentos. Neste sentido, o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, através da prospecção de novas classes de moléculas naturais ou sintéticas (SOUZA *et al.*, 2003; PRATES, 2002; WANNMACHER, 2004).

A pesquisa de atividade antimicrobiana refere-se a diferentes técnicas ou métodos laboratoriais *in vitro*, os quais são utilizados para determinar o potencial antimicrobiano de um determinado agente. Para isso existem três métodos que podem ser utilizados para esta avaliação: método de difusão, método de diluição e bioautográfico. O método de difusão consiste em utilizar um reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície) onde é colocada a substância a ser testada, ficando em contato direto com o meio de cultura sólido inoculado com um determinado micro-organismo. Após o tempo adequado de incubação mede-se o diâmetro ou o halo de inibição (SOUZA *et al.*, 2003).

O método de diluição utiliza uma quantidade fixa de amostra, a qual é dissolvida homogêaneamente num meio sólido ou líquido. Geralmente, utilizam-se diluições da amostra original. E a cada uma delas se inocula o micro-organismo de interesse. Sendo que após o período de incubação, é determinada a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo. Já a bioautografia é um método que visa localizar substâncias com ação antimicrobiana numa placa cromatográfica onde está impregnado um extrato ou fração, permitindo assim guiar o isolamento da substância ativa (SOUZA *et al.*, 2003).

Há décadas o interesse em antimicrobianos oriundos de plantas é crescente, ocorrendo desta forma uma inter-relação entre a química dos produtos naturais e a microbiologia. A medicina por sua vez, é cada vez mais receptiva ao uso de antimicrobianos e outras drogas derivadas de organismos vegetais (COWAN, 1999).

Muitos produtos naturais como a própolis vêm sendo utilizados como antimicrobianos destacando sua ação sobre *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Candida* sp e sobre inúmeros outros micro-organismos. Foi verificado também que bactérias Gram-positivas se mostram mais sensíveis que as Gram-negativas aos extratos de própolis (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 1995, 1997, 2001, 2003 e 2005; BOSIO *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2000; STEPANOVIC *et al.*, 2003; BANSKOTA, TEZUKA & KADOTA, 2001; BEHERA *et al.*, 2008; LOGUERCIO *et al.*, 2005; MAHASNEH & EL-OQLAH, 1999; SISTI *et al.*, 2008).

Na busca de medicamentos tradicionais com atividade antimicrobiana, muitos países têm mantido programas de pesquisa como é o caso da Índia, Palestina, África, Honduras, Jordânia, Cuba e Itália. No Brasil, muitas têm sido as pesquisas baseadas no conhecimento popular na busca de novos produtos antimicrobianos (AHMAD & BEG, 2001; ALI-SHTAYEH *et al.*, 1998; BABA-MOUSSA, AKPAGANA &

BOUCHET, 1999; LENTZ *et al.*, 1998; MAHASNEH, ADEL & EL-OQLAH, 1999; MARTÍNEZ *et al.*, 1996; PANIZZI *et al.*, 1993).

Plantas dos biomas brasileiros foram usadas como medicamento natural pelas populações locais no tratamento de diversas doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções por fungos e bactérias. No entanto, apesar da flora rica, somente dados de poucas plantas são disponíveis, incluindo tanto espécies nativas quanto exóticas. Várias substâncias de origem vegetal, inclusive de espécies brasileiras, já apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica, como flavonoides obtidos de variadas espécies vegetais, alcaloides, como anonaína e isoboldina, isolados de *Annona salzmanii*, e o ácido hidroxibenzóico, isolado de *Piper aduncum* (PATHAK *et al.*, 1991; PAULO *et al.*, 1992; ORJALA *et al.*, 1993; ALVES *et al.*, 2000; LIMA, 2001; SARTORATTO *et al.*, 2004).

As florestas tropicais são as regiões que abrigam a maior diversidade de espécies devido às suas características favoráveis. Os princípios ativos naturais possuem classes metabólicas que exercem funções como a defesa contra herbívoros, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, a alelopatia etc. E estudos mostram que plantas com estas classes de metabólitos apresentam efeito terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes bacterianos. (SANTOS, 2004; MALHEIROS & PERES, 2001; CUNICO *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2005).

Os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos. As drogas antimicrobianas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam o micro-organismo, ou bacteriostáticas, quando impedem o crescimento do mesmo. No caso das drogas bacteriostáticas, o hospedeiro se defende por si, utilizando mecanismos como a fagocitose e a produção de anticorpos, normalmente destruindo o micro-organismo (LIMA, 2001; TORTORA *et al.*, 2005).

Entre as bactérias Gram-positivas de interesse clínico destaca-se *Staphylococcus aureus* devido a sua resistência a muitos fármacos. Por isso, infecções por *S. aureus* estão entre as maiores causas de desordens cutâneas, respiratórias, ósseas e endovasculares (BROWN & NGENO, 2007; LOWY, 2003).

Já entre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são os microrganismos que apresentam maior interesse clínico. Segundo Nobre (2008), embora cepas de *E. coli* ocorram naturalmente na microbiota intestinal, certas linhagens podem apresentar alta capacidade de causar uma variedade de doenças. Ocorrendo isso, passa a ser considerado como o maior patógeno de humanos e animais, estando relacionado a infecções do trato urinário, gastrintestinais e infecções nosocomiais, incluindo septicemia e meningites (SANTO *et al.*, 2006; NOBRE, 2008).

Além das doenças causadas por bactérias, as de origem fúngica vêm aumentando o número de infecções que acometem humanos nas últimas duas décadas, como resultado das imunodeficiências associadas com o vírus HIV, quimioterapia anticancerígena, transplantes, e doenças oportunistas que acometem idosos e neonatos. E apesar de existirem potentes agentes antifúngicos como a anfotericina B, o aparecimento de resistência ou multirresistência de fungos demonstra a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (ZACCHINO, 2001; MARQUI *et al.*, 2008).

As infecções fúngicas por leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por milhões de visitas ao consultório médico a cada ano. Entre as espécies desse gênero, *Candida albicans* é a espécie mais comum, causando entre 85 e 90% dos casos (TORTORA *et al.*, 2005).

A descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana é, portanto, uma necessidade urgente e crescente devido a fatores como o aumento da incidência de novas e reemergentes enfermidades infecciosas, juntamente com a resistência desenvolvida pelos micro-organismos aos antibióticos usados clinicamente (MALLAVAPURU, 2001).

2.4. Atividade Citotóxica

2.4.1. *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um crustáceo filtrador conhecido desde 1755. Na metade do século XIX, foram feitos vários estudos em relação à sua morfologia e taxonomia. Posteriormente, o crustáceo anostráceo seria usado para fazer experimentos de histologia, genética, radiologia, toxicologia, bioquímica, biologia molecular, ecologia, entre outros (VINATEA, 1982).

Geralmente, os anostráceos são sensíveis a temperaturas elevadas e normalmente desaparecem no final da primavera e verão e toleram uma alta salinidade. E tem sido introduzido em laboratórios de Produtos Naturais no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (SIQUEIRA, BOMM & PEREIRA, 1998; MEGLITSCH, 1986).

Os estágios larvais da *A. salina* são facilmente reprodutíveis a partir dos seus cistos resistentes à dessecação, não sendo necessários equipamentos específicos e complexos para desenvolvê-los. A obtenção destes estágios larvais tem início com a imersão em água marina artificial (solução salina) dos cistos secos (facilmente encontrados em lojas de aquaristas, onde montam e vendem aquários de água salgada). O desenvolvimento das larvas dá-se no período de 48 horas, assim como pode ser observado na figura 4.



Figura 4: Diferentes fases de desenvolvimento da *Artemia salina*: 1) cistos entrando no período de eclosão; 2) eclosão das larvas após a imersão em solução salina; 3) larva após 48 horas (Fonte: BREEDER, 2006)

Além disso, os cistos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e a baixas temperaturas. Quando reidratados, os cistos de *Artemia salina* eclodem em aproximadamente 24 horas, sendo que o ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de citotoxicidade (MICHAEL *et al.*, 1956; McLAUGHLIN *et al.*, 1998).

A utilização de bioensaios para monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado à pesquisa fitoquímica. Com o intuito de avaliar a citotoxicidade de extratos, frações e substâncias através de um bioensaio com um sistema de *screening* rápido e sensível, novas metodologias foram desenvolvidas, entre elas o ensaio empregando larvas *Artemia salina*. Esse ensaio visa facilitar o estudo farmacológico e toxicológico com baixo custo, utilizando assim, pouca quantidade de material (McLAUGHLIN, et

al., 1991 e 1993; HAMBURGER, et al.,1991; ALBERTON, 2002; NOLDIN & CECHINEL, 2003; GONZÁLES *et al.*, 2007).

Podem ser observadas a validade e confiabilidade deste bioensaio, onde a toxicidade para *A. salina* convergiu para as frações que continham uma substância reconhecidamente ativa, o que demonstra a sensibilidade da metodologia (SIQUEIRA, BOMM & PEREIRA, 1998).

O bioensaio utilizando este organismo foi inicialmente proposto por Michael e colaboradores (1956), onde se avaliou a citotoxicidade de inseticidas. Segundo Meyer *et al.* (1982), o ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2 - 20mg). O teste, então, permite a avaliação de metabolitos e extratos tóxicos e também a determinação de sua concentração em que a porcentagem de mortalidade seja de 50% dos indivíduos (CL₅₀) (GONZÁLES *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, entre outras (MacRAE et al., 1988).

2.4.2. Cultivo Celular

Uma das características da maioria dos animais é que eles são multi ou pluricelulares. Com essa multicelularidade vem a especialização das células. Em um organismo multicelular, cada célula não desempenha todas as atividades necessárias à sobrevivência do organismo. No entanto, a maioria das células em organismos superiores possui muitas organelas e vias metabólicas em comum, cada célula é também única expressando alguns desses componentes a fim de cumprir uma função específica no organismo. O resultado dessa especialização ou diferenciação celular é que os animais vertebrados possuem mais de 100 tipos diferentes de células, cada qual com características específicas como tamanho, formato, estrutura e função (UNCHERN, 1999).

Muitas células animais, com cuidados especiais, podem ser induzidas a crescer fora de seus órgãos ou tecidos de origem. Células isoladas, tecidos e órgãos podem crescer quando são mantidos a temperaturas definidas usando incubadora, meio suplementado com nutrientes para célula e fatores de crescimento. A cultura *in*

in vitro de órgãos, tecidos e células é coletivamente conhecida como cultura de tecidos, e é usada em muitas áreas da ciência (UNCHERN, 1999).

O ano de 1907 é considerado um marco do início dos cultivos de células animais, com o sucesso dos experimentos de Ross Harrison, que descreveu a manutenção e o crescimento de células nervosas em suspensão por um período superior a 30 dias (KRETZMER, 2002).

Em 1949, Enders, Weller e Robbins mostraram ser possível a obtenção de uma linhagem de poliovírus em culturas primárias de tecidos não-neurais. Isso permitiu a propagação de grandes volumes de vírus e atenuação do poliovírus para uso em vacinas (JUBELT & LIPTON, 1989).

Cinco anos depois, a primeira vacina de uso humano contra poliomielite obtida em cultura de células de rins de macaco foi licenciada. Segundo Butler (2005), até o ano de 2005 havia mais de 30 biofármacos licenciados, entre eles proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e produtos baseados em ácidos nucleicos obtidos através de cultura de células animais.

O cultivo de células animais tem sido largamente utilizado pela indústria biotecnológica para sintetizar produtos, que são em sua grande maioria, destinados à área de saúde humana e animal. A combinação de diversos fatores como a composição do meio de cultivo, a densidade do inóculo celular e o tipo de suporte para adesão celular (no caso de células aderentes) são essenciais para o sucesso do cultivo *in vitro* das células animais. Também se destacam a temperatura, o pH, a pressão osmótica, a agitação e a concentração de oxigênio dissolvido como fatores que influenciam o cultivo celular (MITSUHASHI, 1989).

Os produtos de células animais são tipicamente moléculas de massa molar elevada (em muitos casos proteínas), que podem ser classificados em cinco categorias segundo Augusto e Oliveira, 2001:

- Substâncias imunobiológicas (como vacinas virais, anticorpos monoclonais e citocinas); bioinseticidas (exemplo: baculovírus);
- Enzimas (como asparaginase, colagenase, citocromo P450, fatores sanguíneos VII, VIII e IX, pepsina, renina, tripsina e uroquinase);
- Hormônios de cadeias longas (com 50 a 200 resíduos de aminoácidos, como os hormônios luteinizantes, coriônico, folículo estimulante);
- Células propriamente ditas, utilizadas como fonte para a extração de enzimas e hormônios, em testes toxicológicos, como substrato para sistemas de

bioensaios, como ferramenta de seleção para agentes antitumorogênicos, antivirais e antídotos de drogas, como tecido artificial e outras aplicações.

Os diferentes tipos de células que podem crescer em cultura incluem elementos conectores de tecidos como os fibroblastos, tecido ósseo (osso e cartilagem), músculos cardíaco e liso, tecido epitelial (fígado, rim, pele, bexiga), células neuronais (células da glia e neurônios, no entanto, estes não podem se proliferar *in vitro*), células endócrinas (adrenal, pituitária, células pancreáticas), melanócitos e vários tipos diferentes de células tumorais. O desenvolvimento dessas técnicas de cultura de tecidos tem muito a contribuir com as duas principais linhas de pesquisa na área médica: pesquisa sobre câncer e virologia, bem como no desenvolvimento da biotecnologia (UNCHERN, 1999).

As culturas podem ser derivadas de tecidos adultos ou de tecidos embrionários. Sendo que as culturas de tecidos embrionários geralmente sobrevivem e crescem melhor que aquelas que foram tiradas de tecidos adultos. Tecidos de quase todas as partes do embrião são facilmente cultiváveis, visto que tecidos de adultos são geralmente difíceis quando não impossíveis de serem cultivados. Isso reflete claramente o baixo nível de especialização e presença de precursores de replicação ou células pluripotentes (*stem cells*) no embrião. Tecidos adultos geralmente têm uma baixa fração de crescimento e uma grande proporção de células especializadas não replicantes, geralmente mais estruturada, e com matriz extracelular menos desagregada. A iniciação e propagação são mais difíceis e o período de sobrevivência desse tipo de cultura é geralmente menor (UNCHERN, 1999).

Exemplos de linhagens largamente usadas são as várias linhagens 3T3 (fibroblastos de embrião de camundongo), L929 (fibroblastos de tecido conectivo de adipócitos obtidos de camundongos machos adultos com 100 dias de idade) e MRC-5, e fibroblastos de rim de feto humano. Células derivadas de mesoderme (fibroblastos, endotélio, mioblastos) são mais facilmente cultivados do que tecidos epiteliais, neuronais ou endócrinos mas isso pode explicar o extenso uso de culturas de fibroblastos durante os primeiros anos do desenvolvimento da cultura de células devido a células de mesoderme apresentarem fatores mitogênicos no soro (UNCHERN, 1999; RJCB Collection, 2006).

2.5. Família Fabaceae

A família Fabaceae (Leguminosae) pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Fabales e compreende três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Apresenta distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 727 gêneros e aproximadamente 19.325 espécies, distribuídos em 36 tribos, representando uma das maiores famílias de Angiospermas, é também uma das principais do ponto de vista econômico. No Brasil ocorrem cerca de 175 gêneros e 1.500 espécies. A família encontra-se dispersa em regiões frias, temperadas e tropicais, especialmente, nas regiões subtropicais e tropicais segundo Joly (1998) (CRONQUIST, 1981; ENGLER, 1964; LEWIS *et al.*, 2005; SOUZA & LORENZI, 2008).

Os estudos filogenéticos ainda não foram suficientes para a elaboração de uma classificação aceitável para as subfamílias em Fabaceae. No entanto, é evidente que as subfamílias Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae) são monofiléticas, enquanto Caesalpinioideae é claramente parafilética (SOUZA & LORENZI, 2008).

A América tropical é o maior centro de diversidade de Fabaceae e suas espécies estão representadas nos trópicos úmidos, nas regiões temperadas, nas zonas áridas, na vegetação de altitude ou montanhosa, nas savanas, nas florestas de terra firme da região Amazônica e nas terras baixas inundadas, como os igapós e várzeas, com exceção das regiões árticas e antárticas. A Figura 5 mostra esta vasta distribuição das Fabaceae (SILVA & SOUZA, 2002; BURKART, 1943).

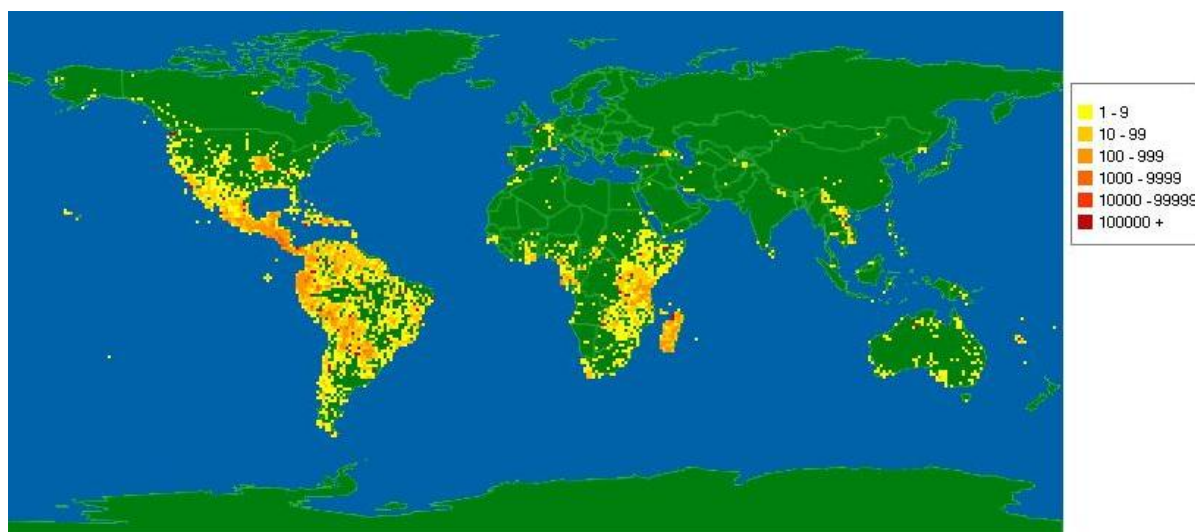


Figura 5: Mapa de distribuição da família Fabaceae (Fonte: Missouri Botanical Garden, 2011)

Esta família apresenta-se como ervas, arbustos, árvores ou lianas; possui folhas alternas, raramente opostas, geralmente compostas, com estípulas, às vezes transformadas em espinhos, frequentemente com nectários extraflorais; inflorescência geralmente racemosa; flores vistosas ou não, geralmente bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, ocasionalmente assimétricas, diclamídeas ou raramente monoclamídeas; cálice geralmente pentâmero, dialissépalo ou gamossépalo, prefloração imbricada ou valvar, pétalas semelhantes entre si ou diferenciadas em carenas ou quilhas (inferiores), alas ou asas (medianas) e vexilo ou estandarte (a superior diferente de todas as outras); estames geralmente em número duplo ao das pétalas, livres ou unidos entre si, anteras rimosas ou raramente porcidas; disco nectarífero geralmente presente; ovário súpero, unicapelar, muito raramente 6 – 12 capelar e dialicapelar, placentação marginal, com óvulos de um a numerosos; fruto geralmente do tipo legume, mas também de outros tipos como drupa, sâmara, folículo, craspédio ou lomento (SOUZA & LORENZI, 2008).

Sementes, folhas, raízes e flores de algumas espécies da família Fabaceae fornecem alimentos ricos em proteína para o homem e animais, além de compreender espécies produtoras de madeiras, de corantes como o brilhante *indigo blue* de algumas espécies de *Indigofera* L. e o vermelho vivo de *Caesalpinia echinata* Lam. – o pau-brasil, e também medicinais, como anti-helmíntico (espécies do gênero *Andira*), e inseticidas. Outra importante aplicação é na adubação verde, considerando a capacidade de algumas espécies associarem-se a bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium*), por exemplo, o feijão-guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) e a alfafa (*Medicago sativa* L.). É também a principal família utilizada na arborização urbana no Brasil, algumas espécies são utilizadas como cercas-vivas, com destaque para o sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) (MATOS, 1979; CORRÊA, 1984; SILVA *et al.*, 2003; LEWIS & OWEN, 1989; SOUZA & LORENZI, 2005; SOUZA & LORENZI, 2008).

Quimicamente, a família Fabaceae é caracterizada pelo número de ocorrências de flavonoides, particularmente isoflavonoides antimicrobianos em suas espécies. Cerca de 28% do total de flavonoides e 95% de todas as estruturas agliconas isoflavonoídicas conhecidas no reino vegetal são produzidos pela família (DUFFUS & DUFFUS, 1991; HEGNAUE & GRAYER-BARKMEIJER, 1993; GRAYER & KOKUBUM, 2001).

Hegnaue & Grayer-Barkmeijer (1993) destacaram além dos flavonoides, os polissacarídeos amido, galactomananas e amiloide, comumente encontrados em sementes de Fabaceae são fatores essenciais na caracterização taxonômica desta família. Ressaltam também que com exceção das tribos Phaseoleae, Viciaeae, Cicereae e Swartzieae, em outras tribos da subfamília Papilionoideae a ocorrência de amido é irregular ou ausente, e no armazenamento de grãos de amido, Caesalpinioideae é uma exceção. Enquanto na subfamília Mimosoideae a situação é semelhante, embora o armazenamento de grãos de amido em sementes ocorre um pouco mais frequentemente. A presença de grandes quantidades de amiloide é restrita às tribos Detarieae e Amherstieae da subfamília Caesalpinioideae, sendo por isso, considerado como uma ferramenta chave na distinção destas tribos.

Além disso, a família é caracterizada pela presença de alcaloides cardioativos, alcaloides com atividade bloqueadora neuromuscular transitória, lectinas usadas no tratamento de gastroenterites, náuseas e diarreia em humanos e gatos. Também podem ser encontrados taninos, isoflavonas, alguns glicosídeos cianogênicos e cristais de proteínas. Harborne (1999) relata que nas décadas de 70 e 80 relacionaram-se 500 tipos diferentes de fitoalexinas (substâncias produzidas pelo vegetal em resposta a uma infecção por um agente patogênico) em espécies de Fabaceae, o que contribuiu para o conhecimento quimiotaxonômico desta família. Através desses estudos ficou confirmado que apenas essa família botânica possui esses metabólitos de defesa com tamanha variedade estrutural, o que permite utilizá-los como marcadores filogenéticos (DUFFUS & DUFFUS, 1991; GRAYER & KOKUBUM, 2001; TANAKA *et al.*, 2001).

A subfamília Papilionoideae é a maior entre as subfamílias de Fabaceae, sendo constituída de 31 tribos, 440 gêneros que englobam aproximadamente 12.000 espécies. A maioria dos gêneros contém 100 ou mais espécies. De acordo com as características morfológicas, é considerada a subfamília mais evoluída. Tem sua distribuição no mundo todo, mas as árvores são mais representativas nos trópicos e hemisfério sul, enquanto arbustos e as espécies herbáceas estão concentradas na zona temperada, principalmente na região Mediterrânea (HUTCHINSON, 1967; HU *et al.*, 2000; HARBORNE *et al.*, 1971; BARROSO, 1991; HEYWOOD, 1993).

Entre as espécies pertencentes à subfamília Papilionoideae com importância ecológica ou econômica estão *Trifolium repens* e *Medicago sativa*, que são utilizadas como fertilizantes. A indústria emprega como corante a tintura amarela extraída de ramos, folhas e flores de *Genista tinctoria*. Alguns gêneros possuem

espécies altamente apreciadas como planta ornamental em países tropicais e temperadas, como: *Lupinus*, *Baptisia* e *Wisteria*. Entre as espécies conhecidas como fonte alimentícias estão grão de bico (*Cicer arietinum*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*), lentilha (*Lens culinaris*), entre outras (HEYWOOD,1993).

As raízes, folhas, frutos e sementes de muitas espécies desta subfamília possuem diversas propriedades medicinais, com as do gênero *Dioclea*, uma importante fonte de aminoácidos não protéicos, L-Dopa, usados no tratamento do mal de Parkinson. O suco de espécies do gênero *Vatairea* é usado na cura de impigens, as sementes de *Dipteyx punctata* são usadas no tratamento de pneumonia, entre outras (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Estudos fitoquímicos de espécies pertencentes a esta subfamília mostram a presença de diversos metabólitos secundários, como isoflavonas, terpenos (incluindo óleos essenciais, diterpenos - eficientes no tratamento de esquistosomose, fitoesterol, triterpenos e saponinas), antraquinonas, alcaloides piperidínicos e pirrolidínicos, cumarinas, glicosídeos cianogênicos, taninos hidrolisáveis e condensados, além de outras substâncias (BRAS FILHO *et al.*, 1971; MAHJAN & MONTEIRO, 1972; DOS SANTOS FILHO *et al.*, 1972; GALIRA & GOTTLIEB, 1974; FASCIO *et al.*, 1975; ELBEIN *et al.*, 1984; SEIGLER, 2003; CUNHA, 2005; VIEGAS JR. *et al.*, 2006)

2.6. Gênero *Andira*

O gênero *Andira* compreende o grupo de plantas popularmente conhecidos por angelins, representado por mais de 30 espécies distribuídas na América Tropical, com uma espécie na África, sendo a maioria originária do Brasil onde foram encontradas 27 espécies e 7 variedades. O maior número de espécies se encontra na Amazônia (MATOS, 1979; PENNIGTON & LIMA, 1995).

No Brasil, as espécies do gênero *Andira* têm diversos nomes vulgares como: *A. cuyabensis* e *A. parvifolia* (angelim mata-baratas), *A. humilis* e *A. vermifuga* (angelim do campo, angelim amargoso), *A. parviflora* (sucupira-vermelha), *A. pisonis* (angelim-pintado, angelim penima), *A. legalis* (angelim-coco, urarema), *A. anthelmia* (angelim da folha larga, angelim da folha grande), *A. unifoliolata* (angelim-preto, pau de morcego, sucupira-chorona), *A. fraxinifolia* (angelim-doce, angelim do mato, mata-baratas, pinhão do mato, pau mamona do mato).

As espécies do gênero *Andira*, como: *A. legalis*, *A. cuyabensis*, *A. paniculata*, *A. parvifolia*, *A. fraxinifolia*, *A. pisonis*, *A. anthelmia* e *A. vermifuga* possuem elevado valor econômico pelas características de sua madeira, considerada forte e apropriada para construção naval, obras expostas, esteios, postes, dormentes, carroçaria, tanoaria e carpintaria (CORRÊA, 1926).

Esse gênero foi utilizado na Europa por suas propriedades vermífugas desde 1755, por médicos e farmacêuticos de diversos países que preconizavam a industrialização das cascas, transformando-as em pó, com o qual procuravam obter uma droga de aplicação anti-helmíntica. Na América esse princípio medicinal já era conhecido. No Brasil, usavam-se as amêndoas (sementes) pulverizadas, enquanto no Suriname era usada a casca pulverizada em chás para expelir os vermes. Algumas espécies que pertencem ao gênero *Andira* ainda são utilizadas popularmente para este fim, apesar de seus efeitos tóxicos (MATOS, 1979; CORRÊA, 1984; SILVA *et al.*, 2003).

Poucos são os estudos fitoquímicos das espécies do gênero *Andira*. O trabalho de Silva *et al.* (2003), mostrou o potencial anti-helmíntico dos extratos brutos de *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia*, e posteriormente, Da Silva *et al.* (2008) demonstraram que alguns flavonoides isolados de *A. anthelmia* podem ser responsáveis pela ação anti-helmíntica.

Já Kraft *et al.* (2002) caracterizaram dois pterocarpanos e um benzofurano de *A. inermis*. Em 2000 e 2001, respectivamente, o mesmo grupo de pesquisa caracterizou isoflavonas e os compostos fenólicos andinermal A-C da mesma espécie, e todas as substâncias apresentaram atividade antiplasmodial para cepas sensíveis e resistentes a cloroquina.

Silva *et al.* (2006) caracterizaram compostos fenólicos e terpenoides de raízes de *A. fraxinifolia*. Já Silva Júnior *et al.* (2010) fizeram um estudo preliminar (atividade citotóxica e genotóxica) do extrato etanólico das raízes de *A. cuyabensis*, que é usado popularmente como vermífugo, antifúngico e hipoglicemiante.

2.7. *Andira retusa* (Poir.) Kunth

A espécie *Andira retusa* (Poir.) Kunth é uma Fabaceae, da subfamília Papilionoideae, da tribo Dalbergieae DC., tem como sinônimas *Andira surinamensis* (Bondt) Splitz ex Pulle (1906), *Geoffrea surinamensis* Bondt (1788) e *Geoffrea retusa* (1797) (MATOS, 1979).

Segundo Amshoff (1939), a espécie é uma árvore com até 20 metros de altura, com ramos novos acastanhados, espículas pequenas com 3 mm e caducas, 9 a 11 folíolos de 6 a 9 cm (podendo chegar a 12 cm) de comprimento por 2,8 a 4,6 (podendo chegar a 6 cm de largura, oblongos, ovados, cartáceos, glabros na face superior e pubérulos na inferior, ápice obtuso, retuso ou emarginado, base arredondada, brilhante na face superior e opaco na inferior, nervura principal impressa na face superior e saliente na inferior, as secundárias são delgadas e planas, impressas ou sub-impressas na face superior e salientes na inferior, arqueadas, limbo finamente reticulado. Cálice tomentoso, de base aguda com 5 sépalas curtas. Pétalas violáceas. Ovário glabro, com 5 cm de comprimento (MATOS, 1979).



Figura 6: Foto da *Andira retusa* (Kunth) coletada. Fonte: Cecilia Veronica Nunez

De acordo com Ducke (1949), tem como nomes populares manga-brava (no Rio Branco), angelim (no litoral paraense), morcegueira, lombrigueira, andirauchi e uchirama (no norte do país). Na Venezuela, é conhecida popularmente como “papillon” ou “sobo”. Sua distribuição geográfica abrange Guianas e Trinidad, segundo Amshoff (1939), e no Brasil, os seguintes estados: Amazonas, Pará, Roraima, Ceará, Piauí e Bahia, conforme relatos de Benthham (1862) e Ducke (1949) (MATOS, 1979).

Ducke (1949) ainda relata que esta espécie é de porte muito variável, apresentando-se como árvore mediana, pequena e muito grande. Quando isolada em campo, desenvolve copa muito frondosa. É frequente nos campos de várzea alta ou plantas marginais de rios e lagos (MATOS, 1979).

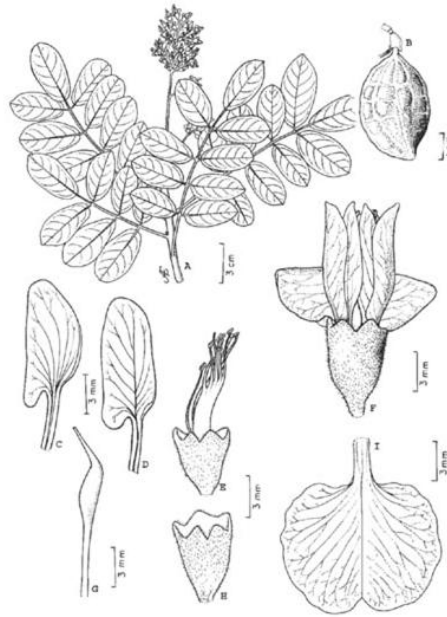


Figura 7: *Andira surinamensis* (Bondt) Splitg. ex Amshoff – A) ramo com inflorescência; B) fruto evidenciando cálice e andorceu persistentes; C) peça da carena; D) peça da ala; E) cálice e androceu; F) flor; G) gineceu; H) cálice; I) vexilo. A, C-I de J. M. Pires & N.T. da Silva 4224 (IAN); B de C. S. Rosário & I. C.B. Lobato 1405 (MG). Fonte: MATOS, 1979.

Estudos fitoquímicos da espécie *Andira retusa* só foram encontrados pela alcunha de uma de suas sinônimas (*Andira surinamensis*). Onde foram reportadas por Almeida *et al.* (2007) as presenças de isoflavonas 4'-metoxiisoflavona-(7-O-7'')-3'', 4''-metilenedioxiisoflavona (surinamensina), 5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona (biochanina A), 5,4'-diidroxi-7-metoxiisoflavona (prunetina), 7,3'-diidroxi-4'-metoxiisoflavona (calicosina) e 5,7,3'-triidroxi-4'-metoxiisoflavona (pratenseina). Além do triterpeno lupeol. Mas não foram relatados mais estudos sobre a espécie, principalmente visando a atividade biológica de seus metabólitos. Porém, popularmente é usada como anti-helmíntico e no tratamento de doenças de pele causadas principalmente por fungos, como *Malassezia furfur*, conhecida popularmente como “pano branco”.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a fitoquímica e a avaliar a atividade biológica dos extratos e frações de extratos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os extratos *Andira retusa* (Poir.) Kunth quanto ao seu potencial antimicrobiano, citotóxico e antioxidante;
- Fracionar os extratos que apresentarem atividade biológica;
- Avaliar as frações obtidas quanto ao potencial antimicrobiano, citotóxico e antioxidante;
- Identificar as substâncias majoritárias presentes nos extratos que tenham atividade biológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e Materiais Utilizados

4.1.1 Preparo de extratos, partição líquido-líquido, análises e fracionamento cromatográfico

O material vegetal foi moído em moinho de facas TECNAL, modelo Willye TE-650. Para o preparo dos extratos foi utilizado banho em ultrassom (UNIQUE), e para a evaporação dos solventes, utilizou-se evaporador rotativo a vácuo (FISATOM).

Os solventes utilizados para as extrações, partições, cromatografias em coluna aberta e cromatografias em camada delgada possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

A fase estacionária utilizada para a cromatografia em coluna aberta empregada até o presente momento foi Sílica Gel 60, 230 – 400 mesh (MERCK).

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), utilizaram-se Cromatofolhas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV 254nm, com 0,20 mm de espessura (MACHEREY – NAGEL -MN).

Para as revelações dos cromatogramas obtidos em CCDC foram utilizados: solução de sulfato de cério IV (VETEC), solução de anisaldeído sulfúrico (4-metoxibenzaldeído) (VETEC), solução de cloreto de ferro III (VETEC), solução de DPPH (2,2 - difenil-1-picril-hidrazila) (SIGMA ALDRICH) e solução de Wagner. Também se utilizou irradiação no UV (254 e 365 nm).

Reveladores	Classes Químicas
Solução de Sulfato de Cério IV	Terpenoides
Solução de Anisaldeído Sulfúrico	Diversas classes químicas (açucares, esteroides, terpenos)
Solução de Cloreto de Ferro III	Substâncias fenólicas
Solução de Cloreto de Alumínio	Alcaloides
Solução de DPPH	Substâncias antioxidantes

Solução de Wagner	Alcaloides e outras substâncias nitrogenadas
Solução de Draggendorf	Alcaloides e outras substâncias nitrogenadas
UV 254 nm	Derivados antraquinônicos, cumarinas, alcaloides
UV 365 nm	Substâncias fenólicas, cumarinas, antraquinonas

As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas em equipamentos de 60 MHz (ANASAZI) e 400 MHz (BRUKER).

4.1.2 Atividade Antioxidante

Para este ensaio foram utilizados os reagentes: Ácido Ascórbico P.A. (VETEC) e DPPH (SIGMA ALDRICH). E utilizou-se espectrofotômetro UV-VIS, modelo Cirrus 80ST (FEMTO) para a leitura da absorbância.

4.1.3 Atividade antimicrobiana

Para este ensaio foram utilizados: Agar e caldo Müller-Hinton (HIMEDIA) e 2,3,5-tri-fenil-tetrazólio (VETEC).

4.2. Metodologia

4.2.1. Coleta e Preparação dos Extratos

4.2.1.1. Coleta

O material vegetal foi coletado na Volta Grande do Xingu (Jurucuá), no município de Altamira, PA. Exsicatas do material coletado foram identificadas pela Msc. Daiane Martins e depositadas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

O material vegetal de um mesmo espécime de *Andira retusa* foi obtido em duas coletas distintas (em 11/11/2008 e 25/08/2009). Tendo sido coletadas as flores somente na primeira coleta. O material de cada coleta recebeu uma numeração diferenciada e, conseqüentemente, resultaram em extratos diferentes.

4.2.1.2. Preparo dos Extratos

As plantas coletadas foram secas em temperatura ambiente, os órgãos vegetais foram separados e posteriormente moídos e pulverizados em moinho de facas.

Após, foram extraídos com diclorometano, metanol e água, sucessivamente. Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando o banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco a temperatura ambiente. Esse mesmo material vegetal foi extraído com os próximos solventes, em ordem crescente de polaridade (figura 8).

Posteriormente, os extratos foram concentrados em rotaevaporador (extratos diclorometânico e metanólico) e os extratos aquosos foram liofilizados.

Os solventes utilizados para as extrações, cromatografias em coluna aberta e cromatografias em camada delgada possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (COTI/INPA).

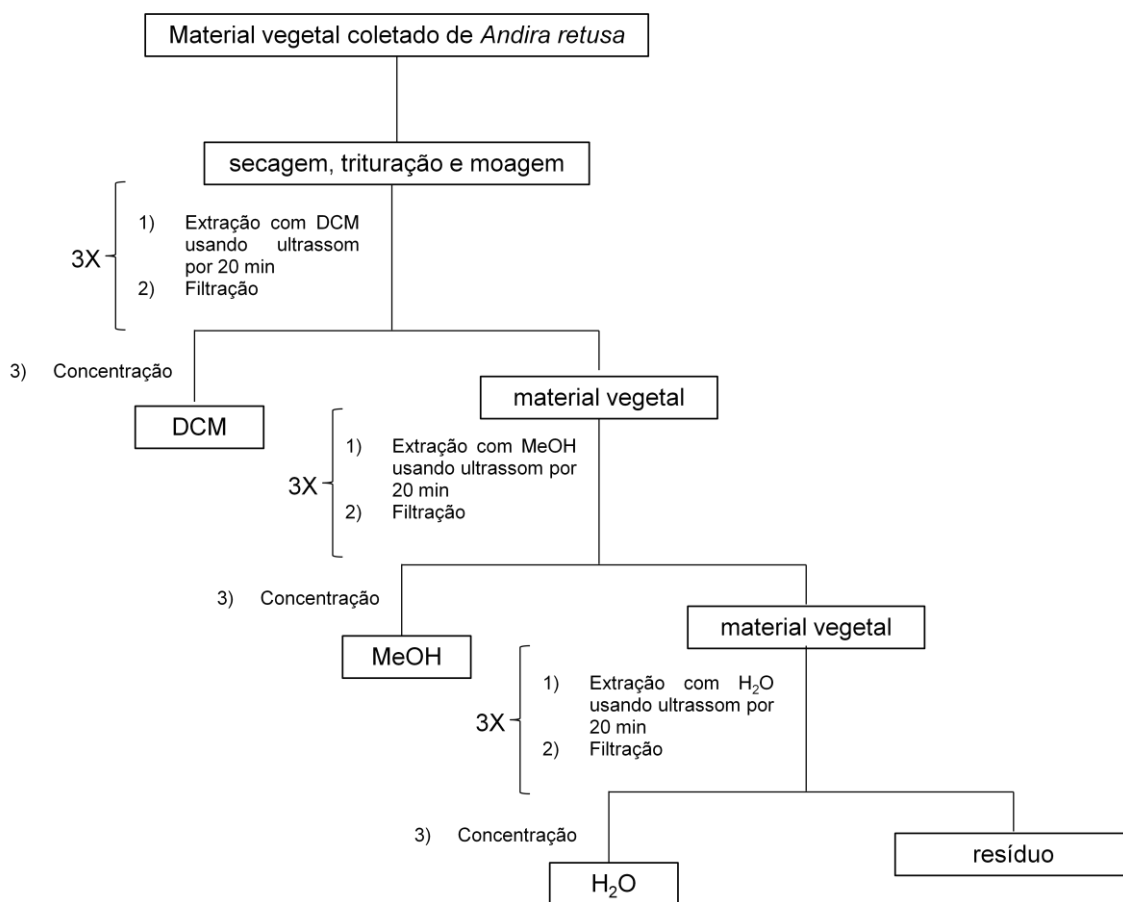


Figura 8: Fluxograma do preparo dos extratos

4.2.2. Análises Cromatográficas e Fracionamento dos Extratos

4.2.2.1. Análise Cromatográfica dos Extratos

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa, empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel com indicador de fluorescência UV 254 nm. A eluição das cromatofolhas foi realizada com vários solventes, em diferentes proporções. A revelação das cromatofolhas empregou a luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), DPPH, sulfato de cério IV, cloreto de ferro III, cloreto de alumínio, reagente de Dragendorff, reagente de Wagner e anisaldeído sulfúrico. Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos procedimentos para o fracionamento e para a análise das frações obtidas das técnicas de fracionamento, indicando a similaridade entre as frações, o nível de pureza, e as possíveis classes de metabólitos presentes.

4.2.2.2. Partição

Após a análise em cromatografia em camada delgada, os extratos que apresentaram indicativo de substâncias com polaridade muito distinta foram submetidos à partição. Para tal procedimento, o extrato foi solubilizado em solução de água destilada e MeOH (9:1) e extraído pelo menos três vezes com cada um dos solventes utilizados na partição (figura 9). As partições foram realizadas com diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). O volume de solvente utilizado varia conforme a massa do extrato a ser fracionado. Esse procedimento visa uma separação preliminar dos constituintes químicos para facilitar o seu posterior fracionamento cromatográfico.

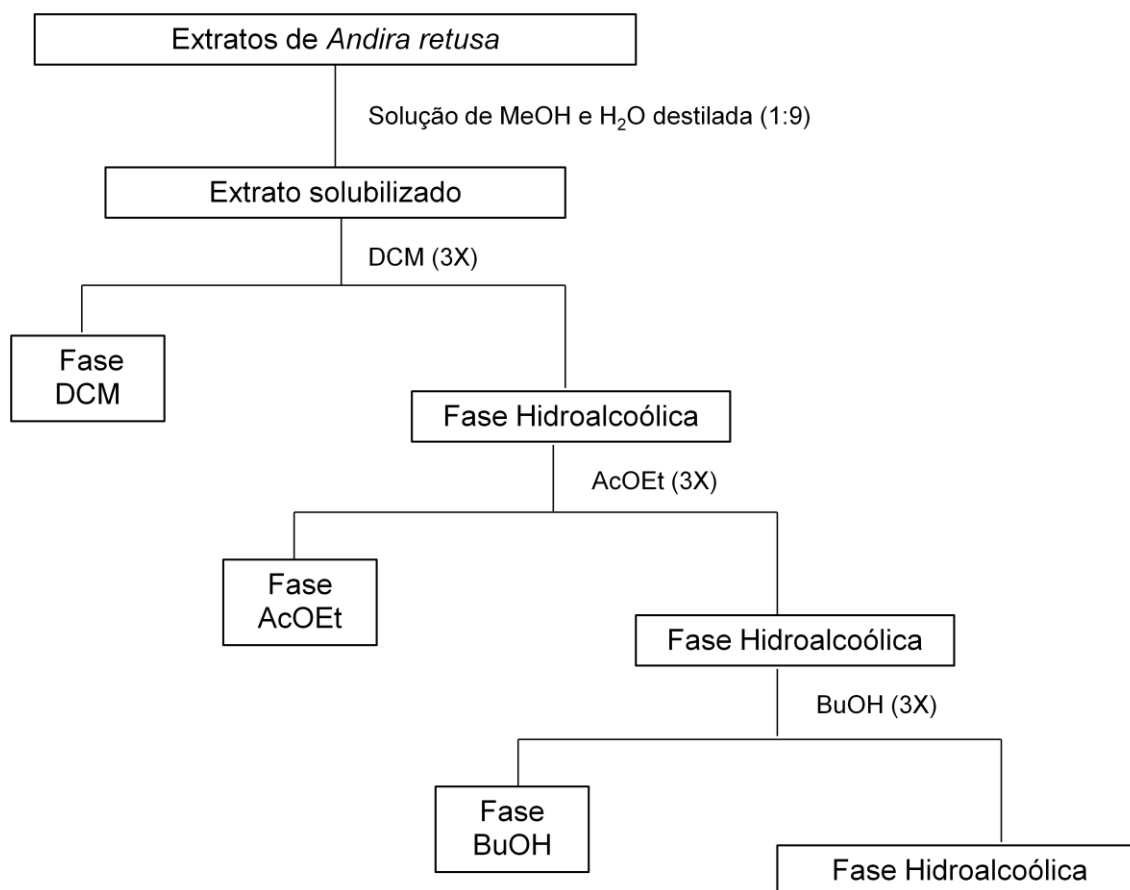


Figura 9: Fluxograma da partição dos extratos de *Andira retusa*

4.2.2.3. Fracionamento e purificação dos constituintes dos extratos

Após a partição, as fases obtidas foram novamente analisadas em CCDC para a escolha do método cromatográfico de fracionamento, da fase estacionária e dos eluentes mais eficientes na separação (figura 10).

As frações obtidas das colunas cromatográficas foram analisadas através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), com revelação em luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), reagente de Dragendorff, sulfato de cério IV, cloreto de ferro III e anisaldeído sulfúrico.

Fracionamento do extrato diclorometânico das flores de *Andira retusa* n° 1 (1 FID): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 69 x 1,4 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (1:1); hexano/diclorometano (3:7); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 150 mL. A massa de amostra utilizada

foi 1,0 g, para 31,8 g de sílica. Foram recolhidas 146 frações de aproximadamente 30 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

Fracionamento da fase diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas de *Andira retusa* n° 1/2 (1/2 CaM 1): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 60 x 1 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (1:1; 4:6; 3:7; 2:8); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 150 mL. A massa de amostra utilizada foi 170 mg, para 25,5 g de sílica. Foram recolhidas 126 frações de aproximadamente 30 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

Fracionamento da fase diclorometânica dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* n° 1/2 (1/2 CaD 1.1): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 100 x 1,4 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (1:1; 3:7); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (8:2; 1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 500 mL. A massa de amostra utilizada foi 3,0 g, para 107,4 g de sílica. Foram recolhidas 30 frações de aproximadamente 80 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

Fracionamento da fase acetato de etila dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* n° 1/2 (1/2 CaD 1.2): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 69 x 1,4 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (1:1; 4:6; 3:7; 2:8); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 120 mL. A massa de amostra utilizada foi 300 mg, para 30 g de sílica. Foram recolhidas 88 frações de aproximadamente 30 mL cada.

Fracionamento da fase acetato de etila dos extratos metanólicos das cascas de *Andira retusa* n° 1 (1 CaM 2.2): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 69 x 1,4 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de diclorometano/acetato de etila (3:7; 2:8; 1:9); acetato de etila 100%; acetato de

etila/acetona (8:2; 7:3; 6:4; 1:1); acetona 100%; acetona/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 250 mL. A massa de amostra utilizada foi 1,3 g, para 90,5 g de sílica. Foram recolhidas 95 frações de aproximadamente 30 mL cada.

Fracionamento da fração 12-15 da fase diclorometânica do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaM 1)(12-15): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 58 x 1 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (4:6; 3:7; 2:8; 1:9); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 40 mL. A massa de amostra utilizada foi 59 mg, para 7,2 g de sílica. Foram recolhidas 28 frações de aproximadamente 20 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

Fracionamento da fração 5-6 da fase diclorometânica do extrato diclorometânico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.1)(5-6): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 60 x 1 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (1:1; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 90 mL. A massa de amostra utilizada foi 120 mg, para 19,8 g de sílica. Foram recolhidas 43 frações de aproximadamente 20 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

Fracionamento da fração 7-8 da fase diclorometânica do extrato diclorometânico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.1)(7-8): utilizou-se coluna cromatográfica aberta (h x Ø = 60 x 1 cm), sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de hexano/diclorometano (4:6; 3:7; 2:8; 1:9); diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etila (1:1); acetato de etila 100%; acetato de etila/metanol (1:1) e metanol 100%. Cada sistema de eluição consistia em 140 mL. A massa de amostra utilizada foi 152 mg, para 32,8 g de sílica. Foram recolhidas 41 frações de aproximadamente 20 mL cada, que foram reunidas por análise em CCDC e as revelações.

