



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Myrciaria strigipes O. Berg (MYRTACEAE)**

RAFAEL DESTEFANI FAITANIN

VITÓRIA

2016



Rafael Destefani Faitanin

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Myrciaria strigipes O. Berg (MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Claudia Masrouah Jamal

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F174a Faitanin, Rafael Destefani, 1986 -
Avaliação do perfil químico e atividades biológicas de
Myrciaria strigipes O. Berg (Myrtaceae) / Rafael Destefani
Faitanin – 2016.
114 f. : il.

Orientador: Claudia Masrouah Jamal.
Coorientador: Rodrigo Rezende Kitagawa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Myrtaceae. 2. Avaliação. 3. Terpenos. I. Jamal, Claudia
Masrouah. II. Kitagawa, Rodrigo Rezende. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

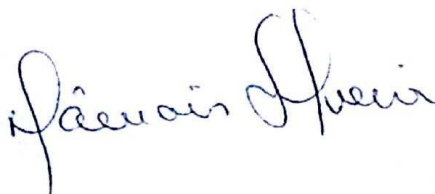
CDU: 61

Rafael Destefani Faitanin

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Myrciaria Strigipes* O. Berg (MYRTACEAE).**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 17/03/2016 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Profª Drª. Damaris Silveira / UnB



Profª Drª. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves / UFES



Profª. Drª. Claudia Masrouah Jamal (orientadora) / UFES

Vitória

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me guiar e sustentar em toda minha caminhada.

A meus pais, Luiz e Silene, por toda a dedicação, amor, auxílio, incentivo e educação que me proporcionam a cada dia, e a meus irmãos, Celso e Roberta, pelo carinho, companheirismo e incentivo. Agradeço também a todos os meus familiares pelo carinho e apoio incondicionais.

À minha namorada Beatriz por todo o amor, incentivo, compreensão, paciência, ajuda e conselhos.

À Prof^a. Dra. Claudia Masrouah Jamal pela orientação, ensinamentos, paciência e incentivo durante todo o período de realização deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com você.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório João Victor Dutra Gomes por todo apoio, ensinamentos e conversas durante toda a realização deste projeto.

Aos professores Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves pelos aprendizados e por todo o suporte disponibilizado em seu Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais. Agradeço também a todos os integrantes deste laboratório, em especial a Otálbio, João Paulo, Augusto e André pelo auxílio e amizade.

À Prof^a. Dra. Damaris Silveira pela oportunidade de conhecer e aprender novas técnicas no Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos da Universidade de Brasília. Não poderia deixar de agradecer ainda a equipe do laboratório, em especial a Patrícia, Márcia, Juliana, Paloma, Marcela e Paula.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes pela coleta e identificação botânica da espécie vegetal objeto de estudo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto e à equipe do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do LabPetro pela obtenção dos espectros.

Aos professores Dr. Warley de Souza Borges e Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves pelas correções e sugestões na qualificação do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores e colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas pelo apoio.

Aos colegas do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes pelo incentivo e compreensão nesses dois anos.

Aos colegas da primeira turma de mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFES.

Aos meus amigos por entenderem a minha ausência e me apoiarem à sua maneira.

“Ninguém é suficientemente perfeito que
não possa aprender com o outro, e
ninguém é totalmente destituído de valores
que não possa ensinar algo a seu irmão”.

São Francisco de Assis

RESUMO

O Brasil é o detentor da maior e mais rica diversidade genética em espécies de plantas, entretanto, a grande maioria carece de estudos sob o ponto de vista químico-biológico. *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae) é uma espécie nativa conhecida popularmente como “cambucá da praia” e “cabeludinha da praia” e usada na medicina tradicional para cãibra, edema e dor de barriga. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química e avaliar a toxicidade e as atividades antimicrobiana, antioxidante, trombolítica e de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e tirosinase de *M. strigipes*. O perfil químico foi obtido através de triagem fitoquímica clássica, da análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e de técnicas usuais de fracionamento/purificação. A toxicidade foi avaliada frente às larvas de *Artemia salina* Leach., e a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A atividade antioxidante foi mensurada frente aos radicais sintéticos DPPH e ABTS. A atividade trombolítica *in vitro* avaliou a capacidade dos extratos promoverem lise de coágulos. As atividades de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e tirosinase foram determinadas utilizando métodos espectrofotométricos *in vitro*. A análise fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos das folhas (EEF) e dos galhos (EEG) indicou a presença de flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, taninos, triterpenos, esteroides e antraquinonas, sendo esta detectada somente no EEF. Foram isolados e/ou identificados do EEF cinco compostos da classe dos terpenos, sendo quatro triterpenos pentacíclicos (friedelina, 28-hidroxifriedelina, glutinol e ácido ursólico) e um esteroide tetracíclico (β -sitosterol), e três compostos fenólicos (isoquercitrina, hiperosídeo e ácido elágico). O EEF demonstrou leve toxicidade (DL_{50} = 648,17 μ g/mL) e somente o EEG apresentou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *S. aureus*. Os EEF e EEG apresentaram capacidade antioxidante e promissora atividade de inibição sobre a α -glicosidase, CE_{50} de 40,66 e 18,52 μ g/mL, respectivamente, enquanto o controle positivo demonstrou CE_{50} de 37,30 μ g/mL. O presente trabalho relatou, pela primeira vez, aspectos químicos e atividades biológicas da espécie *M. strigipes*, e os resultados demonstram a necessidade de mais estudos para um maior conhecimento químico e esclarecimentos quanto ao(s) mecanismo(s) e substância(s) responsáveis pelas atividades demonstradas por essa espécie.