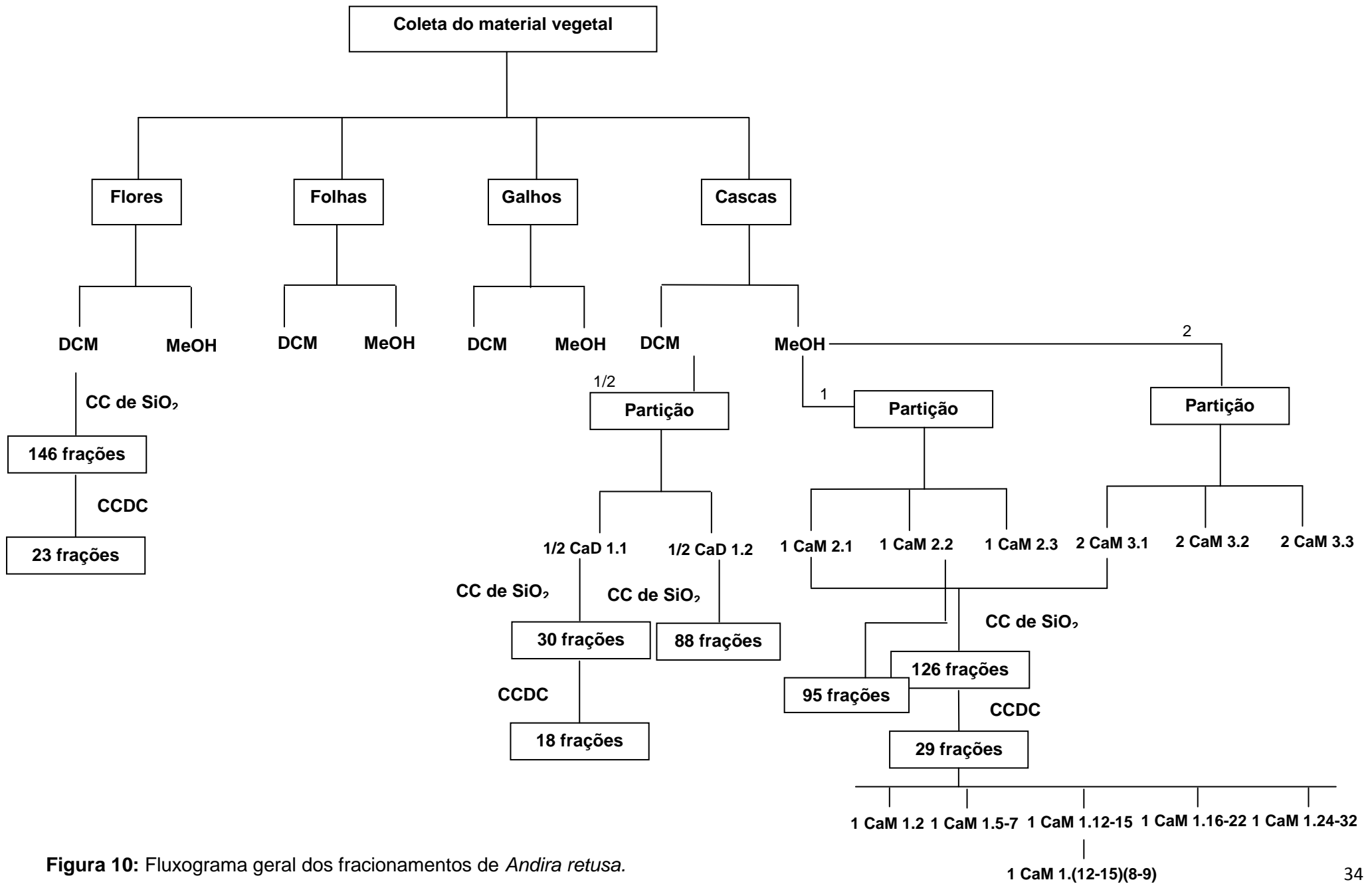


Figura 10: Fluxograma geral dos fracionamentos de *Andira retusa*.

4.2.3. Atividade Antioxidante

4.2.3.1. Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH

Preparo da solução de DPPH•: a solução foi preparada solubilizando 28 mg do DPPH• com 1 mL de DCM e avolumando com MeOH até 100 mL.

A diluição da solução do ácido ascórbico com água deionizada resultou nas seguintes concentrações: 0, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. A solução de DPPH• é utilizada na concentração de 2,8 mg/L.

Preparação da curva do DPPH•: adicionam-se em seis novos micro-tubos 990 µL de DPPH• e completa-se com 10 µL da solução de ácido ascórbico. Espera-se por 30 minutos para realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Ensaio com os extratos: após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, adicionam-se 0,5 mg/mL dos extratos nas soluções de DPPH•. Realiza-se a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação, a leitura é realizada novamente. A variação da absorbância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

4.2.4. Ensaio Biológicos

4.2.4.1 Verificação de atividade antimicrobiana

Os organismos a serem testados, assim como o meio de cultura e as condições de incubação, estão listados na tabela 1:

Tabela 1 – Micro-organismos a serem testados e suas condições de crescimento

Micro-organismos	Meio de cultura	Tempo de incubação (horas)	Temperatura de incubação (°C)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ágar Mueller-Hinton	24	37
<i>Escherichia coli</i>	Ágar Mueller-Hinton	24	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ágar Mueller-Hinton	24	37
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Ágar Mueller-Hinton	24	30

Os testes de atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram realizados segundo as metodologias de cavidade-placa (CLSI, 2003) e microdiluição (CLSI, 2003; Eloff, 1998). Os micro-organismos testados foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura adequado através da técnica de *spread-plate*, onde são feitas cavidades circulares. Em seguida, adicionam-se nas cavidades os extratos de *Andira retusa*, nas concentrações estabelecidas para cada micro-organismo. Utiliza-se como controle negativo de atividade antimicrobiana DMSO. Ao final do período de incubação, procede-se a verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo com o auxílio de uma régua. Como controle positivo foi utilizado uma solução de oxitetraciclina (20 µg/mL).

Para mensuração da intensidade da atividade dos extratos, é utilizada a tabela 2 como referência em relação ao tamanho do halo de inibição (em mm) correspondente.

Tabela 2 – Referência de resultados de atividade (halo de inibição – em mm):

Tamanho do halo de inibição (mm)	Intensidade da atividade
Até 6	Baixa
De 7 a 13	Média
Acima de 13	Alta

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos e substâncias são realizadas conforme metodologia descrita (CLSI, 2003; Eloff, 1998).

Concentração Inibitória Mínima (CIM): A determinação da CIM é realizada em meio líquido, através da técnica de microdiluição. Para isto, são feitas diluições sucessivas dos extratos ou substâncias (1000 µg/mL até 15,62 µg/mL) em tubos de ensaio, e em seguida, 95 µL de cada diluição é colocado em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, é inoculado o micro-organismo-teste (5 µL), preparado pela

escala de (McFarland 0,5) diluído 10 vezes. As placas são incubadas a temperatura e tempo adequado (18 a 24 horas), de acordo com a necessidade de cada micro-organismo. Após esse período, foram inoculados 40µL de revelador (cloreto de 2,3,5-tri-fenil-tetrazólio) numa concentração de 2 mg/mL em cada poço, e estes incubados novamente por 30 minutos. Onde houver crescimento bacteriano, o conteúdo dos poços foram revelado em vermelho, e onde não houver crescimento, o conteúdo dos poços permaneceram incolor. A CIM é considerada a menor concentração do extrato ou substância onde não houver crescimento bacteriano (onde os tubos permanecerem incolor). O teste é realizado em triplicata.

Foram utilizados como controles: negativo (solvente utilizado para solubilizar o extrato + micro-organismo); positivo com antibiótico (oxitetraciclina) e esterilidade do caldo (1 poço contendo apenas o caldo)

Concentração Mínima Bactericida (CMB): Uma alíquota (100 µL) de cada concentração a partir da CIM é inoculada em placas de Ágar Müeller-Hinton e posteriormente incubadas em temperatura e tempo adequado. A CMB é considerada a menor concentração do extrato onde não houver crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9 % de morte microbiana).

4.2.4.2 Teste de citotoxicidade utilizando *Artemia salina*

Para o teste, utiliza-se como meio de crescimento um solução salina (3,8%), e para a eclosão, adicionaram-se 10 mg de cistos de *Artemia salina*. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação em lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após esse período, as larvas são repassadas para microplacas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* para cada poço. Em cada placa, há o controle da solução salina, realizado em triplicata, o controle do solvente utilizado, também realizado em triplicata e os poços a que são adicionados o extrato a ser testado, também em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* são mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avalia-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. Testa-se inicialmente na concentração de 1000 µg/mL, e se for citotóxico, dilui-se o extrato até encontrar a CL₅₀. A análise estatística dos resultados foi feita por análise de variância ANOVA (*one-way ANOVA*).



Figura 11: Béquer contendo larvas de *Artemia salina* com 48 horas após serem colocados para eclodir.

4.2.4.3. Teste de citotoxicidade utilizando fibroblastos L929

Para realização dos experimentos abaixo foram utilizadas células fibroblasto L929, obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ CR020/ATCC CCL1).

Para o preparo das amostras em estudo foi feita a pesagem de 1 mg dos extratos e fases a serem testados. Posteriormente foi preparada uma solução-mãe com 1 mg da amostra, 100 μ L de DMSO e 900 μ L de solução diluente estéril (9 mL de PBS + 1 mL de DMSO).

Foram testadas as amostras em estudo em três concentrações finais (100, 10 e 1 μ g/mL). Sendo essas diluições preparadas a partir da solução-mãe, diluídas com solução diluente.

Foram utilizados como controles: do solvente (180 μ L de meio de cultura D-MEM + 20 μ L de solução diluente); positivo (solução de triton X-100 10%) – tendo como concentração final no poço 1%; e negativo (200 μ L de meio D-MEM).

Para a realização dos testes foram utilizadas placas de 96 poços. E foram plaqueados 200 μ L de uma suspensão de 10000 células/poço. Incubados por 24 horas em incubadora de CO₂ (5%) a 37°C. Após esse período, foi observada a confluências das células nos poços (que deve estar entre 70 a 80%).

Para o plaqueamento das amostras, foi removido o meio das placas, e adicionados 180 μ L de meio D-MEM suplementado com 10% de SFB, L-glutamina (50 μ L/50 mL de meio), antibiótico (penicilina – 500 μ L/50 mL de meio), antifúngico (250 μ L/50 mL de meio) e 20 μ L das amostras a serem testadas. Incubou-se por 24 horas.

Após esse período, removeu-se o meio contendo as amostras, lavou-se com PBS, adicionou-se 180 μ L de meio D-MEM em cada poço e posteriormente, 20 μ L de solução de MTT (5 mg/mL de PBS) estéril em cada poço. Incubou-se por 4 horas.

Posteriormente ao período de incubação, removeu-se o meio completamente. Observam-se os cristais de formazan formados. Adicionam-se 200 μ L de DMSO, agitam-se delicadamente as placas (em agitador de placas) por 10 minutos para solubilizar os cristais de formazan. Após foi feita a leitura em leitor de microplaca (Elisa) com filtro de 540 nm. O zero desta determinação é o meio de cultura sem células. A viabilidade relativa das células relacionadas ao controle sem extrato foi calculada como absorvância da amostra teste/absorvância do controle x 100.

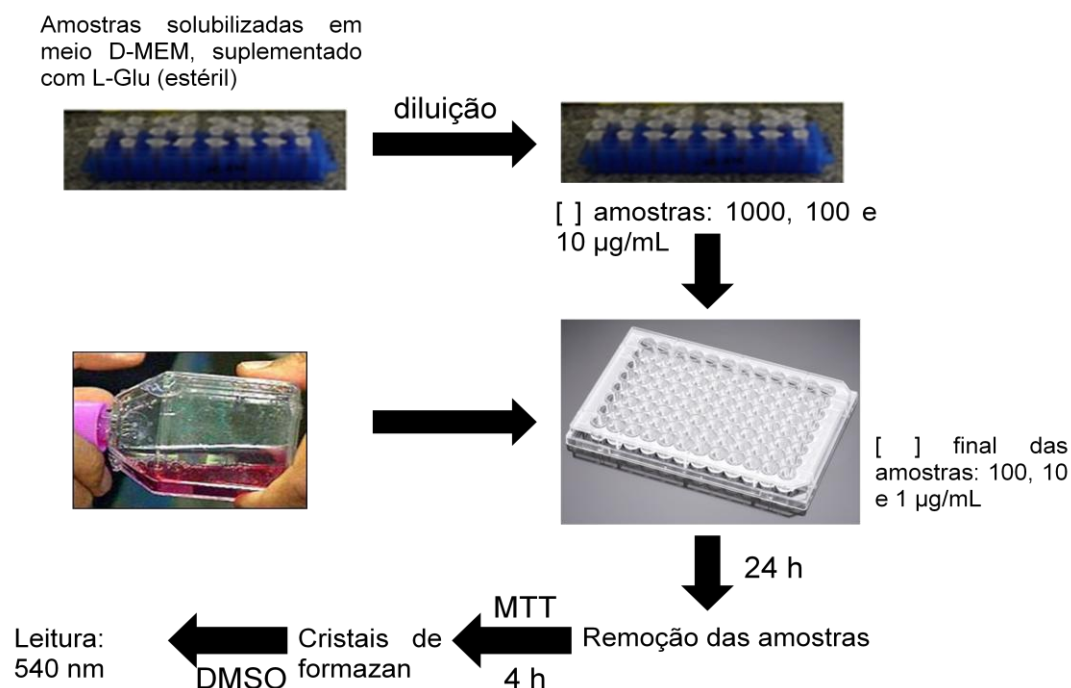


Figura 12: Organograma do teste de citotoxicidade em L929.

A análise estatística dos resultados foi feita por análise de variância ANOVA (*one-way ANOVA*) e posteriormente foi o teste de Tukey para verificar se havia diferença significativa entre as variáveis analisadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta e Preparação dos Extratos

A primeira coleta de *Andira retusa* foi realizada em 11 de novembro de 2008, tendo sido coletados flores, folhas, galhos e cascas. Esses materiais vegetais originaram extratos que foram inicialmente estudados quanto a sua atividade antioxidante, e em função dos resultados positivos obtidos principalmente nas cascas e flores, buscou-se coletar mais material na segunda coleta (25/08/2009). Porém, nesta só foram coletadas as cascas e as folhas, pois não foram encontradas flores.

Tabela 3 – Coletas realizadas e características do material vegetal coletado

Data da coleta	Número do material	Partes coletadas	Obs.
11/11/2008	1	Flores, folhas, galhos, cascas	
25/08/2009	2	Cascas, folhas	Sem flores na época da coleta

Preparação dos extratos: a partir do material seco, moído e pulverizado de *Andira retusa* (Poir.) Kunth, originaram-se os seguintes extratos:

Tabela 4 – Extratos preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/ COTI-Inpa

Material Vegetal	Material pulverizado (g)	Extrato DCM (g)	Extrato MeOH (g)	Extrato Aquoso (g)
1 Flores	85,41	2,1786	2,93335	NP**
1 Folhas	61,34	2,09028	13,2723	EE***
1 Galhos	240,36	2,5443	13,5916	EE***
1 Cascas	51,92	0,5571	7,9832	NP**
2 Cascas	500	5,1803	17,8473	NP**

NP** - não preparado EE*** - etapa de evaporação do solvente

5.2. Análises Cromatográficas e Fracionamento dos Extratos

5.2.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) dos extratos

Todos os extratos obtidos foram comparados utilizando a metodologia de CCDC. Para esta análise, buscou-se aplicar mesma concentração dos extratos na cromatofolha com o intuito de obter um perfil prévio, e identificar algumas possíveis diferenças e semelhanças nos extratos obtidos.

Extratos Diclorometânicos (DCM): Utilizou-se diclorometano para solubilização, e eluição com Hexano/Acetato de etila (2:8 v/v).

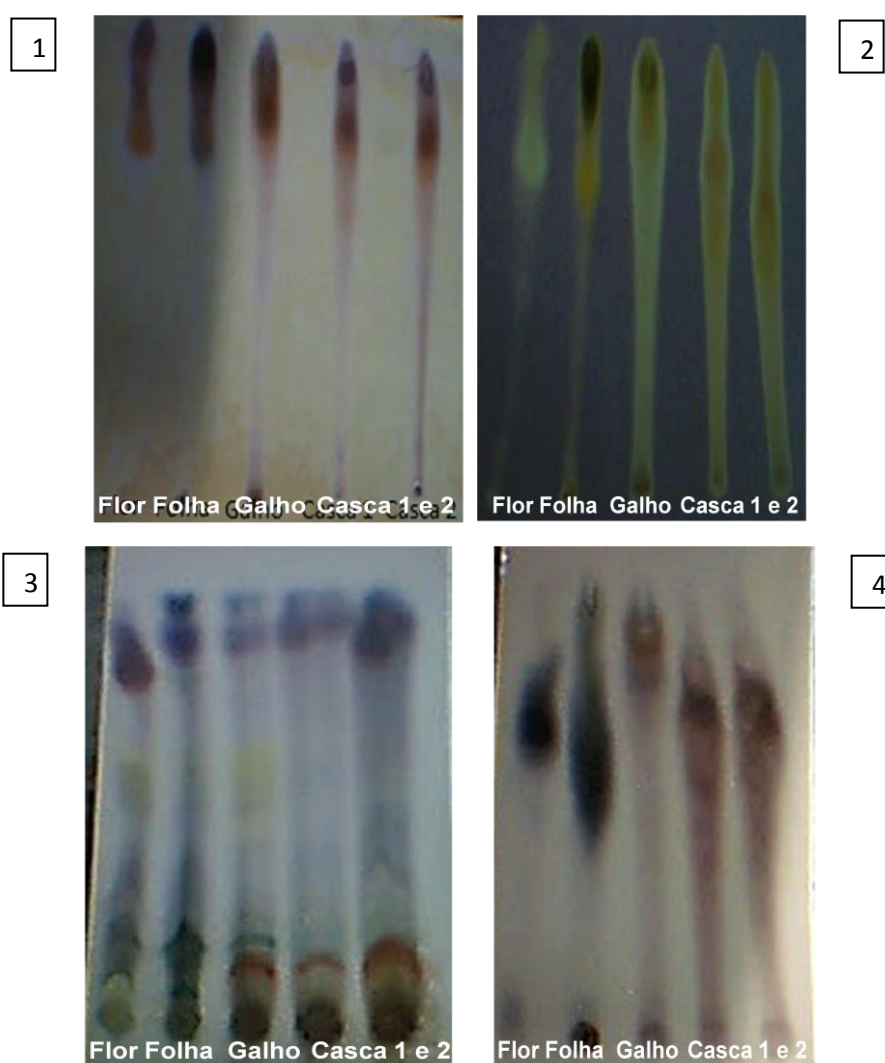


Figura 13: Análise em CCDC dos extratos DCM. Flor, Folha, Galho, Casca (1^a coleta), Casca (2^a coleta). Eluição em Hex/AcOEt (2:8). Reveladores: 1 – sulfato de cério IV; 2 – DPPH; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 – cloreto de ferro III.

Na figura 13 é possível analisar as cromatoplasmas reveladas, observando-se diferenças e semelhanças entre os perfis dos extratos. Na foto 1, onde é

demonstrada a revelação química com sulfato de cério IV, há manchas avermelhadas em todos os extratos, o que pode ser um indicativo da presença de terpenos nos mesmos. A foto 2 mostra a revelação com DPPH, indicando atividade antioxidante dos extratos das flores, galhos e cascas (de ambas coletas). Na foto 3, a revelação com anisaldeído sulfúrico demonstra uma complexidade de substâncias nos extratos, porém, por este revelador ser considerado universal (não revelando grupos específicos de metabólitos), não é possível afirmar quais as possíveis classes de metabólitos presentes nos extratos. A foto 4 mostra a revelação química com cloreto de ferro III (revelador de substâncias fenólicas), nota-se uma considerável quantidade desse grupo de metabólitos em todos os extratos, mas predominantemente nas flores e folhas.

Extratos Metanólicos (MeOH): Utilizou-se metanol para solubilização, e eluição com Diclorometano/Acetato de Etila (4:6 v/v) e Diclorometano/Metanol (9:1 v/v).

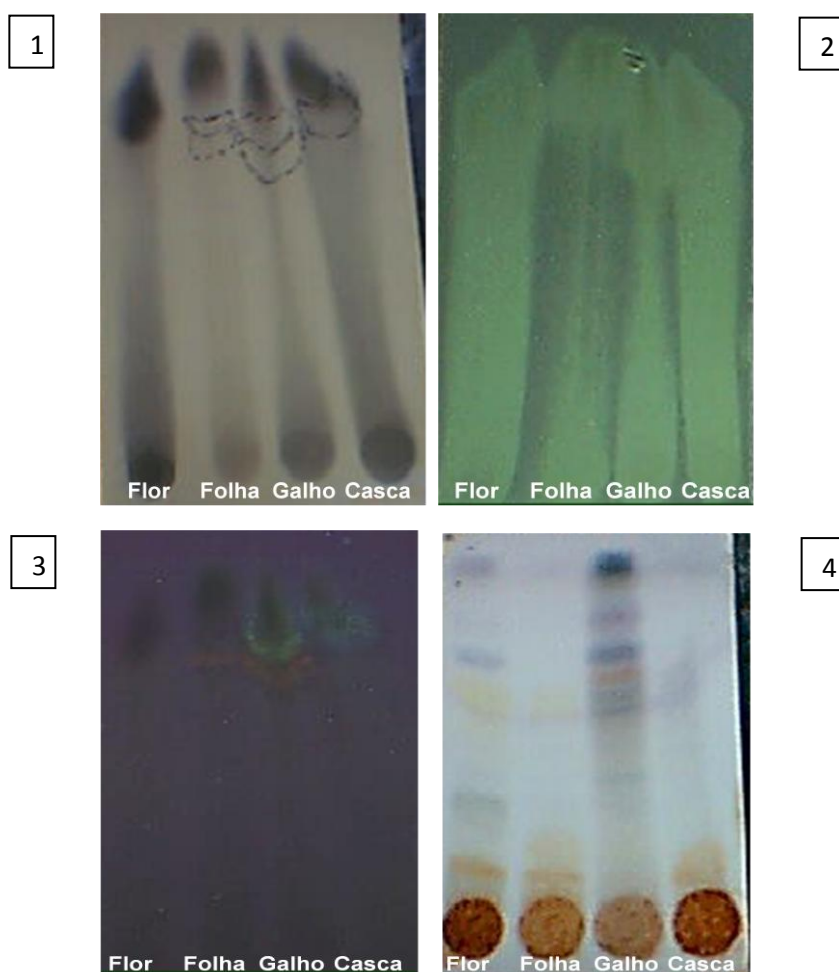


Figura 14: Análise em CCDC dos extratos MeOH. Flor, Folha, Galho, Casca (1ª coleta). Eluição em DCM/AcOEt (4:6) e DCM/MeOH (9:1). Reveladores: 1 – cloreto de ferro III; 2 – DPPH; 3 – UV 365 nm; 4 – anisaldeído sulfúrico.

Na figura 14 é possível analisar as cromatoplasmas reveladas, observando-se diferenças e semelhanças entre os perfis dos extratos. Na foto 1, onde é demonstrada a revelação química com cloreto de ferro III, há manchas escuras em todos os extratos, o que pode ser um indicativo da presença de substâncias fenólicas nos mesmos. A foto 2 mostra a revelação com DPPH, indicando atividade antioxidante de todos os extratos, mas predominantemente nos extratos das flores e cascas. Na foto 3, a revelação física com ultravioleta 365 nm, indica a presença de cromóforos amarelos e avermelhados nos extratos das folhas e galhos, o que pode ser um indicativo de derivados de antraquinona, e de cromóforos azuis no extrato das cascas, que pode ser indicativo de cumarinas e antocianinas. A foto 4 mostra a revelação química com anisaldeído sulfúrico demonstra uma complexidade de substâncias nos extratos, porém, não é possível afirmar quais as possíveis classes de metabólitos presentes nos extratos.

5.2.2 Fracionamento dos extratos

Fracionamento do extrato diclorometânico das flores de *A. retusa*

O extrato diclorometânico das flores de *A. retusa* (1 FLD) foi o primeiro extrato a ser fracionado em função de sua atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

Após o fracionamento em coluna cromatográfica (figura 15) e a análise das frações obtidas, constatou-se que nenhuma das 126 frações da coluna cromatográfica apresentou substâncias purificadas, nem semi-purificadas. As frações apresentaram uma alta complexidade de substâncias. Assim, as mesmas foram analisadas em CCDC para reunião das frações semelhantes visando a purificação das substâncias presentes, resultando em 23 frações.

As análises em CCDC destas frações (figura 16) indicaram a presença de terpenos e esteroides devido à coloração vermelha e laranja quando reveladas com o reativo químico sulfato de cério IV ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$). Observou-se também a presença de substâncias flavonoídicas (coloração amarela sob luz UV 365 nm) nas primeiras frações desta coluna. O espectro de RMN de ^1H (60 MHz) destas frações (figura 17) corrobora com estas classes de compostos devido a presença dos sinais entre δ_{H} 0,8 e 1,6 referentes a hidrogênios metílicos, sinais em torno de δ_{H} 4,29, um *m* em δ_{H} 5,37 característicos de hidrogênios olefínicos, referentes aos sinais dos terpenos, e

sinais entre δ_H 6,70 e 7,28, característicos de hidrogênios aromáticos e dos singletos em δ_H 12,50, 12,73 e 12,80, típicos de hidrogênios quelados com grupos carbonílicos de flavonol, flavona, flavanona e outros derivados flavonoídicos.

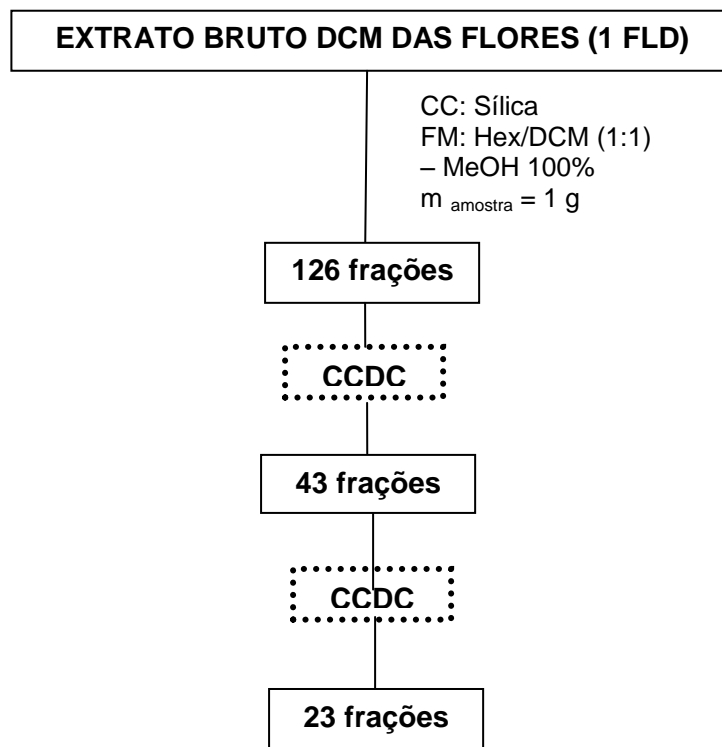


Figura 15: Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometânico das flores de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

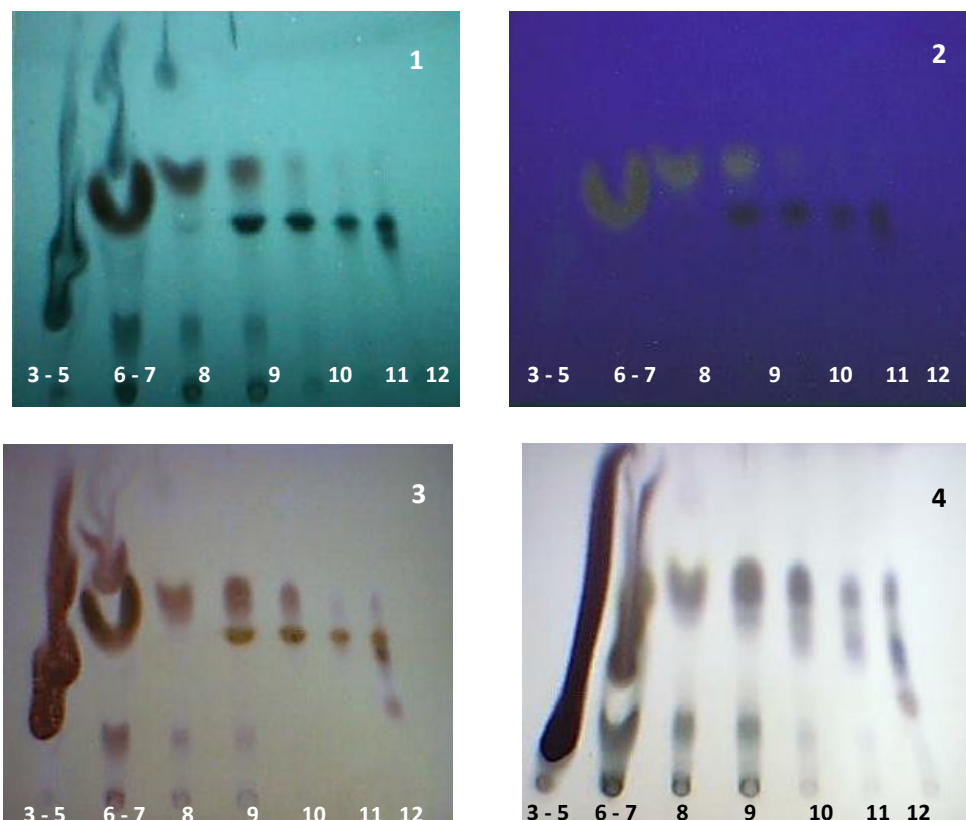


Figura 16: Análise em CCDC das frações do extrato DCM das flores. Eluição em Hex/DCM (2:8) e revelada com UV 254 nm (1), UV 365 nm (2), sulfato de cério IV (3) e anisaldeído sulfúrico (4).

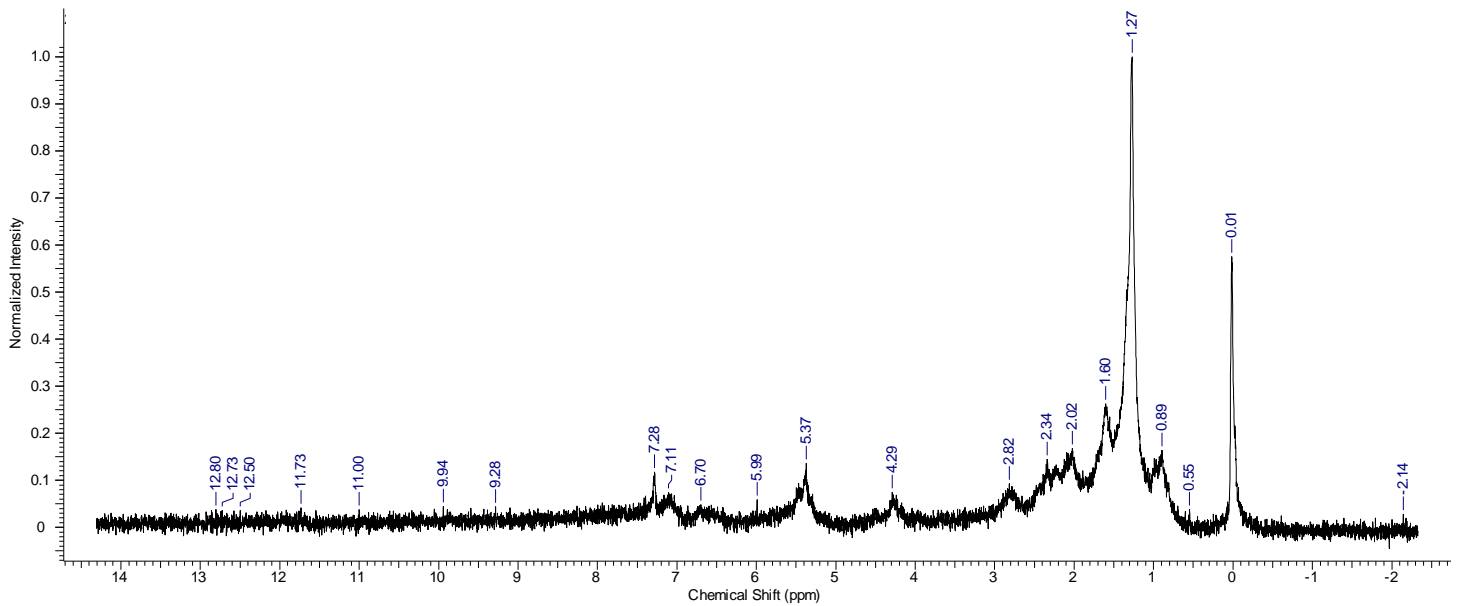


Figura 17: Espectro de ^1H (60 MHz) da fração 8-12 do extrato DCM das flores de *A. retusa*.

Fracionamento da fase DCM dos extratos metanólicos das cascas de *A. retusa* (1/2 CaM 1)

A análise em CCDC dos extratos metanólicos das cascas de *A. retusa* (1 CaM e 2 CaM), demonstraram que estes são compostos por substâncias de polaridades bastante diferentes. Dessa forma, estes extratos foram submetidos à partição com DCM, AcOEt e BuOH (figura 18).

Por não haver diferenças significativas entre as fases DCM dos extratos, após análise por CCDC, as mesmas foram reunidas e posteriormente fracionadas. Resultando em 126 frações que foram reunidas de acordo com suas semelhanças apresentadas na análise em CCDC.

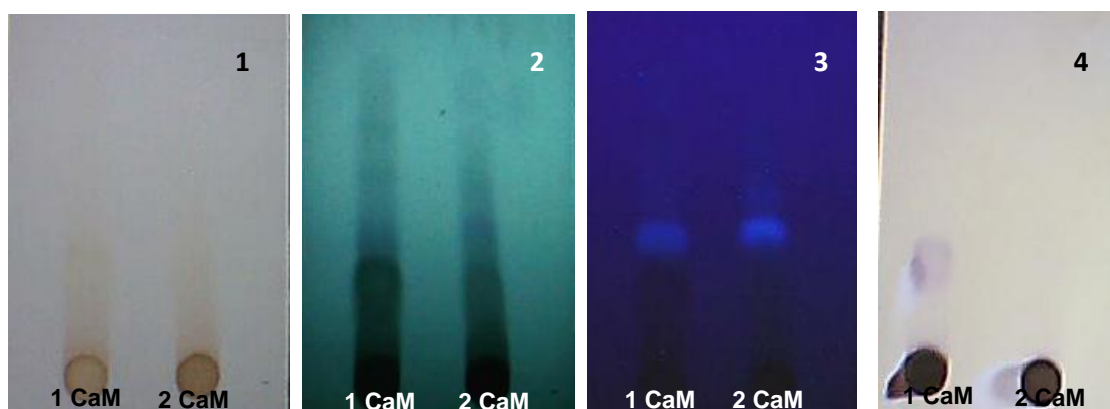


Figura 18: Análise em CCDC das fases do extrato metanólico das cascas. Eluição em DCM/AcOEt (3:7) e revelada com: 1 - visível; 2 - UV 254 nm; 3 - UV 365 nm; 4 - sulfato de cério IV.

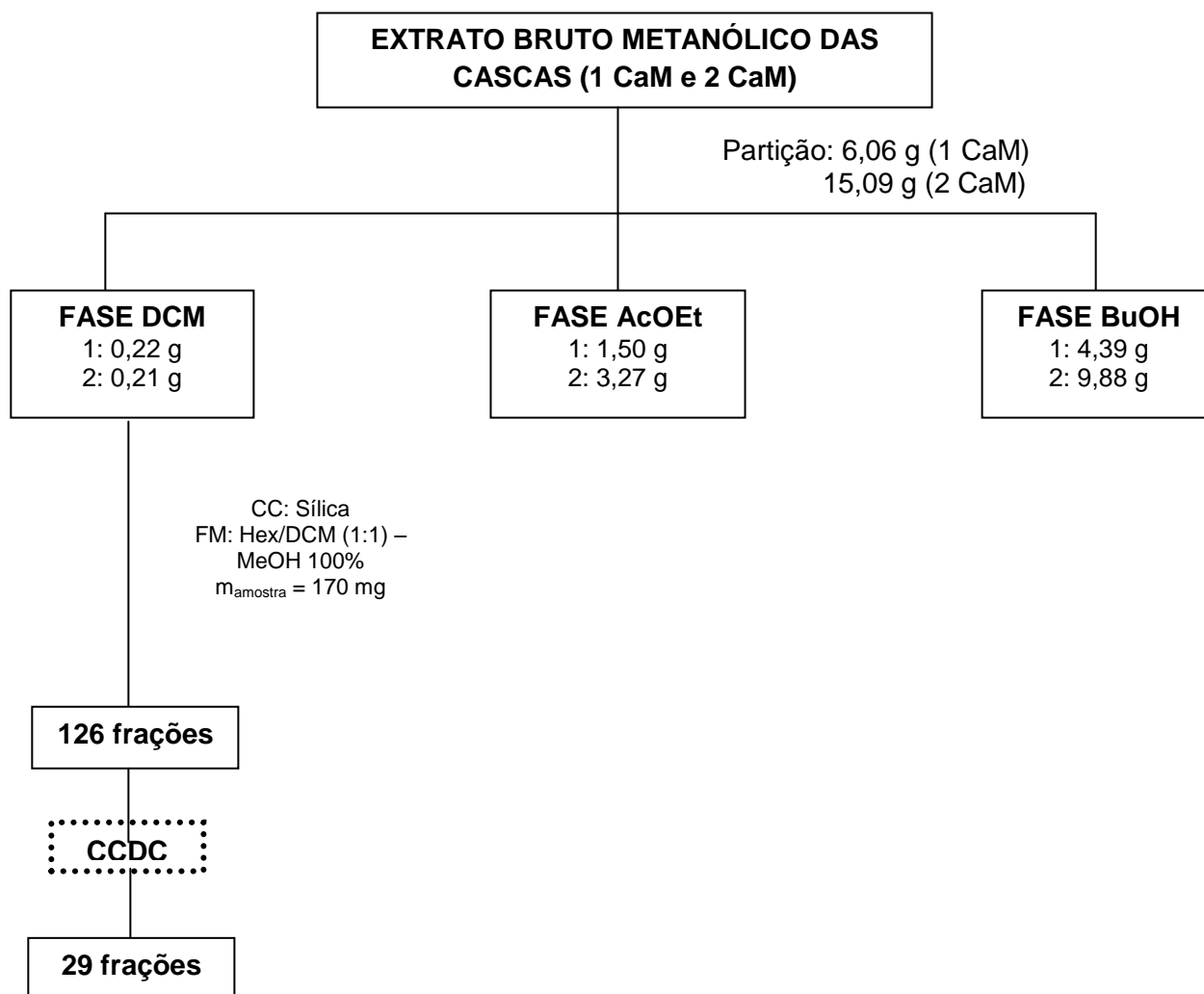


Figura 19: Fluxograma do fracionamento das fases DCM dos extratos metanólicos das cascas de *A. retusa* (Poir.) Kunth.

Das frações dessa coluna, cinco se destacaram por se mostrarem interessantes quimicamente. Foram elas:

- Fração 1/2 CaM 1.2

Através das análises por CCD a fração 1/2 CaM 1.2 apresentou coloração roxa quando reveladas com anisaldeído sulfúrico e sulfato de cério IV, sendo indicando possivelmente a presença de terpenos.

O espectro de RMN de ^1H (60 MHz) mostrou sinais entre δ_{H} 0,80 e 1,02 característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de esqueleto terpênico. Foram observados sinais em δ_{H} 5,12(m) e 5,34 (m) referente a hidrogênios olefínicos (figura 20). Mas devido a estar constituída por uma mistura de

substâncias, será necessária uma posterior purificação a fim de identificar as substâncias presentes.

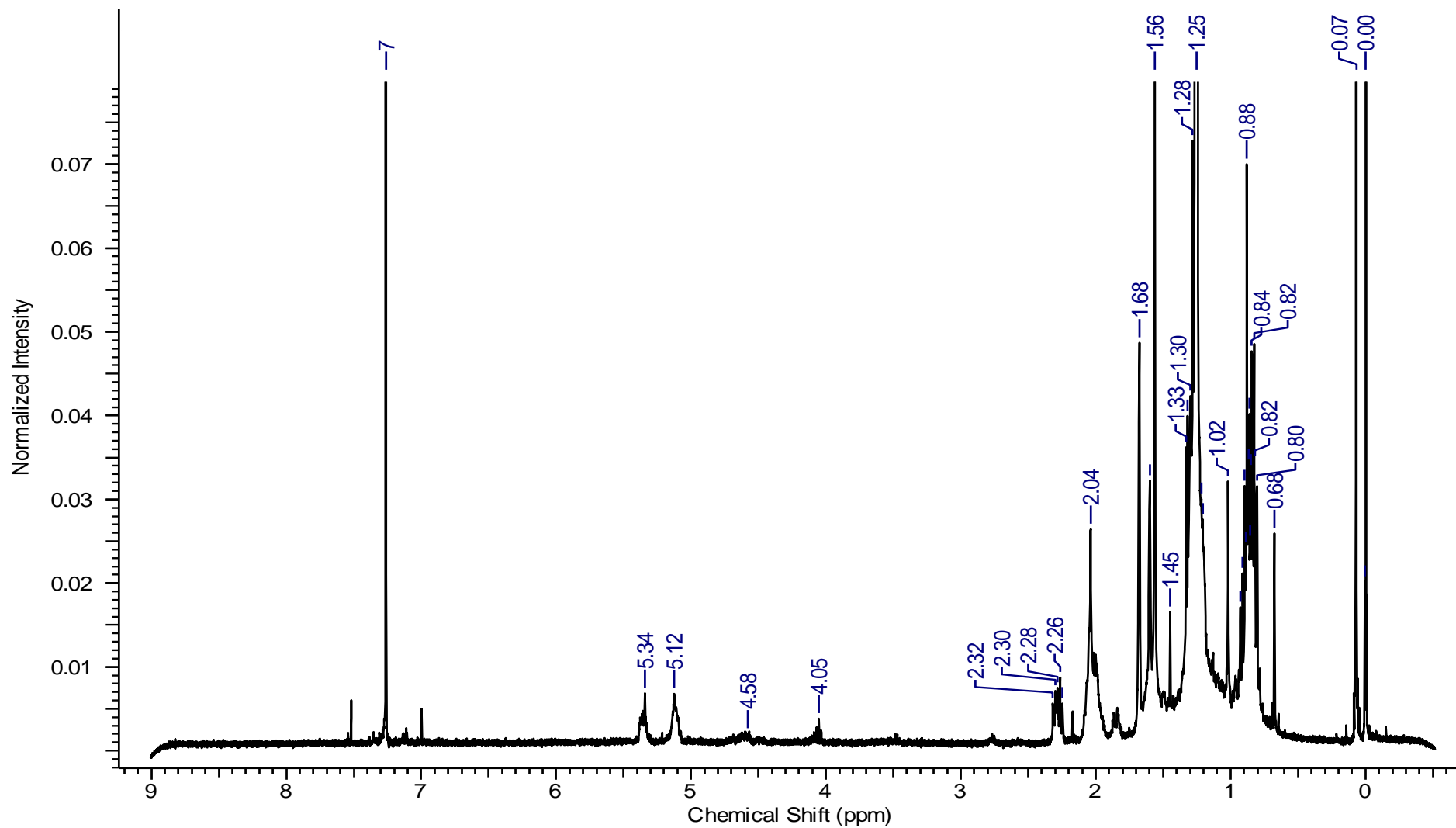


Figura 20: Espectro de RMN (60 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.2

- Fração 1/2 CaM 1.5-7

Após análise por CCD a fração 1/2 CaM 1.5-7 apresentou coloração laranja quando revelada com sulfato de cério IV e amarela com anisaldeído sulfúrico. Quando exposta sob luz UV, apresentou uma mancha avermelhada no comprimento de onda de 254 nm e duas manchas de Rfs distintos (uma amarela e outra azul) em 365 nm.

O espectro de RMN (60 MHz) de ^1H (figura 22) apresentou uma mistura de substâncias de classes de compostos distintos, tais como terpenoides e flavonoides. Foram observados sinais em δ_{H} 5,35 e na região de δ_{H} 0,8 - 2,4, característicos de hidrogênios olefinicos e de hidrogênios da cadeia hidrocarbônica triterpênica, respectivamente. Observou-se também neste espectro sinais de hidrogênios aromáticos que foram atribuídos a substâncias flavonoídicas devido seu comportamento frente aos reativos químicos e com base na quimiosistemática do gênero *Andira*. O tipo de esqueleto flavonoídico foi indicado pela presença dos singletos em δ_{H} 12,03, δ_{H} 12,14 e δ_{H} 12,33 característicos de flavonoides de cadeia fechada (OH-C5), possivelmente flavona, flavonol ou flavanona. No entanto, a ausência de singletos de C-3 de flavona, de sinais dos hidrogênios C-2 e C-3 de flavanona indicam possivelmente tratar-se de flavonol. A ausência de multipletos e o aparecimento de dubletos em δ_{H} 7,10-7,85 sugerem *para*-substituição no anel B por um grupo oxigenado (figura 21). Assim, conseguimos chegar uma estrutura básica de um flavonol. No entanto, será necessária a purificação das substâncias dessa mistura para que seja possível determinar suas estruturas. Os demais sinais do espectro de RMN de ^1H estão mostrados na Tabela 5.

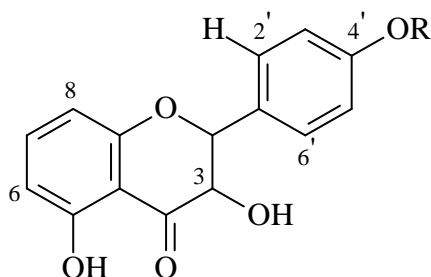


Figura 21: Estrutura básica de um Flavonol

Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.5-7 (mistura ainda não identificada)

δ_{H} (ppm)	Multiplicidade (<i>J</i> , Hz)
12,35	<i>s</i>
12,15	<i>s</i>
12,05	<i>s</i>
7,83	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,8 e 1,2
7,71	<i>d</i> , <i>J</i> = 3,2
7,53	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,2
7,29	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 1,2
7,11	<i>q</i> , <i>J</i> = 0,8
5,34	<i>m</i>
4,22	<i>t</i> , <i>J</i> = 6,2
3,94	<i>s</i>
3,67	<i>s</i>
2,47	<i>s</i>
2,46	<i>s</i>
2,30	<i>t</i> , <i>J</i> = 8
2,17	<i>s</i>
1,61	<i>m</i>

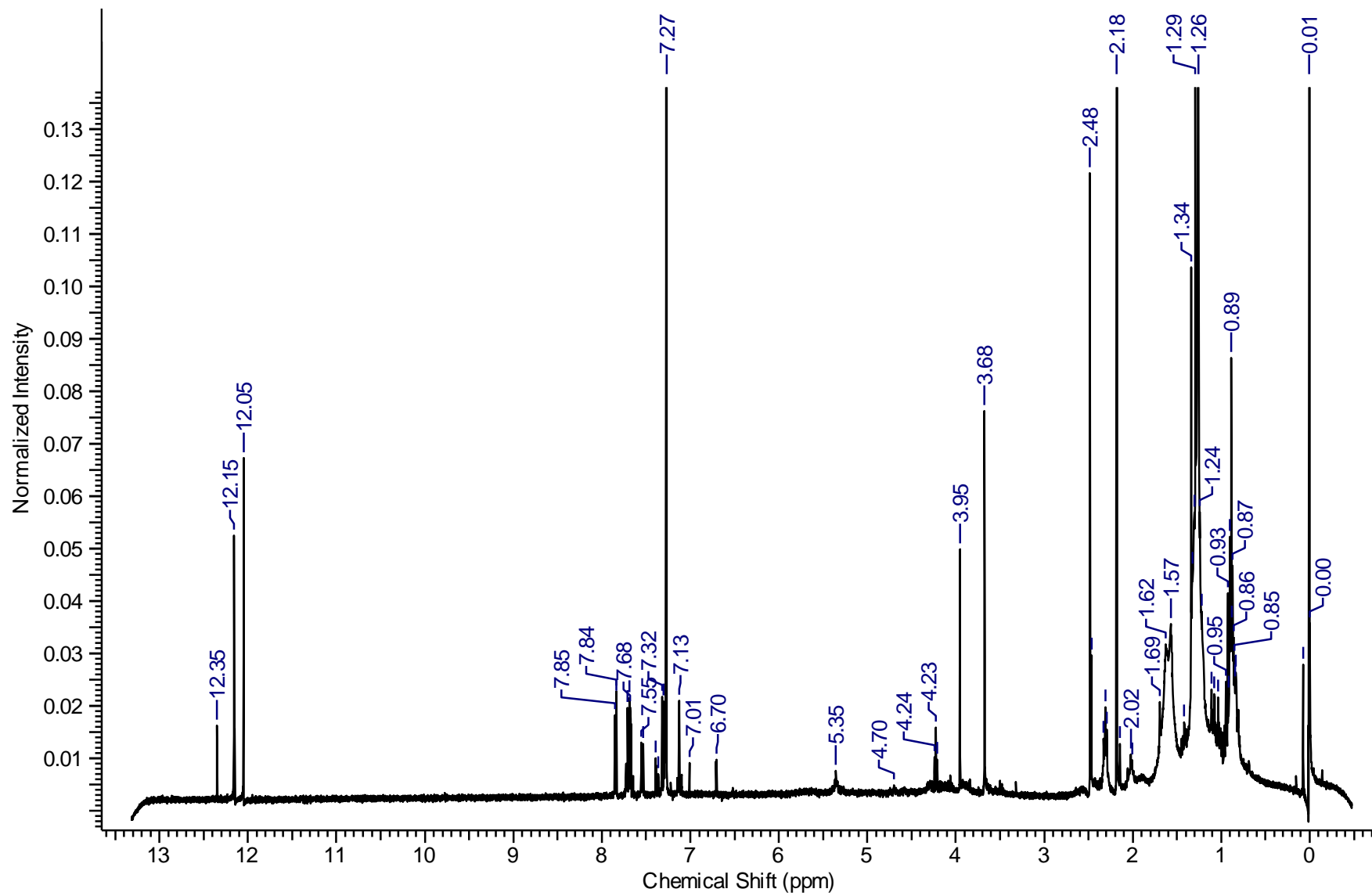


Figura 22: Espectro de RMN (60 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.5-7

Fracionamento da fração 12-15 da fase DCM do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaM 1)(12-15)

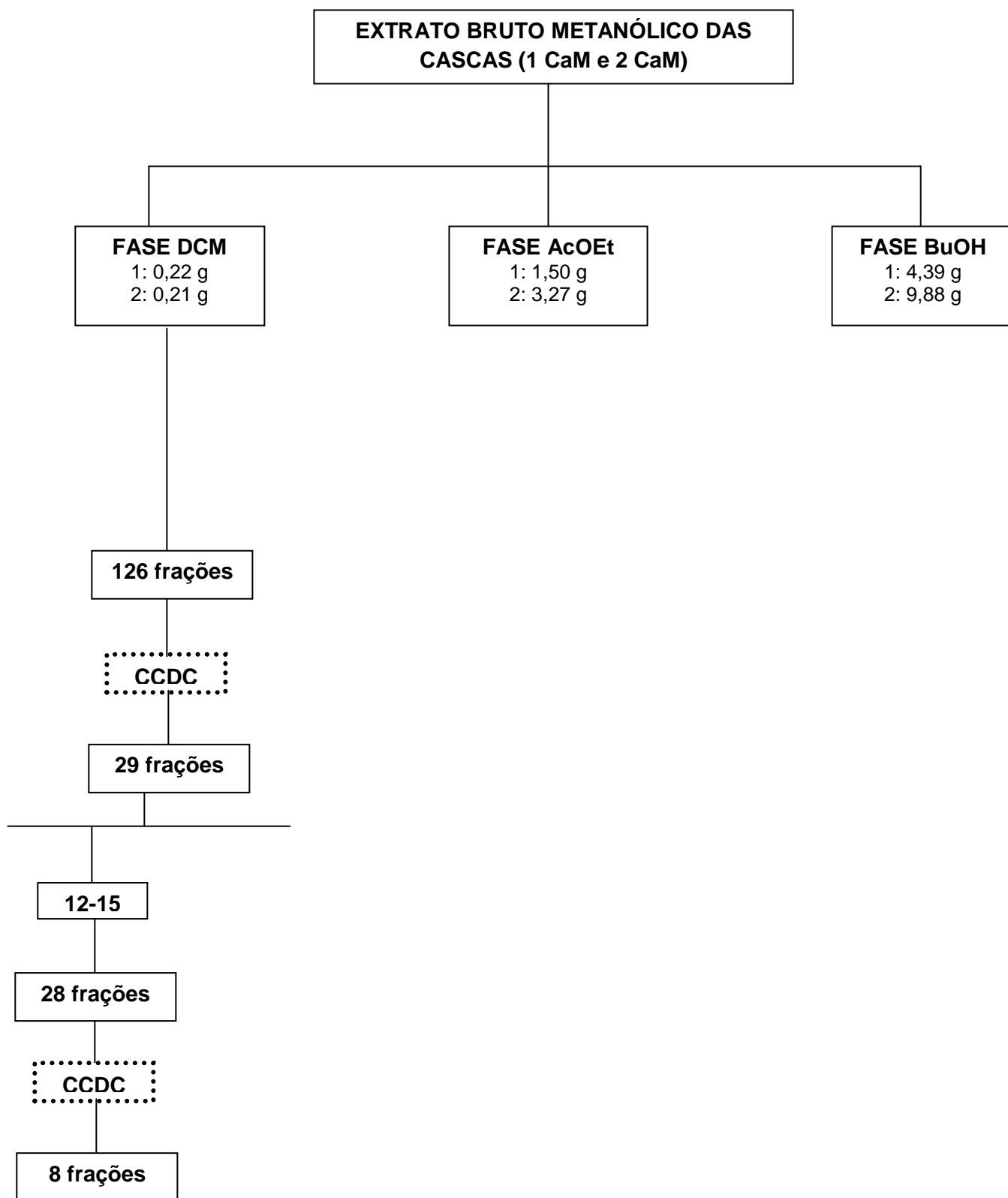


Figura 23: Fluxograma do fracionamento da fração 12-15 das fases DCM dos extratos metanólicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

A fração 12-15 mostrou-se interessante, pois apresentava coloração levemente azul quando revelada com UV 365 nm, rosa e roxa quando, respectivamente, revelada com anisaldeído sulfúrico e sulfato de cério IV (figura 24).

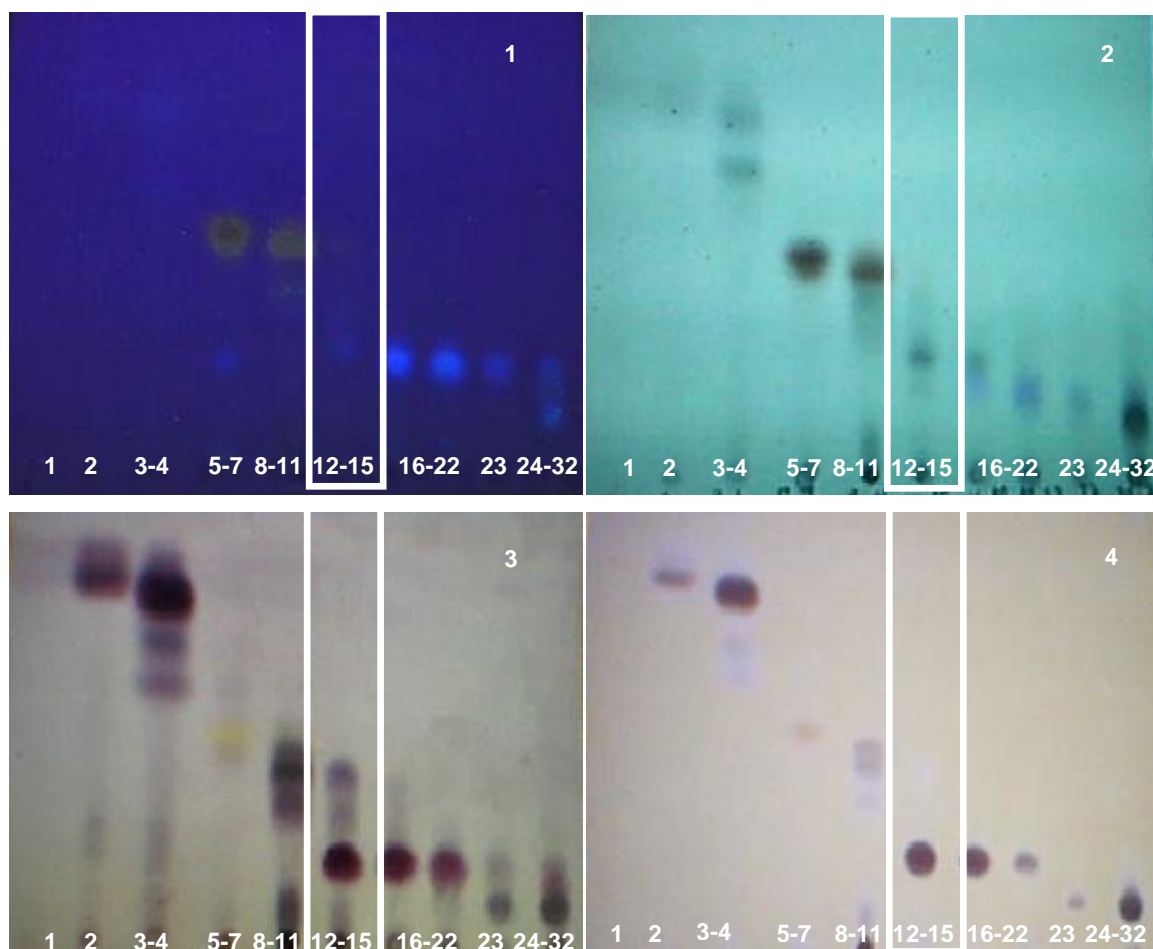


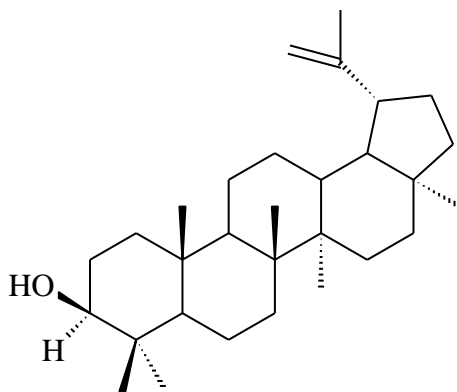
Figura 24: Análise em CCDC das frações da coluna da fase DCM dos extratos metanólicos das cascas. Eluição em Hex/DCM (4:6) e revelada com: 1 – UV 365 nm; 2 - UV 254 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV.

Após o fracionamento em coluna cromatográfica (figura 23) e a análise das frações obtidas, constatou-se que a fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9) apresentou coloração rosa quando revelada com anisaldeído sulfúrico e roxa com sulfato de cério IV (figura 24), e fisicamente era constituída por um sólido amorfo branco.

Então esta foi submetida a análise em RMN (figura 25). E no espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de triterpenos, entre δ_{H} 0,78 e 1,70 indicando sinais de hidrogênios metílicos e metínicos (figura 26). Na região dos hidrogênios olefínicos (figura 27) foram observados um sexteto em δ_{H} 4,58 ($J = 1,45$ Hz) e um dt em δ_{H} 4,70 ($J = 2,59, 0,62$ e $0,62$ Hz) que são indicativos dos dois hidrogênios de uma ligação dupla terminal (H-29a e H-29b, respectivamente), característicos de um triterpeno de esqueleto lupano. Além disso, outro sinal

característico foi observado em δ_H 3,19 (*dd*) referente ao hidrogênio carbinólico (H-3), que indica que a substância majoritária na fração é o lupeol.

O espectro de RMN de 1H foi comparado com o do lupeol previamente isolado no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia das folhas de *Minquartia guianensis* (CURSINO *et al.*, 2009) e com os dados do espectro de RMN de 1H do lupeol isolado de *Luehea candicans* por Silva (2004), como indicado na Tabela 6, o que confirmou a estrutura proposta.



Lupeol

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9) comparados com a literatura (SILVA, 2004, em CDCl_3 , 300 MHz)

$\delta_{\text{H OBSERVADO}}$ (ppm)	Observado (<i>J</i> , Hz)	$\delta_{\text{H LITERATURA}}$ (ppm)	Literatura (<i>J</i> , Hz,H)
5,20	<i>t</i>	-	-
5,15	<i>t</i>	-	-
4,70	1H, <i>d</i>	4,69	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4; H-29
4,58	1H, <i>m</i>	4,56	1H, <i>m</i> ; H-29
3,94	1H, <i>s</i>	-	-
3,88	1H, <i>s</i>	-	-
3,19	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 4 (ambos)	3,19	1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10,8 e 5,4; H-3
2,41	1H, <i>d</i>	2,39	1H, <i>spt</i> ; H-19
1,91	1H, <i>m</i>	1,91	1H, <i>m</i> ; H-21
1,89	1H, <i>t</i>	1,88	1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2,4; H-15
1,70	<i>dd</i>	1,68	3H, <i>s</i> ; H-30
1,66	1H, <i>t</i>	1,66	1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 3,0; H-13
1,65	1H, <i>s</i>	1,65	1H; H-1
1,63	1H, <i>s</i>	1,62	1H; H-12
1,53	2H, <i>s</i>	1,54	2H; H-2
1,49	1H, <i>s</i>	1,49	2H; H-16
1,41	2H, <i>s</i>	1,41	2H; H-7
1,40	1H, <i>s</i>	1,41	1H ; H-22
1,38	1H, <i>d</i>	1,38	1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,5; H-11
1,37	1H, <i>s</i>	1,36	1H; H-18
1,35	1H, <i>m</i>	1,35	1H, <i>m</i> ; H-21
1,27	1H, <i>s</i>	1,28	1H; H-9
1,22	1H, <i>m</i>	1,20	1H; H-11
1,19	1H, <i>s</i>	1,20	1H, <i>m</i> ; H-22
1,05	3H, <i>s</i>	1,07	1H; H-12
1,03	1H, <i>s</i>	1,03	3H, <i>s</i> ; H-26
1,01	1H, <i>s</i>	0,99	1H, <i>d</i> , , <i>J</i> = 2,1; H-15
0,98	1H, <i>d</i>	0,97	3H, <i>s</i> ; H-23
0,97	1H, <i>d</i>	0,94	3H, <i>s</i> ; H-27
0,96	1H, <i>d</i>	0,88	1H; H-1
0,93	<i>s</i>	0,83	3H, <i>s</i> ; H-25
0,89	<i>s</i>	0,79	3H, <i>s</i> ; H-28
0,82	<i>s</i>	0,76	3H, <i>s</i> ; H-24
0,78	<i>s</i>	0,70	1H; H-5

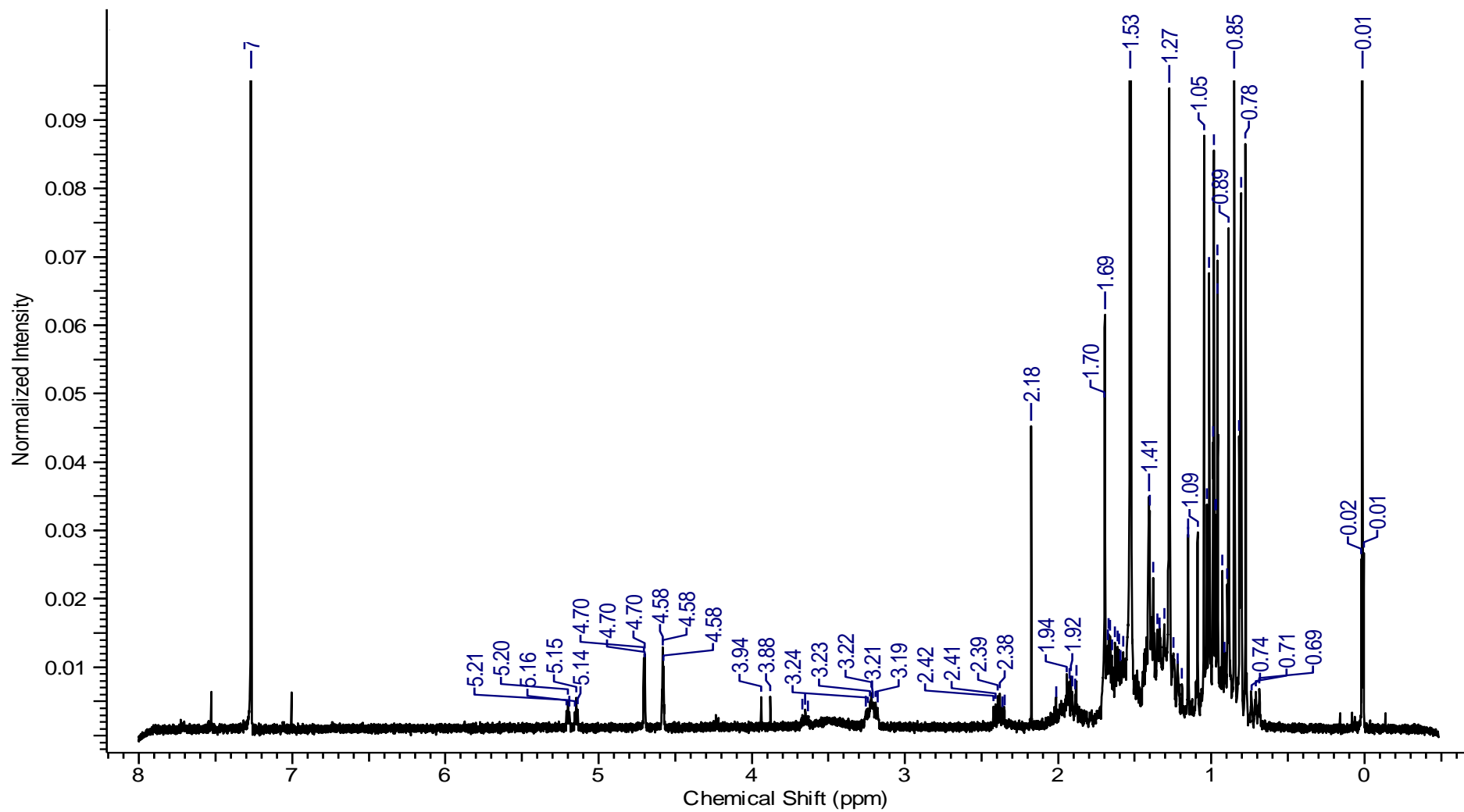


Figura 25: Espectro de RMN (400 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9)

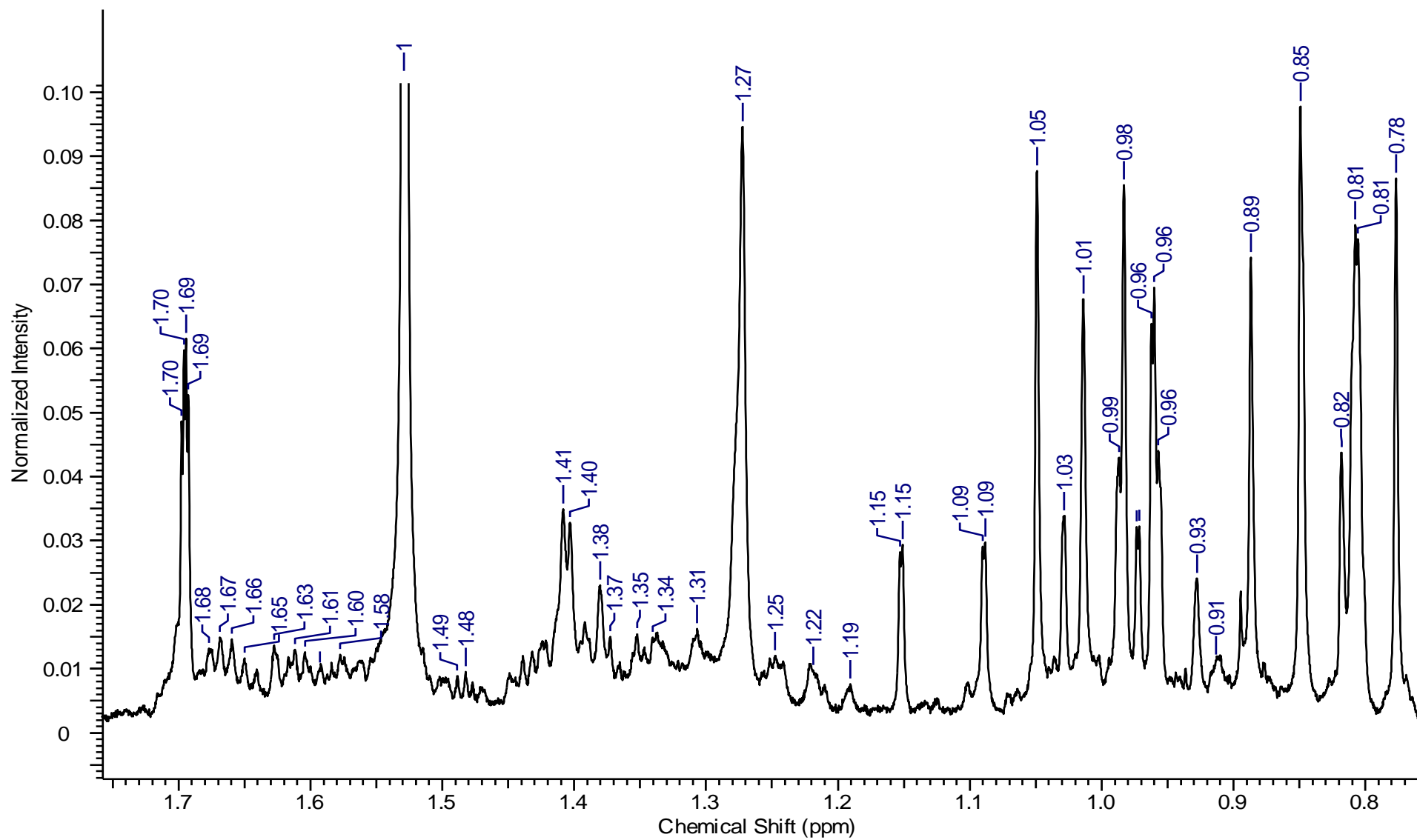


Figura 26: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9) – Região dos hidrogênios olefínicos

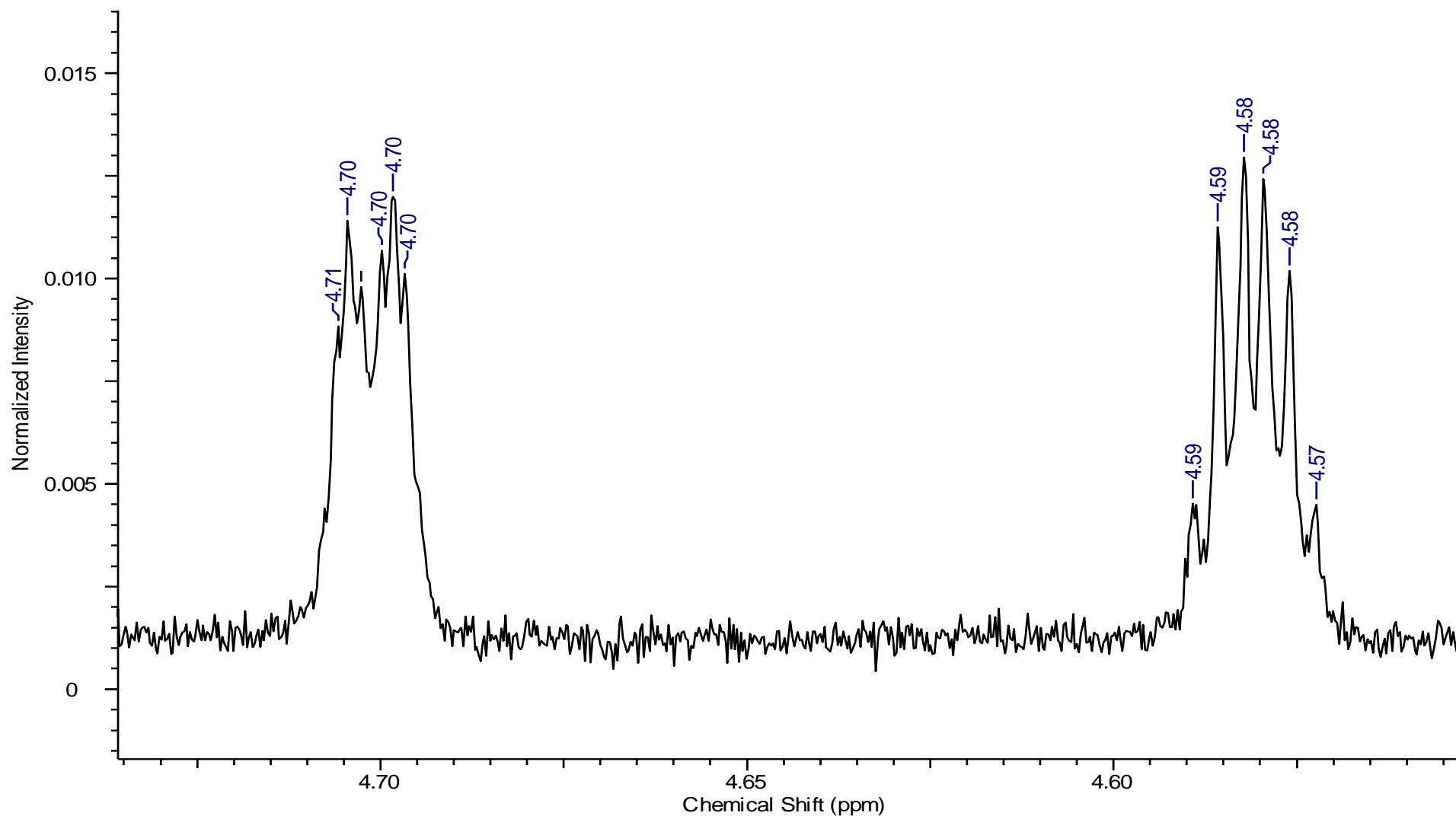


Figura 27: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.(12-15) (8-9) – Região dos hidrogênios olefínicos

- Fração 1/2 CaM 1.16-22

Ao revelar a fração 1/2 CaM 1.16-22 com sulfato de cério IV, observou-se o aparecimento de manchas com coloração roxa e quando revelada com anisaldeído sulfúrico verificou-se o aparecimento de manchas com colorações roxa e rosa, caracterizando a presença de terpenos.

O espectro de RMN de ^1H (figuras 28 e 29) mostrou a presença de sinais entre δ_{H} 0,8 e 1,7 indicando sinais de hidrogênios olefínicos e também foram observados sinais em δ_{H} 4,68 (*d*, $J = 2,4$ Hz), δ_{H} 5,12 (*t*, $J = 3,6$ Hz), 5,18 (*t*, $J = 3,6$ Hz), e δ_{H} 5,35 (*m*) característicos de hidrogênios com ligações duplas. Estes sinais indicam a presença de um triterpeno. O qual foi identificado como sendo o lupeol, previamente isolado na fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9).

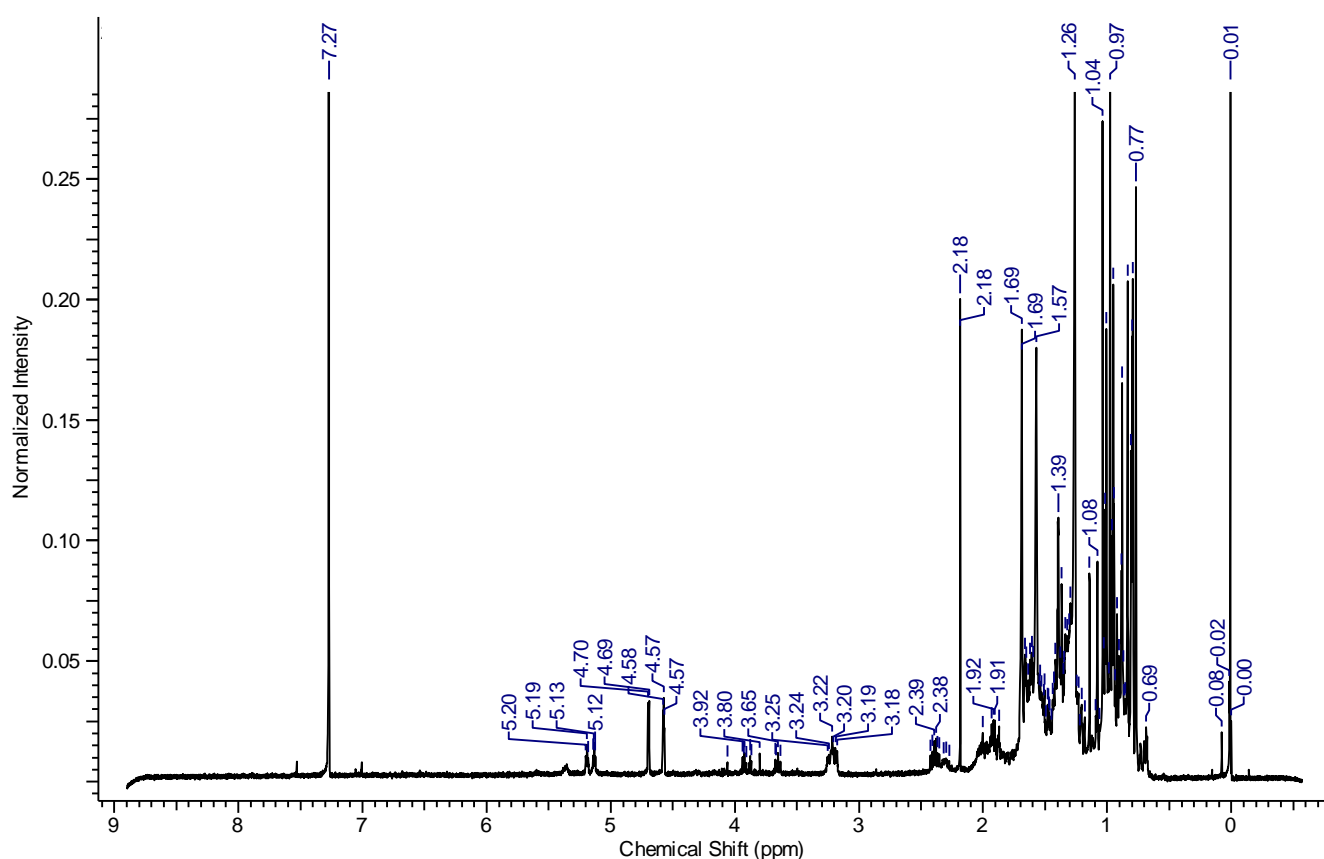


Figura 28: Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.16-22

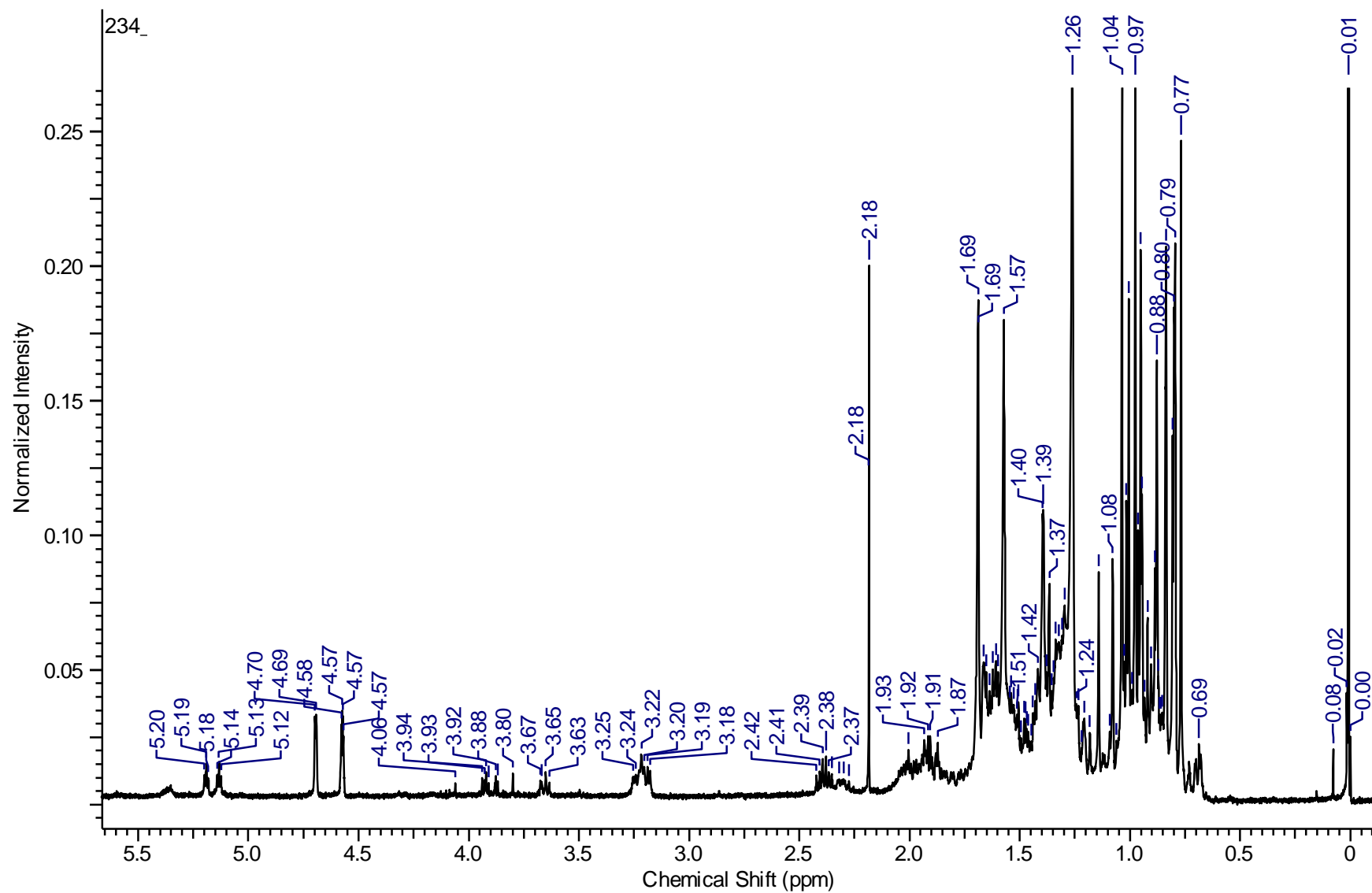
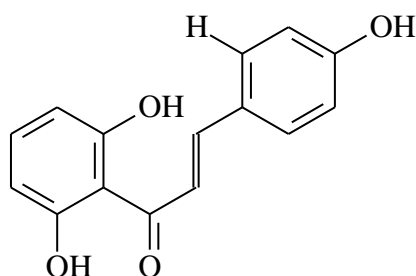


Figura 29: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.16-22

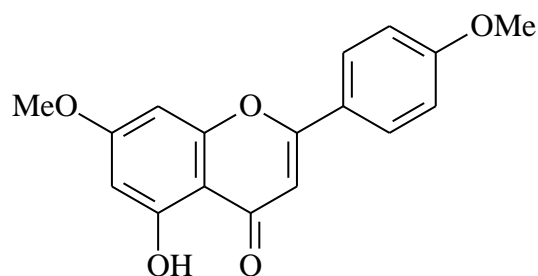
- Fração 1/2 CaM 1.24-32

Através da análise em CCD com os reveladores anisaldeído sulfúrico e sulfato de cério IV, a fração 1/2 CaM 1.24-32 mostrou manchas de coloração roxa.

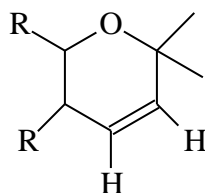
No espectro de RMN (400 MHz) de ^1H (figuras 30 e 31) observou-se a presença de um *s* em δ_{H} 13,39, característico de hidrogênios quelados por ligações intramoleculares de chalconas. E ainda, a presença de um *d* em δ_{H} 7,62 (1H) com larga constante de acoplamento (16,0 Hz) indica a geometria *trans* de um sistema AB de uma chalcona, confirmando esta classe de compostos. Observou-se também, um par de *d* em δ_{H} 6,83 ($J = 10$ Hz) e 5,57 ($J = 10$ Hz), assim como um singlete em δ_{H} 1,47 sugerindo a presença de um anel 2,2-dimetilpirano. Outros sinais foram observados neste espectro, tais como um *s* em δ_{H} 6,99, que pode ser atribuído ao hidrogênio C-3 de uma flavona, uma vez que este hidrogênio desta classe de compostos apresenta singlete entre 6,0 e 8,0 ppm (Baldoqui *et al.*, 2009), e ainda, o *s* em δ_{H} 12,00 corrobora com esta classe de metabólitos. Observaram-se também sinais referentes a grupamentos metoxilicos aromáticos, como os singletos em δ_{H} 3,92 e 3,79, integrando para três hidrogênios.



Chalcona

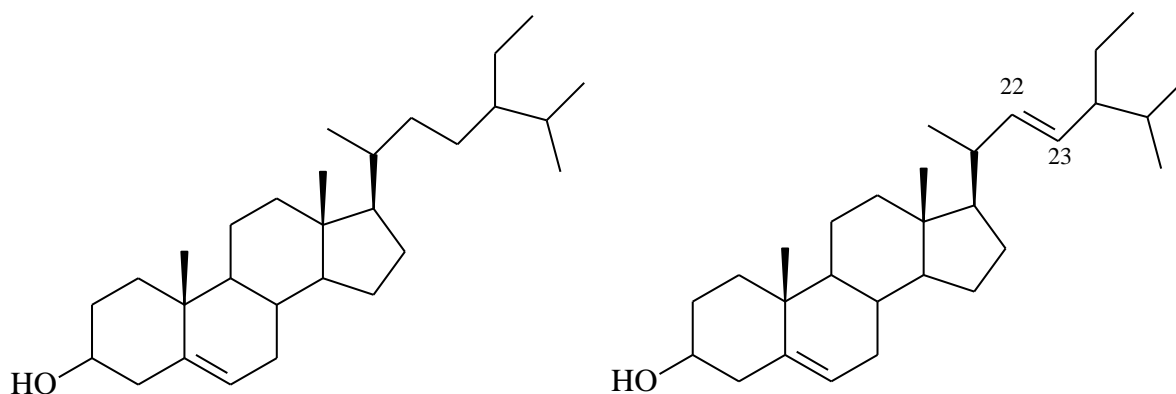


Flavona



2,2 - Dimetilpirano

No entanto, como constituintes majoritários desta fração foram identificados os esteroides β -sitosterol e estigmasterol. Observaram-se sinais entre δ_{H} 0,66 e 2,31 referentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos da cadeia esteroidal. O *m* em δ_{H} 3,50 (2H) caracteriza o hidrogênio C-3 desta classe de compostos, e o *d* em δ_{H} 5,35 (2H), sugere a mistura dos dois esteroides.



Mistura de β -sitosterol e estigmasterol

Tabela 7 – Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.24-32

δ_{H} (ppm)	Multiplicidade (J , Hz)
13,39	1H, <i>s</i>
12,00	<i>s</i>
10,08	<i>s</i>
7,62	1H, <i>d</i> , $J = 16$
7,50	<i>s</i>
7,07	1H, <i>dd</i> , $J = 8,4$ e $2,4$
7,04	<i>d</i> , $J = 16$
7,02	1H, <i>d</i> , $J = 2$
6,99	<i>s</i>
6,91	2H, <i>d</i> , $J = 8,4$
6,87	2H, <i>d</i> , $J = 8,4$
6,83	<i>d</i> , $J = 10$
6,62	<i>d</i> , $J = 10$
6,61	<i>d</i> , $J = 10$
6,36	<i>d</i> , $J = 8,4$
6,29	<i>d</i> , $J = 15,6$
5,87	<i>d</i> , $J = 10$
5,81	<i>d</i> , $J = 13$
5,72	<i>d</i> , $J = 2$
5,57	<i>d</i> , $J = 10$
3,92	3H, <i>s</i>
3,79	3H, <i>s</i>
1,47	<i>s</i>

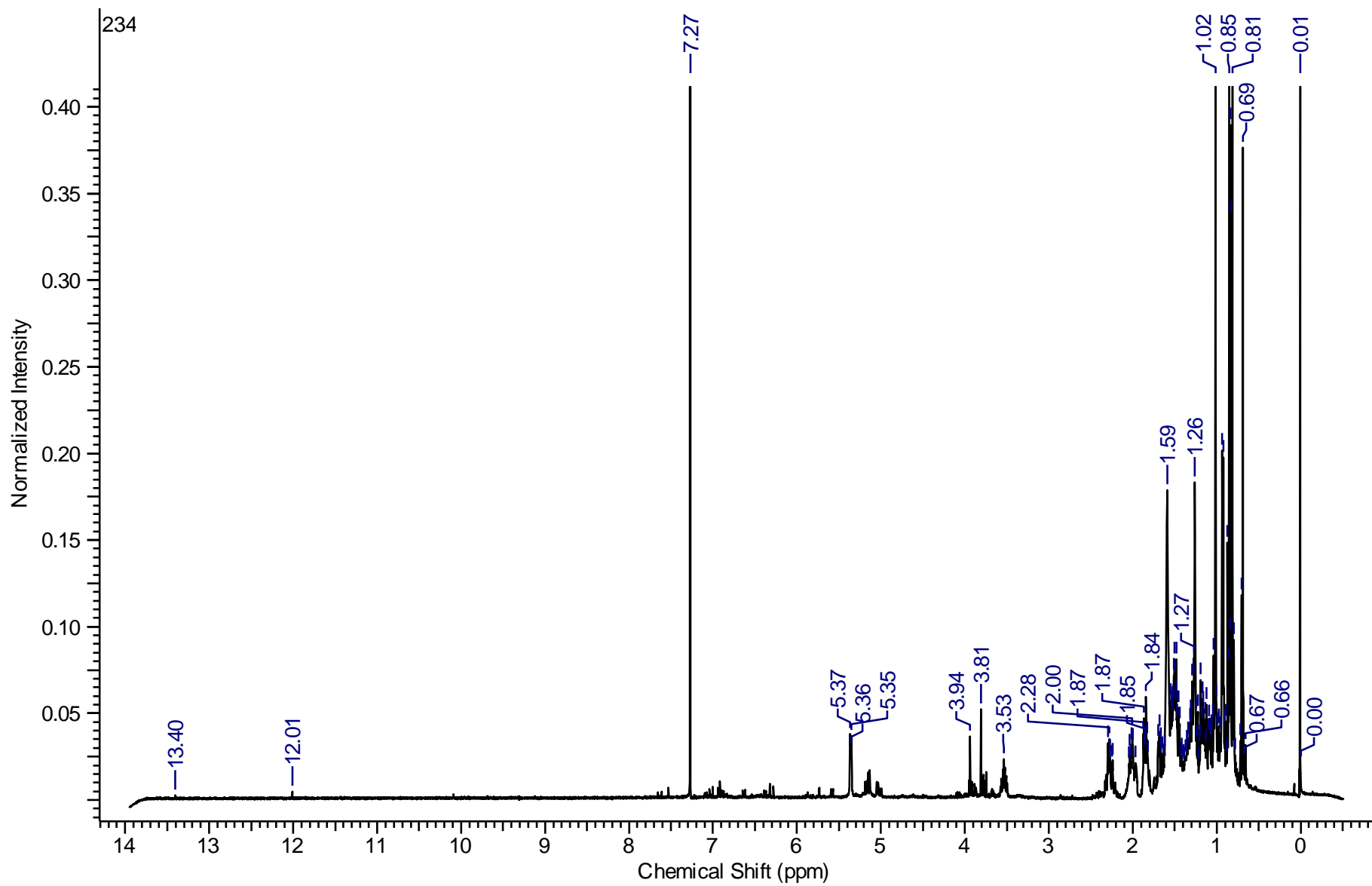


Figura 30: Espectro de RMN (400 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaM 1.24-32

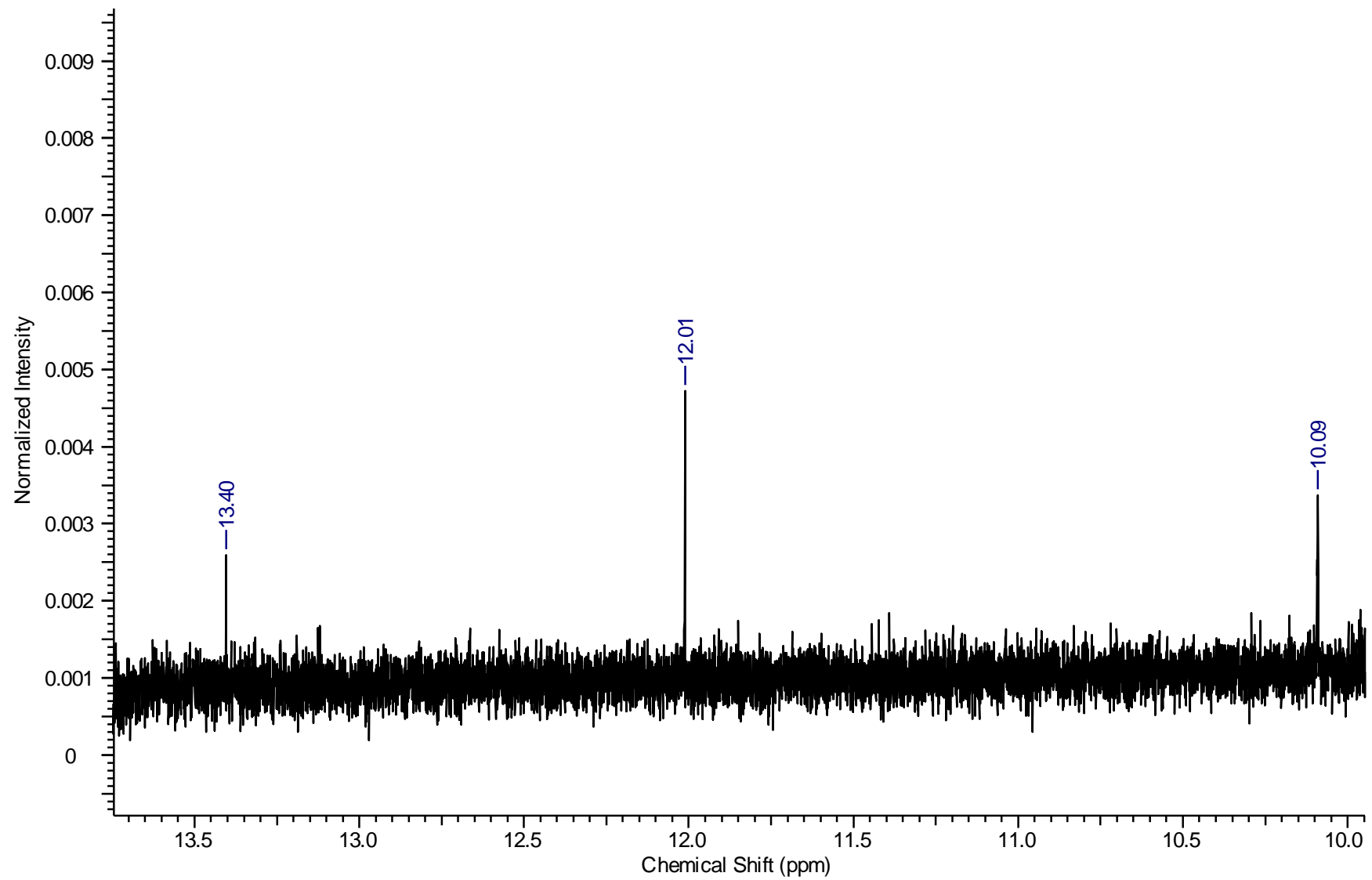


Figura 31: Expansão do espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaM 1.24-32

Fracionamento da fase DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.1)

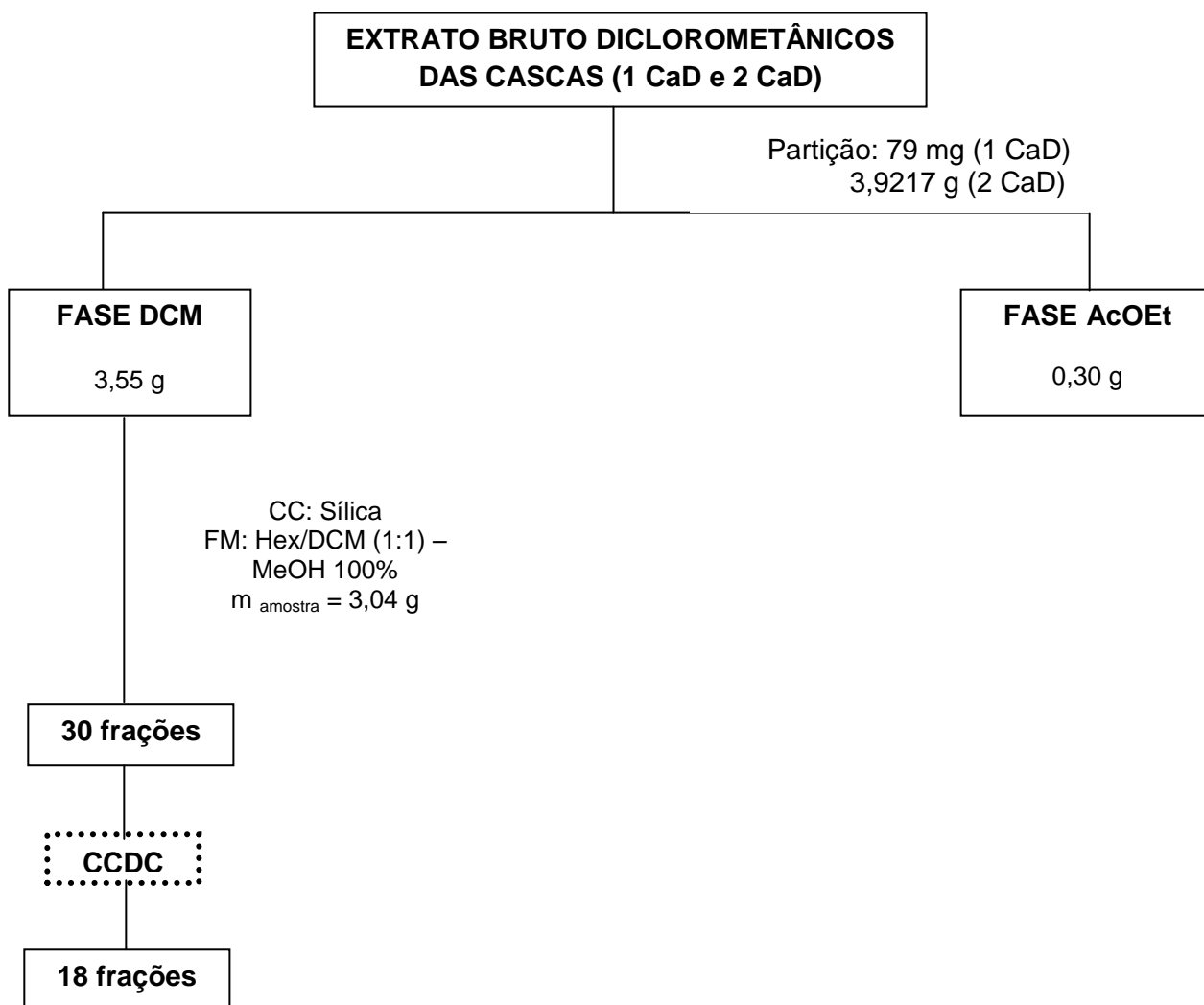


Figura 32: Fluxograma do fracionamento da fase DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

Das frações dessa coluna, duas se destacaram por se mostrarem interessantes para serem estudadas (figura 32). Foram elas: 1/2 CaD 1.1.(5-6), por apresentar coloração avermelhada quando revelada com UV 254 nm, alaranjada com UV 365 nm, rosada e amarelada com anisaldeído sulfúrico, e avermelhada e amarelada com sulfato de cério IV. Já a 1/2 CaD 1.1.(7-8) apresentou coloração escura quando revelada com UV 254 nm, esverdeada com UV 365 nm, rosada com anisaldeído sulfúrico e roxa com sulfato de cério IV.