Palavras-chave: *Myrciaria strigipes*. Fitoquímica. Atividades biológicas.

ABSTRACT

Brazil is the owner of the largest and richest genetic diversity of plant species, however, most of them don't have chemical-biological studies. *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae) is a native species known popularly as "cambucá da praia" and "cabeludinha da praia" and it's used in traditional medicine for cramps, edema and abdominal pain. The aim of this study was to evaluate the chemical profile, the toxicity and the antimicrobial, antioxidant, thrombolytic activities and α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase enzymes inhibition activities of *M. strigipes*. The chemical profile was characterized from phytochemical screening, High Performance Liquid Chromatography analysis and the fractionation/purification techniques. The toxicity was determined against larvae of *Artemia salina* Leach. and the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The antioxidant activity was measured using the synthetic radicals DPPH and ABTS. The *in vitro* thrombolytic activity was evaluated through the extracts capacity to cause lysis in human blood clot. The inhibitory activities of α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase enzymes were determined using *in vitro* spectrophotometric methods. Preliminary phytochemical analysis of ethanolic extracts of leaves (EEF) and branches (EEG) indicated the presence of flavonoids, coumarins, alkaloids, saponins, tannins, triterpenes, steroids and anthraquinones, yet this was only found in the EEF. They were isolated and/or identified of the EEF five compounds of terpenes class, four pentacyclic triterpenes (friedelin, 28-hydroxyfriedelin, glutinol and ursolic acid) and a tetracyclic steroid (β -sitosterol), and three phenolic compounds (isoquercitrin, hyperoside and ellagic acid). The EEF showed a little toxicity (LD_{50} = 648.17 μ g/mL) and only the EEG showed antimicrobial activity, inhibiting the growth of *S. aureus*. The EEF and EEG showed antioxidant capacity and promising inhibitory activity on α -glucosidase, EC_{50} of 40,66 e 18,52 μ g/mL, respectively, while the positive control showed EC_{50} of 37,30 μ g/mL. This study reported, for the first time, chemical aspects and biological activities of *M. strigipes* species, and the results demonstrate the need for more studies to further chemical knowledge and understanding about the mechanism(s) and substance(s) responsible for activities shown by this species.

Keywords: *Myrciaria strigipes*. Phytochemistry. Biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de compostos de origem vegetal utilizados clinicamente.	18
Figura 2 - Estruturas químicas de compostos detectados em espécies da família Myrtaceae.....	21
Figura 3 - Estruturas químicas de compostos identificados em espécies do gênero <i>Myrciaria</i>	23
Figura 4 - Estruturas químicas da acarbose, miglitol e voglibose.....	28
Figura 5 - Ligações dos átomos de cobre com oxigênio molecular e resíduos de histidina no sítio ativo da enzima tirosinase.	29
Figura 6 - Biossíntese da eumelanina.	30
Figura 7 - Estruturas químicas da hidroquinona, ácido kójico e arbutina.	31
Figura 8 - <i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg. (A) Árvore adulta; (B) Detalhe de um ramo florífero; (C) Fruto; (D) Semente; (E) Tronco.....	32
Figura 9 - Redução do radical DPPH por um composto antioxidante genérico.....	45
Figura 10 - Redução do ABTS ^{•+} por um composto antioxidante.....	46
Figura 11 - Reação do DNS com o açúcar redutor.	48
Figura 12 - Curva de calibração com rutina, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).....	53
Figura 13 - Perfil cromatográfico do EEF a 354 nm em CLAE, destacando os sinais 1, 2 e 3.	54
Figura 14 - Perfis de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do EEF, comparados com padrões. (A) Perfil de absorção do sinal 1 comparado com ácido elágico; (B) Perfil de absorção do sinal 2 comparado com hiperosídeo e isoquercitrina; (C) Perfil de absorção do sinal 3 comparado com hiperosídeo e isoquercitrina.	54
Figura 15 - Estrutura química do ácido elágico.	54
Figura 16 - Estrutura química do hiperosídeo (A) e da isoquercitrina (B).....	55
Figura 17 - Perfil cromatográfico do EEG a 354 nm em CLAE, destacando os sinais 1 e 2.	55

Figura 18 - Perfil de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) do sinal 1 do cromatograma do EEG, comparado com ácido elágico.	55
Figura 19 - Perfil de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) do sinal 2 do cromatograma do EEG.....	56
Figura 20 - Curva de calibração do ácido elágico, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).....	56
Figura 21 - Espectro de RMN ^1H de R_1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	57
Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C de R_1 (CDCl_3 , 100 MHz).	58
Figura 23 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_1 (CDCl_3 , 100 MHz).	58
Figura 24 - Estrutura química da substância R_1 , identificada como friedelina.....	60
Figura 25 - Espectro de RMN ^1H de R_2 (CDCl_3 , 400 MHz).....	61
Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C de R_2 (CDCl_3 , 100 MHz).	61
Figura 27 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_2 (CDCl_3 , 100 MHz).	62
Figura 28 - Estrutura química da substância R_2 , identificada como glutinol.....	62
Figura 29 - Espectro de RMN ^1H de R_3 (CDCl_3 , 400 MHz).....	65
Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C de R_3 (CDCl_3 , 100 MHz).	65
Figura 31 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_3 (CDCl_3 , 100 MHz).	66
Figura 32 - Estrutura química da substância R_3 , identificada como β -sitosterol.....	66
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H de R_4 (CDCl_3 , 400 MHz).....	68
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C de R_4 (CDCl_3 , 100 MHz).	69
Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_4 (CDCl_3 , 100 MHz).	69
Figura 36 - Estrutura química da substância R_4 , identificada como 28-hidroxifriedelina.	71
Figura 37 - Espectro de RMN ^1H de R_5 (CDCl_3 , CD_3OD , 400 MHz).....	72
Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C de R_5 (CDCl_3 , CD_3OD , 100 MHz).	72
Figura 39 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_5 (CDCl_3 , CD_3OD , 100 MHz).	73
Figura 40 - Estrutura química da substância R_5 , identificada como ácido ursólico. ...	73
Figura 41 - Resultado dos ensaios de captura do radical DPPH pelos EEF, EEG e TROLOX.....	76
Figura 42 - Resultado dos ensaios de captura do radical ABTS pelos EEF, EEG e TROLOX.....	77