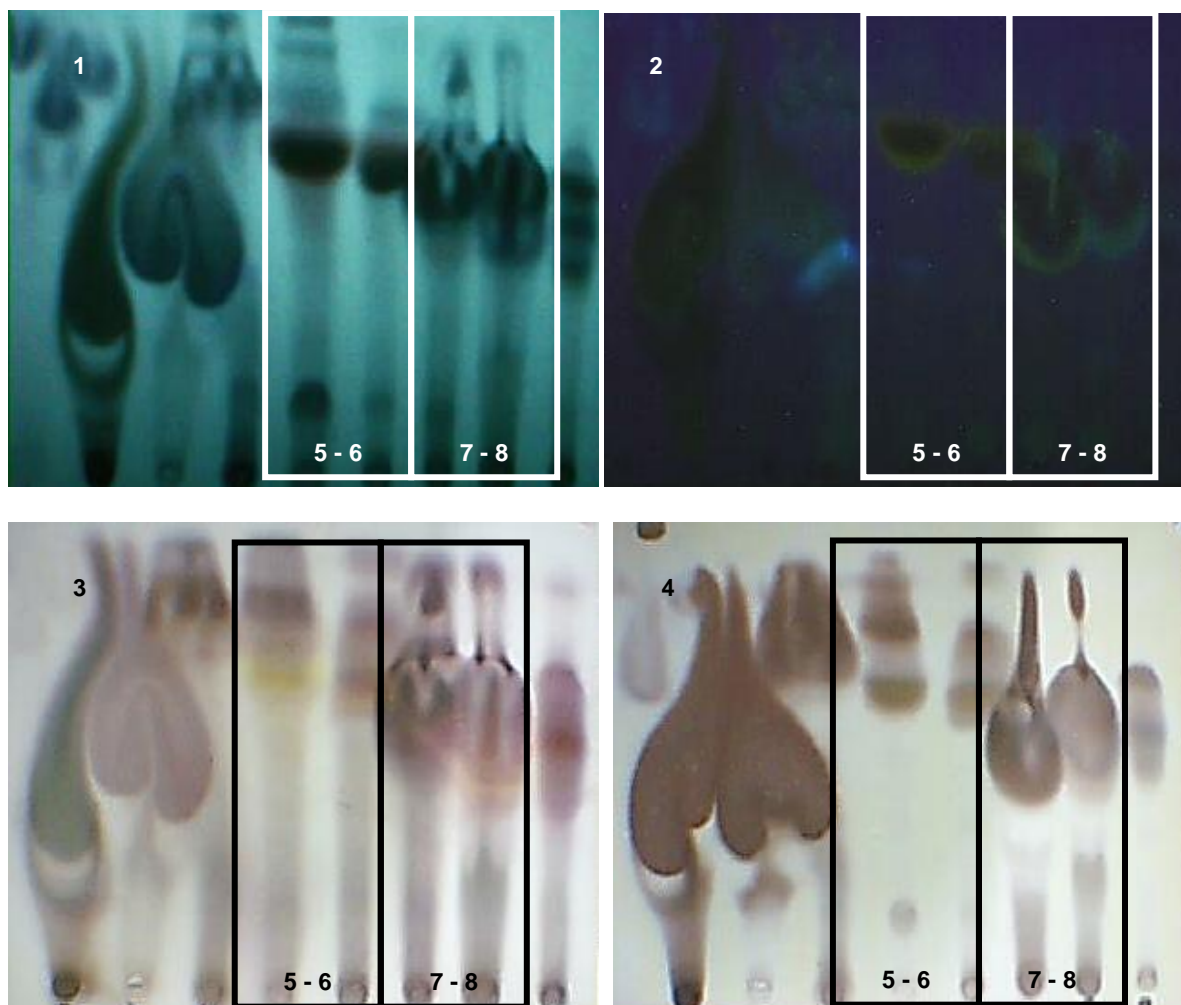


Figura 33: Análise em CCDC das frações da coluna da fase DCM dos extratos metanólicos das cascas. Eluição em Hex/DCM (2:8) e revelada com: 1 – UV 254 nm; 2 - UV 365 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV.

No espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1 (5-6) (figura 34) foram observados sinais entre δ_{H} 0,8 e 2,16 indicando sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos possivelmente de esteroides e δ_{H} 5,29 e 5,52 característicos de hidrogênios com ligações duplas. Há também sinais de hidrogênios mais desprotegidos, entre δ_{H} 6,47 e 9, que podem ser de anéis aromáticos. Mas a mistura não pode ser identificada.

No espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1 (7-8) (figura 35) foram observados sinais entre δ_{H} 0,89 e 2,32 indicando sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que analisados junto aos sinais em δ_{H} 3,30 e 3,54, e com os hidrogênios de ligações duplas em δ_{H} 5,30 (*m*) e 5,67 (*m*) indicam a presença de esteroides. Outros sinais foram observados em δ_{H} 4,5 característicos de hidrogênios de carbonos alifáticos oxigenados. Além de alguns sinais de hidrogênios aromáticos e outros sinais desprotegidos em δ_{H} 9, podendo ser de aldeídos.

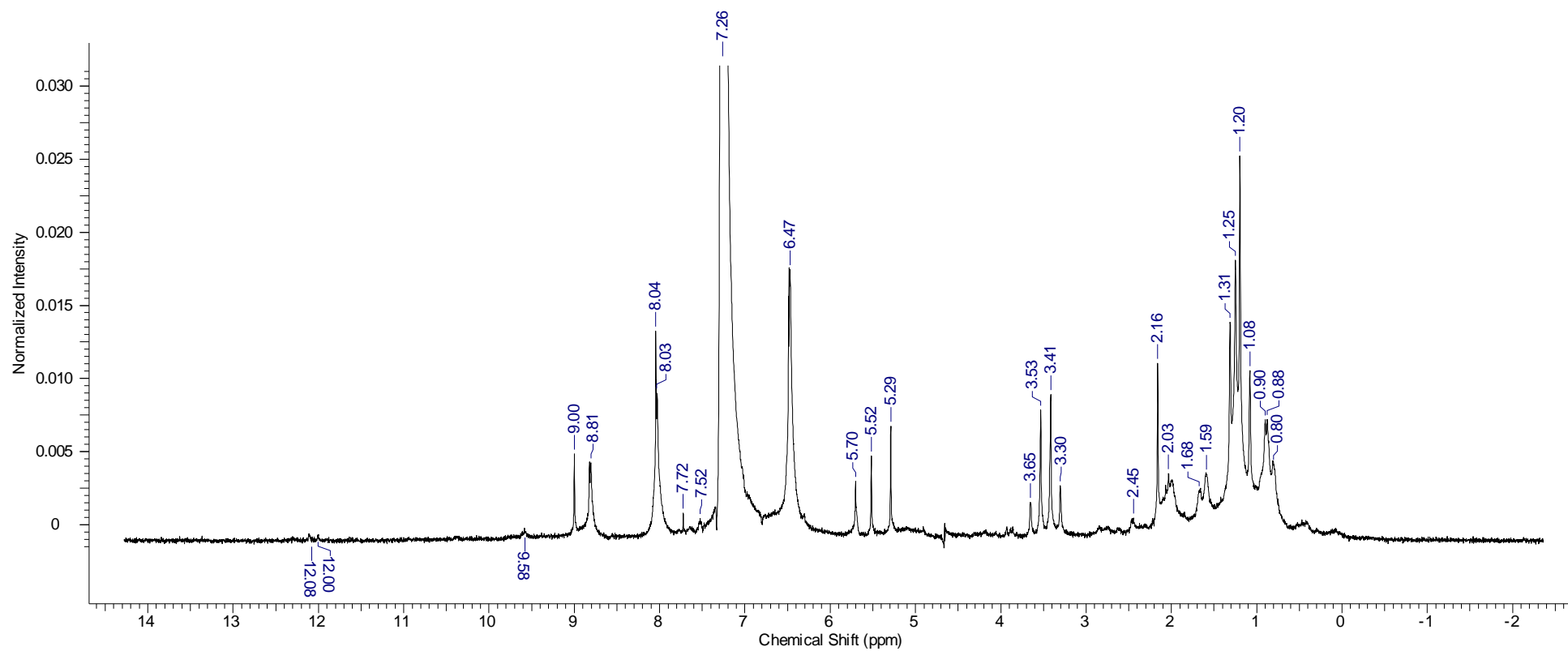


Figura 34: Espectro de RMN (60 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)

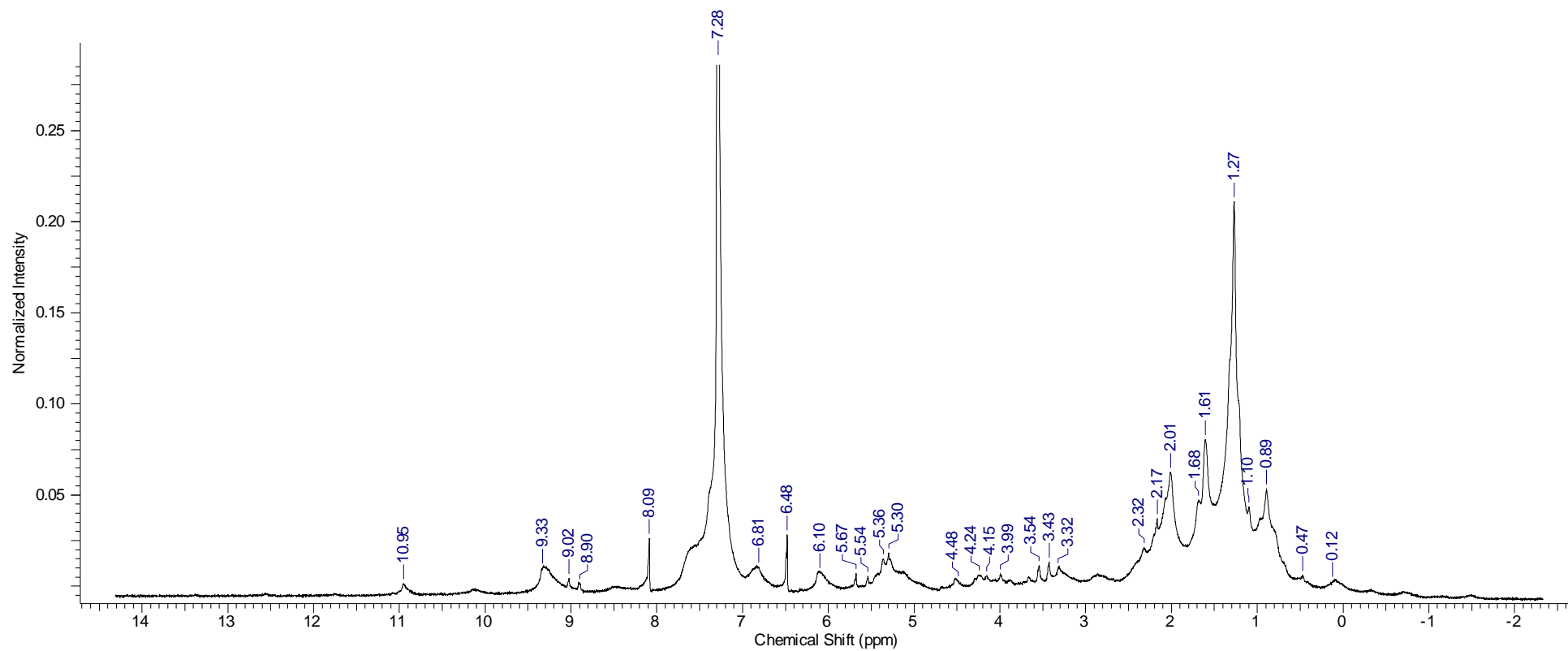


Figura 35: Espectro de RMN (60 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaD 1.1(7-8)

Fracionamento da fração 5-6 da fase DCM do extrato diclorometânico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.1)(5-6)

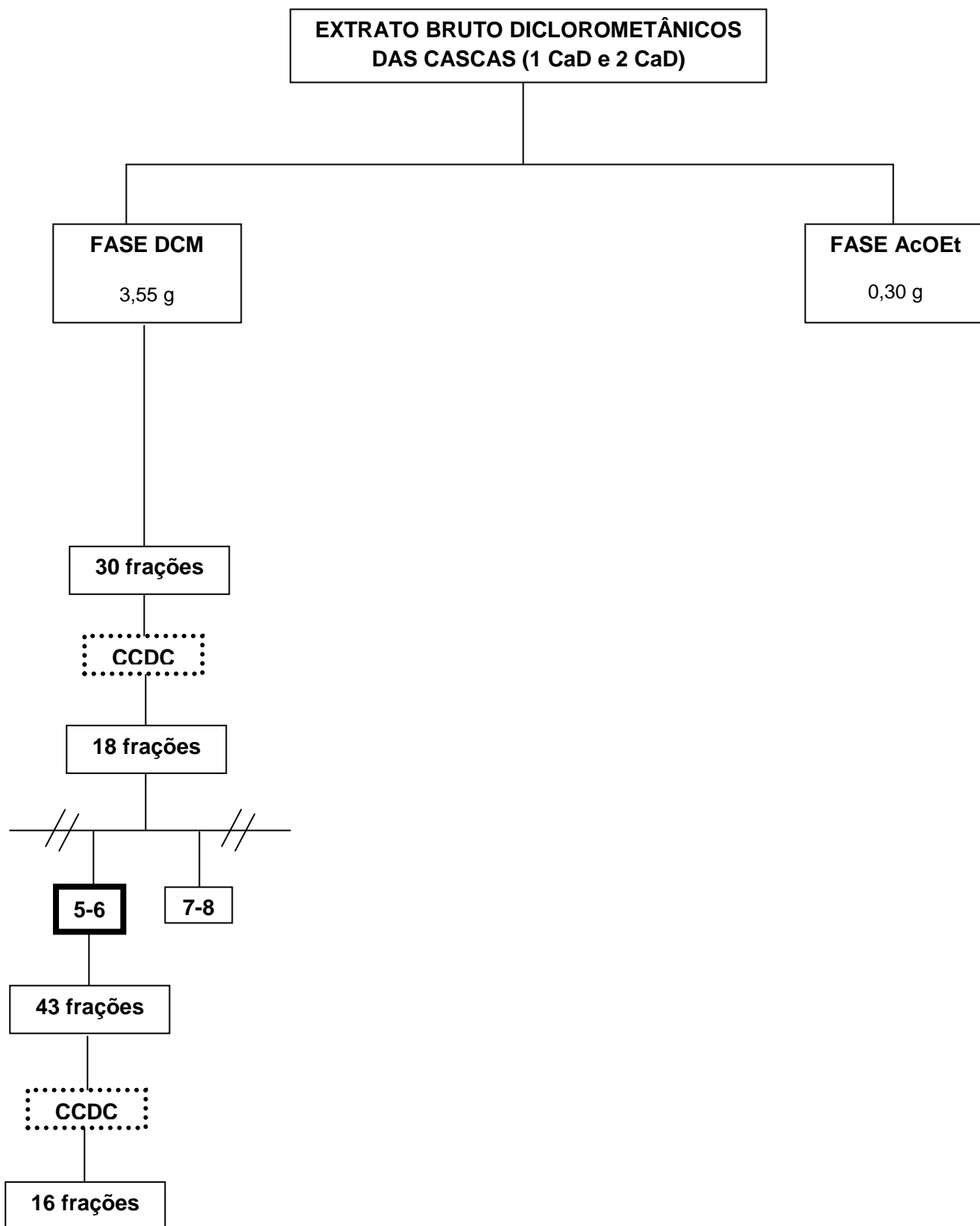


Figura 36: Fluxograma do fracionamento da fração 1/2 CaD 1.1 (5-6) das fases DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

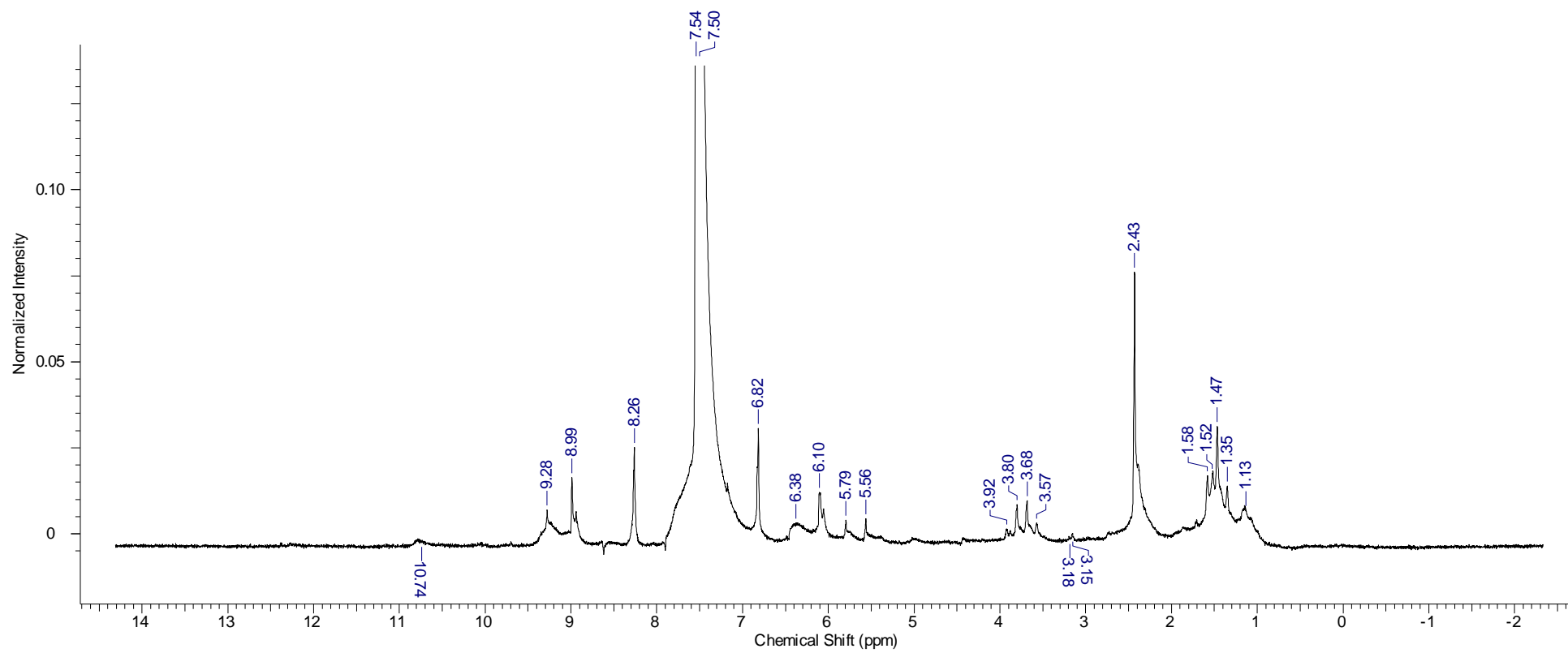


Figura 37: Espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(3)

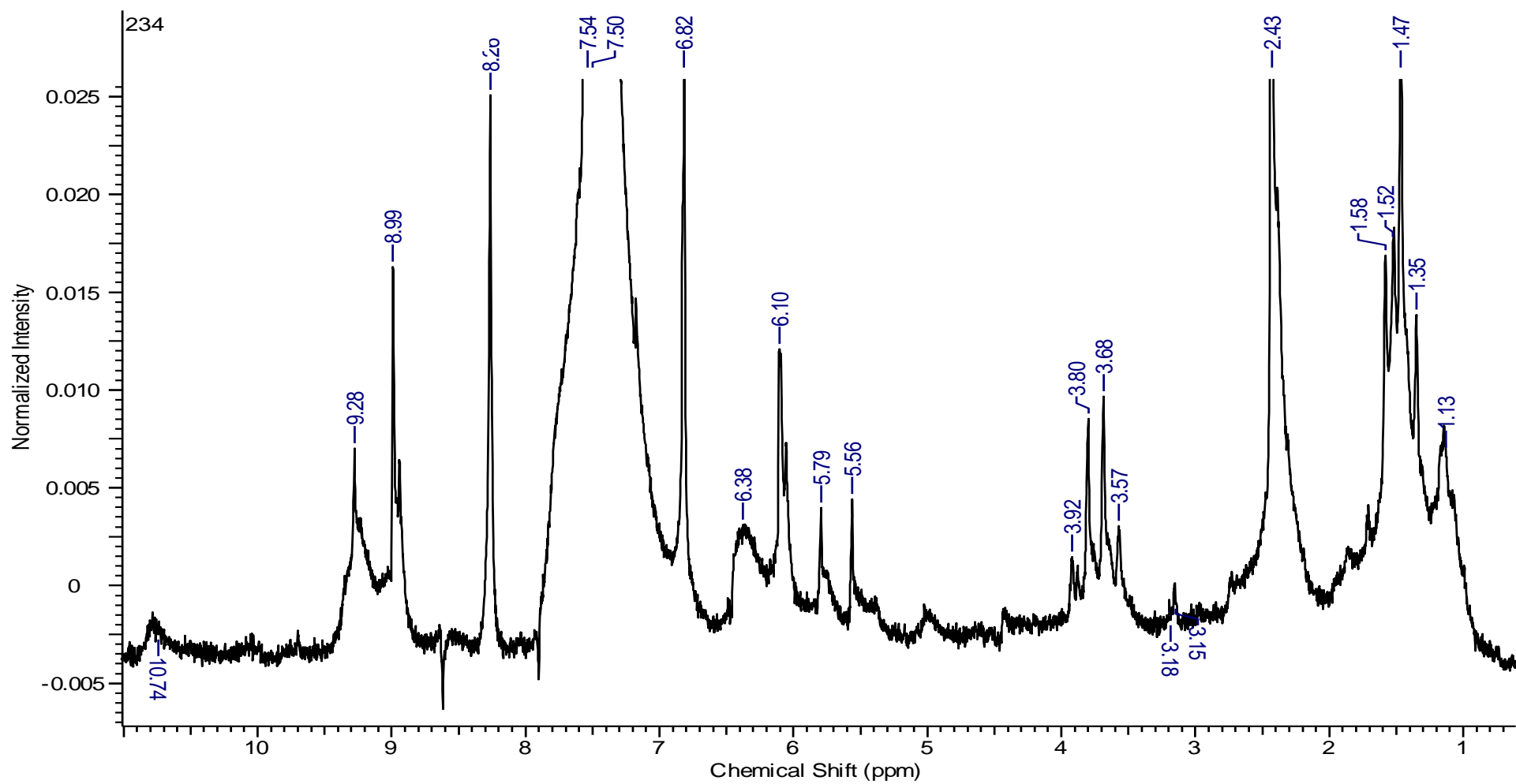


Figura 38: Expansão do espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(3)

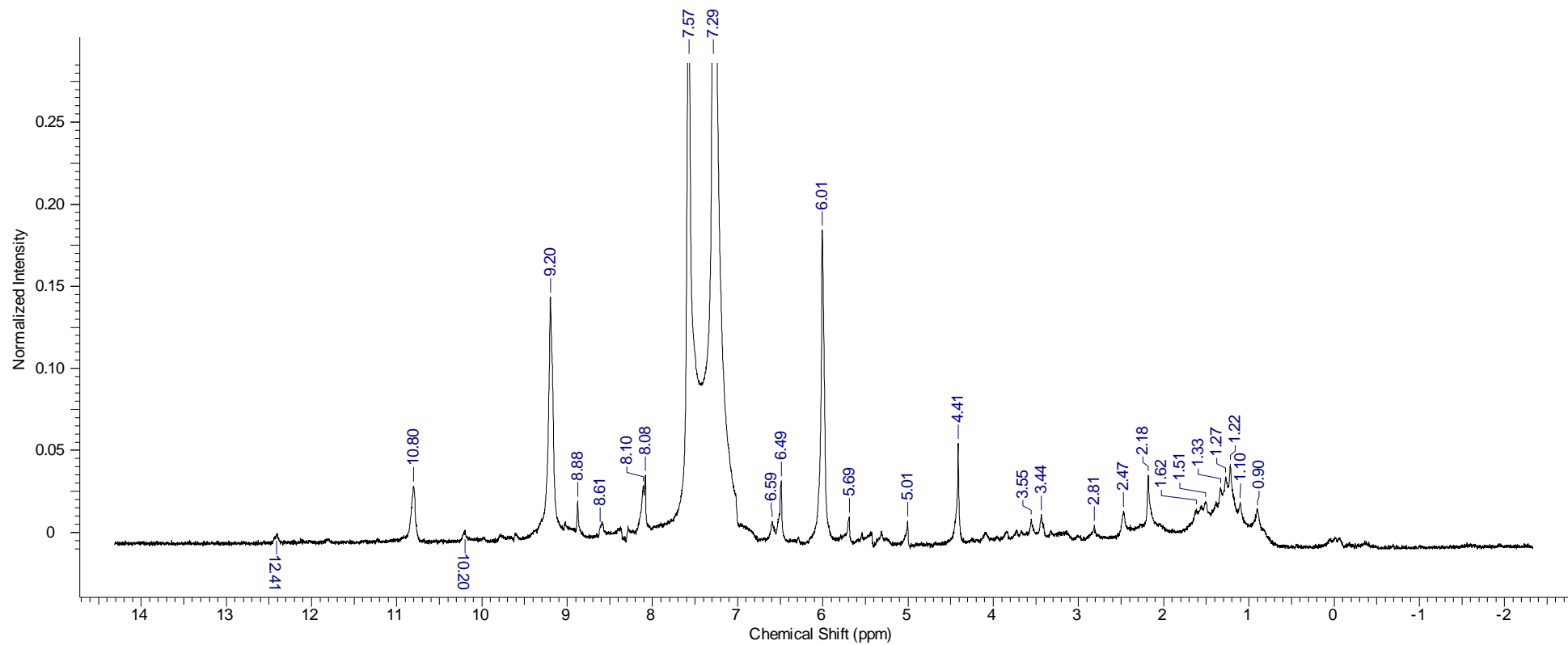


Figura 39: Espectro de RMN (60 MHz) de ¹H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(4)

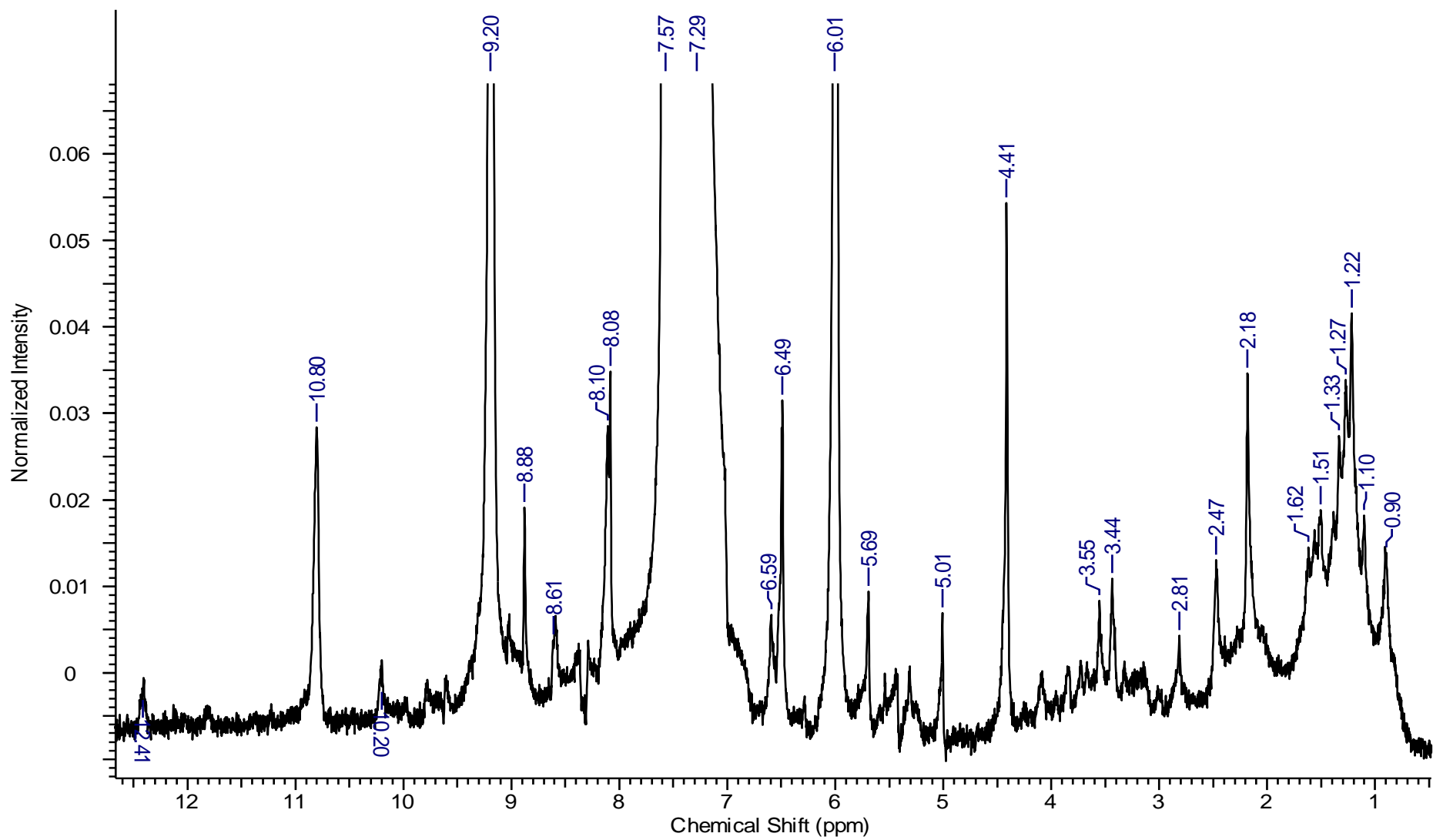


Figura 40: Expansão do espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1(5-6)(4)

Das frações dessa coluna, duas se destacaram por se mostrarem interessantes para serem estudadas. Foram elas: 1/2 CaD 1.1 (5-6)(3) e 1/2 CaD 1.1 (5-6)(4) e ambas apresentaram coloração amarelada quando revelada com UV 254 nm, e UV 365 nm, e amarelada com anisaldeído sulfúrico, e avermelhada com sulfato de cério IV (figura 41).

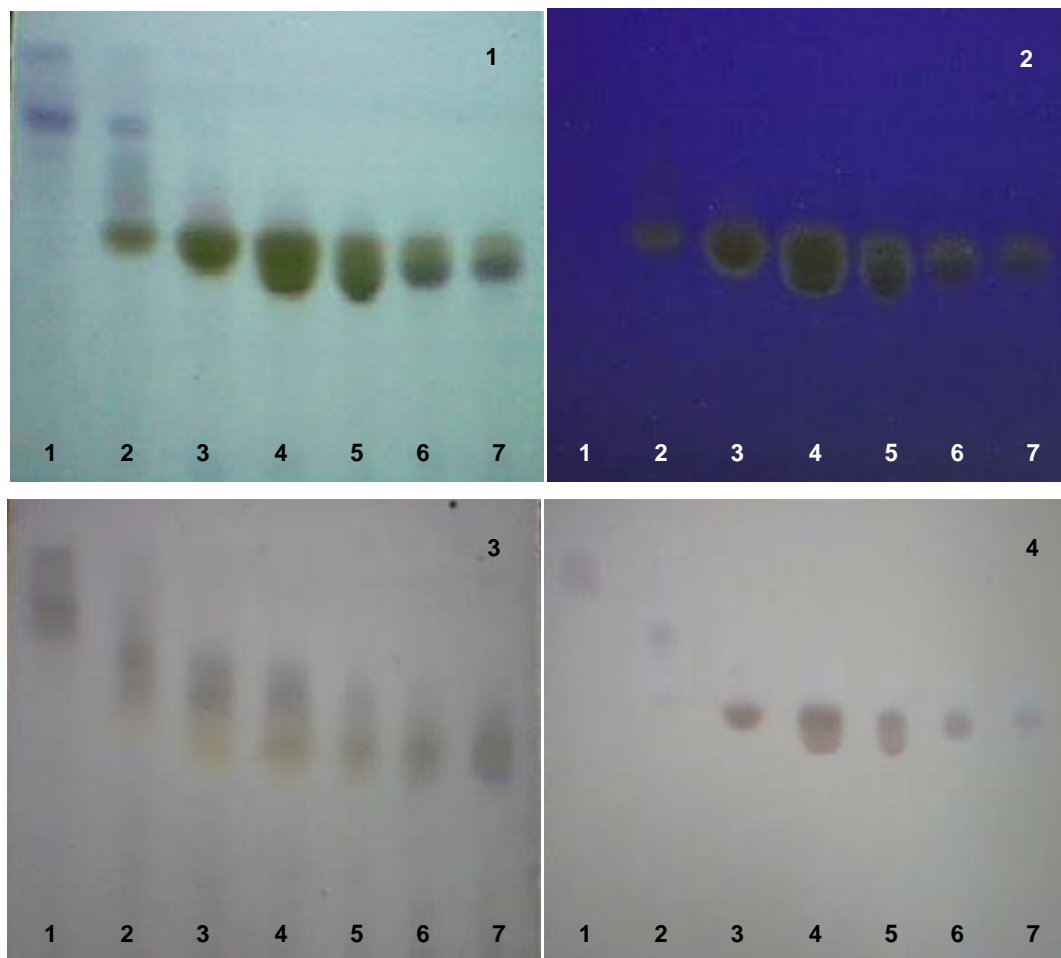


Figura 41: Análise em CCDC das frações da coluna da fração 1/2 CaD 1.1.(5-6). Eluição em Hex/DCM (4:6) e revelada com: 1 – UV 365 nm; 2 - UV 254 nm; 3 – anisaldeído sulfúrico; 4 - sulfato de cério IV.

No espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1 (5-6)(3) (figuras 37 e 38) foram observados sinais entre δ_{H} 1,13 e 1,58 indicando sinais de hidrogênios metílicos e também sinais entre δ_{H} 3,15 e 3,92, e hidrogênios característicos de compostos aromáticos com δ_{H} 8,26 e 10,74.

No espectro de RMN (60 MHz) de ^1H da fração 1/2 CaD 1.1 (5-6)(4) (figuras 39 e 40) foram observados sinais entre δ_{H} 0,9 e 1,62 indicando sinais de hidrogênios metílicos e também foram observados sinais entre δ_{H} 4,41 e 5,59, característicos de hidrogênios com ligações duplas. Além de hidrogênios próximos de δ_{H} 8 e 12, característicos de hidrogênios aromáticos e hidroxílicos de flavonoides.

Fracionamento da fração 7-8 da fase DCM do extrato diclorometânico das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.1)(7-8)

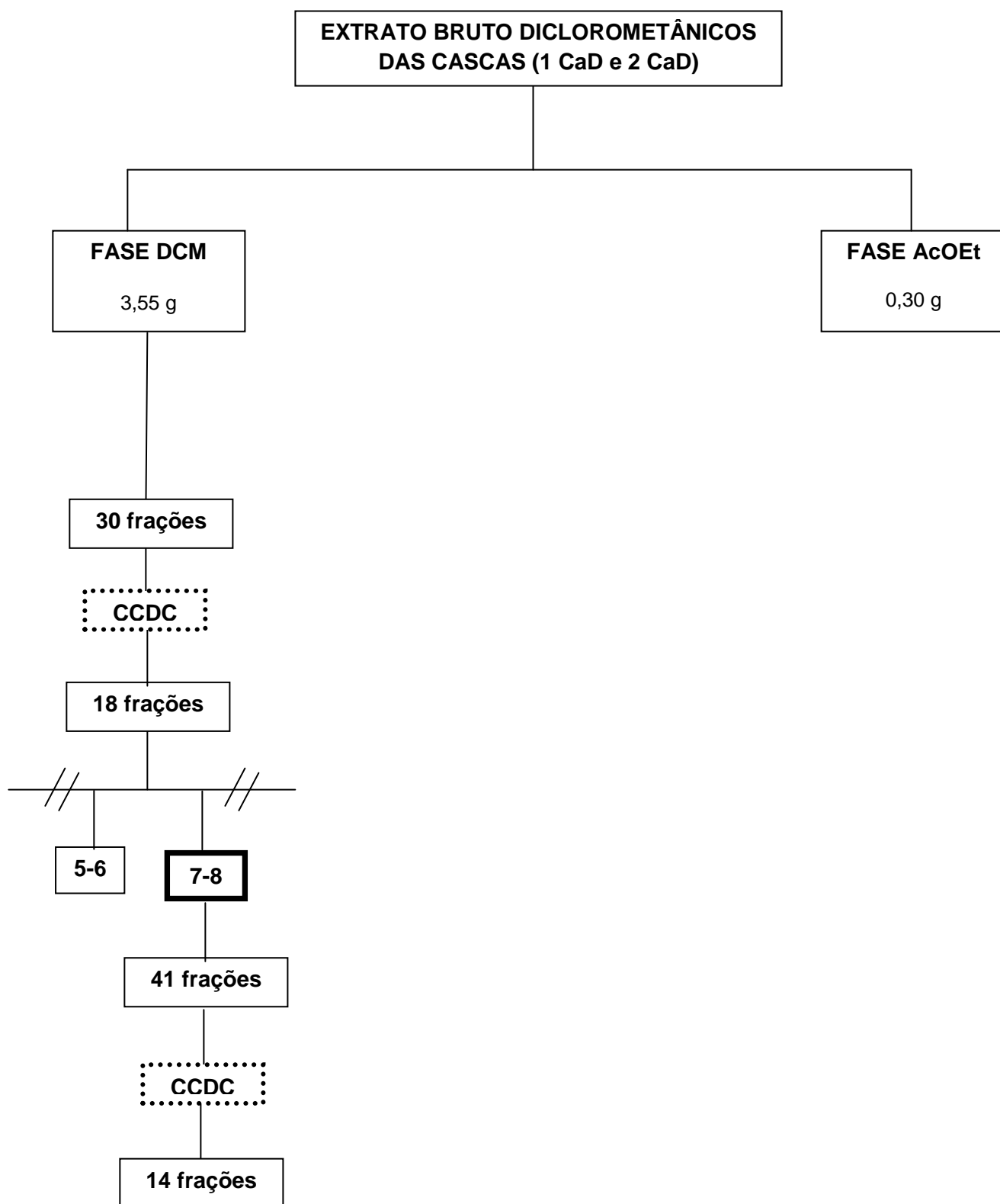


Figura 42: Fluxograma do fracionamento da fração 1/2 CaD 1.1 (7-8) das fases DCM dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

Fracionamento da fase AcOEt dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (1/2 CaD 1.2)

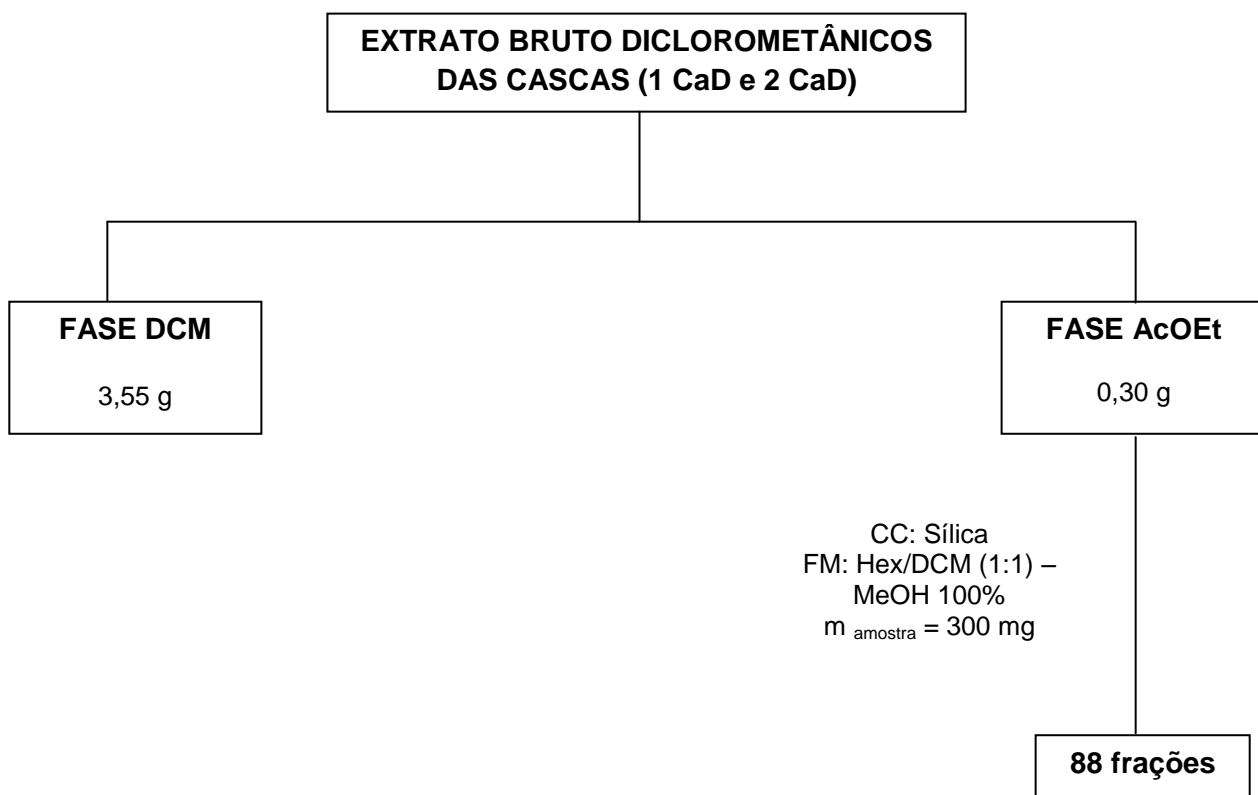


Figura 43: Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

Fracionamento da fase AcOEt dos extratos metanólicos das cascas de *Andira retusa* da 1ª coleta (1 CaM 2.2)

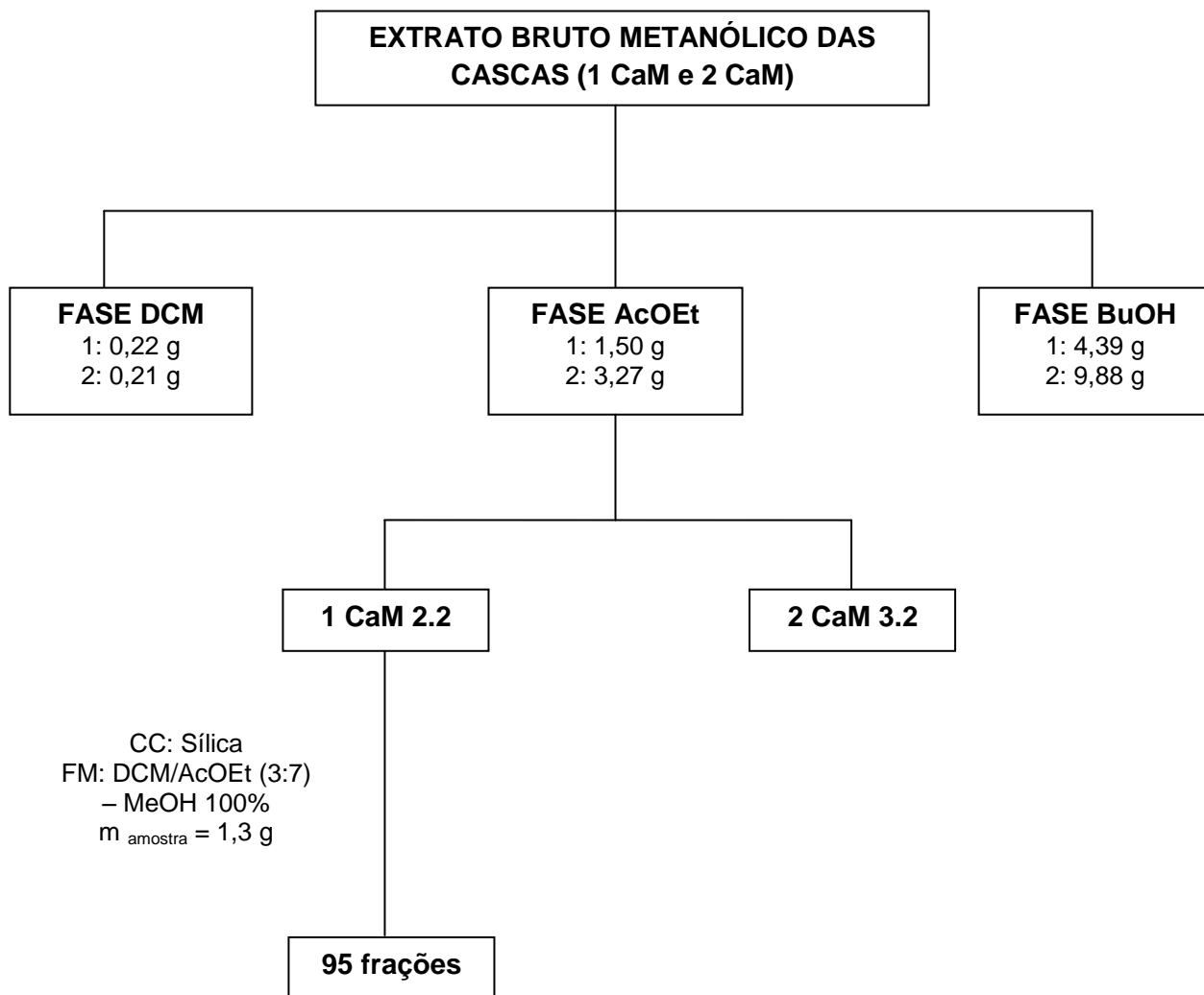


Figura 44: Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth – 1ª coleta.

5.3. Atividade Antioxidante

O ensaio quantitativo da atividade antioxidante utilizando o método com DPPH obteve os seguintes resultados:

Tabela 8 – Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos brutos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato testado	[AA]_{eq}	Equivalência
1 Casca DCM	0,701	7,260
2 Casca MeOH	4,480	1,122
1 Flor DCM	0,601	8,379
1 Flor MeOH	1,192	4,246
1 Folha DCM	0,133	38,275
1 Folha MeOH	2,360	2,123
1 Galho DCM	0,598	8,385
1 Galho MeOH	4,480	1,122
2 Casca DCM	0,693	7,233
2 Casca MeOH	3,628	1,381

O potencial antioxidante de *Andira retusa* está presente nos extratos mais polares das cascas (de ambas coletas), das folhas e dos galhos, pois quanto mais próximo de 1 o valor da equivalência, maior o potencial antioxidante do extrato.

Essa maior atividade nos extratos polares pode ser em decorrência da maior concentração de substâncias fenólicas nos extratos metanólicos, já que as análises em CCDC reveladas com FeCl₃ indicaram a presença desse grupo de substâncias (figura 14). Porém, os extratos diclorometânicos, apesar de apresentarem reatividade frente a esse revelador (figura 13), não apresentaram grandes atividades neste ensaio quantitativo utilizando o DPPH.

A tabela 8 mostra os resultados para o ensaio antioxidante quantitativo das fases das partições dos extratos brutos das cascas (que é a parte da planta mais utilizada popularmente).

Tabela 9 – Resultados dos testes de atividade antioxidante das fases das partições dos extratos brutos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato testado	Fase	[AA]_{eq}	Equivalência
1/2 Casca DCM	DCM	1,167	4,288
1/2 Casca DCM	AcOEt	2,176	2,306
1 Casca MeOH	DCM	0,294	18,650
1 Casca MeOH	AcOEt	3,832	1,307
1 Casca MeOH	BuOH	5,534	0,904
2 Casca MeOH	DCM	0,513	9,777
2 Casca MeOH	AcOEt	4,777	1,057
2 Casca MeOH	BuOH	4,058	1,233

A tabela 9 mostra os resultados para o ensaio antioxidante quantitativo das fases das partições dos extratos brutos das cascas (que é a parte da planta mais utilizada popularmente). Percebe-se que o potencial antioxidante de *Andira retusa* está presente nas fases de polaridade intermediária (fase acetato de etila) e nas mais polares (fase butanólica) das cascas de ambas as coletas, pois os valores de equivalência foram mais próximos de um.

Essa maior atividade nas fases de polaridade intermediária e mais polares pode ser em decorrência da maior concentração de substâncias fenólicas nas mesmas, corroborando os resultados anteriores com os extratos brutos.

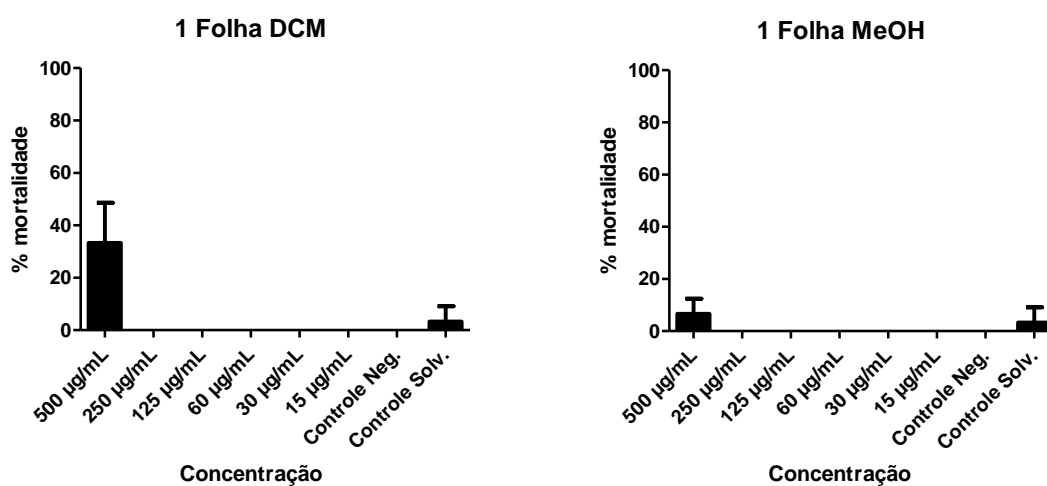
5.4. Ensaios Biológicos

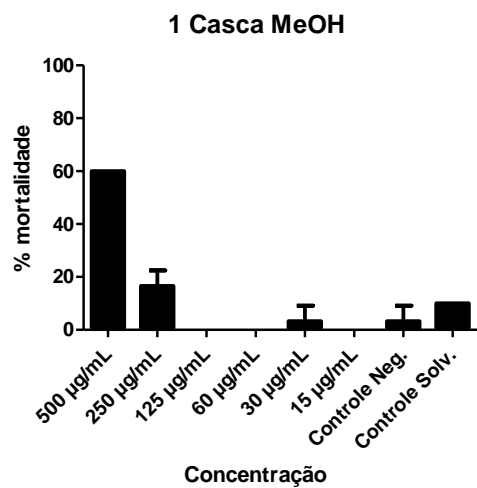
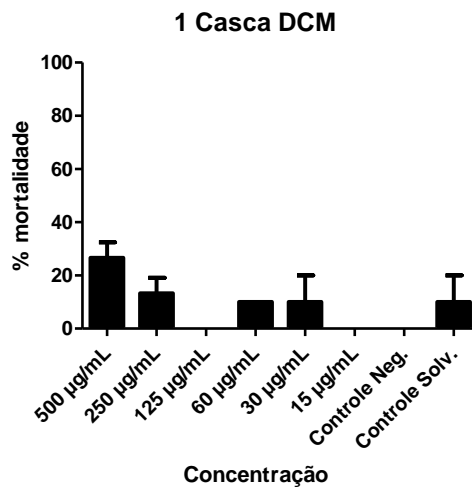
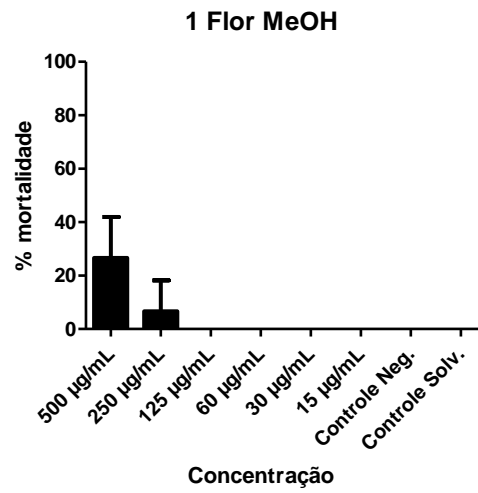
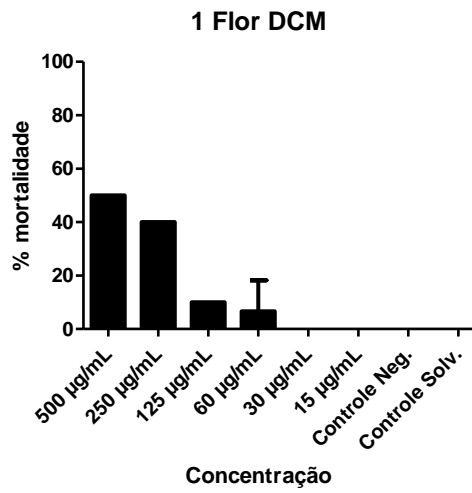
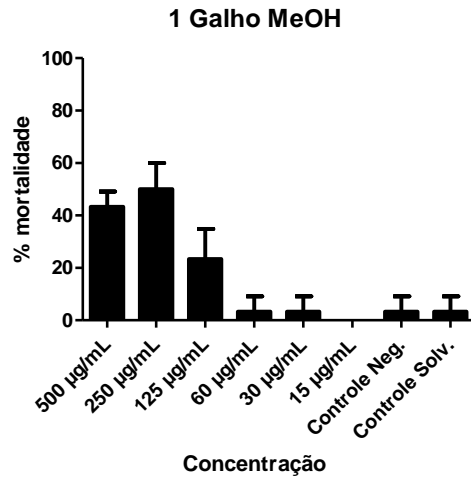
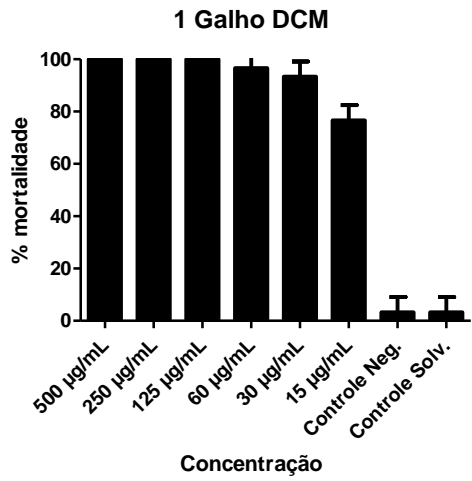
5.4.1. Atividade Citotóxica

5.4.1.1. *Artemia salina*

Os testes para verificar a possível atividade citotóxica sobre o microcrustáceo *Artemia salina* foram realizados em triplicata de cada uma das amostras testadas, nas concentrações finais de 500, 250, 125, 60, 30 e 15 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas, e repetidos pelo menos uma vez a fim de confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Os dados apresentados na forma de gráficos (abaixo) representam média de uma triplicata e o erro padrão (figura 44). É admitida nesse teste uma tolerância de até 10% de mortalidade nos controles negativo e do solvente. E são considerados: baixa atividade (0 a 20 % de mortalidade); média atividade (20 a 40%) e alta atividade (40 a 100%).