Figura 43 - Grupamentos químicos importantes para o desempenho da atividade antioxidante de flavonoides.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição para a análise por CLAE - DAD.....	38
Tabela 2 - Classes químicas detectadas nos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	52
Tabela 3 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R ₁ em RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e friedelina	59
Tabela 4 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R ₂ em RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e glutinol	63
Tabela 5 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R ₃ em RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e β -sitosterol	67
Tabela 6 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R ₄ em RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) e 28-hidroxifriedelina.....	70
Tabela 7 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R ₅ em RMN ¹³ C (CDCl ₃ , CD ₃ OD, 100 MHz) e ácido ursólico	74
Tabela 8 - Atividade trombolítica dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> , estreptoquinase e veículos de solubilização.....	78

LISTA DE SIGLAS

ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA – Análise de variância
ATCC - American Type Culture Collection
CCD – Cromatografia em camada delgada
CE₅₀ – Concentração eficaz 50%
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD – Detector *diodo array*
DL₅₀ – Dose letal 50%
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEF – Extrato etanólico das folhas
EEG – Extrato etanólico dos galhos
ER – Espécies reativas
OMS – Organização Mundial de Saúde
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas
SUS – Sistema Único de Saúde
Tr – Tempo de retenção
UV – Ultravioleta
UV-Vis – Ultravioleta-visível
pNP – p-nitrofenol
pNPG – p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	PLANTAS MEDICINAIS	17
1.2	FAMÍLIA MYRTACEAE	20
1.3	GÊNERO <i>Myrciaria</i>	22
1.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	23
1.4.1	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	24
1.4.2	Atividade antimicrobiana.....	24
1.4.3	Atividade antioxidante.....	25
1.4.4	Atividade trombolítica	26
1.4.5	Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase.....	26
1.4.6	Inibição da enzima tirosinase	28
1.5	ESPÉCIE ESTUDADA: <i>Myrciaria strigipes</i> O. Berg (MYRTACEAE).....	32
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	34
3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	34
3.3	DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO	34
3.3.1	Triagem fitoquímica preliminar dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	34
3.3.2	Quantificação de flavonoides nos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	36
3.3.3	Análise dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.3.4	Fracionamento cromatográfico do EEF de <i>M. strigipes</i>	38
3.3.5	Isolamento de constituintes químicos do EEF de <i>M. strigipes</i>	39
3.3.5.1	Fração 109.....	39
3.3.5.2	Frações 110 - 116.....	39
3.3.5.3	Fração 117.....	39
3.3.5.4	Frações 132 - 137.....	39
3.3.5.5	Frações 167 - 168.....	39
3.3.5.6	Fração 169.....	40

3.3.5.7	Frações 213 – 217	40
3.3.5.8	Frações 247 - 248.....	41
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	41
3.4.1	Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	41
3.4.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	42
3.4.2.1	Preparação das soluções dos extratos	42
3.4.2.2	Preparação dos discos	42
3.4.2.3	Preparação dos meios de cultura	42
3.4.2.4	Preparação dos inóculos	43
3.4.2.5	Ensaio de disco-difusão em ágar.....	43
3.4.3	Avaliação da atividade antioxidante dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	44
3.4.3.1	Ensaio de captura do radical DPPH.....	44
3.4.3.2	Ensaio de captura do radical ABTS	46
3.4.3.3	Análise estatística da atividade antioxidante	47
3.4.4	Avaliação da atividade trombolítica dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	47
3.4.5	Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> sobre as enzimas α -amilase, α -glicosidase e tirosinase	48
3.4.5.1	Determinação da atividade de inibição sobre a α -amilase.....	48
3.4.5.2	Determinação da atividade de inibição sobre a α -glicosidase	49
3.4.5.3	Determinação da atividade de inibição sobre a tirosinase	50
3.4.5.4	Determinação da porcentagem de inibição enzimática.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	PERFIL QUÍMICO	52
4.1.1	Rendimento dos extratos.....	52
4.1.2	Triagem fitoquímica preliminar dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	52
4.1.3	Quantificação de flavonoides nos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	52
4.1.4	Análise dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> em CLAE	53
4.1.5	Quantificação de ácido elágico por CLAE nos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> ..	56
4.1.6	Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos isolados do EEF de <i>M. strigipes</i>	57
4.1.6.1	R ₁	57
4.1.6.2	R ₂	60
4.1.6.3	R ₃	64