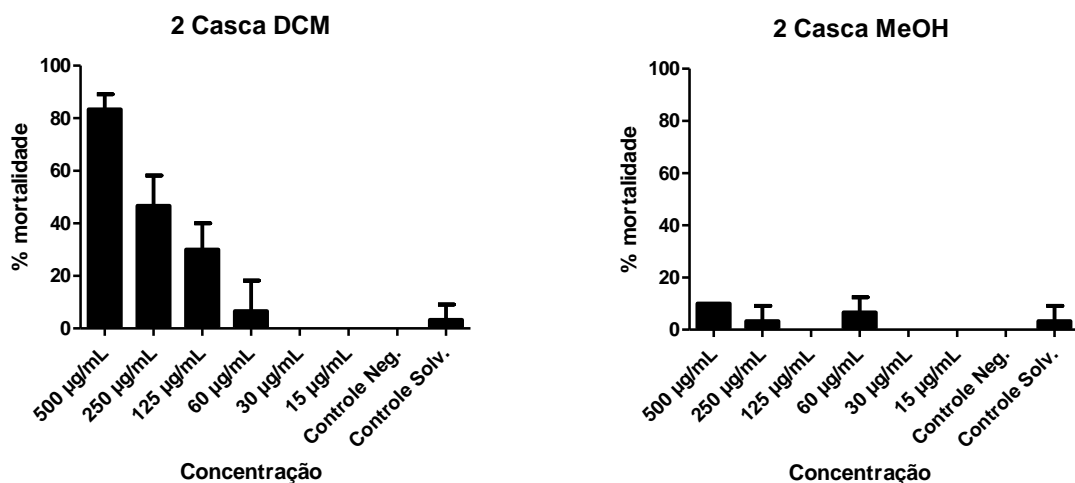
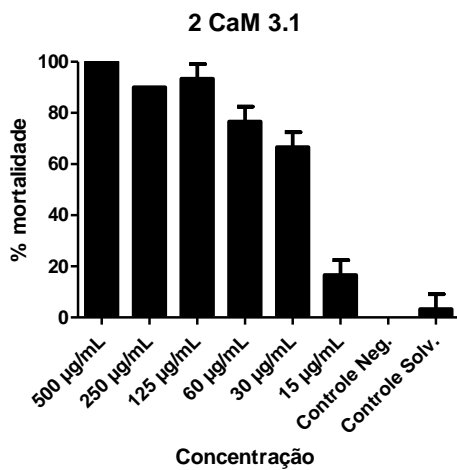
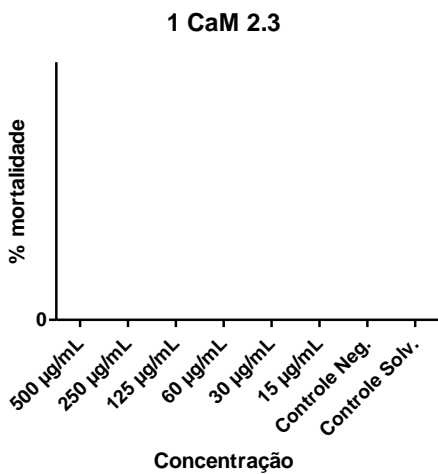
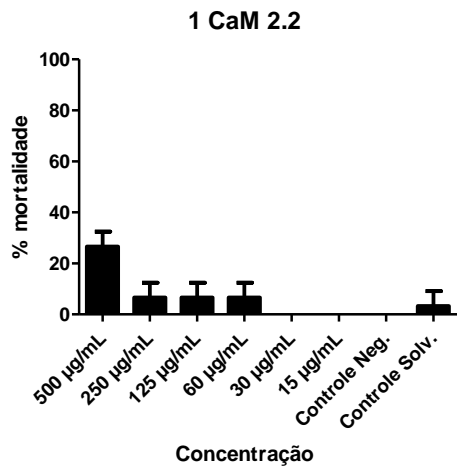
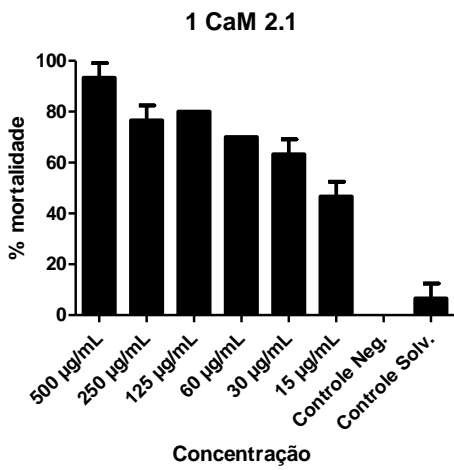
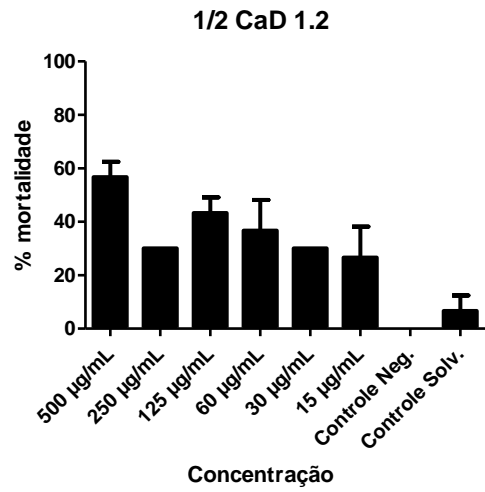
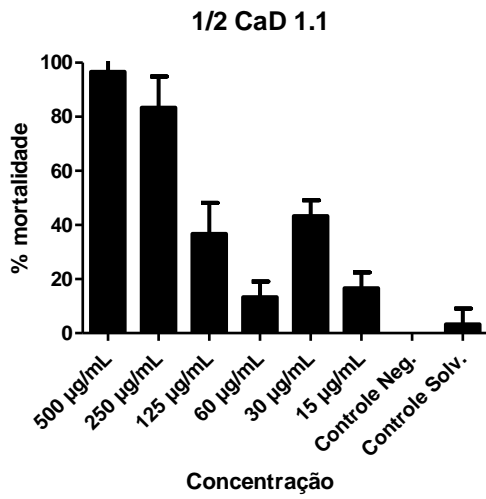


Figura 45: Porcentagem de mortalidade dos extratos de *Andira retusa* frente à *Artemia salina*, em diferentes concentrações.

Foram considerados de baixa atividade os extratos: 1 Folha MeOH e 2 Casca MeOH (todas as concentrações), 1 Galho MeOH e 2 Casca DCM (a partir de 60 µg/mL), 1 Flor DCM (a partir de 125 µg/mL), 1 Flor MeOH, 1 Casca DCM e 1 Casca MeOH (a partir de 250 µg/mL).

Foram considerados de média atividade os extratos: 1 Folha DCM, 1 Flor MeOH e 1 Casca DCM (500 µg/mL), 1 Flor DCM (250 µg/mL), e 1 Galho MeOH e 2 Casca DCM (125 µg/mL).

Foram considerados de alta atividade os extratos: 1 Galho DCM (todas as concentrações), 1 Flor DCM, 1 Casca MeOH e 2 Casca DCM (500 µg/mL) e 1 Galho MeOH (250 µg/mL). Este foi o único caso encontrado na nossa análise onde uma concentração menor foi mais ativa que a concentração maior.



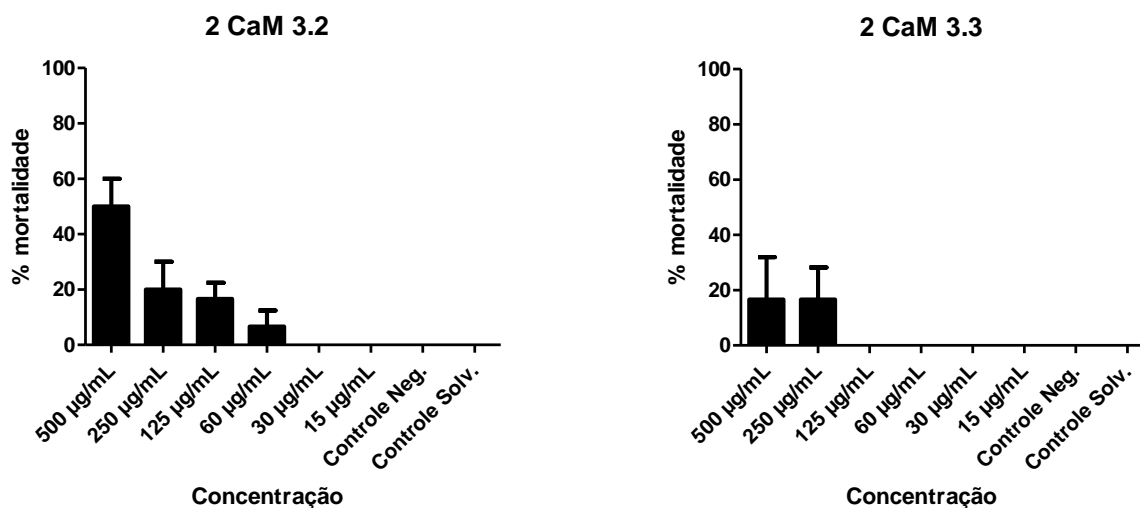


Figura 46: Porcentagem de mortalidade dos extratos de *Andira retusa* frente à *Artemia salina*, em diferentes concentrações.

Para as fases obtidas, resultados mostrados na figura 46 foram considerados de baixa atividade as fases: 1/2 CaD 1.1 (60 e 15 µg/mL), 1 CaM 2.2 e 2 CaM 3.2 (a partir de 250 µg/mL), 1 CaM 2.3 e 2 CaM 3.3 (todas as concentrações).

Foram consideradas de média atividade as fases: 1/2 CaD 1.2 (a partir de 250 µg/mL).

Foram consideradas de alta atividade as fases: 1/2 CaD 1.1 (500, 250, 125 e 30 µg/mL), 1/2 CaD 1.2 e 2 CaM 3.2 (500 µg/mL), 1 CaM 2.1 (todas as concentrações) e 2 CaM 3.1 (500 a 30 µg/mL).

Alguns dos extratos e fases apresentam uma constância maior na atividade tóxica frente à *Artemia salina*, como 1 Galho DCM e 2 CaM 3.1. Nestes casos, mesmo realizando diversas diluições, a atividade permaneceu alta.

Na maioria dos extratos e das fases testadas a resposta foi diretamente proporcional à concentração. No entanto, os extratos 1 Galho MeOH (onde a concentração de 250 µg/mL foi maior que a de 500 µg/mL) e 2 Casca MeOH (a concentração de 60 µg/mL foi maior que a de 250 e 125 µg/mL), assim como a fase 1/2 CaD 1.1 (a concentração de 30 µg/mL maior que a 60 e 125 µg/mL).

Destaca-se que duas das fases obtidas (2 CaM 3.1 e 2 CaM 3.2) que mostraram alta atividade frente *Artemia salina* provieram de um dos extratos que apresentou baixa atividade (2 Casca MeOH). Isto mostra a importância de testar todas as fases mesmo aquelas que vieram de extratos inativos ou com baixa atividade.

5.4.1.2. Cultivo Celular Animal

Os testes para verificar a possível atividade citotóxica sobre fibroblastos L929 foram realizados em quadruplicata de cada uma das amostras testadas, nas concentrações finais de 100, 10 e 1 µg/mL por 24 horas, e repetidos pelo menos uma vez a fim de confirmar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Dessa maneira, descarta-se a possibilidade de erro experimental.

As amostras testadas nesse experimento foram os extratos diclorometânicos e metanólicos das cascas de ambas as coletas e o extrato diclorometânico das flores e todas as fases das partições dos extratos das cascas de ambas as coletas. Foram selecionadas essas amostras, pois estas estavam em fracionamento ou haviam sido fracionadas previamente. Abaixo, na figura 45, seguem os esquemas das placas de 96 poços, e a disposição das amostras utilizadas nos experimentos:

***	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 Casca MeOH			2 Casca DCM			2 Casca MeOH			Controle Negativo		
B												
C										Controle Solvente		
D												
E	1 Flor DCM			1/2 CaD 1.1			1/2 CaD 1.2			Controle Positivo		
F												
G										Zero do equipamento		
H												
concentração	100	10	1	100	10	1	100	10	1	µg/mL		

***	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 CaM 2.1			1 CaM 2.2			1 CaM 2.3			Controle Negativo		
B												
C										Controle Solvente		
D												
E	2 CaD 3.1			2 CaD 3.2			2 CaD 3.3			Controle Positivo		
F												
G										Zero do equipamento		
H												
concentração	100	10	1	100	10	1	100	10	1	µg/mL		

Figura 47: Esquemas das placas de 96 poços utilizadas nos experimentos e demonstração da disposição das amostras testadas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

Os dados apresentados na forma de gráficos (abaixo) representam média de uma quadruplicata e o erro padrão ($*p < 0,05$ comparado com o controle negativo/ANOVA). E as amostras em suas diferentes concentrações foram comparadas com o controle negativo pelo teste de Tukey.

Como unidade de medida foi usada densidade ótica ou absorvância após a exposição dos fibroblastos a cada um dos extratos, nos diferentes tempos, e avaliada a redução do MTT (sal tetrazolium) em sal de formazan de coloração azulada, que é proporcional ao número de células viáveis presentes. As leituras estão mostradas nos gráficos a seguir:

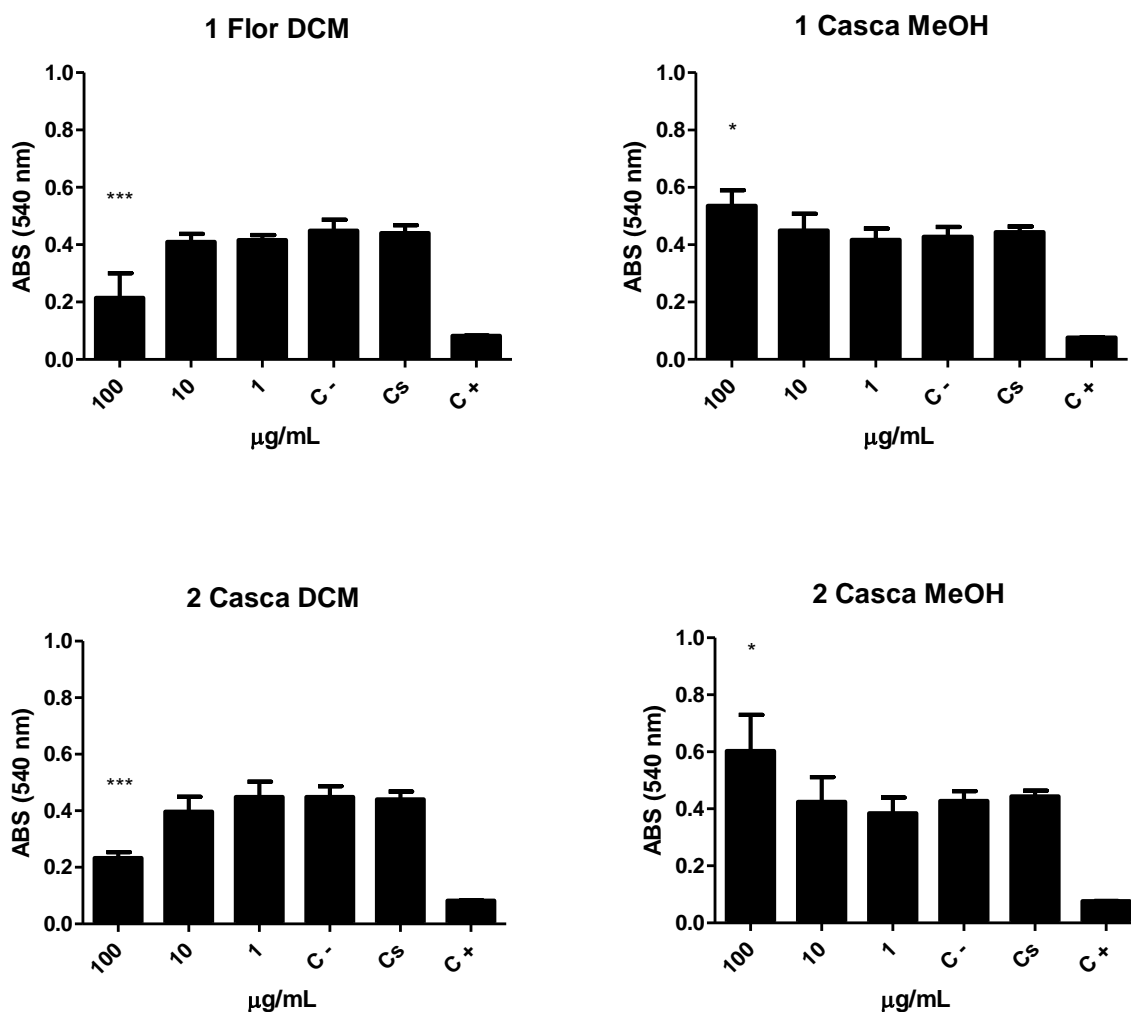


Figura 48: Absorvância em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth. O controle negativo (C-): 200 μL de meio D-MEM, o controle do solvente (Cs): 180 μL de meio D-MEM + 20 μL de solução diluente e o controle positivo (C+): Triton X-100 1%

Dos quatro extratos testados sobre as células L929 (figura 48), dois foram ativos, 1 Flor DCM e 2 Casca DCM, com resultados significativos (ANOVA/Teste de Tukey) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Esses extratos apresentaram características de redutores da atividade mitocondrial, e a toxicidade pode ser observada inclusive através de mudanças na conformação das células após a exposição ao tratamento (figura 49).

Já os extratos metanólicos das cascas de ambas as coletas aumentaram a atividade mitocondrial na concentração de 100 µg/mL, sendo este constatado pela transformação do sal tetrazolium (MTT) em sal de formazan (de coloração azul), mediada pela enzima succinato desidrogenase. Como não é possível o crescimento celular, pois durante os experimentos as células não serem suplementadas com fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino, suspeita-se que o extrato atue como indutor mitocondrial.

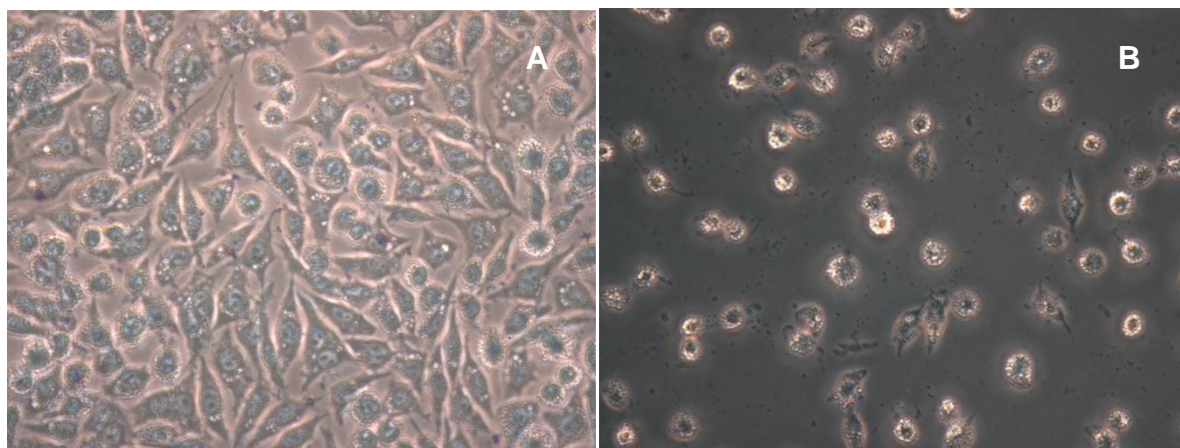


Figura 49: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com os extratos 2 Casca MeOH (A) e 2 Casca DCM (B)

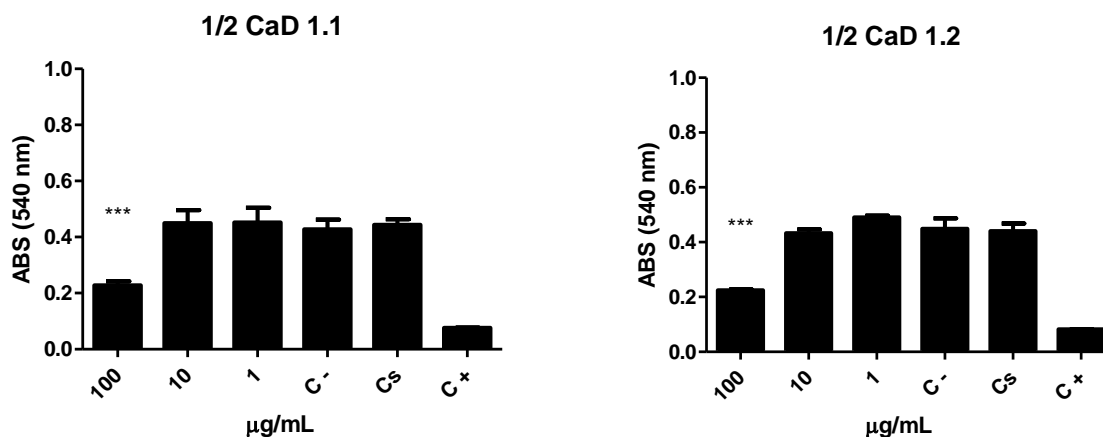


Figura 50: Absorbância em função da concentração (µg/mL) das fases diclorometânica (1/2 CaD 1.1) e acetato de etila (1/2 CaD 1.2) dos extratos diclorometânicos das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

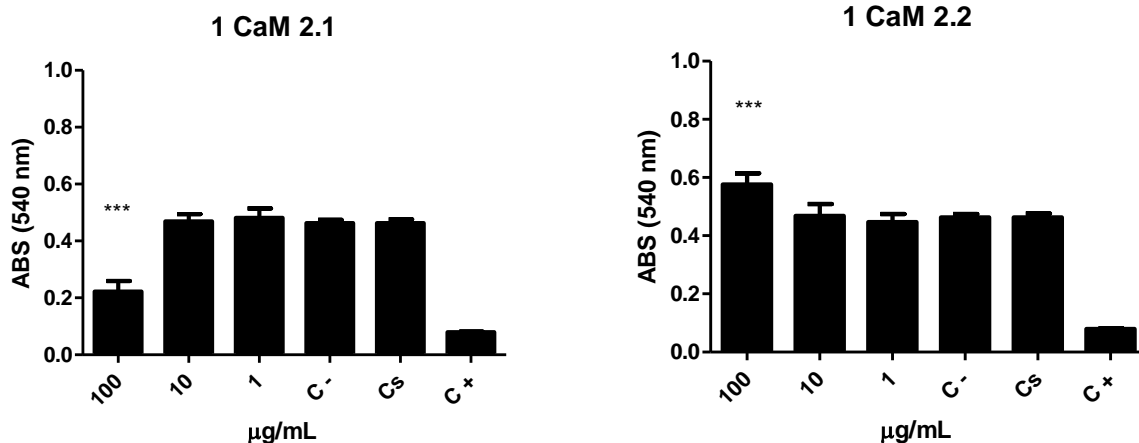


Figura 51: Absorbância em função da concentração (µg/mL) das fases diclorometânica (1 CaM 2.1) e acetato de etila (1 CaM 2.2) do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

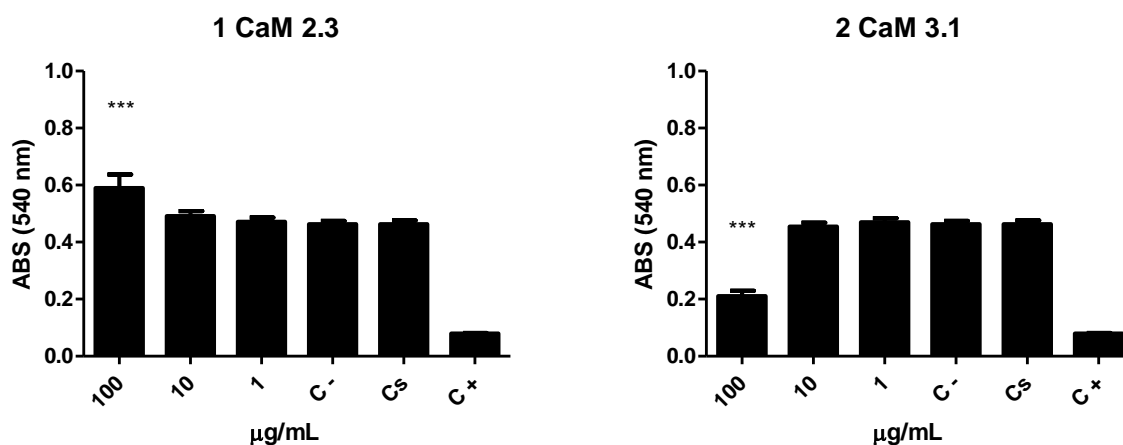


Figura 52: Absorbância em função da concentração (µg/mL) das fases butanólica (1 CaM 2.3) e diclorometânica (2 CaM 3.1) do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

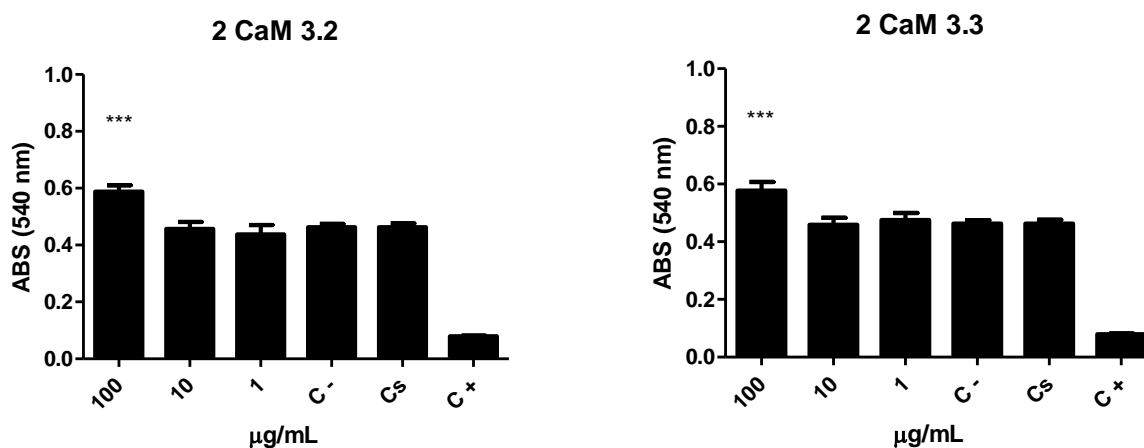


Figura 53: Absorbância em função da concentração (µg/mL) das fases acetato de etila (2 CaM 3.2) e butanólica (2 CaM 3.3) do extrato metanólico das cascas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth.

Quando as células L929 foram submetidas ao tratamento com as oito fases das partições dos extratos diclorometânicos e metanólicos das cascas de ambas as coletas (1/2 CaD 1.1, 1/2 CaD 1.2, 1 CaM 2.1, 1 CaM 2.2, 1 CaM 2.3, 2 CaM 3.1, 2 CaM 3.2 e 2 CaM 3.3), observa-se que mesmo extratos inativos podem ter fases ativas.

As fases diclorometânicas de todas as partições (1/2 CaD 1.1, 1 CaM 2.1 e 2 CaM 3.1) e a fase acetato de etila dos extratos diclorometânicos (1/2 CaD 1.2) apresentaram características de redutores da atividade mitocondrial, ou seja, foram tóxicos para as células na concentração de 100 µg/mL (figuras 50 a 53), sendo possível inclusive observar mudanças na conformação das células após a exposição ao tratamento (figura 54). Destaca-se que dos dois extratos originalmente inativos (1 Casca MeOH e 2 Casca MeOH), suas fases diclorometânicas (1 CaM2.1, 2 CaM 3.1) foram tóxicas para as células L929, com valores próximos ao controle positivo. Estes resultados ressaltam a importância de estudar mesmo extratos originalmente inativos, pois a mistura complexa de substâncias no extrato original pode mascarar uma atividade promissora, através da sinergia de duas ou mais substâncias, que só será observada com o desenvolvimento dos fracionamentos, com a purificação das substâncias que constituem esses extratos.

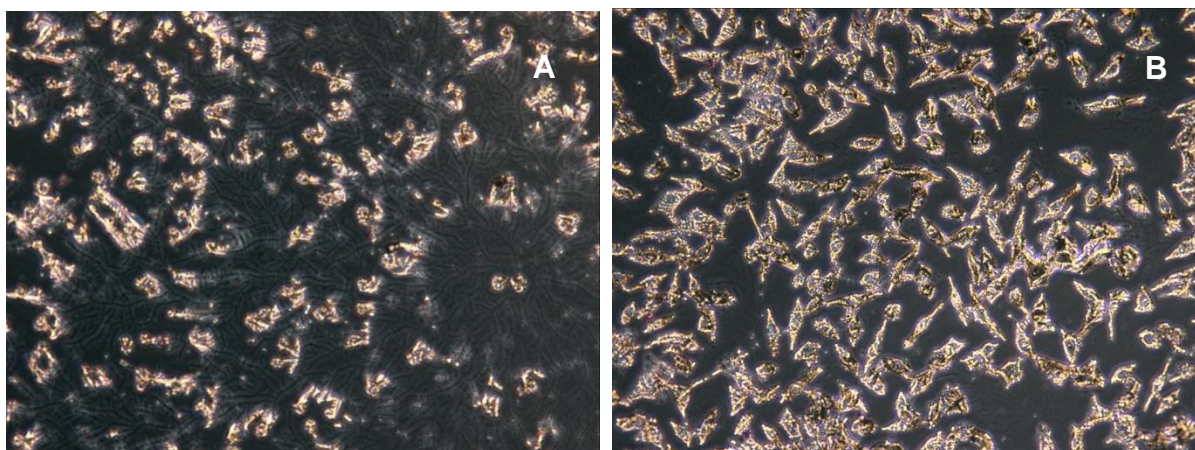


Figura 54: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com as fases diclorometânica dos extratos diclorometânicos das cascas (1/2 CaD 1.1) - **(A)** e acetato de etila dos extratos diclorometânicos das cascas (1/2 CaD 1.2) - **(B)**

Já as fases acetato de etila e butanólicas dos extratos metanólicos das cascas de ambas as coletas (1 CaM 2.2, 1 CaM 2.3, 2 CaM 3.2 e 2 CaM 3.3) revelaram um aumento da atividade mitocondrial também na concentração de 100

$\mu\text{g/mL}$, agindo também como indutor mitocondrial, assim como os extratos que deram origem a essas fases. O que pode ser observado na figura 55:

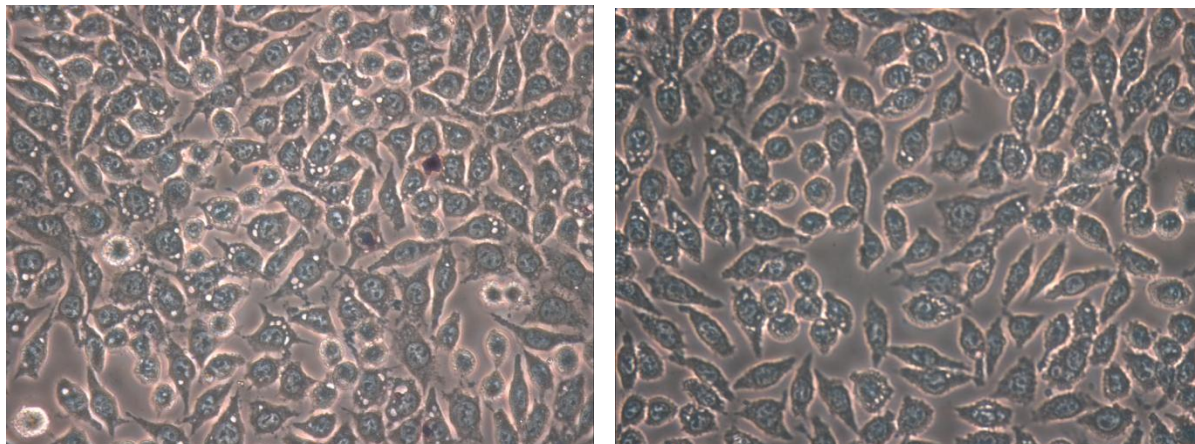


Figura 55: Fotos de células L929 submetidas ao tratamento com as fases acetato de etila do extrato metanólico das cascas (1 CaM 2.2) - **(A)** e butanólica do extrato metanólico das cascas (2 CaM 2.3) - **(B)**

5.4.2. Atividade Antimicrobiana

Foram realizados os testes pela metodologia de cavidade-placa com todos os extratos contra *Aeromonas hydrophyla*, uma bactéria patogênica para peixes e humanos, e que influencia de forma determinante a economia da região. Os resultados estão apresentados na tabela 10 indicam que todos os extratos mostraram uma baixa atividade ou sem atividade contra *Aeromonas hydrophyla*.

Tabela 10 – Resultados dos testes de atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophyla* dos extratos brutos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato	Halo de Inibição (mm)	Intensidade da Atividade
1 Folha DCM	-	Sem atividade
1 Flor DCM	1	Baixa
1 Galho DCM	2	Baixa
1 Casca DCM	1	Baixa
1 Folha MeOH	2	Baixa
1 Flor MeOH	2	Baixa
1 Galho MeOH	2	Baixa
1 Casca MeOH	4	Baixa
2 Casca DCM	1	Baixa
2 Casca MeOH	3	Baixa

Com o intuito de investigar outras atividades antimicrobianas dos extratos e fases, estes foram testados pela metodologia de microdiluição os micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As tabelas 11 e 12 mostram os resultados obtidos pelos extratos brutos e pelas fases, respectivamente.

Tabela 11 – Resultados dos testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) dos extratos brutos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato	MO	Concentrações dos Extratos de <i>Andira retusa</i> (µg/mL)						
		1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6
1 Casca DCM	Sa	-	-	-	-	-	-	-
	Pa	-/+	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
1 Casca MeOH	Sa	-	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
1 Galho DCM	Sa	+	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
1 Galho MeOH	Sa	-	-	-	-	-	-	-
	Pa	-/+	-/+	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
1 Folha DCM	Sa	-/+	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
1 Folha MeOH	Sa	+	+	-/+	-	-	-	-
	Pa	+	-/+	-	-	-	-	-
	Ec	+	-	-	-	-	-	-

Continuação Tabela 11 – Resultados dos testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) dos extratos brutos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato	MO	Concentrações dos Extratos de <i>Andira retusa</i> (µg/mL)						
		1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6
1 Flor DCM	Sa	+	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	+	-	-	-	-	-	-
1 Flor MeOH	Sa	+	-/+	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-/+	-	-	-	-	-	-
2 Casca DCM	Sa	-	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
2 Casca MeOH	Sa	-	-	-	-	-	-	-
	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-

Dos extratos testados, os que apresentaram atividade antimicrobiana foram: 1 Casca MeOH (1000 µg/mL) e 1 Folha DCM (1000 e 500 µg/mL) contra *Staphylococcus aureus*, 1 Folha MeOH (1000 µg/mL) contra os três microorganismos e 1 Flor DCM (1000 µg/mL) contra *S. aureus* e *Escherichia coli*. Porém, a concentração mínima inibitória ficou acima de 1000 µg/mL para todos os extratos que apresentaram atividade.

Tabela 12 – Resultados dos testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) das fases de *Andira retusa* (Poir.) Kunth

Extrato	MO	Concentrações dos Extratos de <i>Andira retusa</i> (µg/mL)						
		1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6
	Sa	-/+	-	-	-	-	-	-
1/2 CaD 1.1	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
1/2 CaD 1.2	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-/+	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
1 CaM 2.1	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
1 CaM 2.2	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
1 CaM 2.3	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	+	-	-	-	-	-	-
2 CaM 3.1	Pa	-/+	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
2 CaM 3.2	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-
	Sa	-	-	-	-	-	-	-
2 CaM 3.3	Pa	-	-	-	-	-	-	-
	Ec	-	-	-	-	-	-	-

Das fases testadas frente a esses micro-organismos, somente a fase 1 CaM 2.3 apresentou atividade antimicrobiana na maior concentração testada, e sobre um único dos micro-organismos teste (*Staphylococcus aureus*). A concentração mínima inibitória ficou acima de 1000 µg/mL). O extrato-mãe desta fase também não havia apresentado atividade, o que confirma a importância de testar mesmo fases de extratos inativos.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho relata o estudo fitoquímico e as avaliações biológicas dos extratos e fases da espécie *Andira retusa* coletada em duas épocas distintas, quanto às atividades: antioxidante, citotóxica e antimicrobiana.

Do fracionamento cromatográfico foi possível isolar o lupeol e a mistura de β -sitosterol e estigmasterol da fase diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas obtidos da reunião de ambas as coletas.

O extrato diclorometânico das flores e as fases diclorometânica e acetato de etila do extrato diclorometânico das cascas e a fase acetato de etila do extrato metanólico das cascas foram fracionadas, de ambas as coletas. Foram observados sinais da presença de terpenos (possivelmente esteroides), compostos aromáticos (possivelmente flavonoides e chalconas) e grupos aldeídos, mas não foi possível isolar as substâncias, a tempo da defesa desta dissertação, para realizar a identificação estrutural.

Os extratos metanólicos das cascas, das folhas e dos galhos, assim como as fases de polaridade intermediária (acetato de etila) e mais polares (butanólicas) dos extratos diclorometânico e metanólicos das cascas, apresentaram um maior potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH.

Os extratos: diclorometânico dos galhos (1^a coleta) (todas as concentrações), diclorometânico das flores (1^a coleta), metanólico das cascas (1^a coleta), diclorometânicos das cascas (2^a coleta) e metanólico dos galhos (1^a coleta) (na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram alta atividade no teste de toxicidade frente à *Artemia salina*. Este último foi o único caso encontrado nas análises realizadas onde uma concentração menor foi mais ativa que a concentração maior. Foram consideradas de alta atividade as fases:

- diclorometânica dos extratos diclorometânicos das cascas reunidos da 1^a e 2^a coleta (1/2 CaD 1.1);
- acetato de etila dos extratos diclorometânicos das cascas reunidos da 1^a e 2^a coleta (1/2 CaD 1.2);
- diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas da 1^a coleta (1 CaM 2.1);
- diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas da 2^a coleta (2 CaM 3.1);
- acetato de etila dos extratos metanólicos das cascas da 2^a coleta (2 CaM 3.2);

É interessante notar que alguns dos extratos e fases apresentaram uma constância maior na atividade tóxica frente à *Artemia salina*, como o extrato

diclorometânico dos galhos da 1^a coleta e fase diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas da 2^a coleta. Nestes casos, a atividade permaneceu alta mesmo depois de realizar diversas diluições. Na maioria dos extratos e das fases testadas a resposta foi diretamente proporcional à concentração, o que é de se esperar. No entanto, dois extratos e uma fase se destacaram por suas atividades em concentrações menores. Foram eles: extrato metanólico dos galhos da 1^a coleta (onde a concentração de 250 µg/mL foi mais ativa que a de 500 µg/mL), extrato metanólico das cascas da 2^a coleta (a concentração de 60 µg/mL foi mais ativa que as de 250 e 125 µg/mL), e também a fase diclorometânica dos extratos diclorometânicos das cascas reunidos da 1^a e 2^a coleta (1/2 CaD 1.1) (concentração de 30 µg/mL mais ativa que as 125 e 60 µg/mL). Outro ponto que deve ser destacado é que duas das fases obtidas - diclorometânica dos extratos metanólicos das cascas da 2^a coleta (2 CaM 3.1) e a acetato de etila dos extratos metanólicos das cascas da 2^a coleta (2 CaM 3.2) - que mostraram alta atividade frente *Artemia salina* provieram de um dos extratos que apresentou baixa atividade (extrato metanólico das cascas da 2^a coleta). Isto mostra a importância de testar todas as fases mesmo aquelas que vieram de extratos inativos ou com baixa atividade.

Dos quatro extratos testados sobre as células L929, dois foram ativos, extrato diclorometânico das flores da 1^a coleta e extrato diclorometânico das cascas da 2^a coleta, com resultados significativos (ANOVA/Teste de Tukey) na concentração de 100 µg/mL. Esses extratos apresentaram características de redutores da atividade mitocondrial. Já os extratos metanólicos das cascas de ambas as coletas aumentaram a atividade mitocondrial na concentração de 100 µg/mL, sendo este constatado pela transformação do sal tetrazolium (MTT) em sal de formazan (de coloração azul), mediada pela enzima succinato desidrogenase.

As fases diclorometânicas de todas as partições (dos extratos diclorometânicos das cascas reunidos da 1^a e 2^a coleta (1/2 CaD 1.1), do extrato metanólico das cascas da 1^a coleta (1 CaM 2.1) e do extrato metanólico das cascas da 2^a coleta (2 CaM 3.1) e a fase acetato de etila dos extratos diclorometânicos das cascas reunidos da 1^a e 2^a coleta (1/2 CaD 1.2) apresentaram características de redutores da atividade mitocondrial, ou seja, foram tóxicos para as células na concentração de 100 µg/mL. É interessante destacar que dos dois extratos originalmente inativos (extrato metanólico das cascas da 1^a coleta e extrato metanólico das cascas da 2^a coleta), as suas fases diclorometânicas (do extrato

metanólico das cascas da 1ª coleta (1 CaM 2.1) e do extrato metanólico das cascas da 2ª coleta (2 CaM 3.1)) foram tóxicas para as células L929, com valores próximos ao controle positivo. Estes resultados mostram a importância de trabalhar mesmo com extratos originalmente inativos, pois a mistura complexa de substâncias no extrato original pode mascarar uma atividade promissora que só será observada com o desenvolvimento dos fracionamentos.

Já as fases acetato de etila e butanólicas dos extratos metanólicos das cascas de ambas as coletas (1 CaM 2.2, 1 CaM 2.3, 2 CaM 3.2 e 2 CaM 3.3) revelaram um aumento da atividade mitocondrial também na concentração de 100 µg/mL, agindo também como indutor mitocondrial, assim como os extratos que deram origem às mesmas.

Todos os extratos apresentaram baixa atividade contra *Aeromonas hydrophila*. No entanto, frente a outros micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) houve inibição do crescimento dos mesmos. Dos extratos testados, os que apresentaram atividade antimicrobiana foram:

- sobre *Staphylococcus aureus*:

- extrato diclorometânico dos galhos da 1ª coleta (1000 µg/mL);
- extrato diclorometânico das flores da 1ª coleta (1000 µg/mL);
- extrato metanólico das flores da 1ª coleta (1000 µg/mL);
- extrato metanólico das folhas da 1ª coleta (1000 e 500 µg/mL);

- sobre *Escherichia coli*:

- extrato diclorometânico das flores da 1ª coleta (1000 µg/mL);
- extrato metanólico das folhas da 1ª coleta (1000 µg/mL);

- sobre *Pseudomonas aeruginosa*:

- extrato metanólico das folhas da 1ª coleta (1000 µg/mL);

A concentração mínima inibitória ficou acima de 1000 µg/mL para todos os extratos que apresentaram atividade. Das fases testadas frente a esses microrganismos, somente a fase diclorometânica do extrato metanólico das cascas da 2ª coleta (2 CaM 3.1) apresentou atividade antimicrobiana na maior concentração testada (1000 µg/mL), e sobre um único dos micro-organismos teste (*S. aureus*). O extrato-mãe também não havia apresentado atividade o que confirma a importância de testar mesmo fases de extratos.

7. REFERÊNCIAS

ACUÑA, G. L. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Revista Chilena de Infectología*, 20 (1): S7 - S10, 2003.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 74, p. 113 - 123, 2001.

ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. *Revista Parcerias Estratégicas*. 2001. Disponível em: <<http://ftp.mct.gov.br/CEE/revista/Parcerias12/01sarita>>.

ALBERTON, E.B. Análise fitoquímica e avaliação da toxicidade de *Vernonia scorpioides* (Lam.) pers. [Monografia] (Graduação em Farmácia) Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde – UNIVALI, Itajaí, 2002.

ALÉCIO, M. R.; 2007. Toxicidade do extrato de *Derris amazonica* KILLIP a adultos de *Ceratomyia arcuatus* OLIVIER, 1791 (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE). – Dissertação de mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais da Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

ALI-SHTAYED, M.S.A.; YAGHMOUR, R.M.-R.A.; FAIDI, Y.R.B.; SALEM, K.; AL-NURI, M.A.D. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 60, n. 3, p. 265 - 271, 1998.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA JR., A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 95, p. 367 - 373, 2000.

AMSHOFF, G. H. Papilionaceae. *In*: Pulle, Flora of Suriname, Amsterdam 2 (2): 1127, 1939.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological Activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96 (5): 723 - 728, July 2001.

AUGUSTO, E. F. P; OLIVEIRA, M. S. Processos com células animais. *In*: Biotecnologia Industrial, Processo Fermentativos e Enzimáticos, São Paulo, Editora Edgard Blucher LTDA., 3, 548, 570 - 571, 2001.

ASSELEIH, L.M.C.; HERNANDEZ, O.H.; SANCHEZ, J.R. Seasonal variation in the content of sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula* populations. *Phytochemistry* 29: 3095 - 3099, 1990.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, v. 74, p. 133 -137, 2001.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 66, n. 3, p. 335 - 338, 1999.

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). *Química Nova*. v. 32, n. 32, p. 1107-1109, 2009.

BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. v. 15, p. 561-571, 2001.

BARREIRO, E. Desenho de Fármacos a partir de produtos naturais. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: editora Argós. 523 p. 2001.

BARREIRO, E. & BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, 679 - 688, 2009.

BARROSO, G. M. Sistemáticas de Angiospermas do Brasil. v. 2. Imprensa Universitária: Viçosa, 337 p., 1991.

BEHERA, B.C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 776 - 784, 2008.

BENTHAM, G. Papilionaceae. *In*: Mart. Fl. Bras. 15 (1): 291-9. Monachii, 1862.

BHAKTA, T.; MUKHERJEE, P.K.; MUKHERJEE, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, S.C.; MAITY, T.K.; PAL, M.; SAHA, B.P. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 66: 277 - 282, 1999.

BORGES, M. H. & BRANDENBURGO, M. I. H.. Ação antipeçonhenta do extrato vegetal de *Casearia sylvestris*. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2003. Disponível em <<http://www.biotecnologia.com.br>>

BORGES, S. H.; IWANAGA, S.; DURIGAN, C. C.; PINHEIRO, M. R. Janelas para a biodiversidade no Parque Nacional do Jaú: uma estratégia para o estudo da biodiversidade na Amazônia. Manaus: Fundação Vitória Amazônica, 2004.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters Applied in Microbiology*. v. 31, p. 174 - 177, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v. 28, p. 25 - 30, 1995.

BRAS FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; ASSUMPCÃO, R. M. V. Chemistry of Brazilian Leguminosae. XXXIV Isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry* 10 (11), 2835 - 2836.

- BREEDER, 2006. Disponível em : <www.advancedaquarist.com/.../breeder.htm>.
- BROWN, P. D. & NGNENO, C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. *International Journal of Infectious Diseases*. v. 11, p. 220 - 225, 2003.
- BURKART, A. Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. Buenos Aires: Acme Agency, 590 p., 1943.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 283 - 291, 2005.
- CALIXTO, J. B. Estudo Farmacológico Pré-Clínico de Plantas Medicinais. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.
- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica: Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.
- CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I.; NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, v. 91, p. 113 - 121, 2005.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro. 1: 118 - 121, 1926.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.
- COUTINHO, H. D. M., BEZERRA, D. A. C., LÔBO, K., BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Revista Conceitos*, v. 6, p. 77 - 85, 2004.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents . *Clinical Microbiology Reviews*. v. 12, n. 4, p. 564 - 582, 1999.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York Bot. Gdn., Columbia University Press, New York, 1262p., 1981.
- CUNHA, A. P; Farmacognosia e Fitoquímica. Editora Fundação Caloust Gulbenkian, 1ª ed., Lisboa, 2005.
- CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; OBDULIO, G. M.; AUER, C. G.; CÔCCO, L. C.; LOPES, A. R.; YAMAMOTO, C. I.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. *Química Nova*, v. 29, p. 746 - 749, 2006.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA JÚNIOR, O. L. P.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). *Acta Amazonica*, v. 39, n. 1, p. 181-186, 2009.

DAPKEVICIUS, A., et al. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food Agriculture*. v. 77. 1998.

DE LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e Carotenóides Totais em Pitanga. *Scientia Agricola*. v. 59, n. 3, p. 447 - 450, 2002.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2002.

DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W.; BAKER, P. M.; GILBERT, B. Prophylaxis of Schistosomiaris. Diterpenes from *Pterodon pubescens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 44 (1), p. 45 - 49, 1972.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 305 - 311, 2005.

DUCKE, A. As Leguminosas da Amazônia Brasileira. 2. ed. Belém: Bol. Téc. Inst. Agr. Norte. 18: 200 - 202, 1949.

DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. Introduction and overview. *In: D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. (Ed.). Toxic substances in crop plants*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 1 - 20, 1991.

ELBEIN, A. D.; MICHELL, M.; SANFORD, B. A.; FELLOWS, L. E.; EVANS, S. V. The Pyrrolidine Alkaloid, 2, 5-Dihydroxymethyl-3, 4-dihydroxypyrrolidine, Inhibits Glycoprotein Processing. *J. Biol. Chem.* v. 259, n. 20, p. 12409-12413, 1984.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo : Manole, 2001.

ENGLER, A. Syllabus der Pflanzenfamilien. By H. Melchior, Berlin, Gebrüder Borntraeger, v. 2, p.193 - 242, 1964.

FASCIO, M.; MORS, W.; GILBERT, B.; MAHAJAN, M. B.; MONTEIRO, M. B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. Diterpenenoid Furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry*. 15, p. 201 - 203, 1975.

FETROW, C.W.; ÁVILA, J.R. Manual de Medicina Alternativa para o Profissional. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

FERNANDES JÚNIOR, A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. v. 1, p. 63 - 69, 1995.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C.A.M.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. v. 3, p. 287 - 294, 1997.

FERNANDES JÚNIOR; LEOMIL, L.; FERNANDES, A.A.H.; SFORCIN, J.M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. v. 7, p. 173 - 182, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.C.; CUNHA, M.L.R.S. Anti-*Staphylococcus aureus* activity of bee propolis extracts prepared with different ethanol concentrations. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 24, p. 147 - 152, 2003.

FERNANDES JÚNIOR, A., et al. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 100, n. 5, p. 563 - 566, 2005.

FRAGA FILHO, C. Radicais Livres: vilões ainda em estudo. *Ciência Hoje*, v.27, p. 60 - 62, 2003.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499 - 525, 2001.

FREITAS, P. C. D. Avaliação "in vitro" da atividade antioxidantes de plantas medicinais brasileiras da família Piperaceae. São Paulo: USP, 2000. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo, 2000.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. UK: Churchill Livingstone, 2004.

YOUNGSON, R. *Como combater os Radicais Livres*. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda, p. X - XIII. 1996.

GALIRA, E.; GOTTLIEB, O. R. Chemistry of Brazilian Leguminosae. Isoflavones from *Pterodon appariciori*. *Phytochemistry*. 13 (11), p. 2593 - 2595, 1974.

GAMA, J. J. T. Efeito do processo de obtenção do catchup sobre seus compostos antioxidantes, capacidade seqüestrante do radical DPPH e cor. 2008, 169f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2008.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J.A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2042 - 2046, 2008.

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

GONZÁLES, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*. v. 24 p. 59 - 61. 2007.

GRAYER, R. J.; KOKUBUM, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*. v. 56, p. 253 - 263, 2001.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. Ed. p.13 - 26, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTTMAN, K.; *Phytochemistry*, 30, p. 3864. 1991.

HARBORNE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press: London, 621 p., 1971.

HARBORNE, J.B. *The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants*. Biochemical Systematics and Ecology, 1999.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. UK: Churchill Livingstone, 2004.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67–202, 2002.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

HEYWOOD, V. H. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press: New York, 335 p., 1993.

HU, J. M.; LAVIN, M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; SANDERSON, M. J. Phylogenetic Systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on Chloroplast trnK/matK Sequences and its Implications for Evolutionary Patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany*. 87, p. 418 - 430, 2000.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 1.841 - 1.856, 2005.

HUTCHINSON, J. *The genera of flowering plants (Angiospermae)*, v. 1. – Clarendon Press: Oxford, 1967.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 12ª ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JUBELT, B.; LIPTON, H. L. Enterovirus infections, *In: Handbook for Clinical Neurology*, 12: Viral Disease, R. R. McKendall, p. 308, 1989.

KÄHKÖNEN, M.P *et al.* Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 47, p. 3954 - 3962, 1999.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *J. Ethnopharmacol.* v.73, p. 131 - 135, 2000.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Andinermals A - C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. *Phytochemistry*. v. 58, p. 769 – 774, 2001.

KIM, B. J.; KIM, J. H.; KIM, H. P.; HEO, M. Y. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmestic Science*, v. 19, n.6, p. 299 - 307, 1997.

KOYSOMBOON, S.; VAN ALTENA, I.; KATO, S, CHANTRAPROMMA, K. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1034–1040, 2006.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, p. 135 - 142, 2002.

LEWIS, G. P.; OWEN, P. E. Legumes of the Ilha de Maracá. Royal Botanic Gardens, Kew, 95 p., 1989.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew. 577p., 2005.

LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C. M. D.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A. L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Short communication. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 63, p. 253 - 263, 1998.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS A. C.; HENZEL, A.; WITT N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão, (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, v. 2, p. 371 - 376, 2005.

LOMBARDO, M. KIYOTA, S. KANEKO, T.M.; Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2009.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. v.111: p. 1265 - 1270, 2003.

MAATTA-RIIHINEN, K. R.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 20, p. 6.178 - 6.187, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429 - 438, 2002.

MacRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N.; *Journal of Ethnopharmacology*. v. 22, p. 143, 1988.

MAHASNEH, A. M. A.; ADEL, M. A.; EL-OQLAH, A. A. B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 64, p. 271 - 276, 1999.

MAHJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. *Journal of the Chemical Society of Perkintrans*. v. 1, p. 520 - 525, 1973.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (Eds) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Ed. Argos: Chapecó, p. 502 - 523, 2001.

MALLAVAPURU, G. O. Contribution of medicinal plants to modern medicine. *Journal of Medicinal Plants in Modern Medicine*, v. 22, p. 572 - 578, 2001.

MARQUI, S. R. *et al.* Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova*. v. 31, n.4., 2008.

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

MATOS, N. F. O gênero *Andira* Lam. (Leguminosae:Papilionoideae) no Brasil. *Acta Amazonica*. v. 9, p. 241 - 266, 1979.

MATIUCCI, C. A. R. Atividades antioxidante "in vitro" em plantas com propriedades medicinais. Jundiaí: UFV, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.

McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. v. 32, p. 513 - 524, 1998.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J.; SMITH, D. L. Human Medicinal Agents from Plants. *In: Studies in Natural Products Chemistry*, v. 9, Ed. Atta-ur- Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 383 - 409, 1991.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J.; SMITH, D. L. Human Medicinal Agents from Plants. *In: Kinghorn, A. D. & Balandrin, M. F., eds., Symposium Series n. 534, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 112 - 137, 1993.*

MEGLITSCH, P. Zoologia de invertebrados. Madrid: Ediciones Pirâmide, 1986.

MELO, M. S. O. Antioxidantes Naturais da castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*), da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e fruto do dendezeiro (*Elais guineensis*, Jacq.) São Paulo: USP, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1989.

MENSOR, L. L. Avaliação da atividade antioxidante de plantas brasileiras. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAN, J. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, p. 31 - 34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, v. 123, 1956.

MITSUHASHI, J. *In: Invertebrate Cell System Applications*, CRC Press, 3 - 20, 1989.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. v. 24, n.1, p.105 - 111, 2001.

MOREIRA, A. V. B. Avaliação da atividade antioxidante de semente de mostarda (*Brassica alba*, L) I.- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. São Paulo: USP, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1999.

MOSADDIK, et. al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine* v. 11 p. 461 – 466, 2004.

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. Biodiversidade da Amazônia Online. <http://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/index.asp>. Acessado em: 12 de julho de 2011.

NOBRE, I. K. C. Atividade Antimicrobiana de Plantas Pertencentes ao gênero *Hyptis* Jacq coletadas no semi-árido baiano. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivadas no Brasil. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 331 - 334, 2003.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL-FILHO, V. IN: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. *Ciências Farmacéuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos*. Itajaí: UNIVALI, p.11 – 56, 2003.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 16, n. 4, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. Brasília – DF, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: Essencial Medicines Selection – Essencial Medicines List and WHO Model Formulary. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf>. Acessado em 26/10/2011.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Chromenes and prenylated benzoic-acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*. v.34, p. 813 – 818, 1993.

PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of 4 mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 39, p. 167 - 170, 1993.

PATHAK D.; PATHAK K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. *Fitoterapia*. v. 62, p. 371 - 389, 1991.

PAULO, M. Q. *et al.* Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v.36, p. 39 - 41, 1992.

PEARSON, D. A. *et al.* Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sciences*. v. 64, p. 1913 - 1920, 1999.

PENNINGTON, T.; LIMA, H. C. Two new species of *Andira* (Leguminosae) from Brazil and the influence of dispersal in determining their distributions. *Kew Bull.* v. 50, p. 557 - 566, 1995.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n.7, p. 1.035 - 1.042, 2000.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n.6, p. 1.539 - 1.545, 2004.

PRATES, M. V. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v.17, p. 30 – 36, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; FALÇÃO, A. C. G. M.; AGRA, M. F.; SOUSA, M. F. V; BARBOSA-FILHO, J. M.; Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. *Acta Farm. Bonaerense*. v. 21, n. 3, p. 179-84, 2002.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*. v.20, n.1, p. 522 - 531, 2002.

REIS, M. S. R.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. IN: SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

RJCB Collection. Disponível em: <
<http://www.nce.ufri.br/bcrj/busca1.asp?bcrj=CR020>>.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA, 2002.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 20, n. 7, p. 933 - 956, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia-Farmacobiotecnologia*. p.123 - 148. São Paulo: Premier, 1997.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235 - 254, 2005.

SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 48, n.4, 2006.

SANTOS, I. R. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: Simões, C. M. L.; Schenkel, E. P.; Gosmam, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. Ed. Editora UFSC, p. 403 - 434, 2004.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 35, p. 275 - 280, 2004.

- SEIGLER, D. S. Phytochemistry of *Acacia* - sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 31, p. 845–873, 2003.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 73, p. 243 - 249, 2000.
- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* v. 61, p. 1053-1071, 1998.
- SIANI, C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica. Scriptorio Comunicação: Rio de Janeiro, 2003.
- SILVA, D. A. da. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* Mart et Zucc. (Tiliaceae). Maringá, 2004. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá.
- SILVA, M. F. da.; SOUZA, L. A. G. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, Baixo Rio Negro, Amazonas. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ser. Bot.*, v.18, n.1, p. 3 - 35, 2002.
- SILVA, S. L. C.; BORBA, H. R.; BONFIM, R. C. B.; CARVALHO, M. G.; CAVALCANTI, H. L.; BARBOSA, C. G. Ação Anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) acbr. e *Andira fraxinifolia* Benth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepsis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. *Parasitol Latinoam.* v.58, p. 23 - 29, 2003.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5 ed. . Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2004.
- SIQUEIRA, M. J.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmani* – Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova*. v. 21, p. 557-559, 1998.
- SISTI, M.; DE SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized *in vitro* culture. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, p. 946 - 950, 2008.
- SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. cap. 3, p. 107 - 166, 2003. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL, V. F. Ciências Farmacêuticas; Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora Univali. Itajaí - SC, 2003.
- SOUZA V. C.; LORENZI H. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

SOUZA V. C.; LORENZI H. Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. v. 158, p. 353 - 357, 2003.

TAKASHIMA, J.; CHIBA N.; YONEDA K.; OHSAKI, A. Derrisin, a New Rotenoid from *Derris malaccensis* Plain and Anti-Helicobacter pylori Activity of Its Related Constituents. *J. Nat. Prod.*, 65, p. 611-613, 2002.

TANAKA, H.; ETOH, H.; SHIMIZU, H.; OH-UCHI, T.; TERADA, Y.; TATEISHI, Y. Erythrinan alkaloids and isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*. *Planta Medica*, v. 67, p. 871 - 873, 2001.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 834 - 837, 2005.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

TIWARI, R. D.; MISRA, G. R.; *Planta Med.* v. 28, p. 182, 1985.

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

UNCHERN, S. Basic Techniques in Animal Cell Culture. Drug Delivery System Workshop. August 19 - 20: Bangkok, Thailand, 1999.

VELIOGLU, Y. S. *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 46, p. 4113 - 4117, 1998.

VERPOORTE, R. ; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.

VIEGAS JR., C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

VINATEA, J. E. *Acuicultura continental*. Libreria Studium, Lima - Perú, 1982.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. FG.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das

cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 44, p. 701-705, 1996.

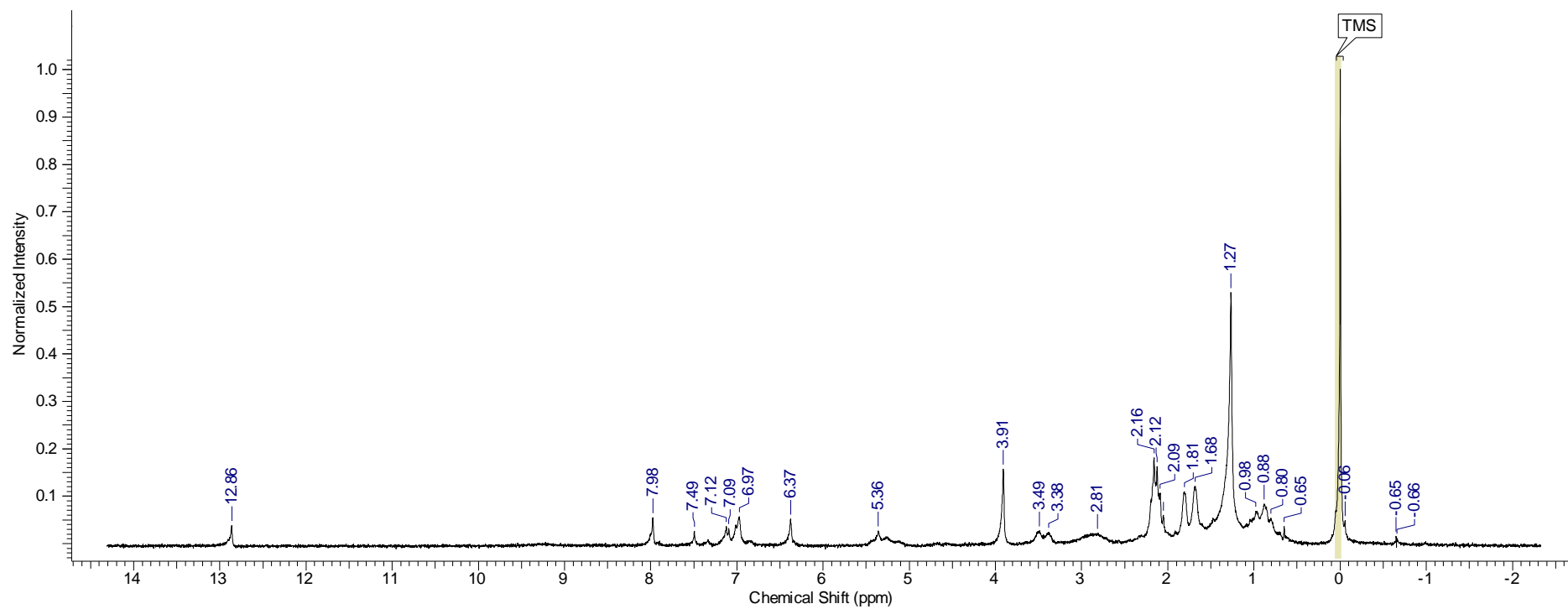
WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Boletim de Saúde*, v. 1, p. 4, 2004.

WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: editora Argós. 523 p., 2001.

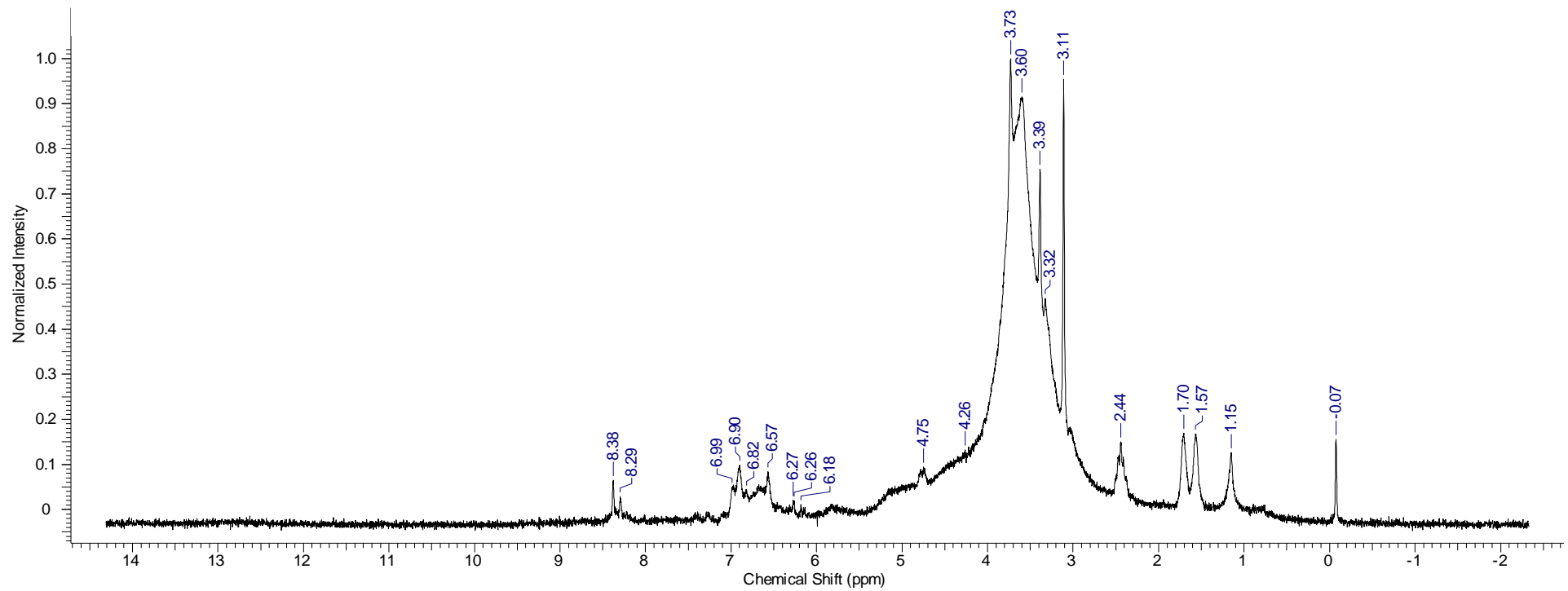
ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.

8. ANEXOS

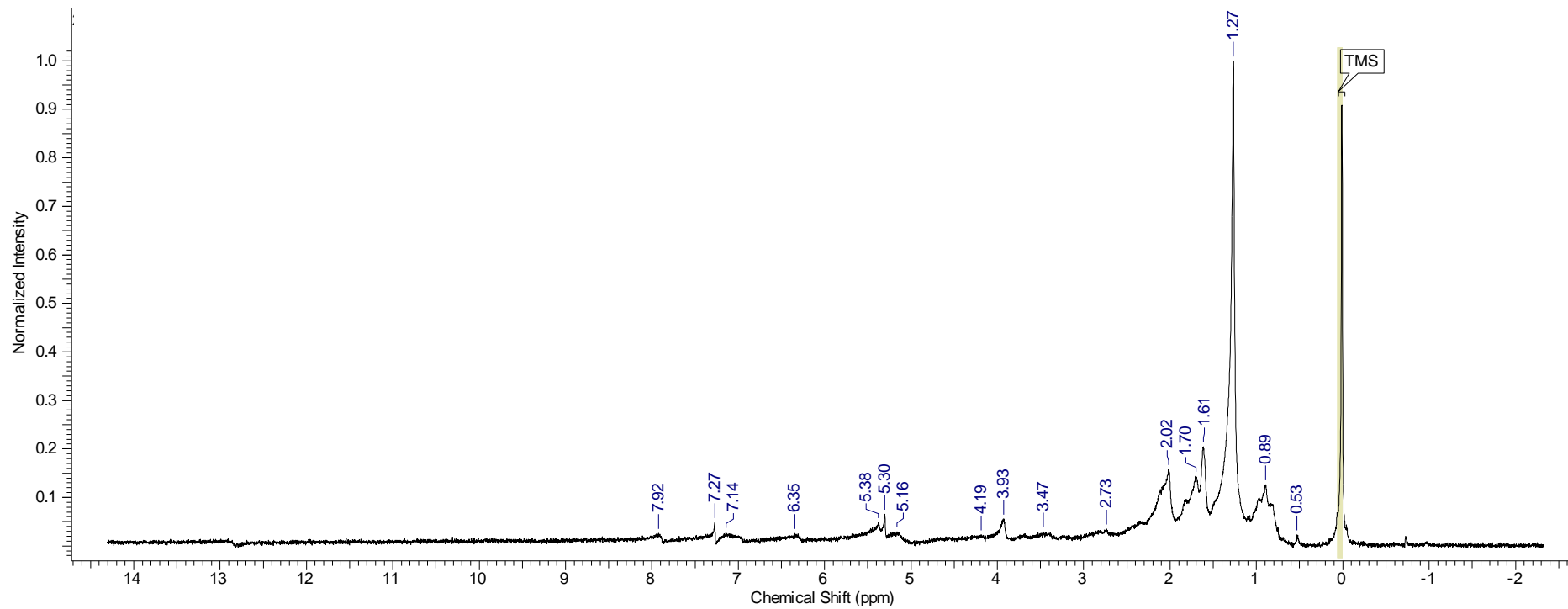
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato DCM das Flores (1 FLD)



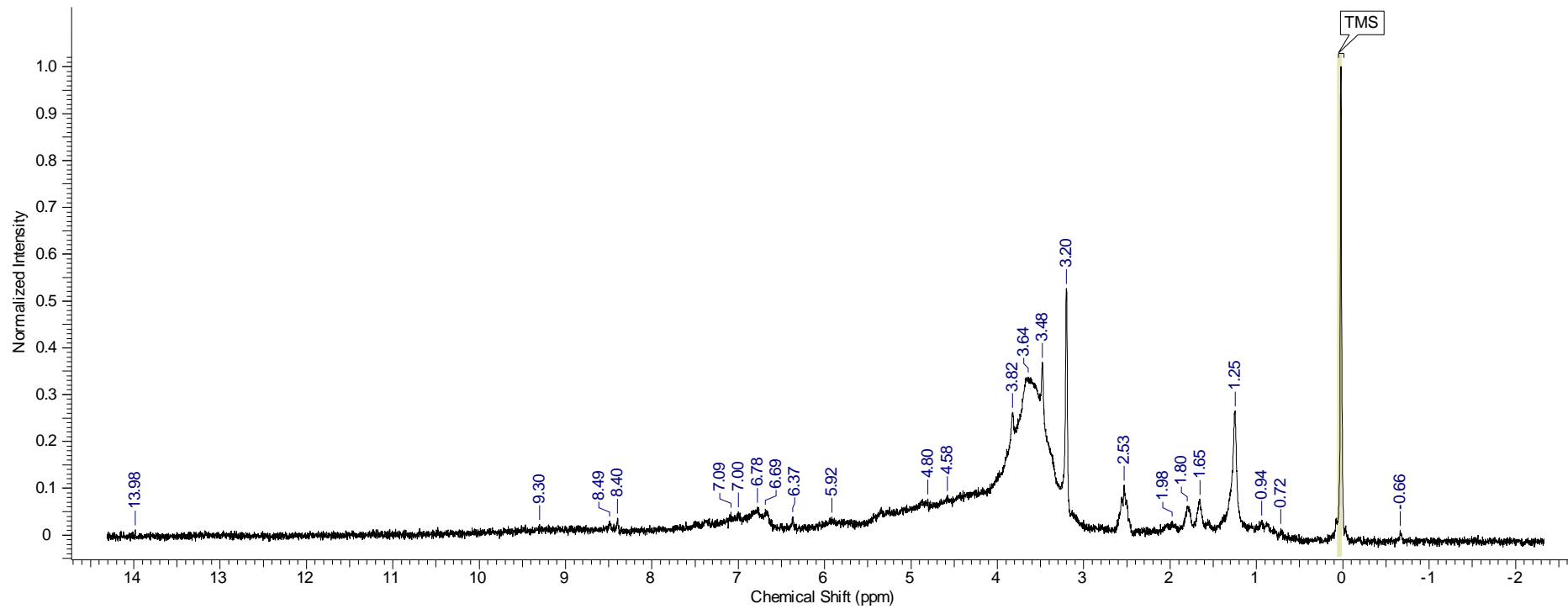
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato MeOH das Flores (1 FLM)



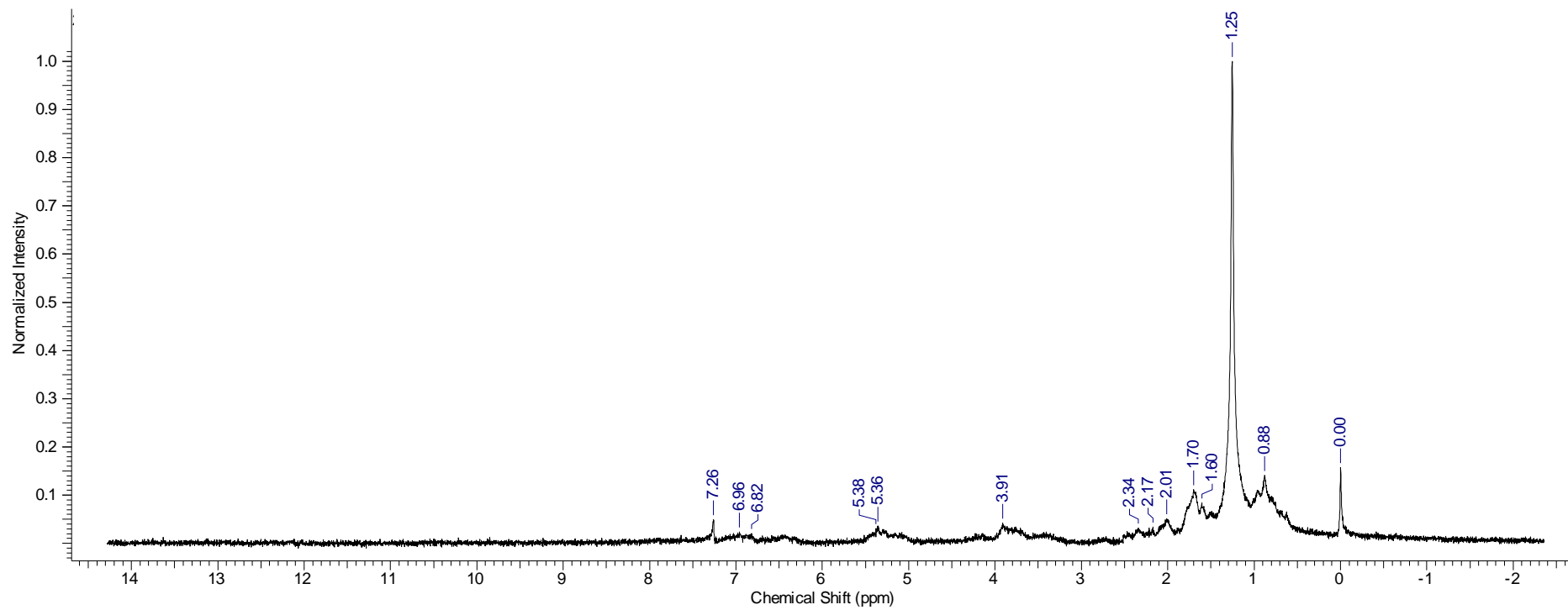
Espectro de RMN de ^1H (60 Mhz) do extrato DCM das Folhas (1 FoD)



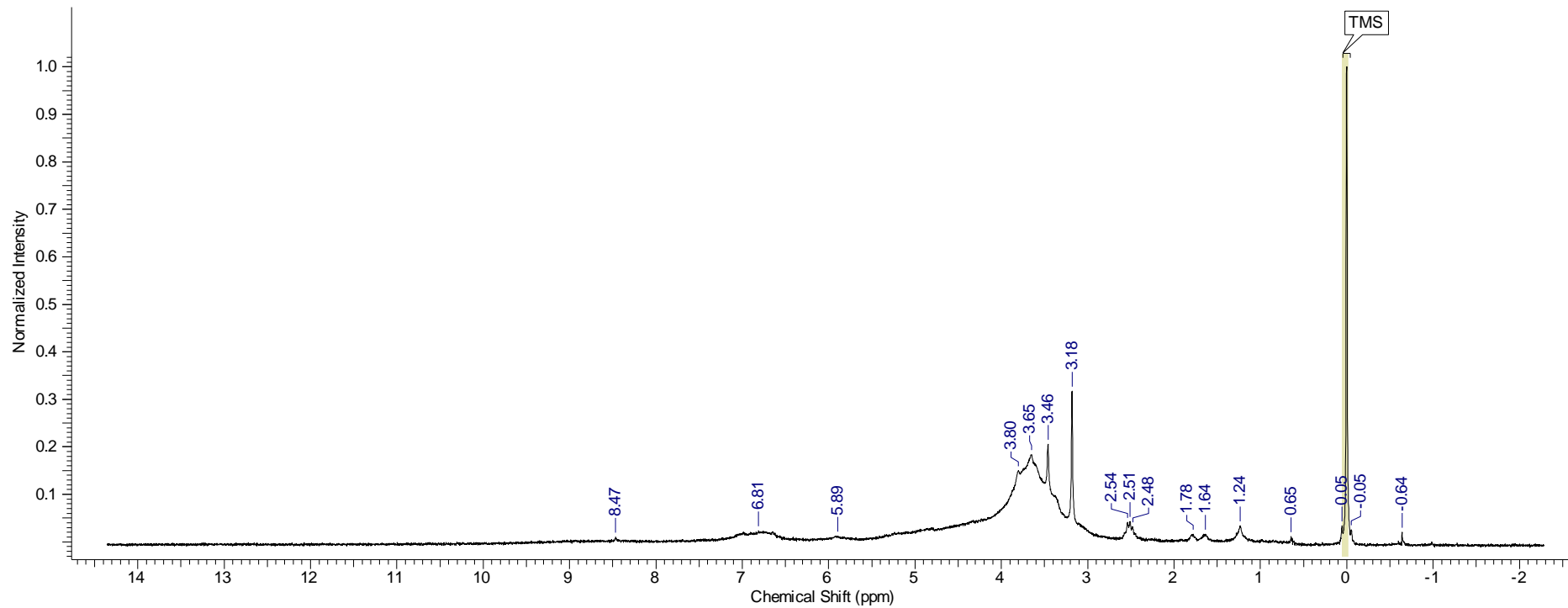
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato MeOH das Folhas (1 FoM)



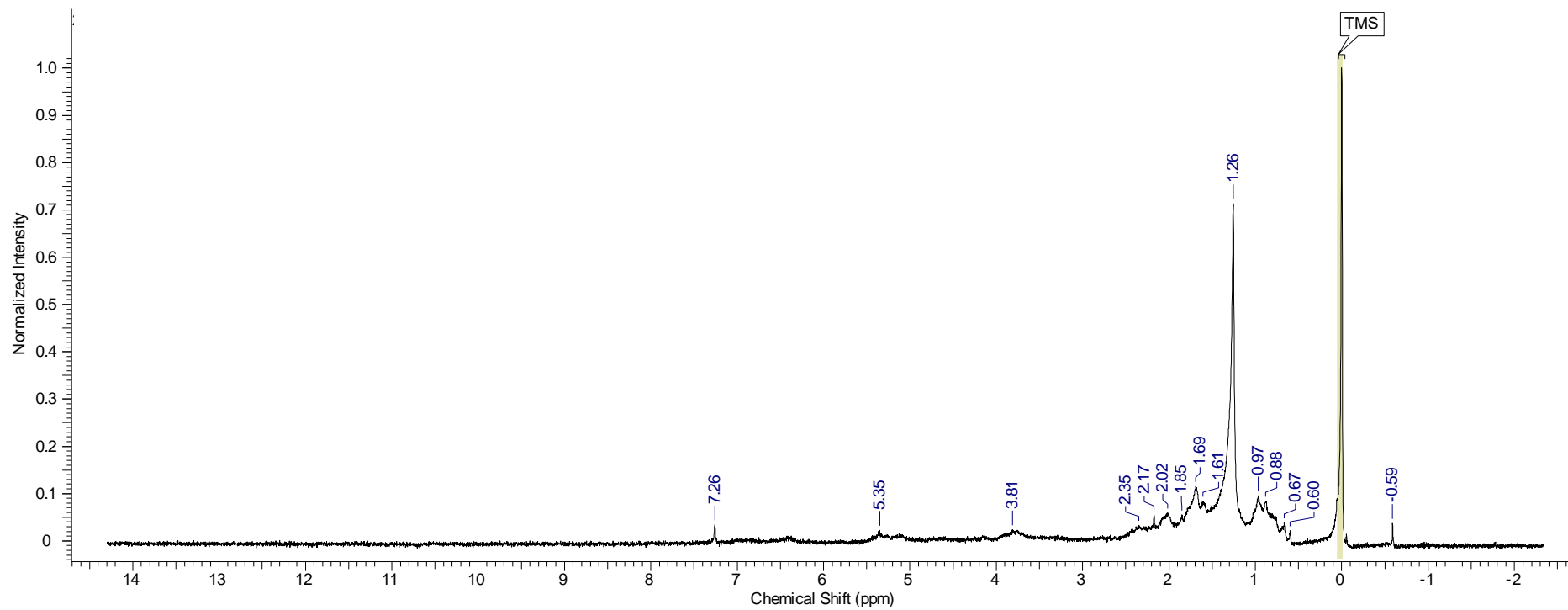
Espectro de RMN de ^1H (60 Mhz) do extrato DCM dos Galhos (1 GaD)



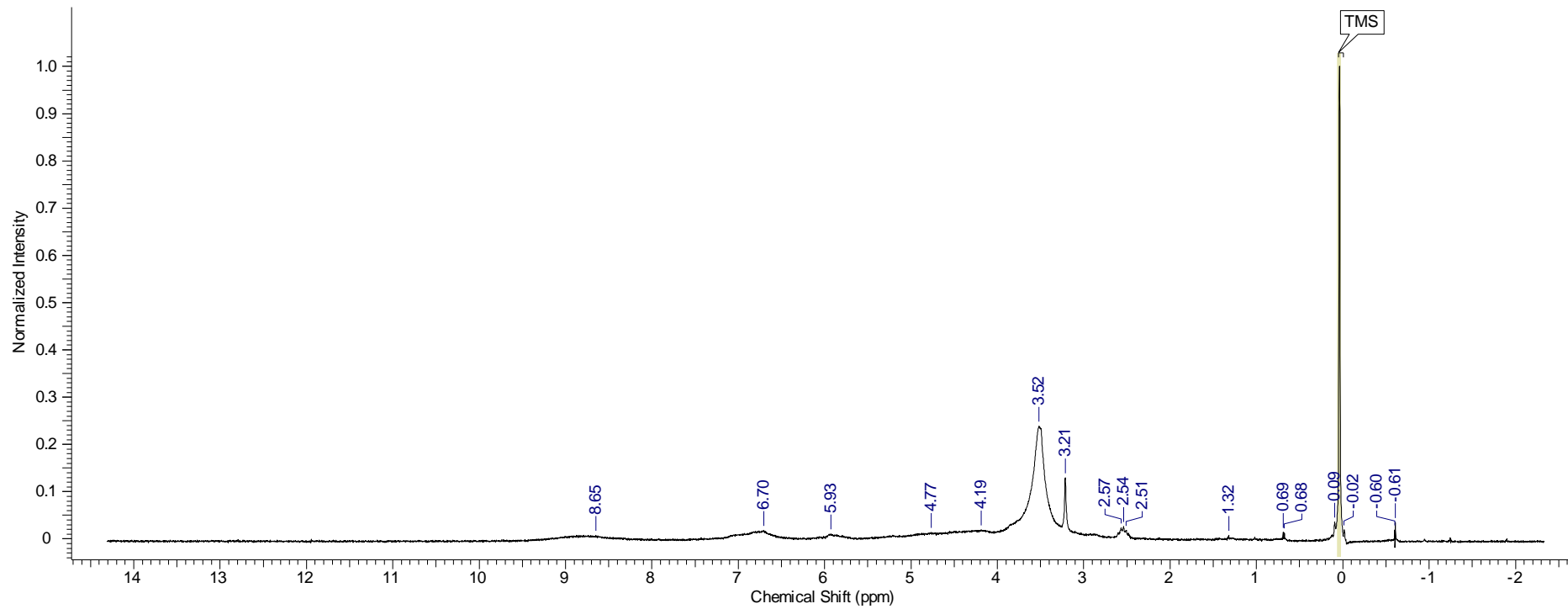
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato MeOH dos Galhos (1 GaM)



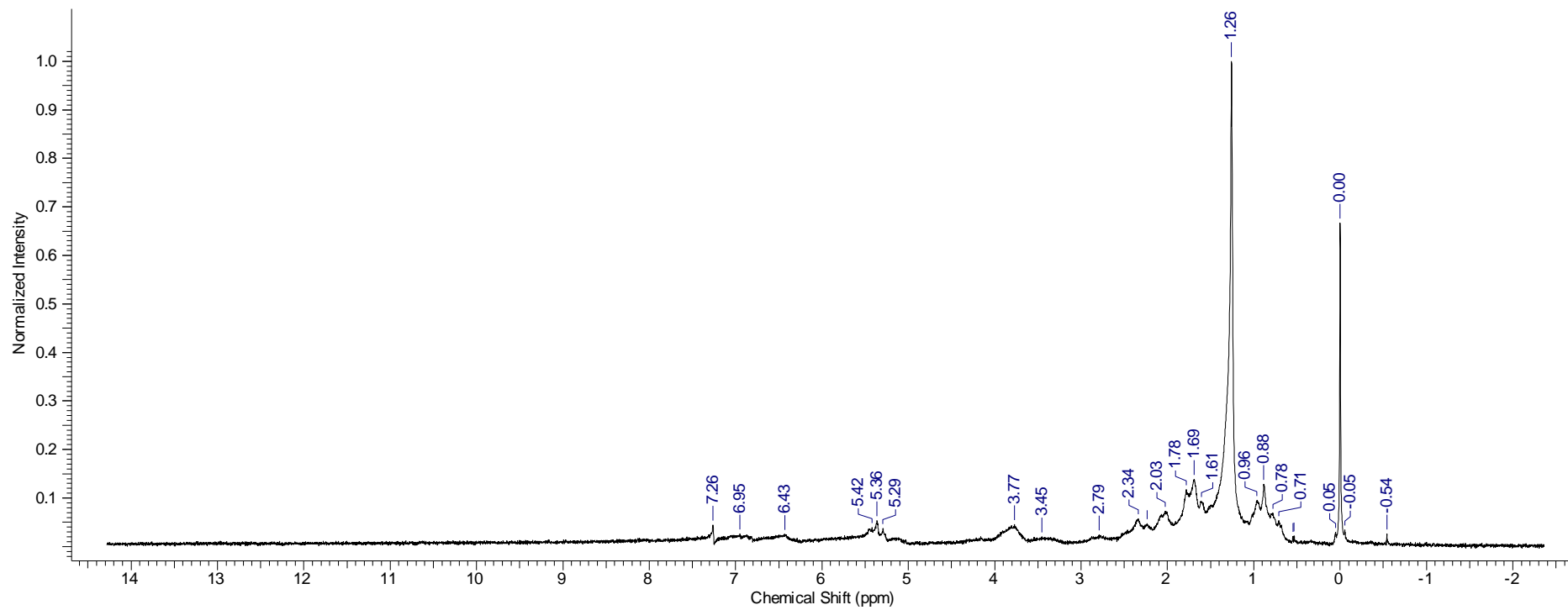
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato DCM das Cascas (1 CaD)



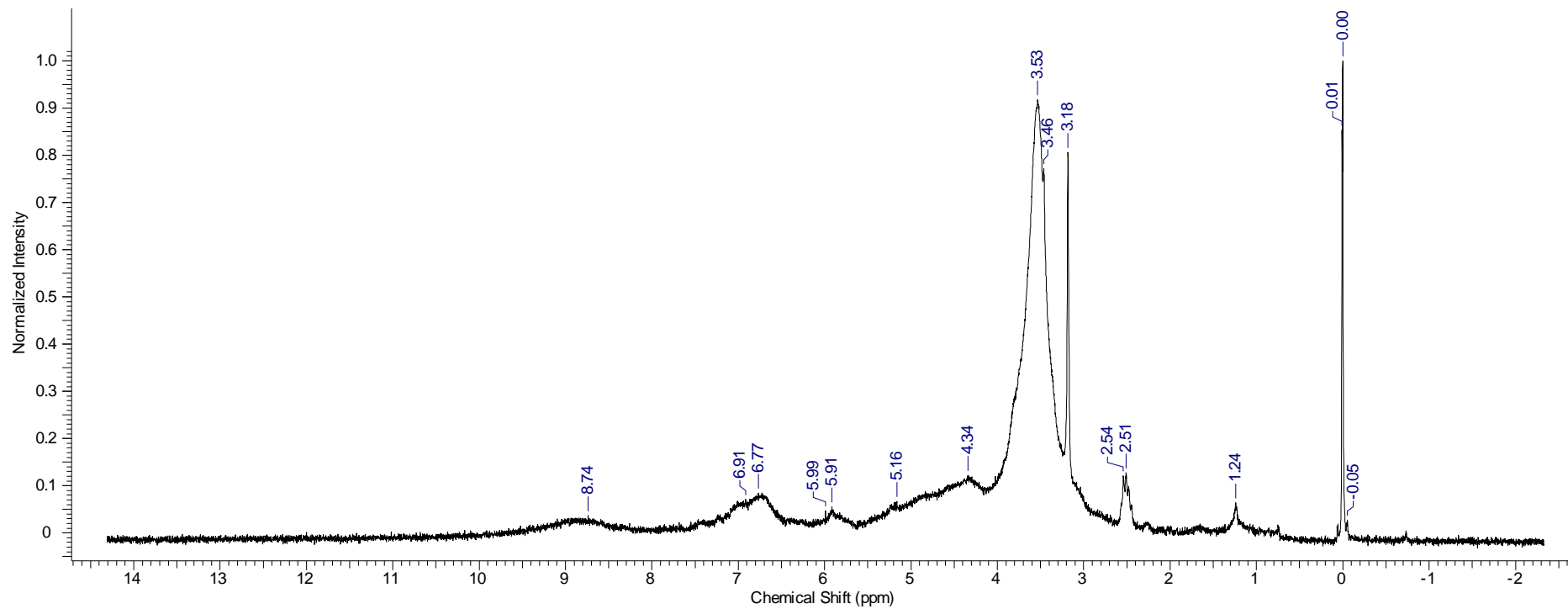
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato MeOH das Cascas (1 CaM)



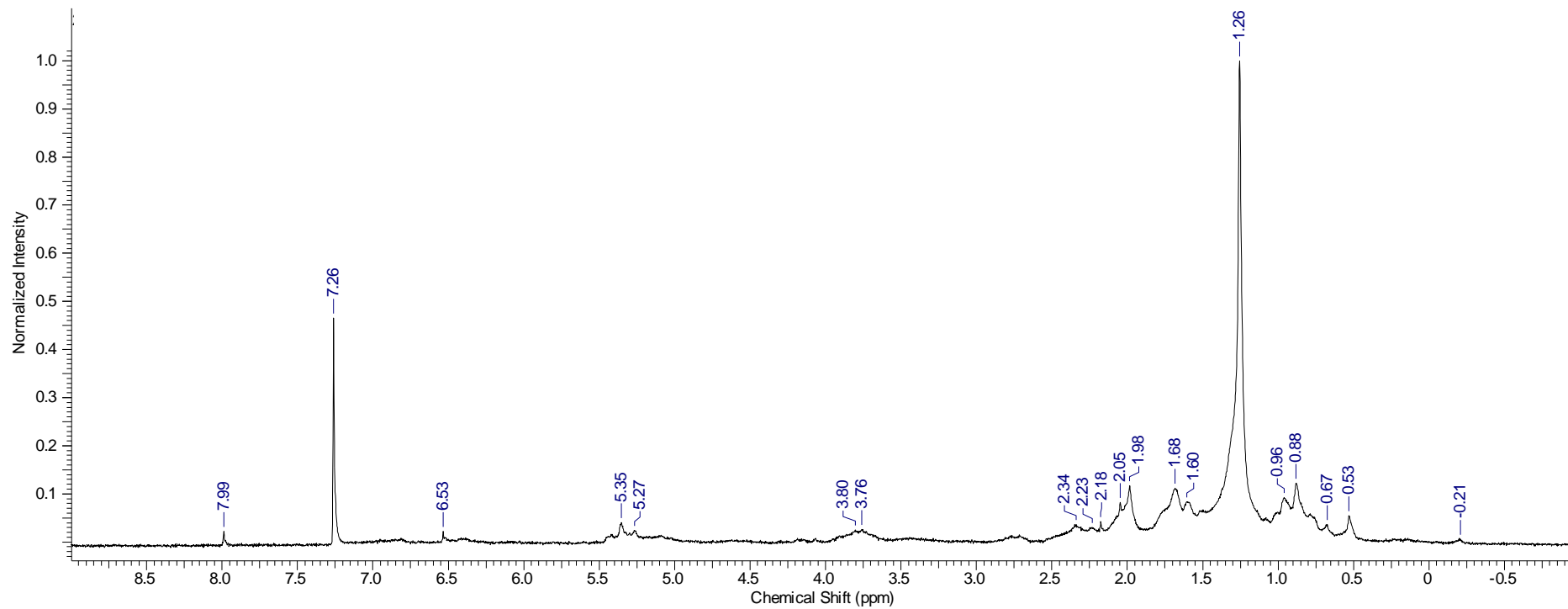
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato DCM das Cascas (2 CaD)



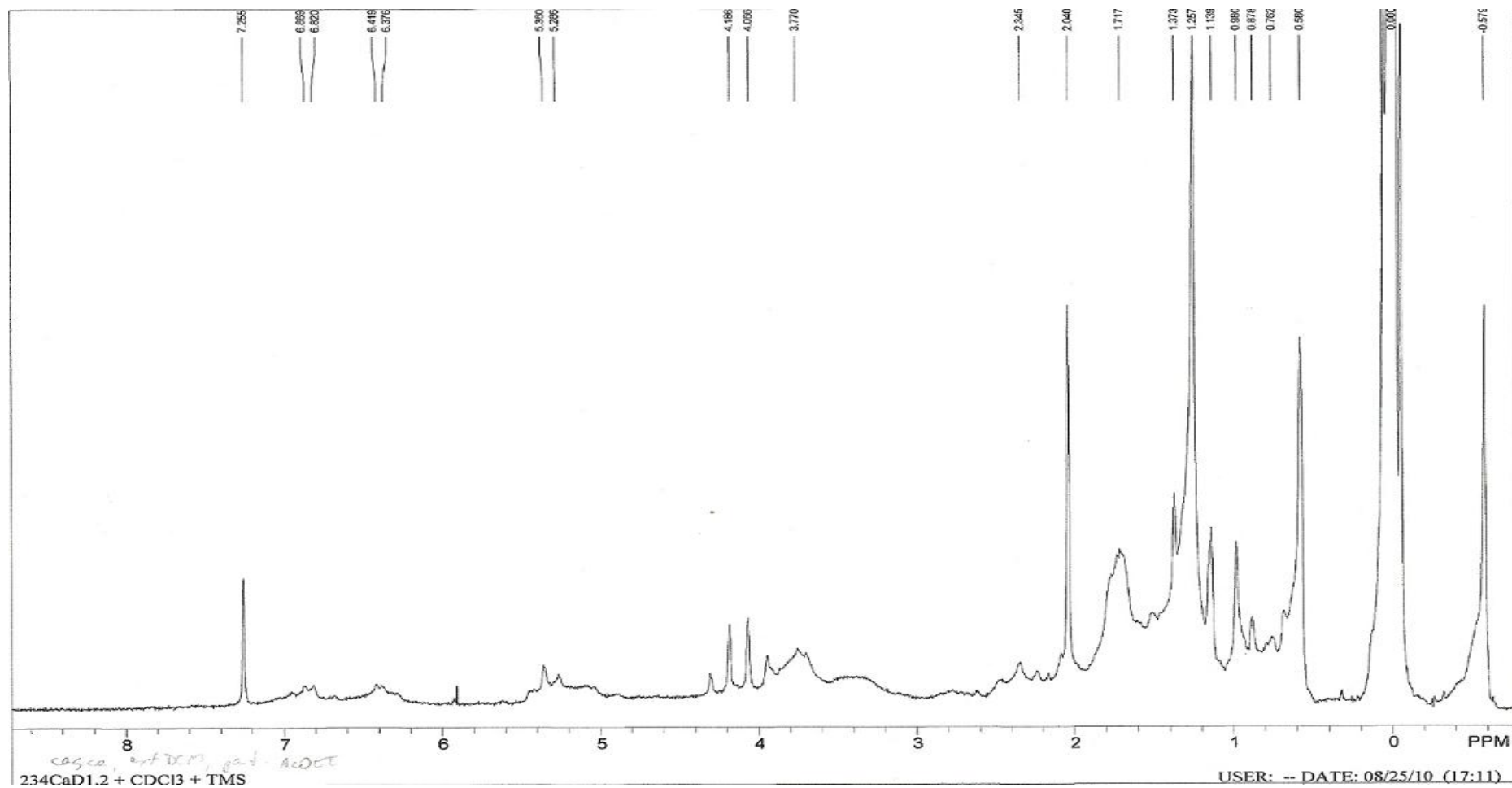
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) do extrato MeOH das Cascas (2 CaM)