4.1.6.4	R ₄	68
4.1.6.5	R ₅	71
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	75
4.2.1	Avaliação da toxicidade dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	75
4.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	75
4.2.3	Avaliação da atividade antioxidante dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	76
4.2.3.1	Ensaio de captura do radical DPPH.....	76
4.2.3.2	Ensaio de captura do radical ABTS.....	77
4.2.4	Avaliação da atividade trombolítica dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i>	78
4.2.5	Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> sobre a α -amilase.....	78
4.2.6	Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> sobre a α -glicosidase.....	78
4.2.7	Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de <i>M. strigipes</i> sobre a tirosinase.....	79
5	DISCUSSÃO.....	80
6	CONCLUSÃO.....	92
7	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	108
	APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO.....	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde o início da civilização que o homem utiliza espécies vegetais para fins de tratamento e cura de doenças e sintomas. Um dos principais registros farmacêuticos conhecido é o “*Ebers Papyrus*”, datado de cerca de 1.500 a.C., no qual estão documentados cerca de 700 fármacos, sendo a maioria com base em plantas. Além desse, existem vários outros registros que demonstram o uso de plantas com finalidade terapêutica em épocas antes de Cristo, como registros da Mesopotâmia datados de aproximadamente 2.100 a.C. e a existência de uma lista chinesa de plantas medicinais com suas respectivas indicações e doses sugeridas, datada de 500 a.C. (CRAGG; NEWMAN, 2014).

Essa prática milenar permanece ao longo dos anos, sendo utilizada por grande parte da população mundial como alternativa de tratamento para várias doenças, principalmente por populações mais carentes que tem pouco acesso a medicamentos industrializados (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que possivelmente 70-95% da população na maioria dos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África, América Latina e Oriente Médio, utiliza a medicina tradicional, incluindo o uso de plantas medicinais, para os cuidados primários à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

O estudo de plantas conhecidas historicamente por terem propriedades medicinais é uma importante ferramenta na pesquisa de novas substâncias biologicamente ativas, visto que muitos compostos isolados dessa fonte natural tornaram-se importantes medicamentos e foram cruciais no estímulo à formação da moderna indústria farmacêutica (RISHTON, 2008).

Estima-se que pelo menos 25% dos medicamentos disponíveis são derivados direta ou indiretamente de compostos bioativos provenientes de espécies vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Cerca de 120 compostos, obtidos de 90 espécies de plantas, são utilizados clinicamente (CALIXTO; YUNES, 2001). Além disso, a presença de 28 medicamentos exclusivamente originários de plantas, dentre

a lista dos 252 medicamentos considerados como essenciais e básicos pela OMS, reitera a importância das espécies vegetais como fonte de compostos bioativos (RATES, 2001).

Dentre os medicamentos provenientes de espécies vegetais pode-se citar o taxol, obtido de *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento do câncer; a morfina, isolada da espécie *Papaver somniferum*, tornou-se o grande protótipo da classe dos hipnoanalgésicos; a vincristina e vimblastina, obtidas de *Catharanthus roseus*, utilizadas no tratamento do câncer; a pilocarpina, isolada das folhas de espécies de *Pilocarpus*, utilizada no tratamento de certas formas de glaucoma; e a artemisinina, obtida de *Artemisia annua*, potente fármaco antimalárico (Figura 1) (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2014).

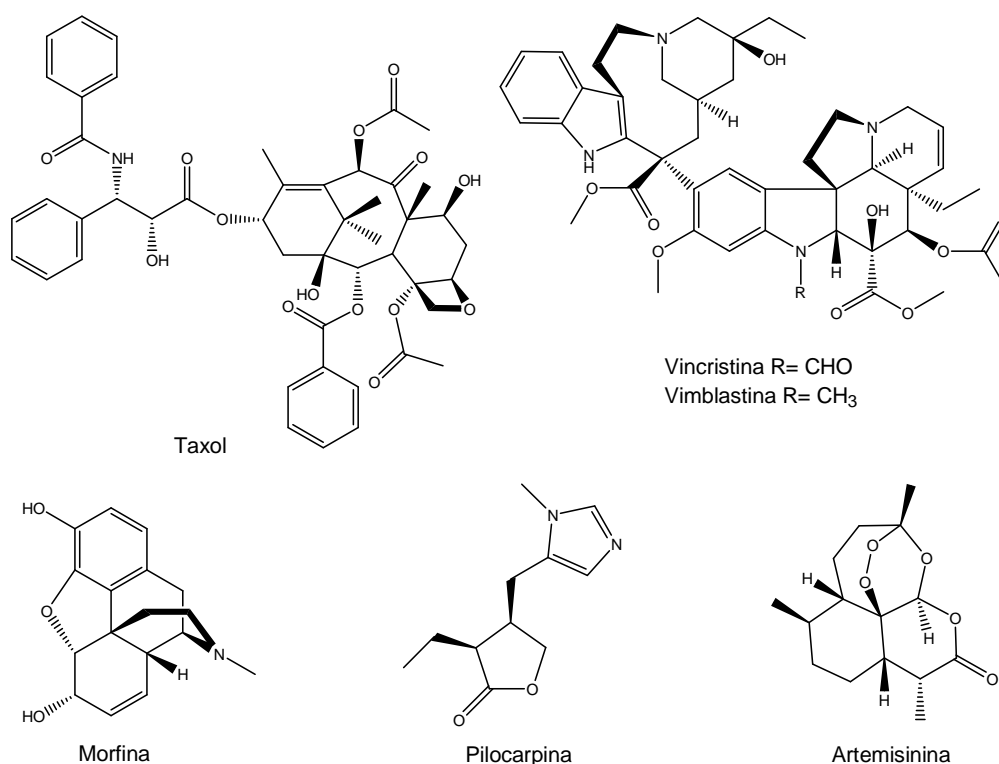


Figura 1 - Estruturas químicas de compostos de origem vegetal utilizados clinicamente.