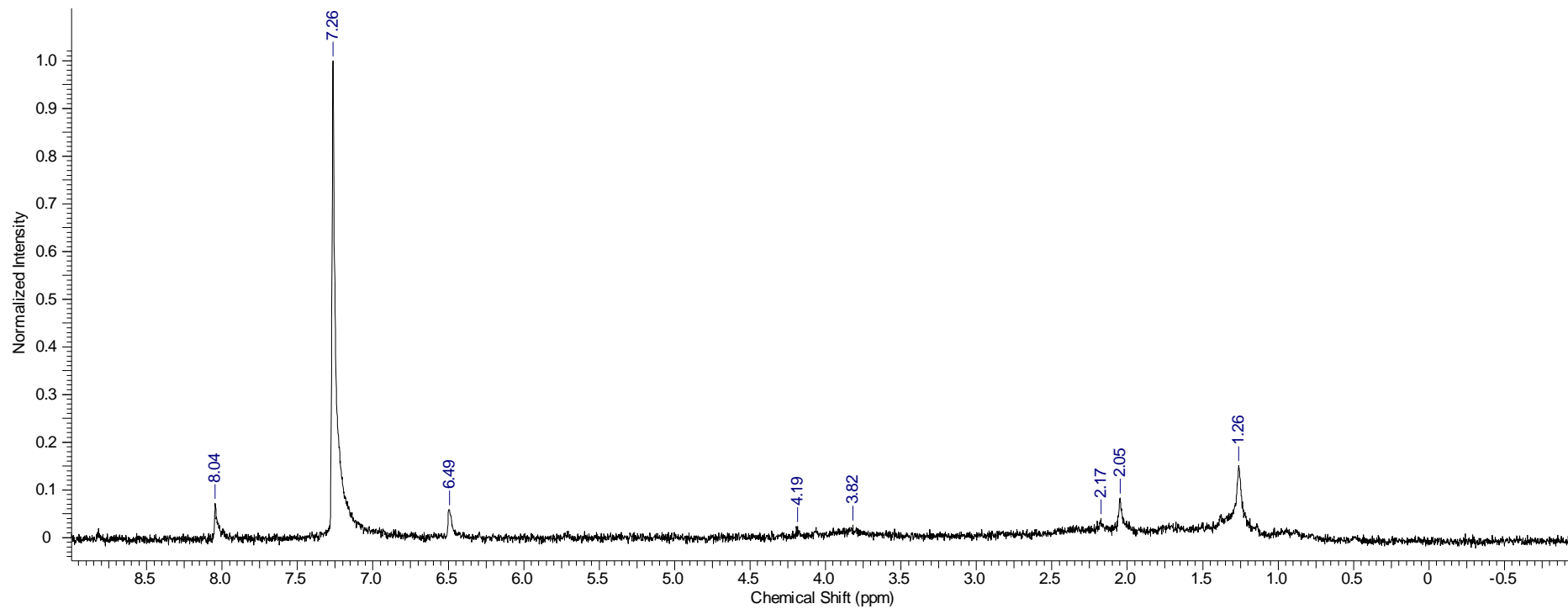
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase DCM do extrato DCM das Cascas (1/2 CaD 1.1)



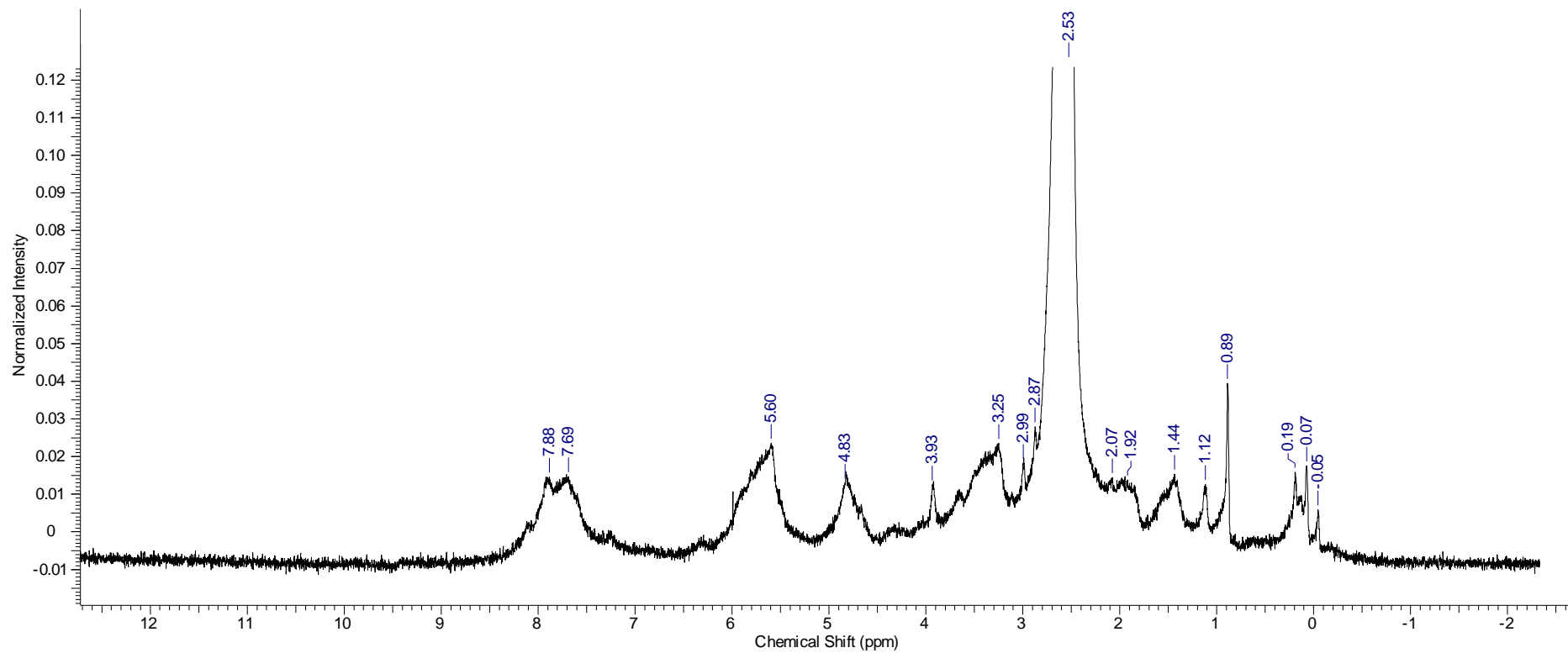
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase AcOEt do extrato DCM das Cascas (1/2 CaD 1.2)



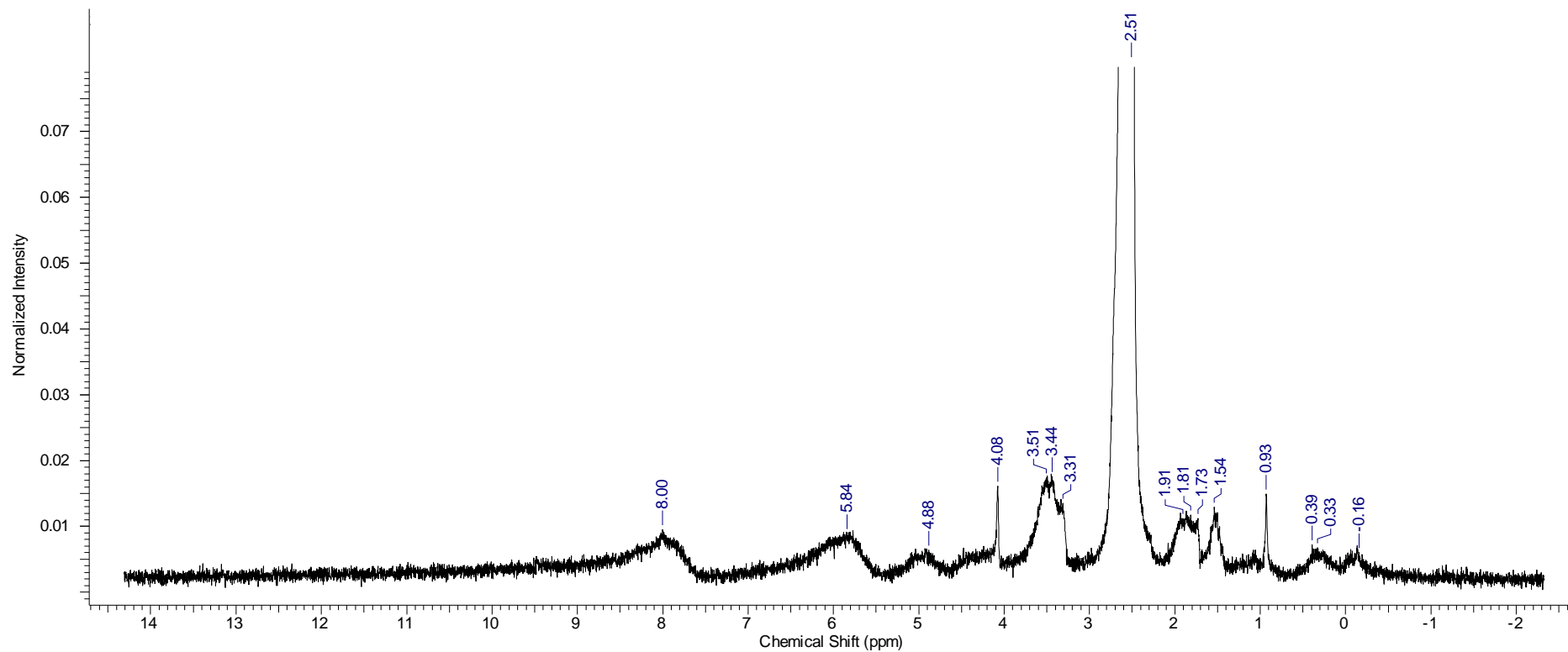
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase DCM do extrato MeOH das Cascas – 1^a coleta (1 CaM 2.1)



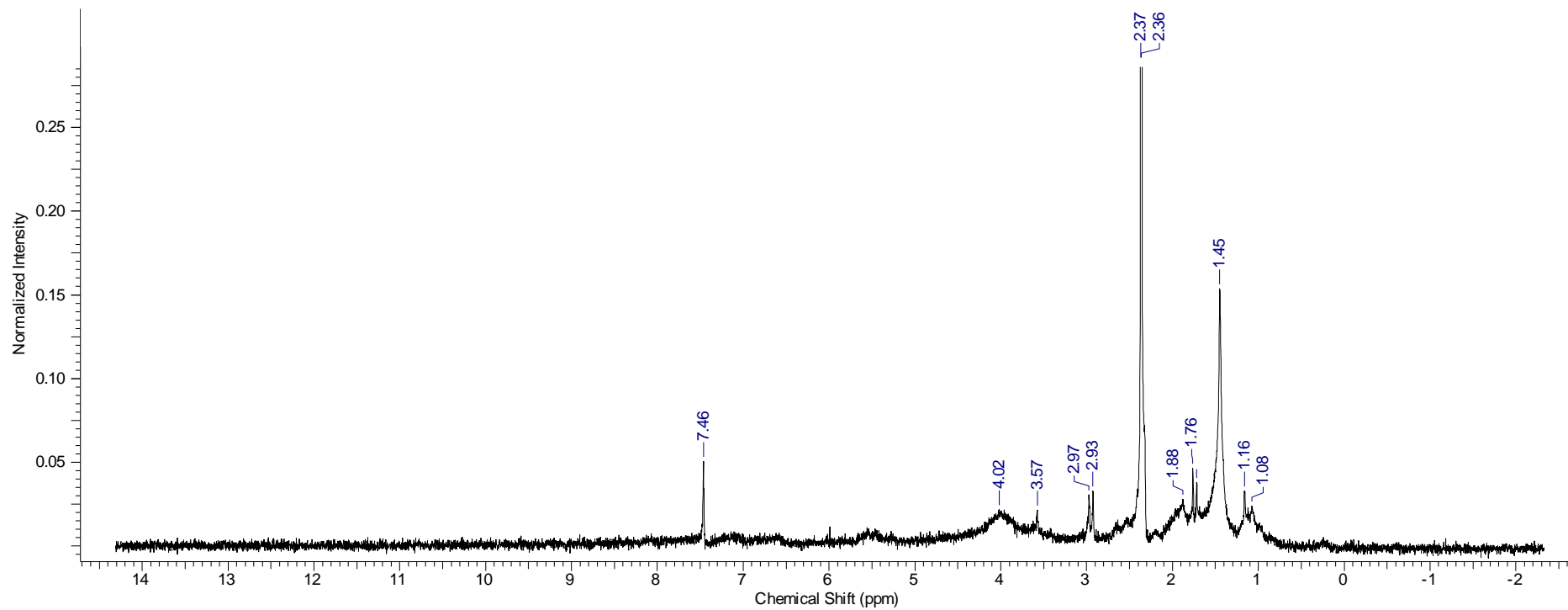
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase AcOEt do extrato MeOH das Cascas – 1^a coleta (1 CaM 2.2)



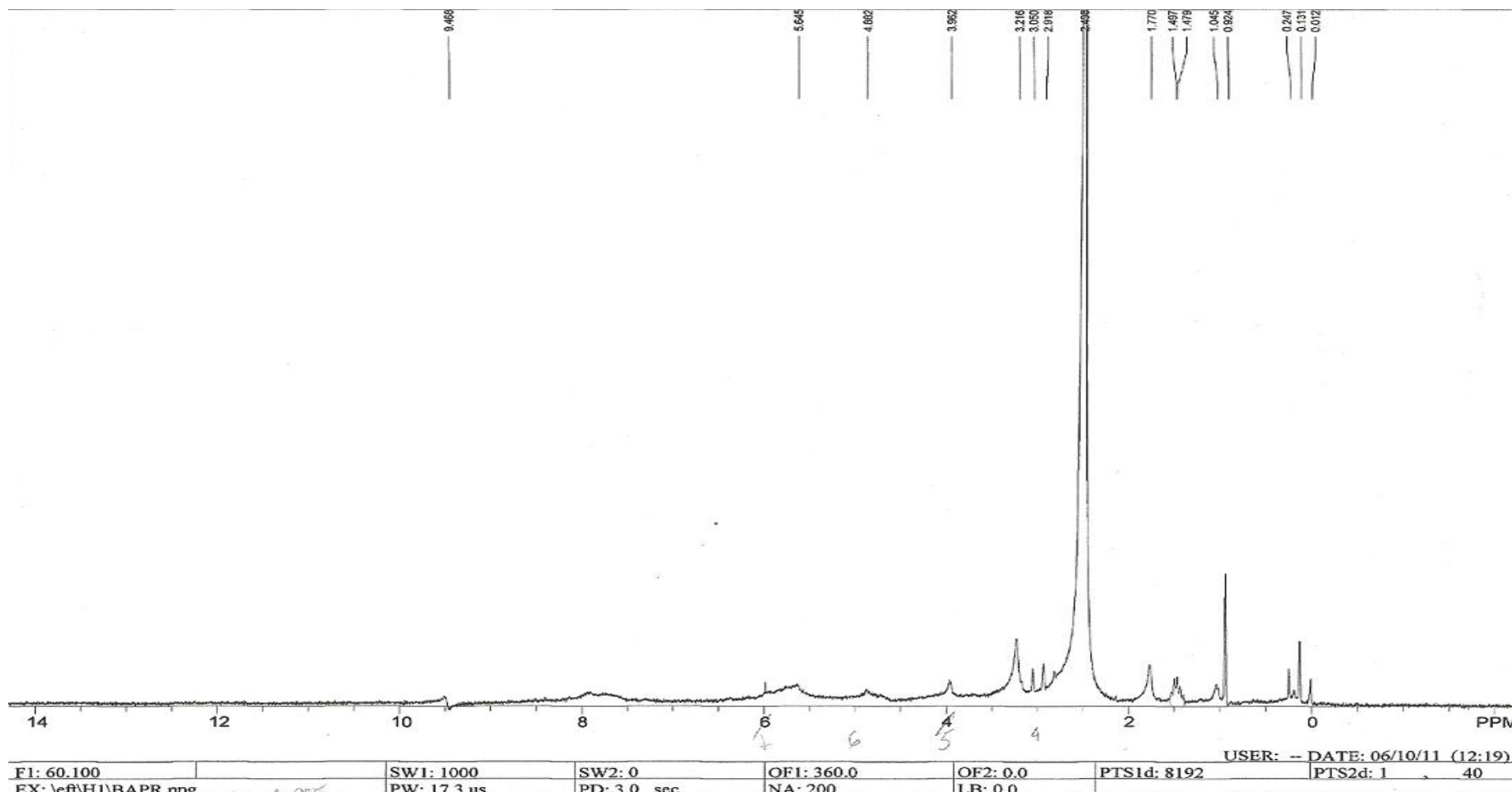
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase BuOH do extrato MeOH das Cascas – 1ª coleta (1 CaM 2.3)



Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase DCM do extrato MeOH das Cascas – 2^a coleta (2 CaM 3.1)

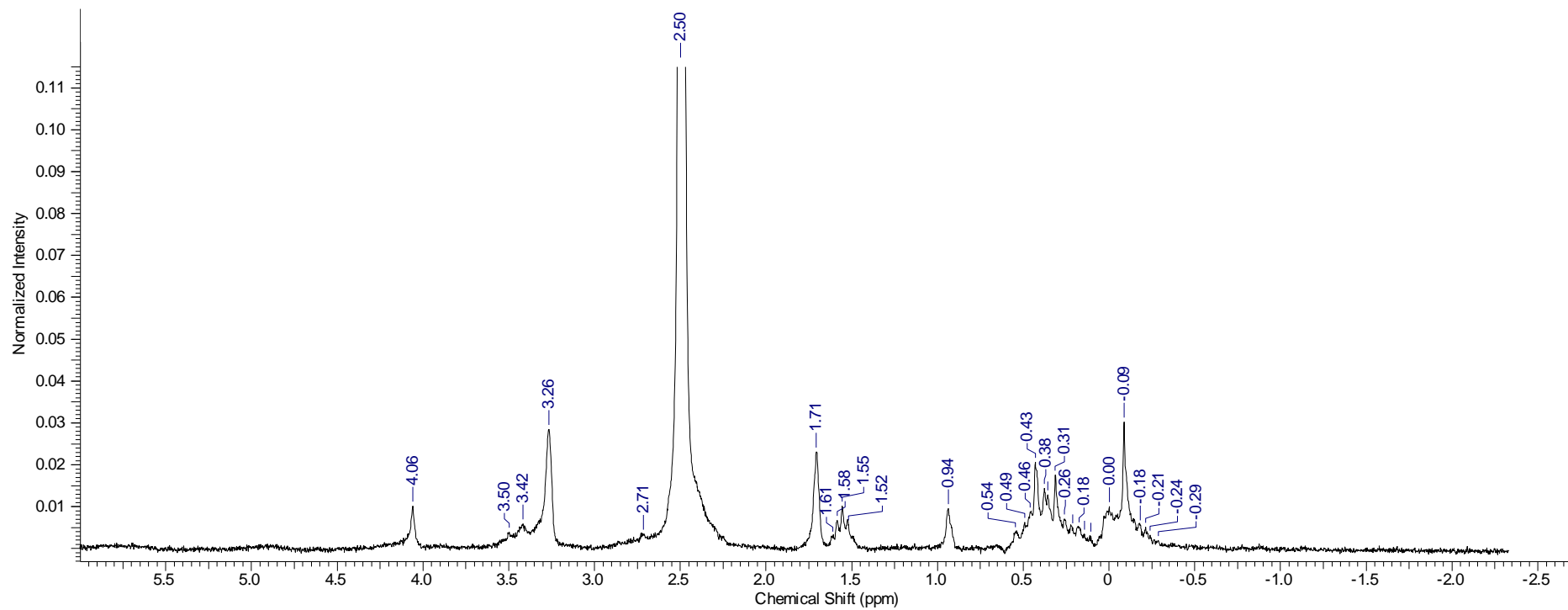


Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase AcOEt do extrato MeOH das Cascas – 2^a coleta (2 CaM 3.2)

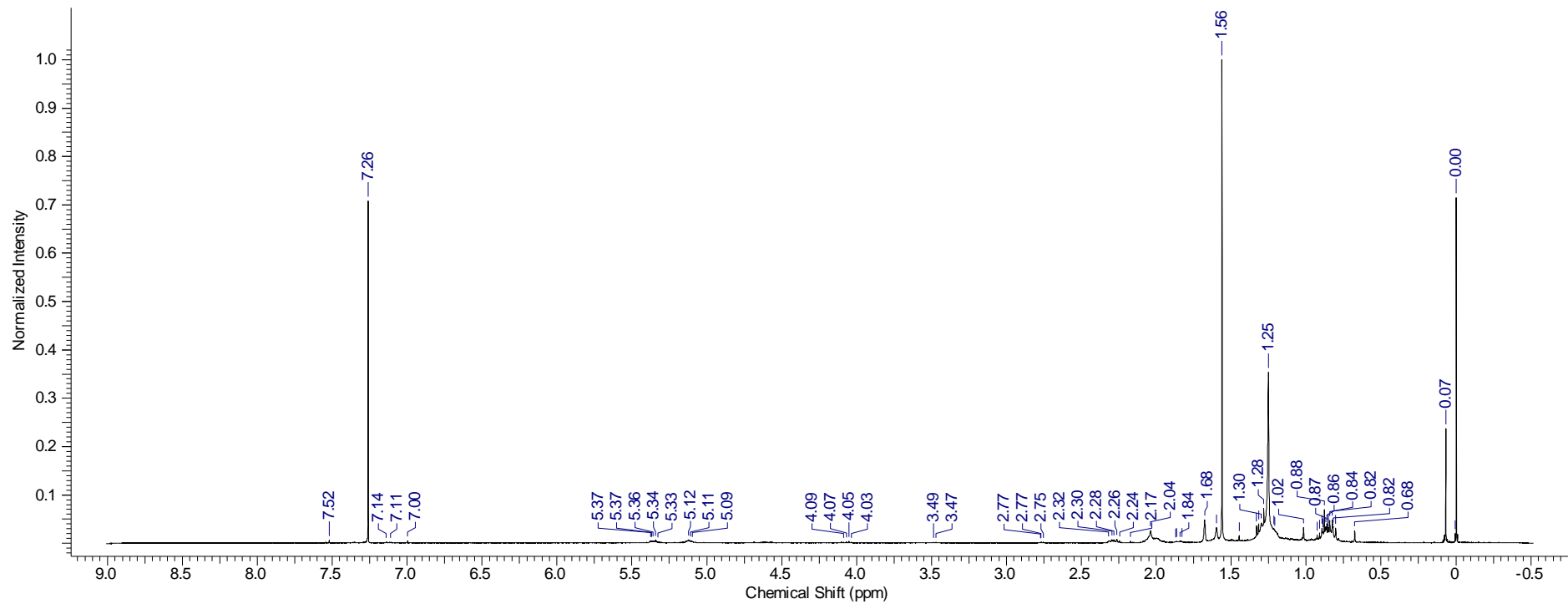


304 CaM 3.2 DIL: DMSO + 40BL. VANESSA

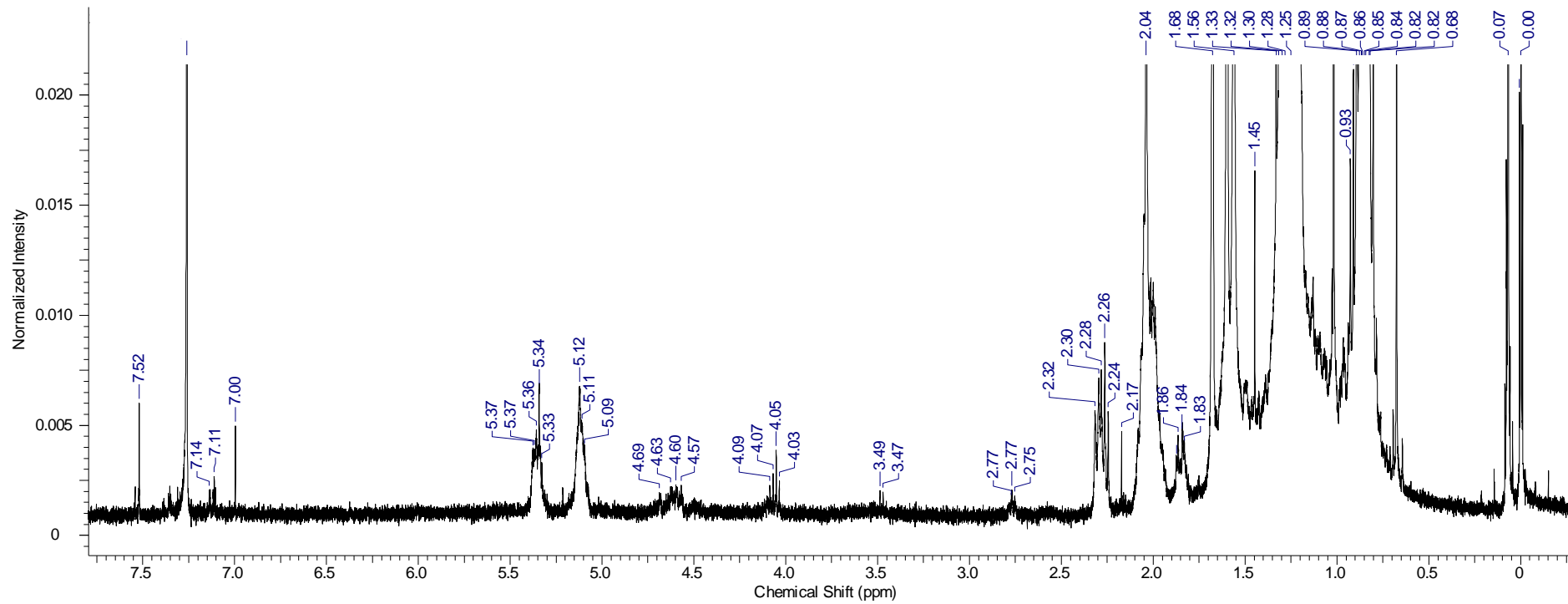
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fase BuOH do extrato MeOH das Cascas – 2^a coleta (2 CaM 3.3)



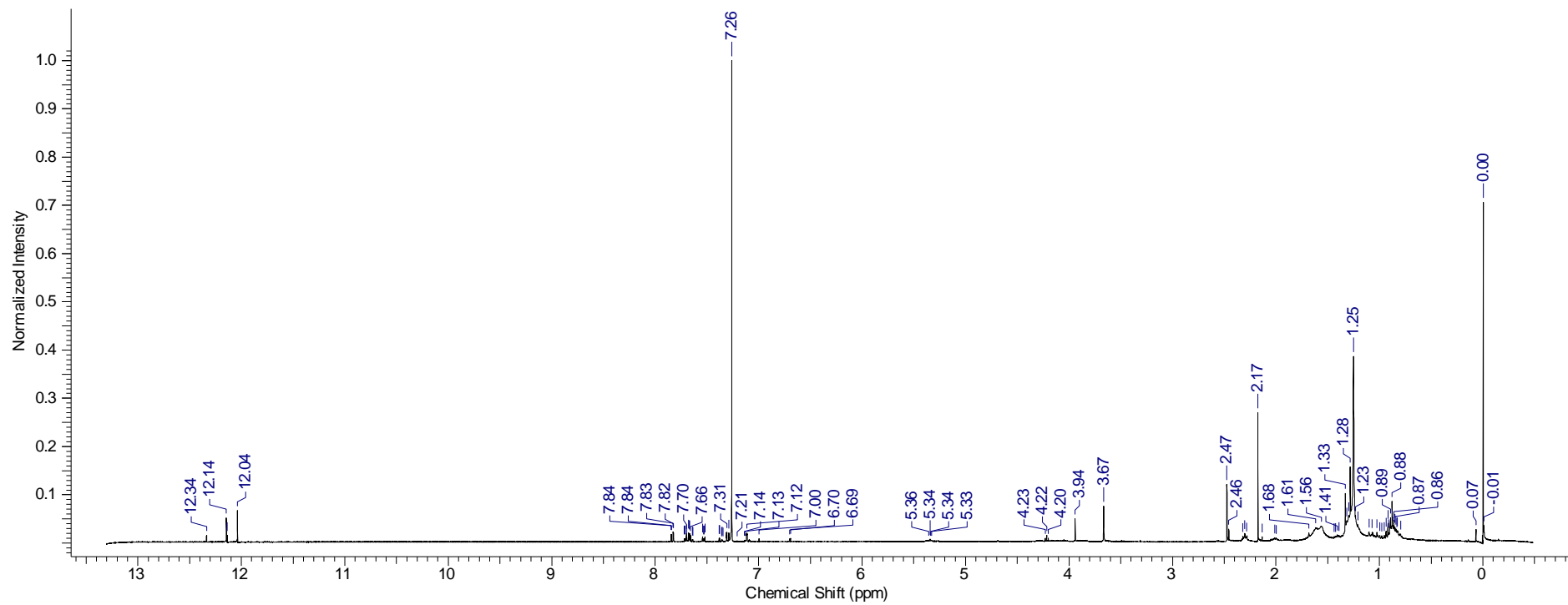
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.2



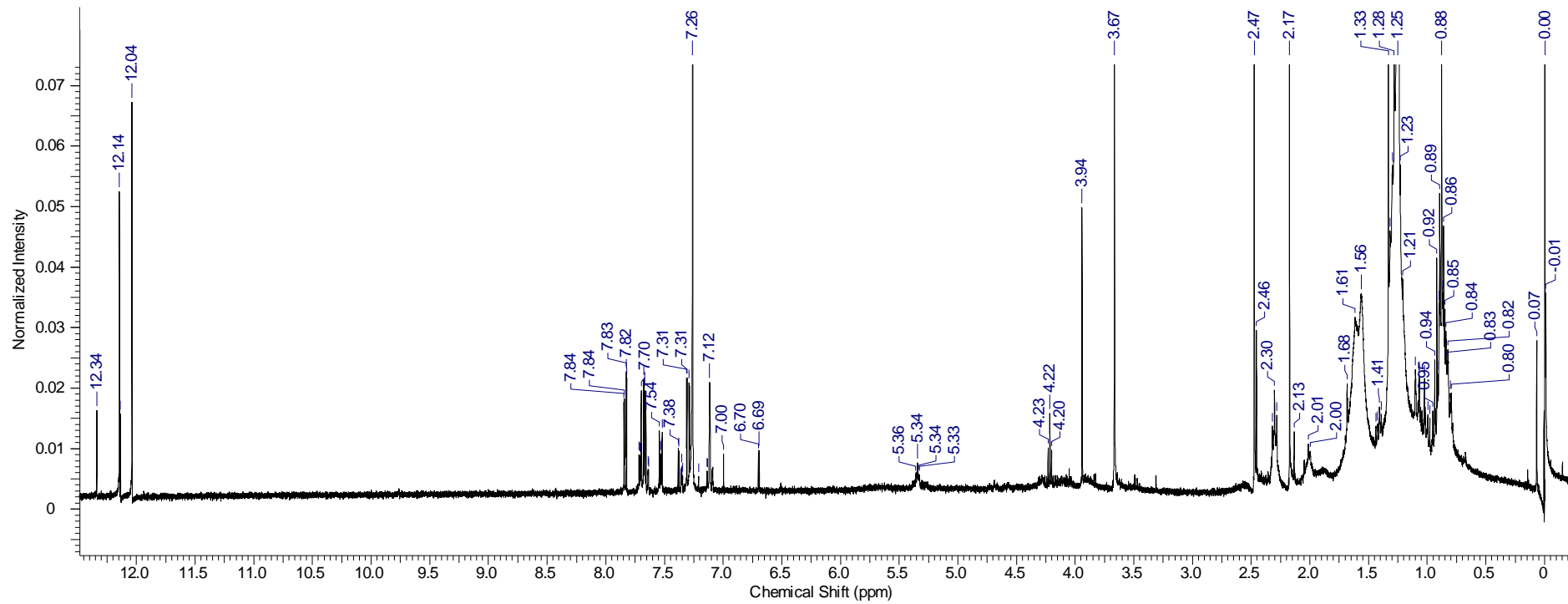
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.2



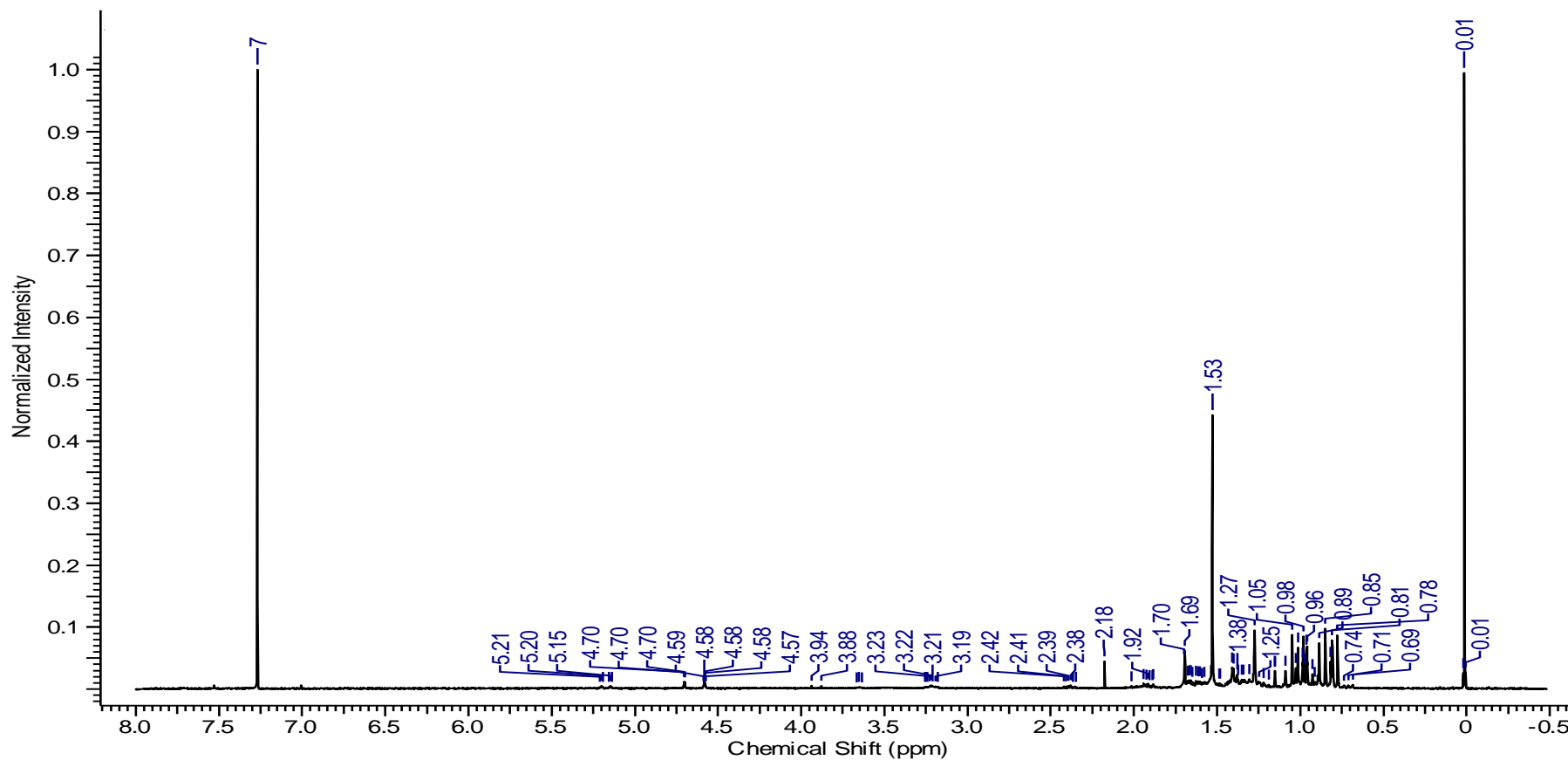
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.5-7



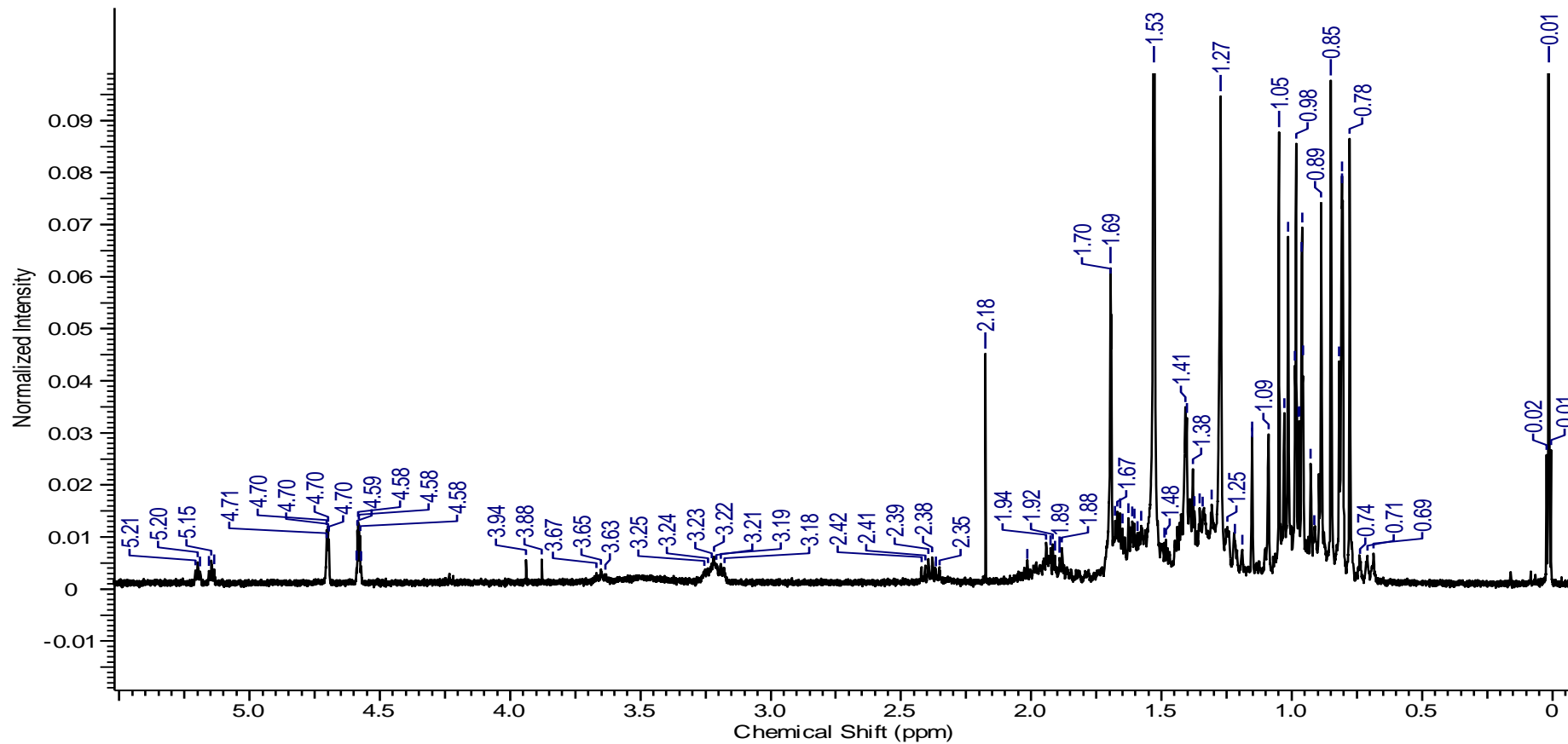
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.5-7



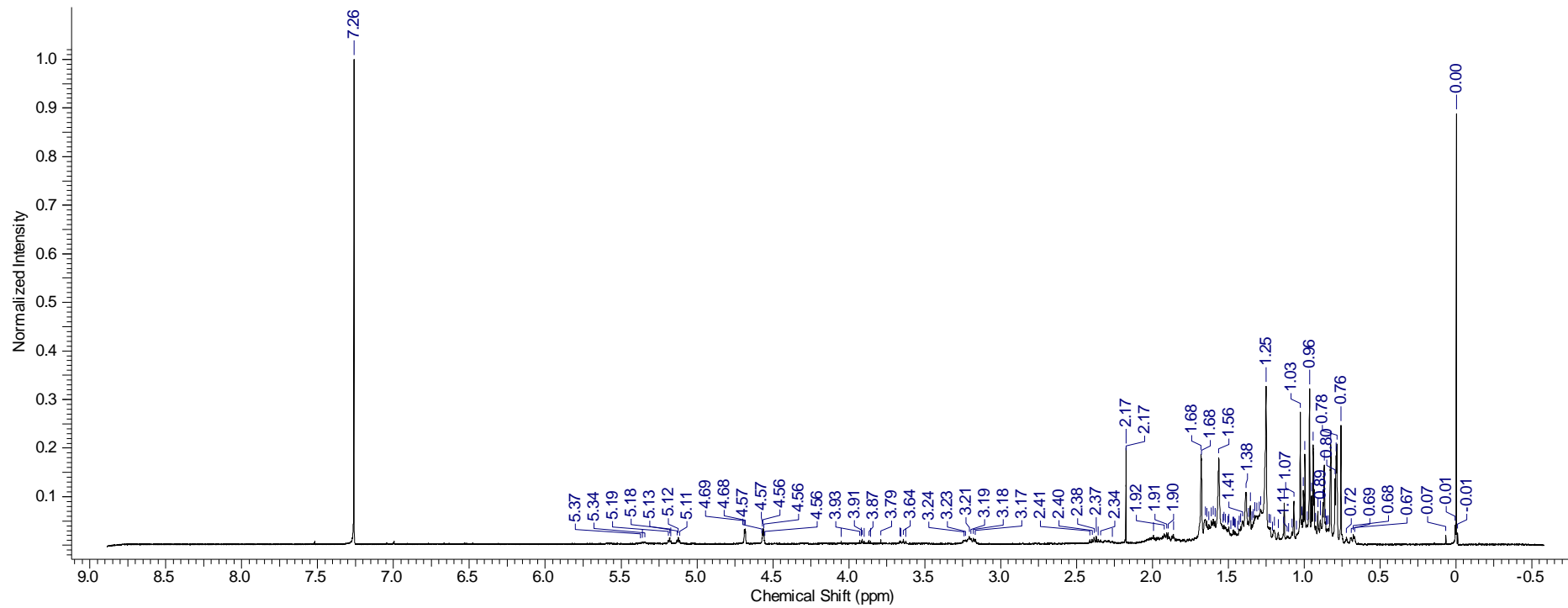
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9)



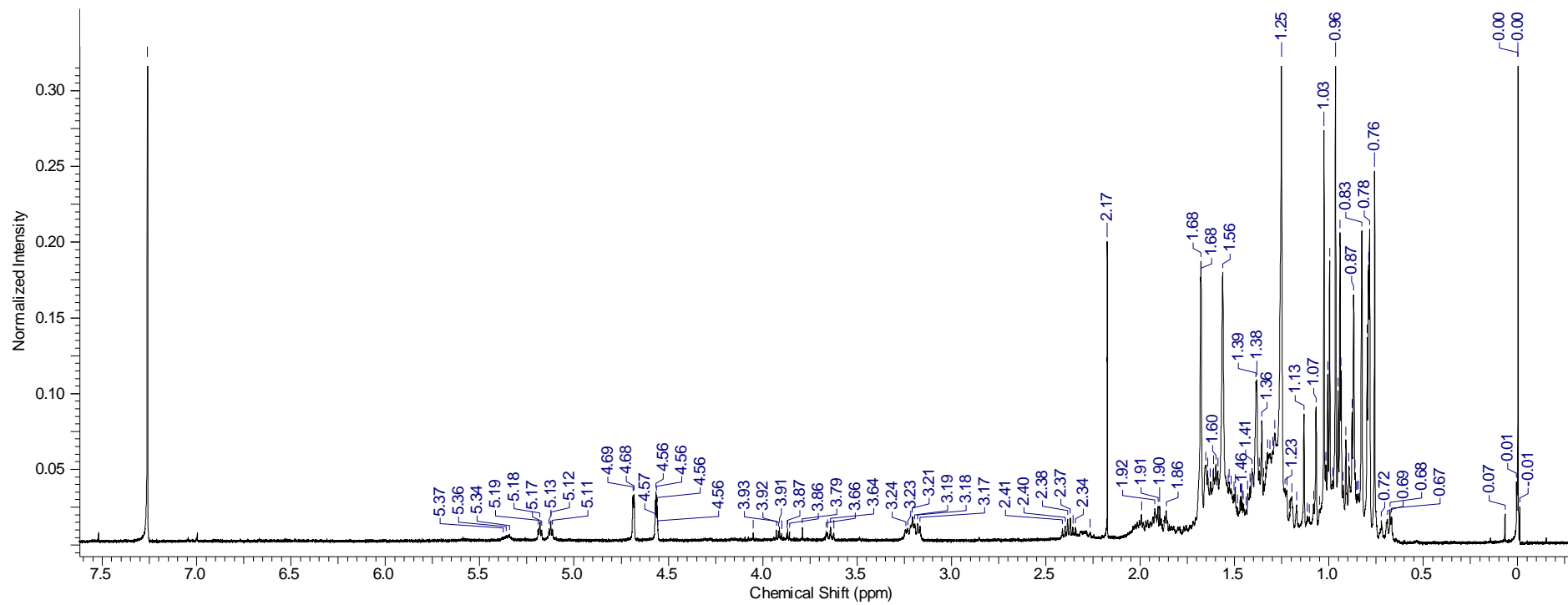
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9)



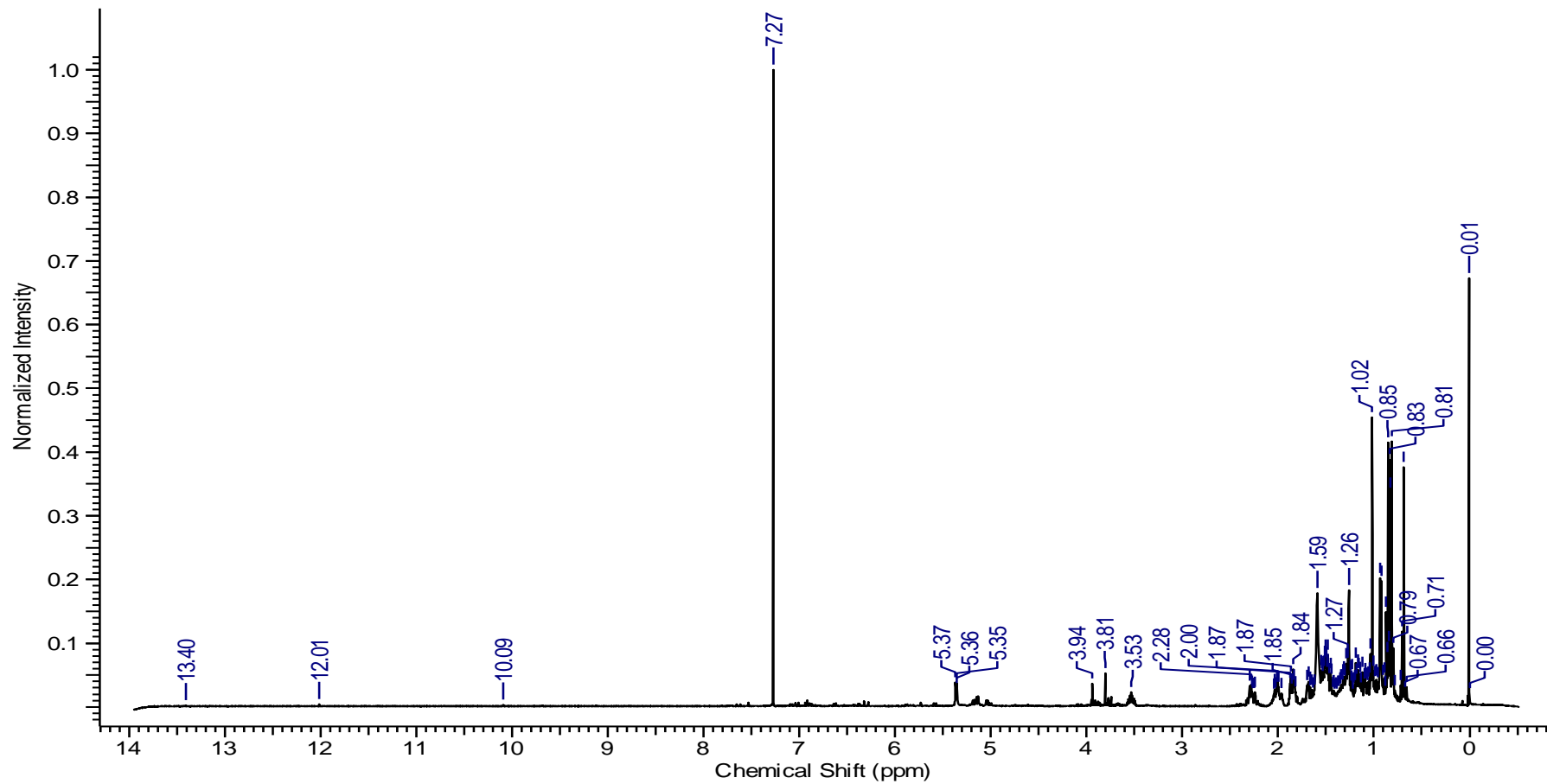
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.16-22