O metabolismo secundário das plantas é o responsável por originar essas e várias outras moléculas bioativas. Os compostos originários desse metabolismo caracterizam-se como elementos de diferenciação e especialização, garantindo vantagens para a sobrevivência e perpetuação das espécies vegetais. Tais compostos desempenham muitas funções nas plantas, como, por exemplo, funções adaptativas (proteção contra perda de água e irradiação), funções na reprodução

(atração de insetos polinizadores) e funções de defesa (herbívoros e microrganismos) (GARCÍA; CARRIL, 2009).

A obtenção e identificação desses compostos bioativos e a realização de ensaios biológicos demandam um longo tempo e também muitos recursos financeiros. Eventualmente todo esse processo resulta em substâncias já conhecidas e em quantidades insuficientes para realização de testes biológicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004). Por outro lado, a manutenção do interesse em investigar espécies vegetais como possíveis fontes de substâncias bioativas decorre de características peculiares de compostos obtidos. Dentre estas características pode-se destacar, principalmente, a grande diversidade e a alta complexidade estrutural das moléculas e os mecanismos de ação, muitas vezes inéditos, pelos quais essas moléculas exercem seus efeitos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014). Ademais, a riqueza da flora brasileira e sua potencialidade como fonte de substâncias úteis também contribuem para que o interesse em espécies vegetais seja cada vez maior (CRAGG; NEWMAN, 2014).

Apesar do grande potencial demonstrado pelas plantas, somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e uma porcentagem menor ainda tem suas propriedades farmacológicas devidamente estudadas (RATES, 2001). Dentre todos os países do mundo, o Brasil é o detentor da maior e mais rica diversidade genética em espécies de plantas, com aproximadamente 55 mil espécies (BARREIRO; BOLZANI, 2009), porém, menos de 10% foram avaliadas quanto as suas características biológicas e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (LUNA et al., 2005).

Após levantamento bibliográfico verificou-se que a espécie vegetal *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae), popularmente conhecida como “cambucá da praia”, “cabeludinha da praia”, “ubanaxica” e “manaxica”, usada na medicina tradicional para cãibra, edema e dor de barriga (SOUZA et al., 2014), é uma dessas espécies que carecem de estudos no que se refere a sua caracterização química e possíveis atividades biológicas.

1.2 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae compreende aproximadamente 121 gêneros e cerca de 3.800 a 5.800 espécies, sendo plantas arbustivas ou arbóreas de distribuição predominantemente pantropical e subtropical (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011), com concentração na região neotropical, sudeste da Ásia e Austrália (REYNERTSON et al., 2008).

Essa representa uma das maiores, mais comuns e diversificadas famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies. Representantes dessa família possuem grande importância econômica, além de serem utilizadas, inclusive, como plantas ornamentais, alimentos e na medicina popular (SOUZA; LORENZI, 2005).

Do ponto de vista econômico, destaca-se o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) com várias espécies sendo utilizadas principalmente para obtenção de madeira, como matéria-prima para fabricação de produtos de limpeza e aromatizantes. Como ornamentais merecem destaque a eugênia (*Eugenia sprengelii*), a papuleira (*Melaleuca leucadendra*), a falsa-érica (*Leptospermum scoparium*) e a escova-de-garrafa (*Callistemon citrinus*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Muitas espécies dessa família produzem frutos comestíveis que se destacam na alimentação, como, por exemplo, a goiabeira (*Psidium guajava*), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*) (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Na medicina popular, várias espécies da família Myrtaceae são utilizadas, principalmente como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, antidiarreicos, antirreumáticos e hipocolesterolêmicos (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). A presença de 4 espécies dessa família, *Eugenia uniflora*, *Eucalyptus globulus*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini*, entre as 71 espécies vegetais com potencial farmacológico presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) reforça sua grande importância (BRASIL, 2009).

Diversos compostos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários já foram descritos em espécies da família Myrtaceae, entre eles tem-se terpenos, como α -pineno, espatulenol, biciclogermacreno (PADOVAN et al., 2014) e β -amirina (DOMINGUES et al., 2010); compostos fenólicos, como miricetina, rutina, quercitrina (DASTMALCHI et al., 2012), quercimeritrina e hexaidroxidifenol-galoil-glicose (WU et al., 2012); alcaloides, como 1,2,3,4-tetraidro-1-metil- β -carbolina (DOMINGUES et al., 2010) e antocianinas, como delfinidina, cianidina e malvidina-3-glicosídeo (FLORES et al., 2012) (Figura 2).