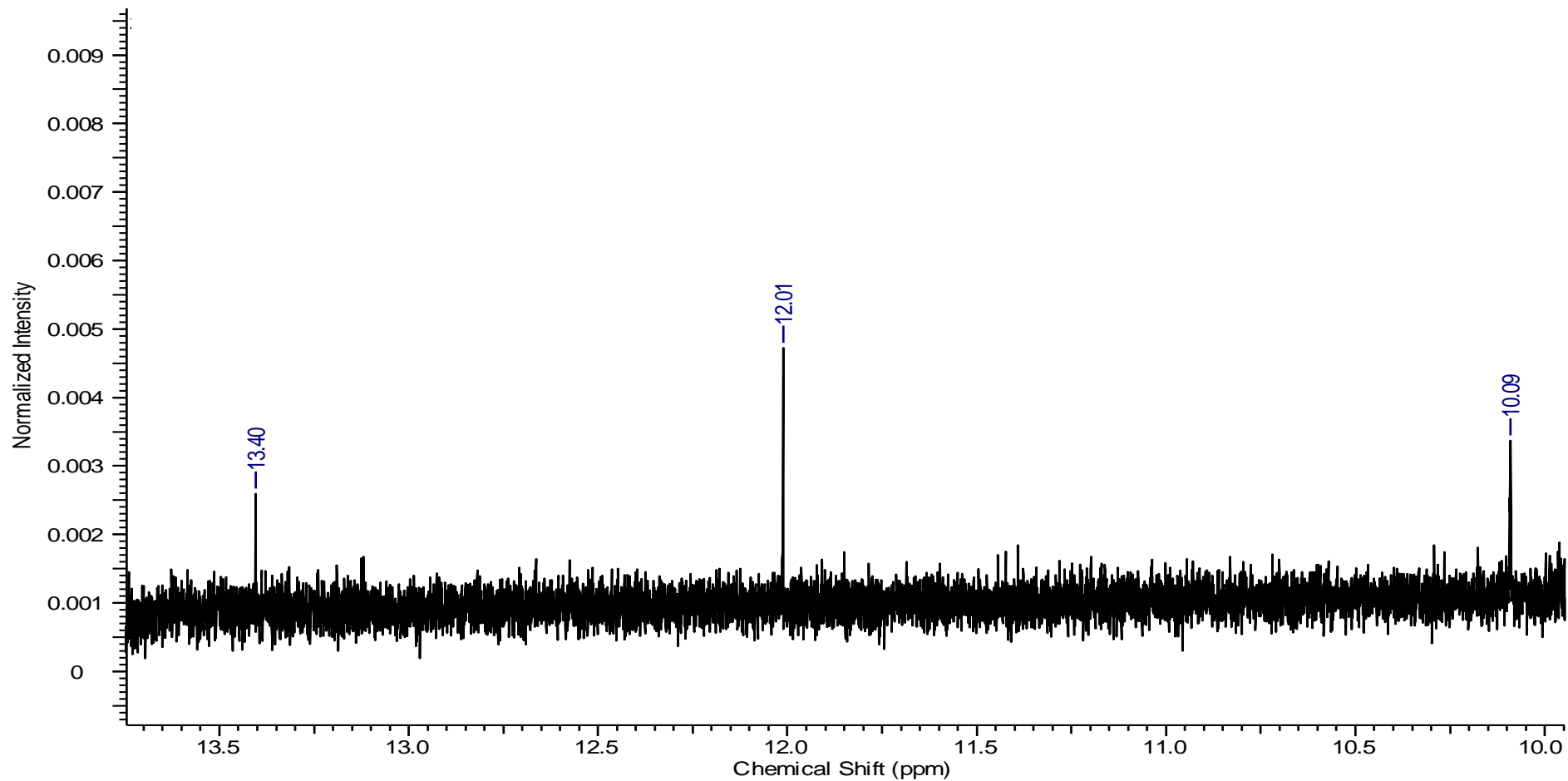
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.16-22



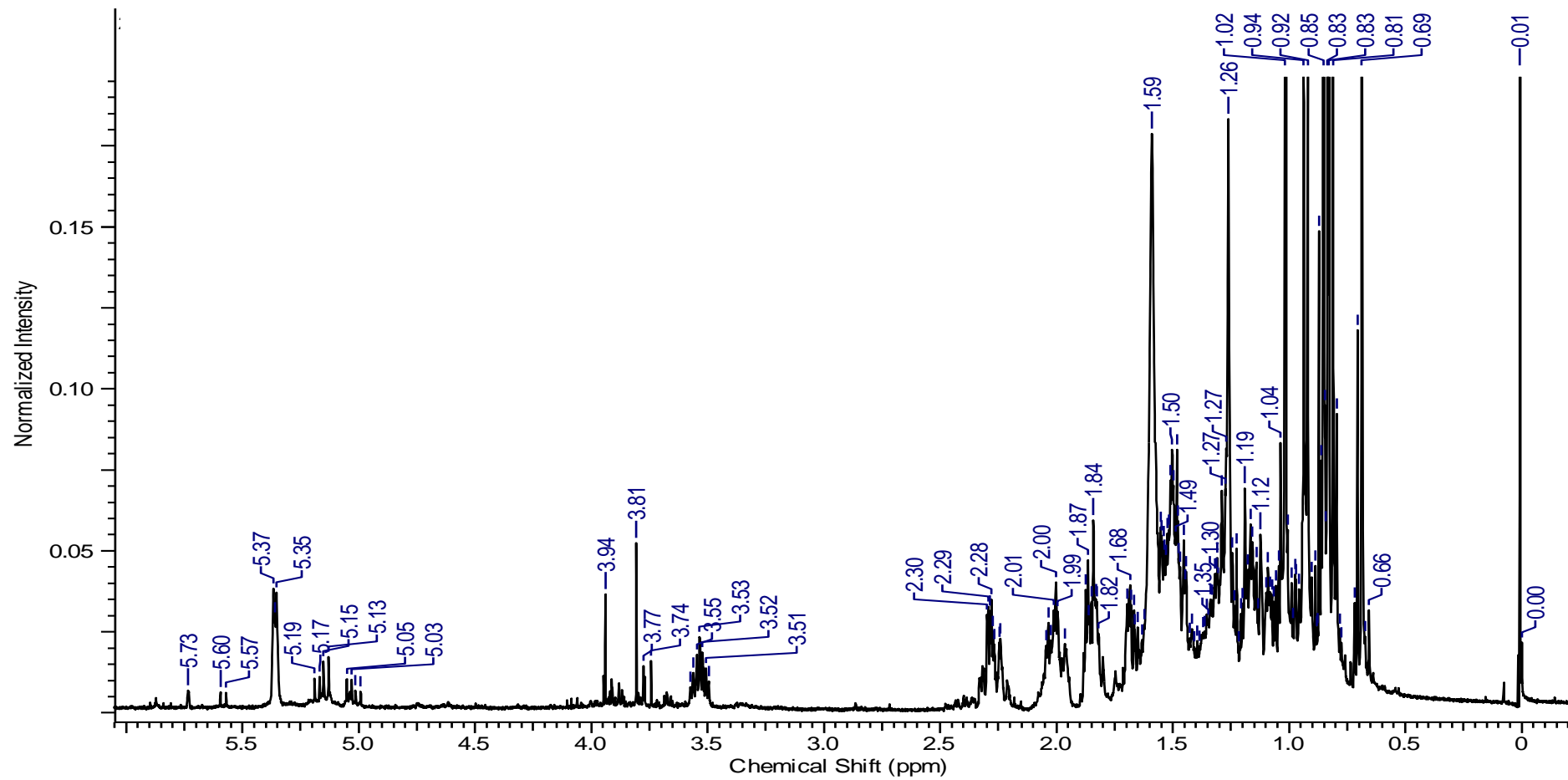
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.24-32



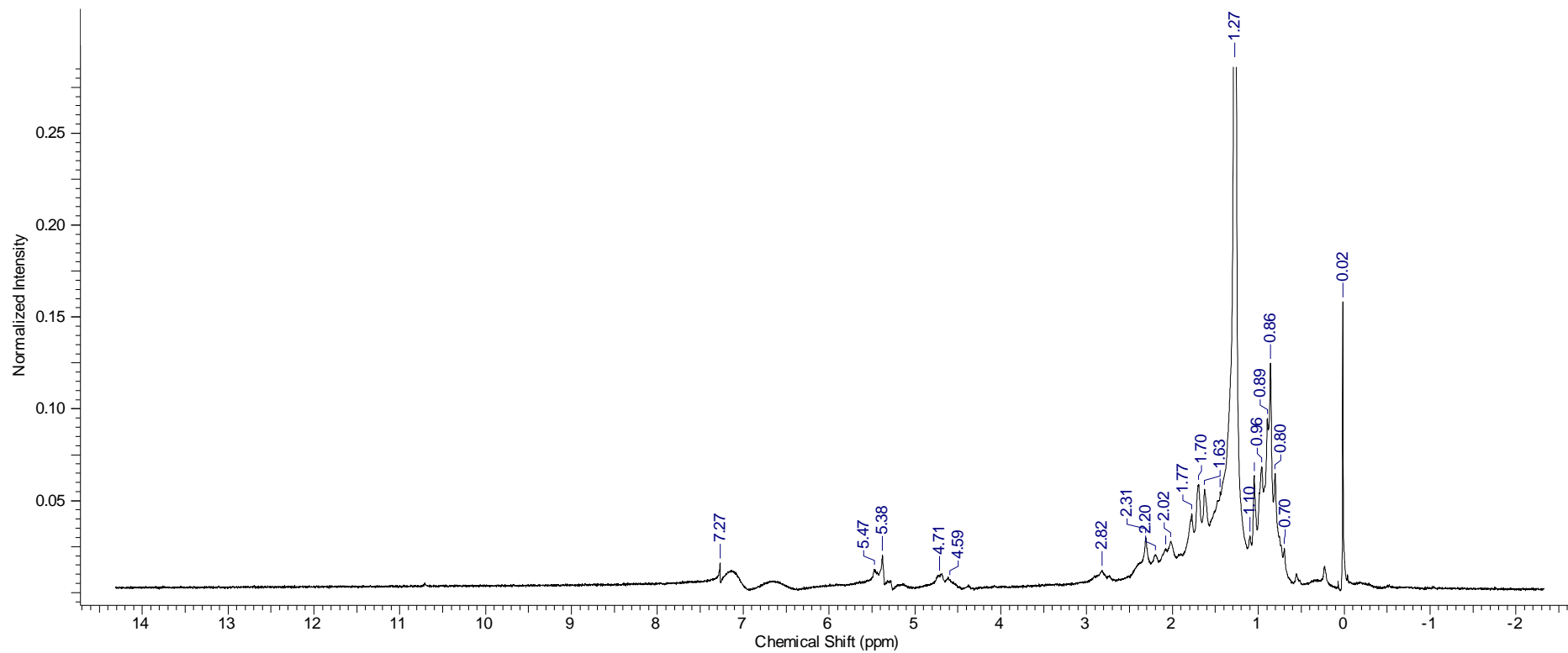
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.24-32



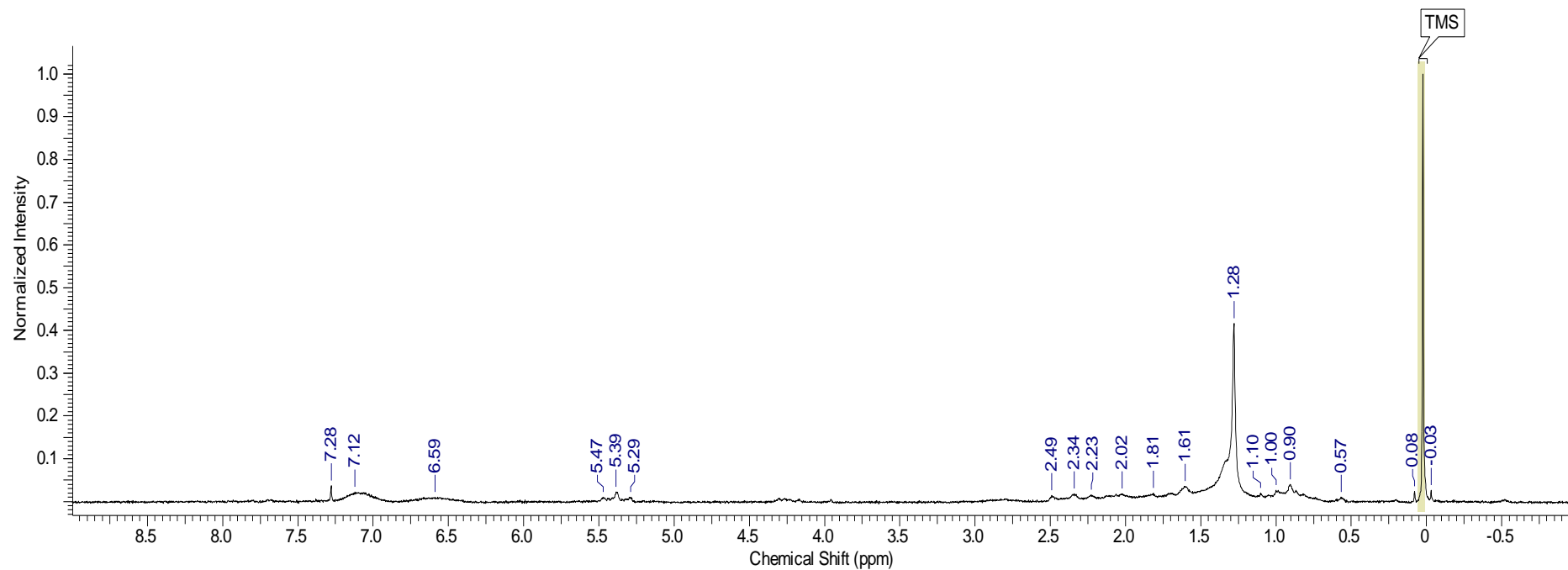
Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1/2 CaM 1.24-32



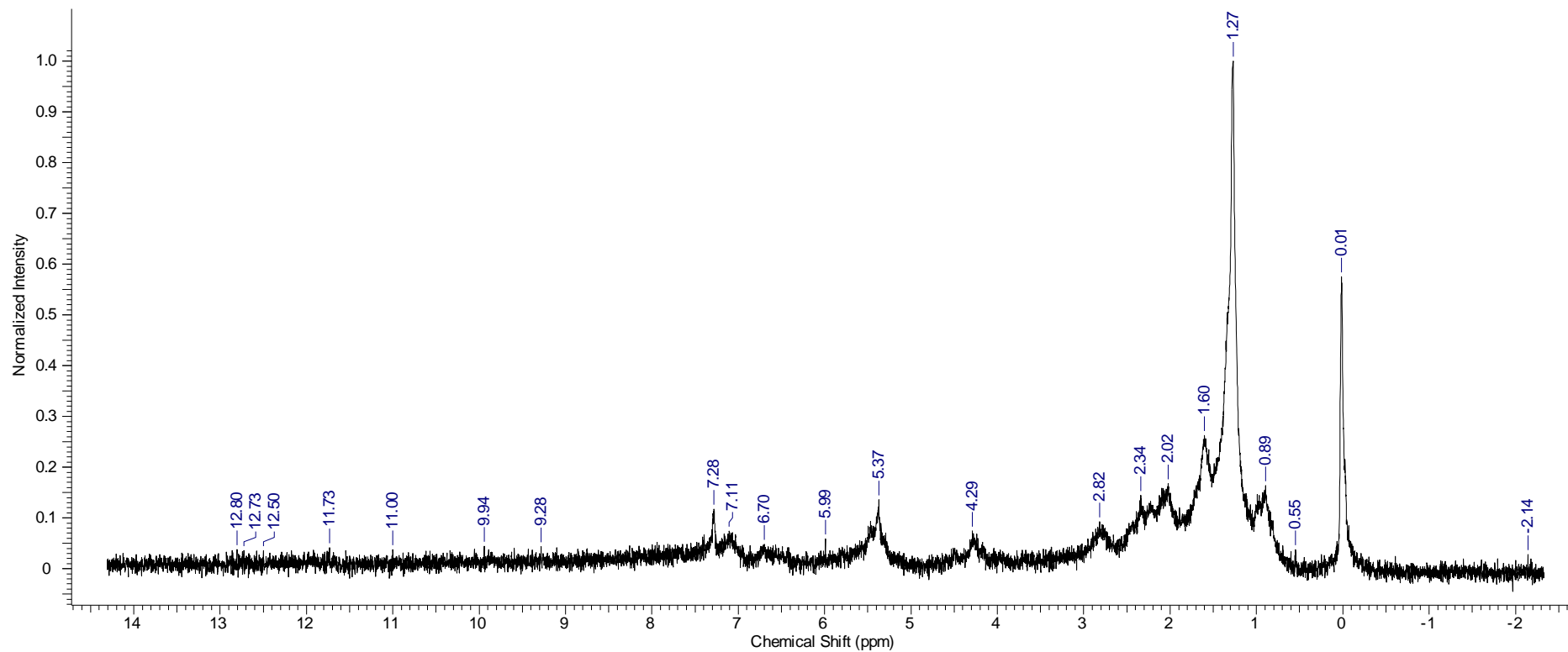
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (3-5)



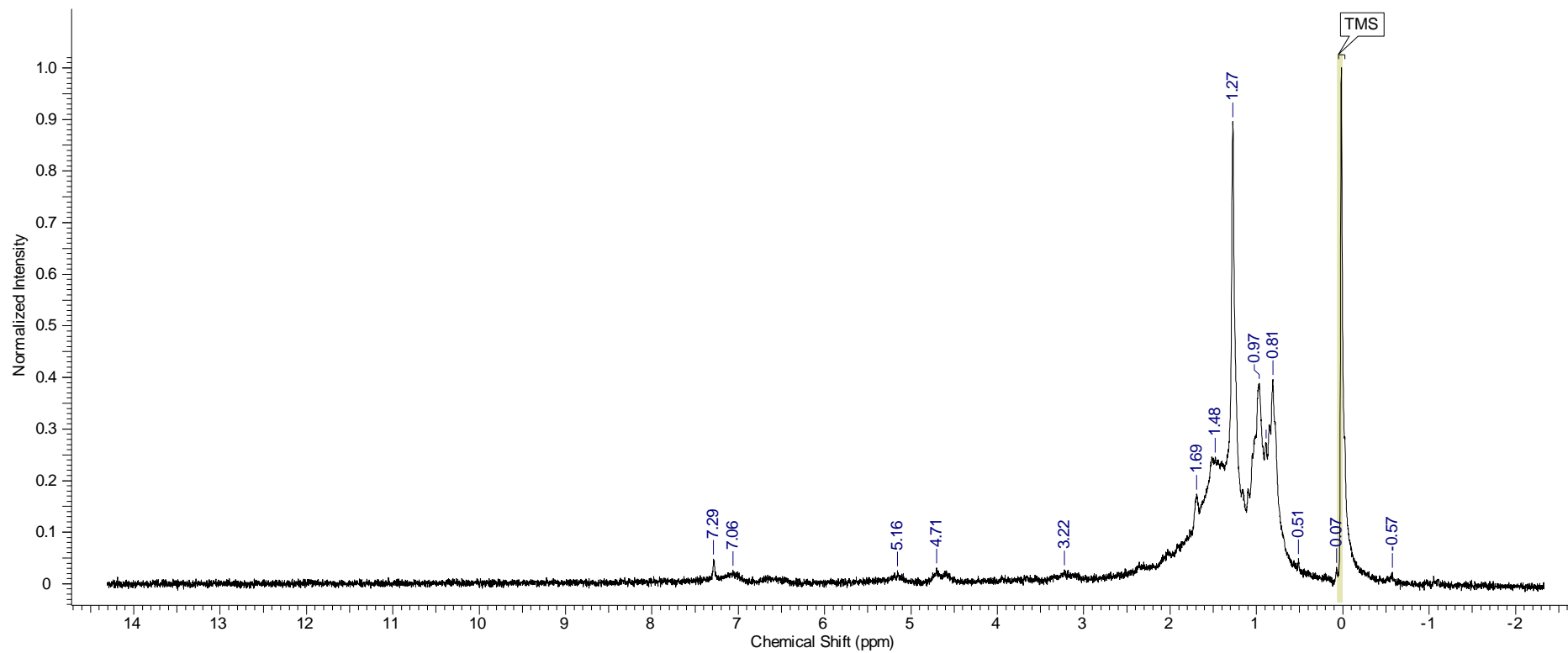
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (6-7)



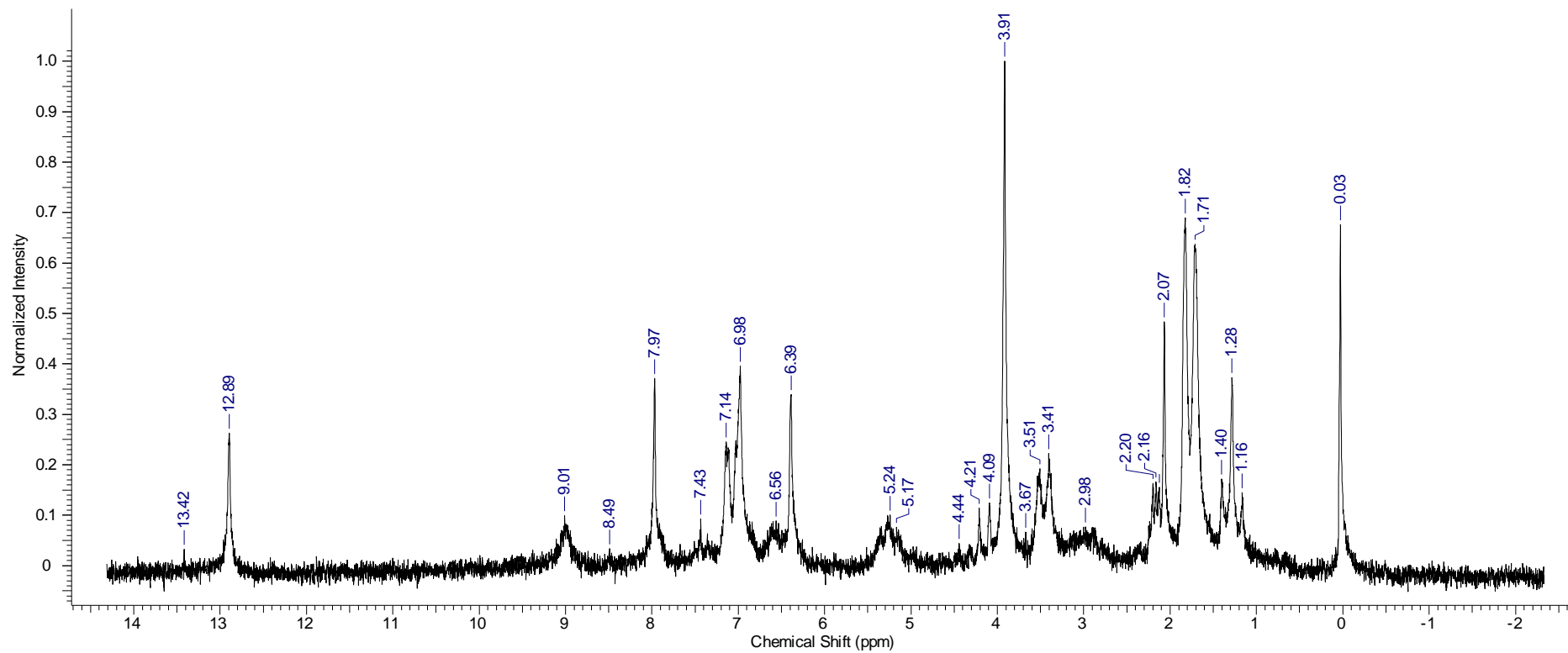
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (8-12)



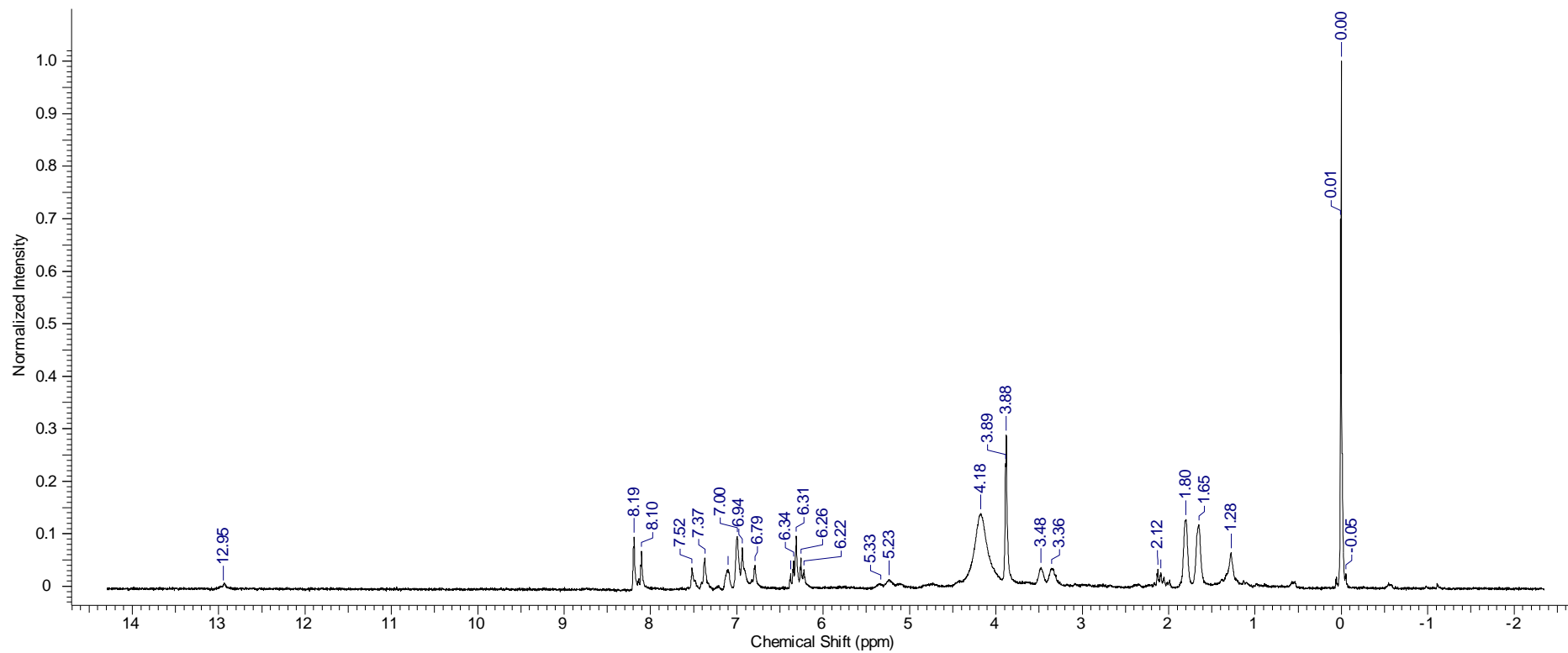
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (13-16)



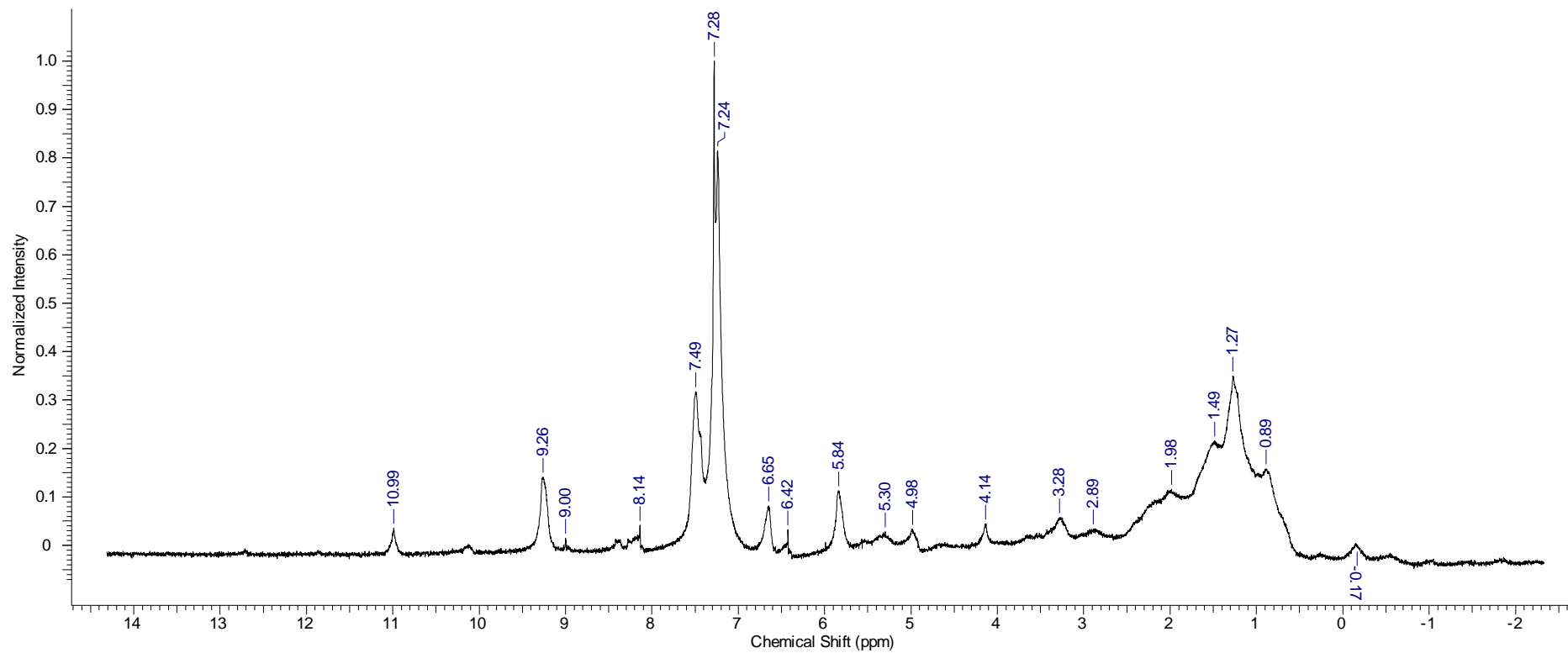
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (91-92)



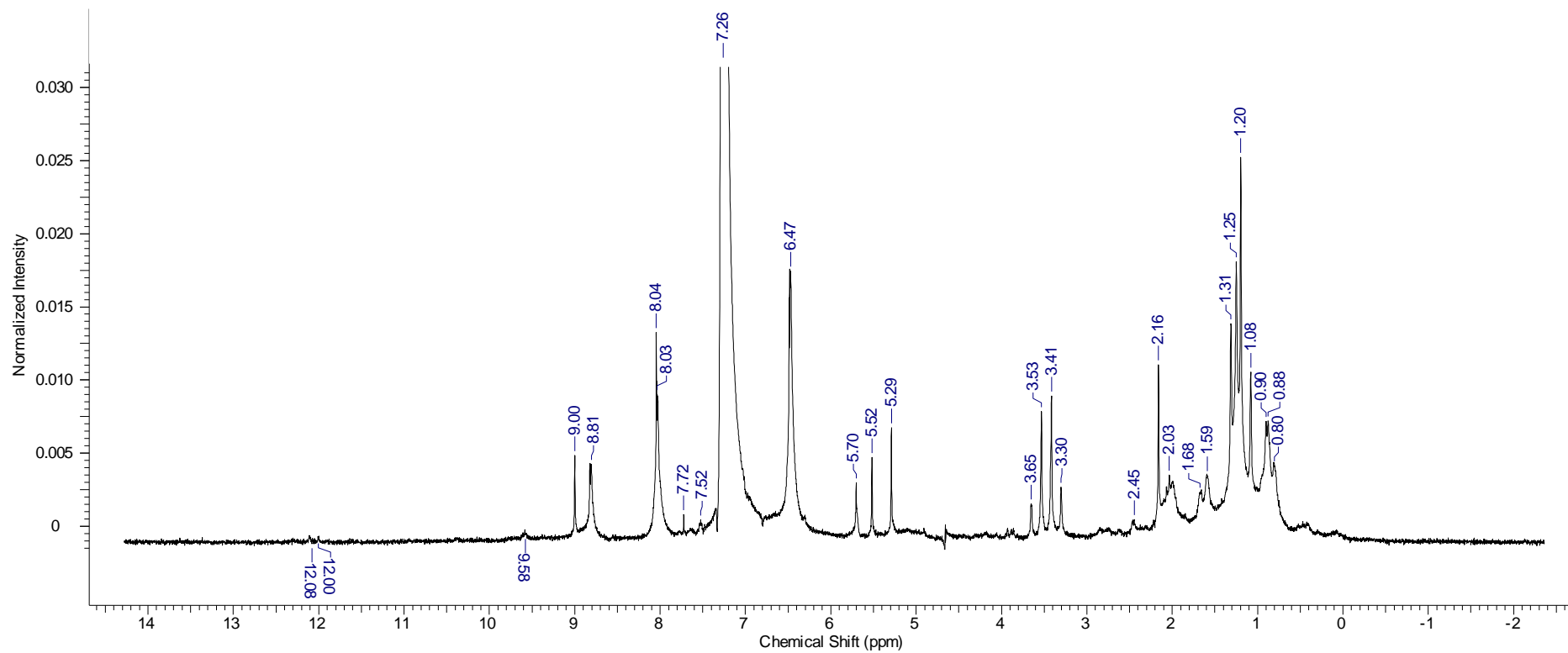
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 FLD (93-100)



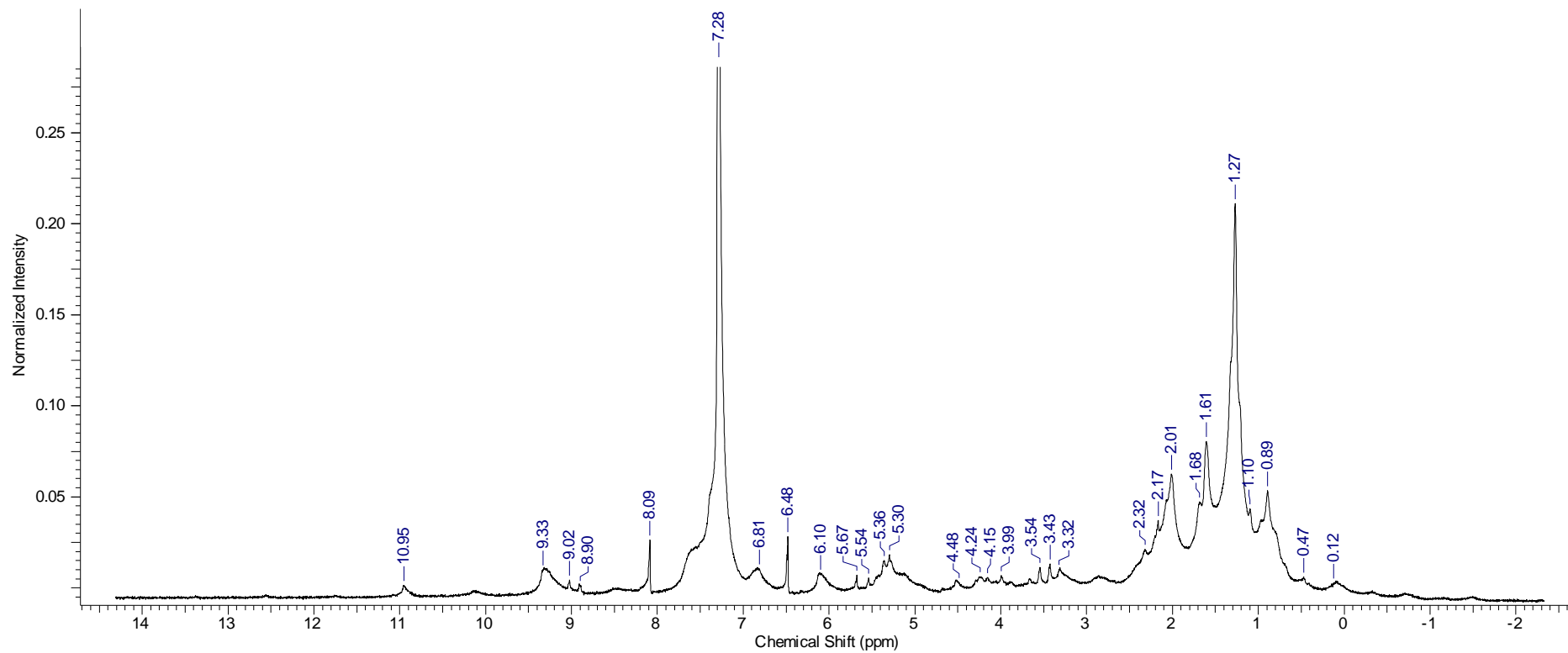
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(3)



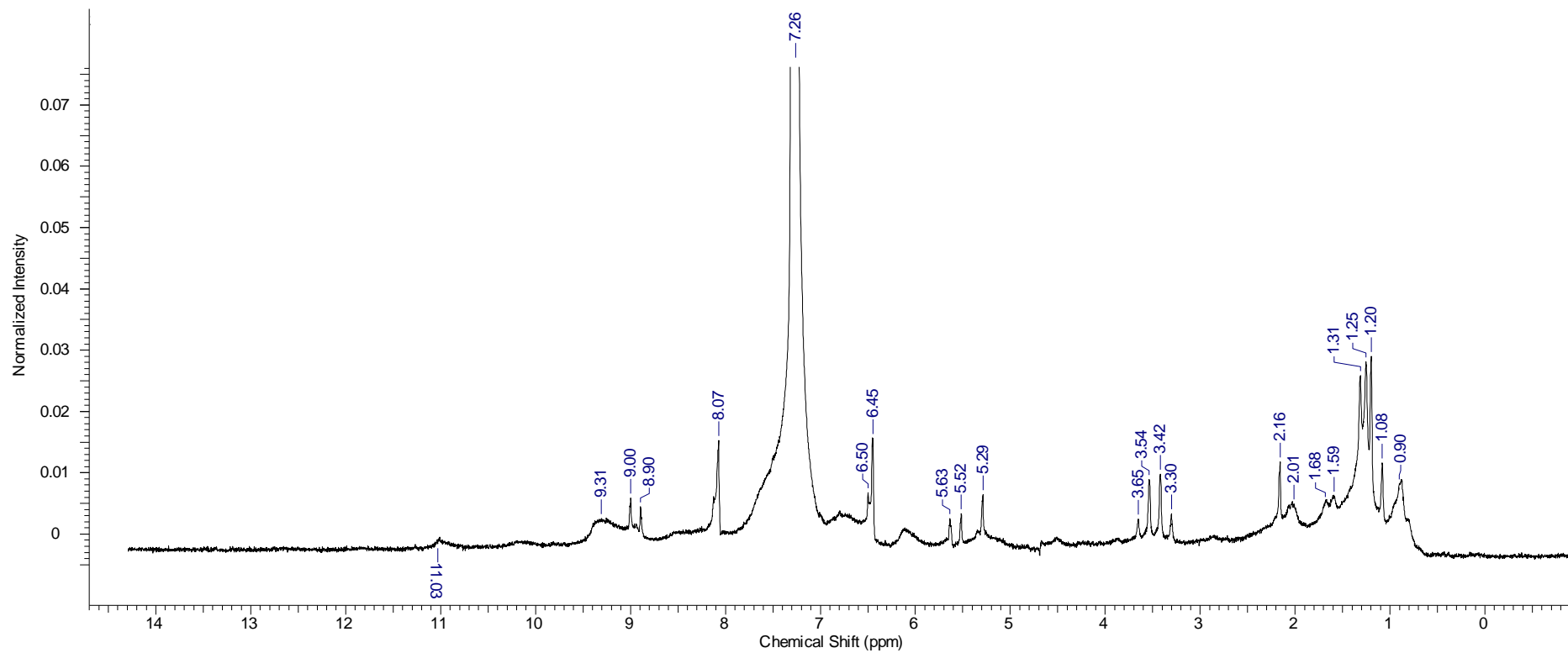
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(5-6)



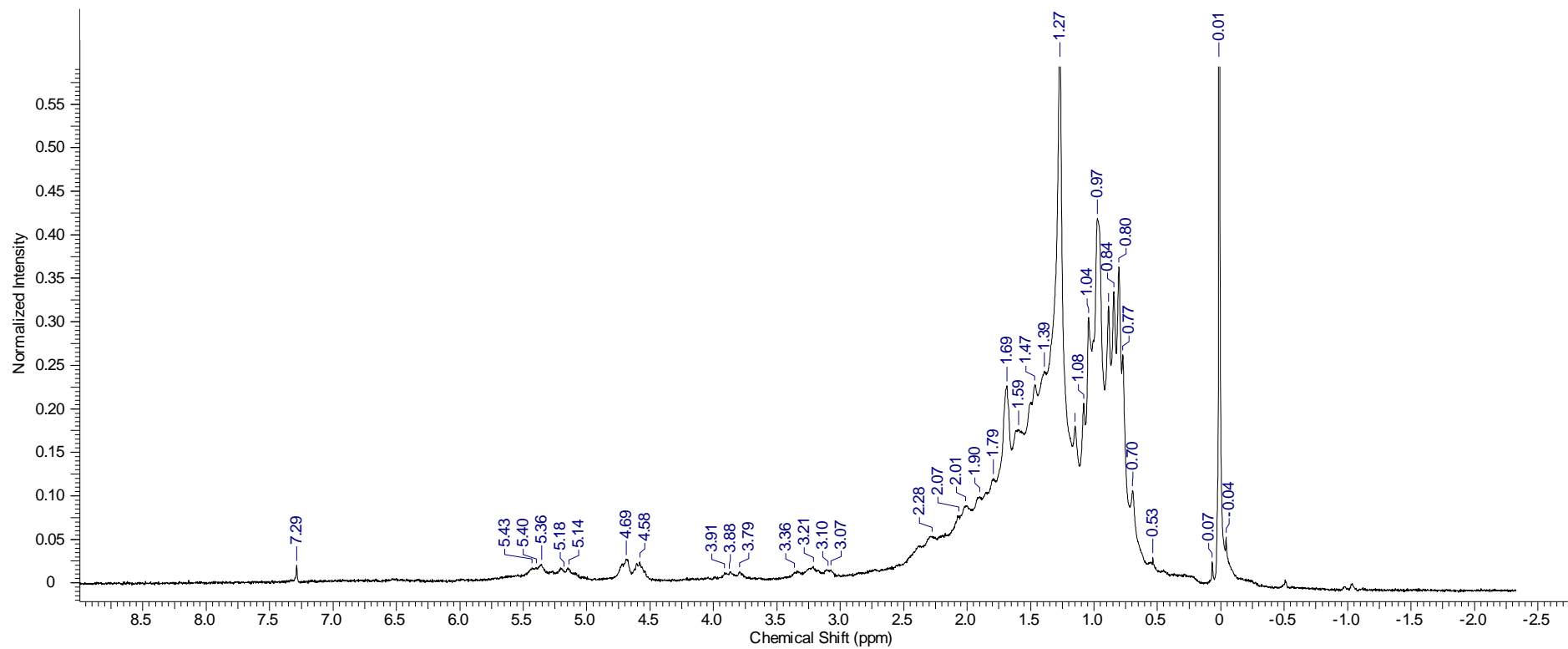
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(7-8)



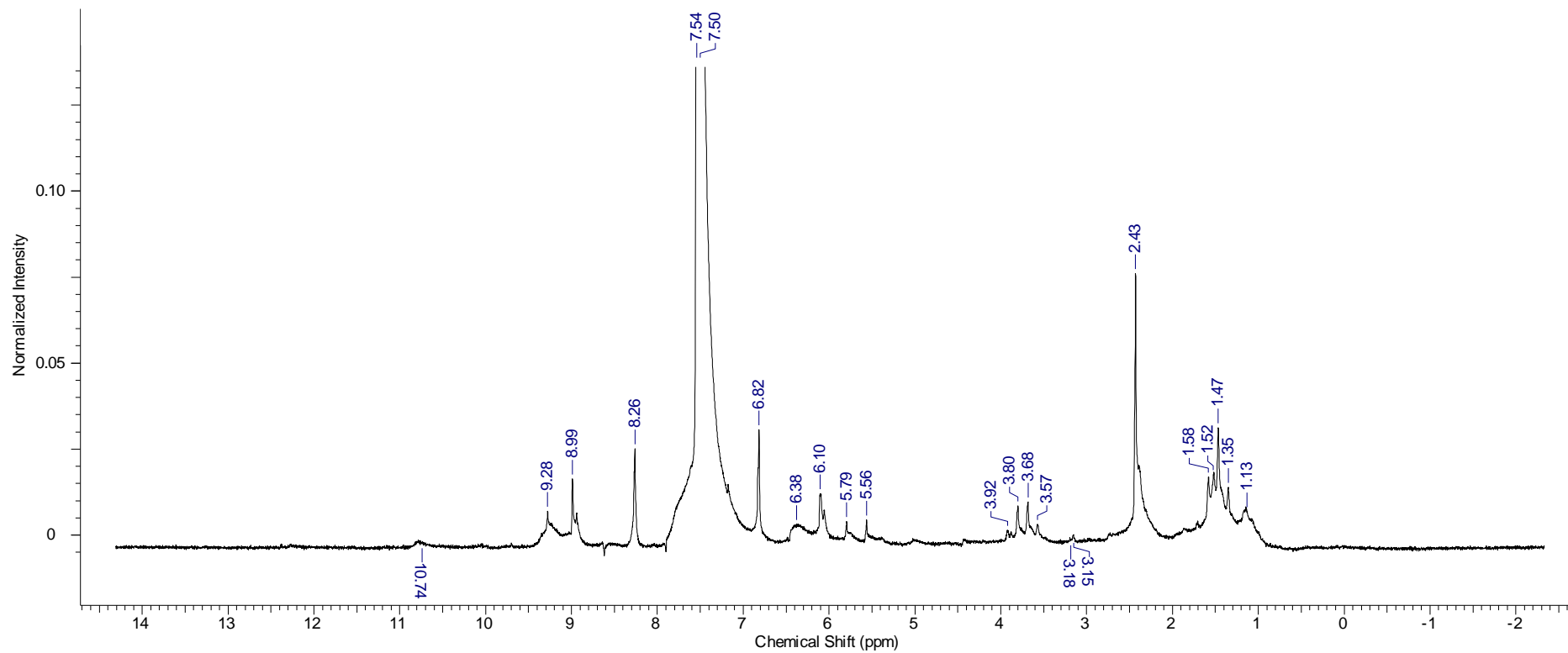
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(9)



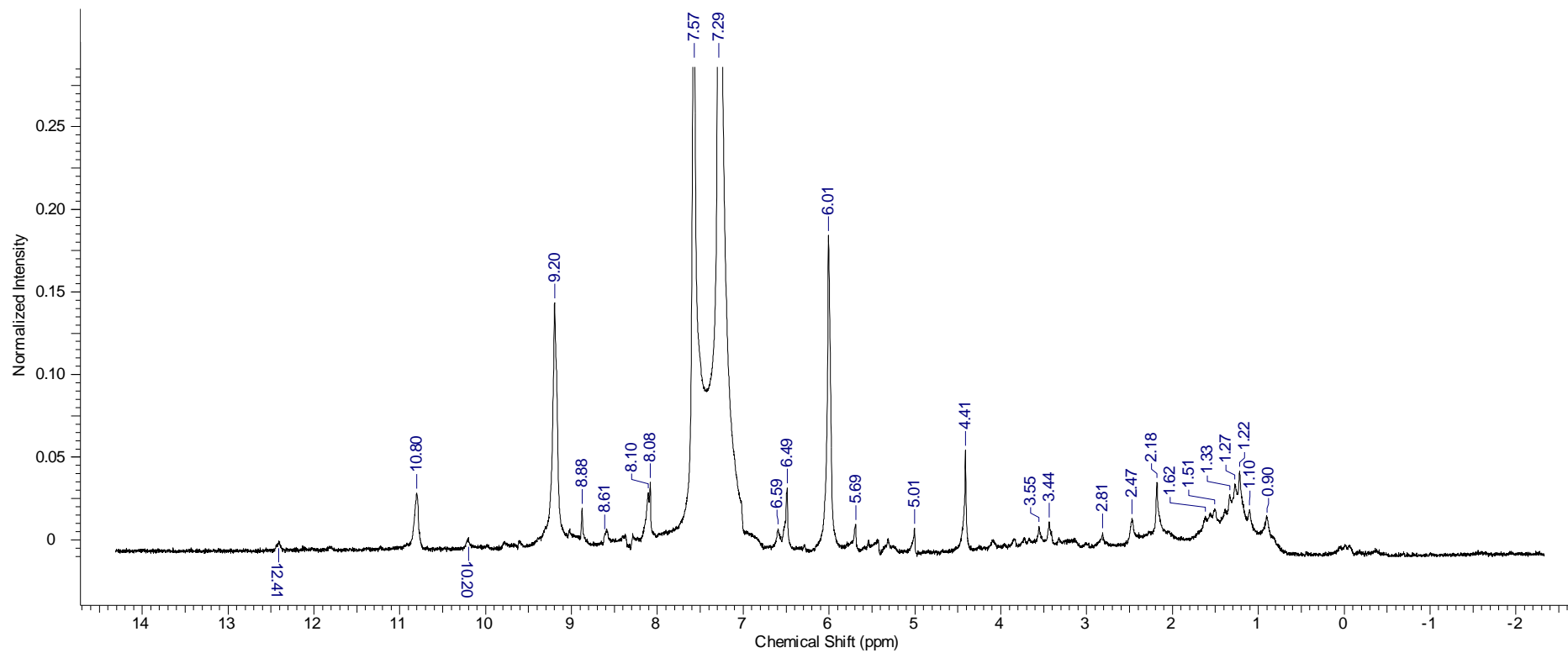
Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(11-12)



Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(5-6)(3)



Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1 CaD 1.1.(5-6)(4)



Espectro de RMN de ^1H (60 MHz) da fração 1/2 CaM 1.(12-15)(8-9)