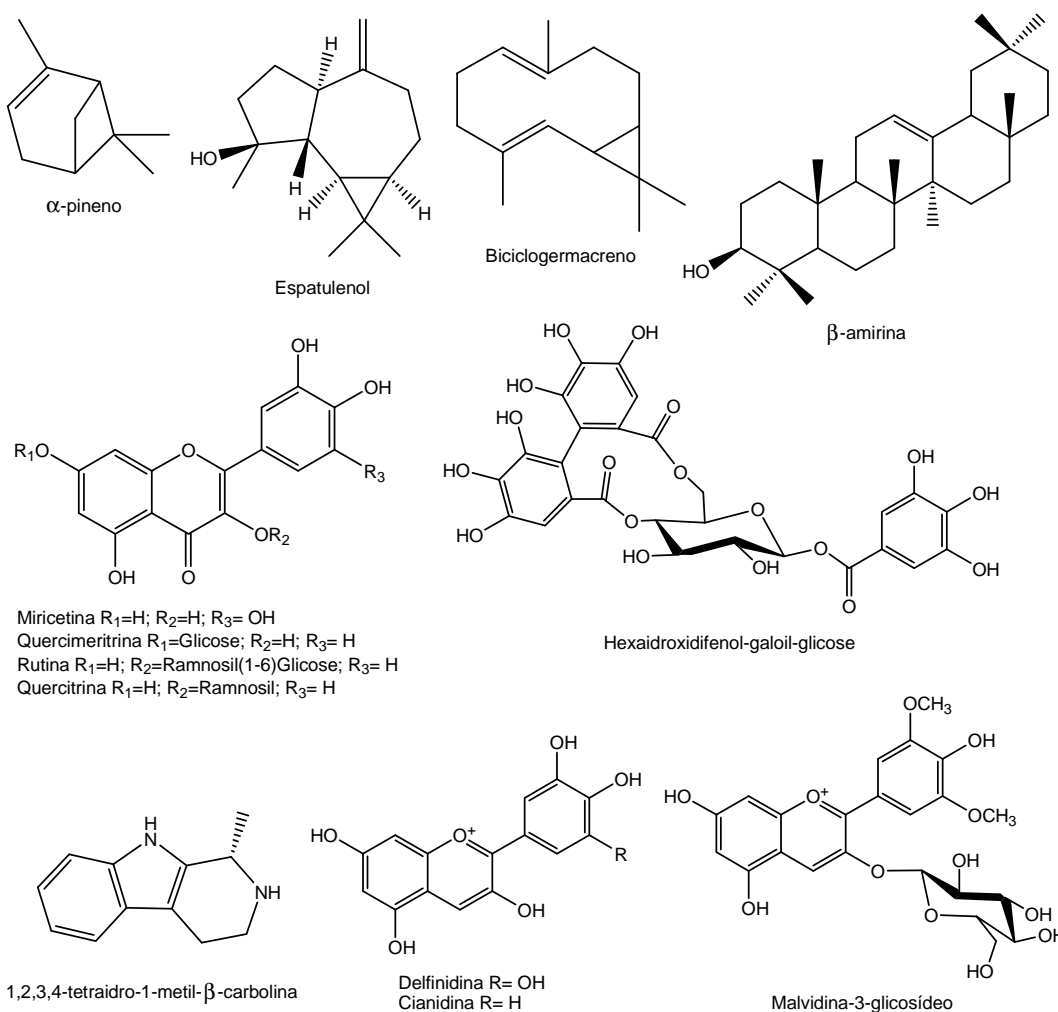


Figura 2 - Estruturas químicas de compostos detectados em espécies da família Myrtaceae.

Apesar desse promissor potencial químico e farmacológico, poucas espécies pertencentes aos diversos gêneros da família têm sido estudadas no que se refere aos seus constituintes químicos e às suas propriedades farmacológicas (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). O gênero *Myrciaria* é um dos

gêneros pertencentes a essa família e ainda carece de muitos estudos (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

1.3 GÊNERO *Myrciaria*

O gênero *Myrciaria* possui em torno de 99 espécies conhecidas, 21 das quais são nativas do Brasil. As espécies desse gênero estão geograficamente distribuídas em diversas regiões, incluindo países da América do Sul, como Brasil, Argentina, Paraguai, Venezuela e Bolívia, países da América Central, como, por exemplo, Belize, Guatemala, El Salvador e Honduras, e sul da Flórida. No Brasil, as espécies estão difundidas em vários biomas como, Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa, e são cultivadas principalmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014).

Diversos compostos ativos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários já foram identificados em espécies do gênero *Myrciaria*. Em seu trabalho de revisão sobre o gênero, Borges, Conceição e Silveira (2014) descreveram a estrutura molecular de 49 substâncias encontradas, entre elas destacam-se vários compostos fenólicos, como os flavonoides kaempferol, quercetina e isoquercitrina, as antocianinas delphinidina 3-O-glicosídeo e cianidina 3-O-glicosídeo, o ácido gálico, os ácidos elágico e O-metilelágico, os monoterpênos d-limoneno e 1,8-cineol e os sesquiterpênos globulol e acetato de (2E,6E)-farnesol (Figura 3).

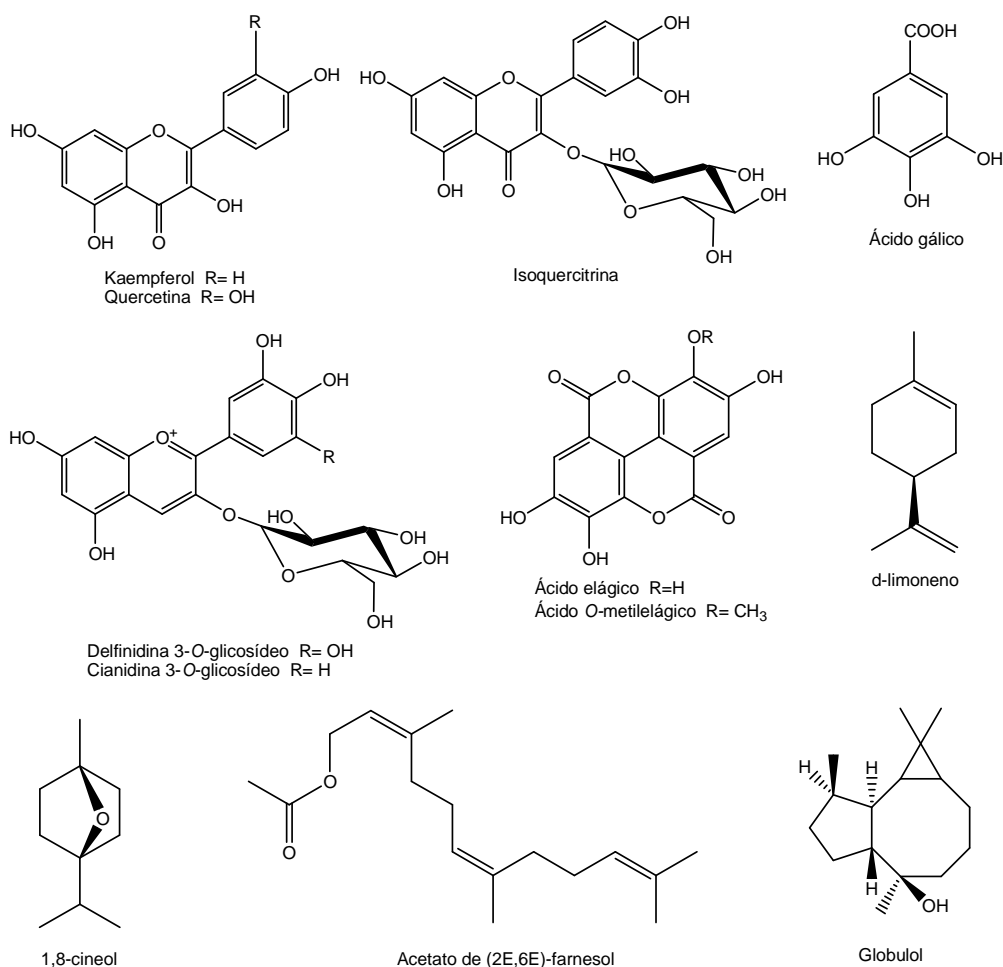


Figura 3 - Estruturas químicas de compostos identificados em espécies do gênero *Myrciaria*.
 Fonte: Adaptado de Borges, Conceição e Silveira (2014).

Estudos têm demonstrado que algumas espécies desse gênero apresentam propriedades biológicas importantes. Destacam-se as atividades antioxidante (FRACASSETTI et al., 2013), anti-inflamatória (APEL et al., 2010), hipoglicemiante (UEDA et al., 2004), hipolipemiante (NASCIMENTO et al., 2013), antifúngica (DINIZ et al., 2010), antiproliferativa (WANG et al., 2014) e antibacteriana (MACEDO-COSTA et al., 2009).

1.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Na busca por moléculas bioativas provenientes de espécies vegetais faz-se necessária a realização de estudos multidisciplinares que abordem aspectos químicos e biológicos.

1.4.1 Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Grande parte das plantas medicinais não possuem estudos de avaliação de toxicidade, mas mesmo assim são utilizadas indiscriminadamente. Devido a isso, intoxicações com plantas não são raras (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil, de acordo com dados do ano de 2012 do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), foram registrados 1.185 casos de intoxicação humana por plantas, sendo que desses, 1 foi a óbito (BRASIL, 2012).

O microcrustáceo marinho, *Artemia salina* Leach, é um organismo simples e o teste de toxicidade frente às suas larvas é um ensaio biológico amplamente utilizado para a avaliação preliminar de toxicidade (ARCANJO et al., 2012). Além disso, demonstrou ser um indicativo para a previsão das atividades citotóxica (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998) e anti-*Trypanosoma cruzi* (ZANI et al., 1995). Acredita-se que a toxicidade frente à *A. salina* pode direcionar o estudo fitoquímico na busca por compostos com atividades biológicas como larvicida, parasiticida, antibacteriana e antifúngica (AMARANTE et al., 2011).

1.4.2 Atividade antimicrobiana

No século passado, por muitos anos, o aumento na resistência dos microrganismos foi combatido pela descoberta de novos agentes antimicrobianos. Entretanto, nas últimas décadas, o uso indiscriminado de antimicrobianos aumentou e o desenvolvimento desses agentes diminuiu consideravelmente, enquanto a resistência dos microrganismos aos mesmos cresceu imensamente. Como consequência, o problema da resistência tornou-se mais grave, sendo um dos maiores problemas de saúde pública (LIVERMORE, 2011).

A necessidade de descoberta de novas alternativas terapêuticas frente ao aumento da resistência dos microrganismos aos múltiplos fármacos existentes tem provocado uma grande corrida em busca de agentes antimicrobianos cada vez mais eficientes, sejam eles de origem natural, semissintética ou sintética (SILVEIRA et al., 2006). Nesse sentido, as plantas medicinais têm sido alvo de grande interesse científico na busca por compostos com atividade comparada à dos antimicrobianos disponíveis,

porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra os microrganismos patogênicos e com menor impacto ambiental (BONA et al., 2014).

1.4.3 Atividade antioxidante

As espécies reativas (ER), como, por exemplo, radical hidroxil, ânion superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peroxinitritos, são geradas continuamente no organismo, seja durante processos metabólicos essenciais, como também em decorrência de alguma disfunção biológica, e estão envolvidas na regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas importantes e produção de energia. Entretanto, o excesso de ER é um sério problema para a homeostase do organismo e promovem vários efeitos deletérios, como danos às enzimas, carboidratos, DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Assim, as ER estão envolvidas em diversos processos patológicos, como câncer, distúrbios gástricos, envelhecimento precoce, catarata, artrite, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (BHATTACHARYYA et al., 2014).

O excesso de ER no organismo é combatido por um sistema de defesas antioxidantes, que envolve substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos provocados pelas ER. Essa defesa compreende antioxidantes enzimáticos produzidos pelo organismo, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, e antioxidantes provenientes da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), betacaroteno (pro-vitamina-A), alfa-tocoferol (vitamina E) e compostos fenólicos (BHATTACHARYYA et al., 2014). Sendo assim, a pesquisa da atividade antioxidante de plantas se mostra de grande importância na busca por novos compostos capazes de prevenir ou minimizar os efeitos deletérios das ER.

Existem diversos métodos para avaliação *in vitro* da atividade antioxidante de extratos vegetais, entre eles destacam-se os que utilizam radicais livres sintéticos, como o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e o 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013). Os ensaios que utilizam esses radicais se caracterizam, principalmente, por serem rápidos, fáceis e reprodutíveis, sendo então amplamente utilizados para a investigação preliminar da atividade antioxidante (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012; RE et al., 1999).

1.4.4 Atividade trombolítica

As doenças cardiovasculares foram responsáveis por 29,6% das mortes em todo o mundo no ano de 2010, sendo as de natureza isquêmica uma das principais responsáveis por esse elevado índice (FOROUZANFAR, 2013). No tratamento das doenças isquêmicas, uma das ferramentas utilizadas para a restauração do fluxo sanguíneo é a lise do trombo utilizando-se medicamentos trombolíticos. Entretanto, o arsenal desses agentes ainda é limitado, quando comparado a outras classes terapêuticas como, por exemplo, os agentes antiplaquetários usados em doenças cardiovasculares (OLIVEIRA, 2001).

Vários estudos recentes tem buscado demonstrar a atividade trombolítica *in vitro* de extratos de plantas medicinais (ALI et al., 2014a; HUSSAIN et al., 2014) visando à busca por novas moléculas que possam ser utilizadas como alternativa ao arsenal terapêutico em uso, bem como para serem utilizadas concomitantemente aos medicamentos usuais com o objetivo de reduzir efeitos colaterais e buscar efeitos sinérgicos.

1.4.5 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase

Diabetes é um grave problema de saúde pública mundial, visto que afeta milhões de pessoas e sua prevalência aumenta, em um ritmo alarmante, a cada ano. Estima-se que em 2013 a doença tenha afetado 382 milhões de adultos (20-79 anos) no mundo, e a projeção é que esse número aumente para 592 milhões em 2035. Em 2013, no Brasil, cerca de 11,9 milhões de adultos eram afetados por essa doença, com previsão de chegar a 19,2 milhões em 2035. Além disso, estima-se que 5,1 milhões das mortes mundiais no ano de 2013 tenham sido causadas pelo diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Diabetes é uma doença metabólica crônica causada pela deficiência herdada ou adquirida na secreção de insulina e/ou pela diminuição na resposta celular à insulina. Caracteriza-se por níveis elevados de glicose sanguínea e alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (CHENG; FANTUS, 2005). As complicações crônicas do diabetes são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes afetados por essa doença. Entre essas complicações

destacam-se a nefropatia, retinopatia, neuropatia e doença vascular arterosclerótica (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Os dois principais tipos de diabetes são o tipo 1 e o tipo 2, classificados de acordo com sua etiologia. O diabetes tipo 1 é caracterizado pela destruição das células β -pancreáticas causada por processo autoimune, normalmente levando à deficiência absoluta de secreção de insulina, o que faz com que os pacientes necessitem da administração exógena de insulina para sobreviverem. Esse tipo de diabetes afeta principalmente crianças e adolescentes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

O diabetes tipo 2 é de origem heterogênea, caracterizado por uma progressiva resistência à insulina e deficiência na secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. Esse tipo de diabetes é mais prevalente, sendo responsável por cerca de 90 a 95% do total de pacientes diabéticos (RÍOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015). Uma das estratégias de tratamento para esse tipo de diabetes é a redução da hiperglicemia pós-prandial utilizando inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase, enzimas envolvidas no processo de digestão dos polissacarídeos ingeridos na dieta (CHENG; FANTUS, 2005). Os principais inibidores dessas enzimas disponíveis para uso clínico são a acarbose, oligossacarídeo obtido do processo de fermentação de fungos do gênero *Actinoplanes*, o miglitol, originalmente obtido de várias cepas bacterianas dos gêneros *Baccillus* e *Streptomyces*, e a voglibose, composto sintetizado a partir de um produto da fermentação de *Streptomyces hydroscopicus* (Figura 4) (RÍOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015). Entretanto, o uso desses hipoglicemiantes causam diversos efeitos colaterais gastrointestinais, como desconforto e distensão abdominal, diarreia e flatulência, limitando dessa forma sua utilização terapêutica (CHENG; FANTUS, 2005).

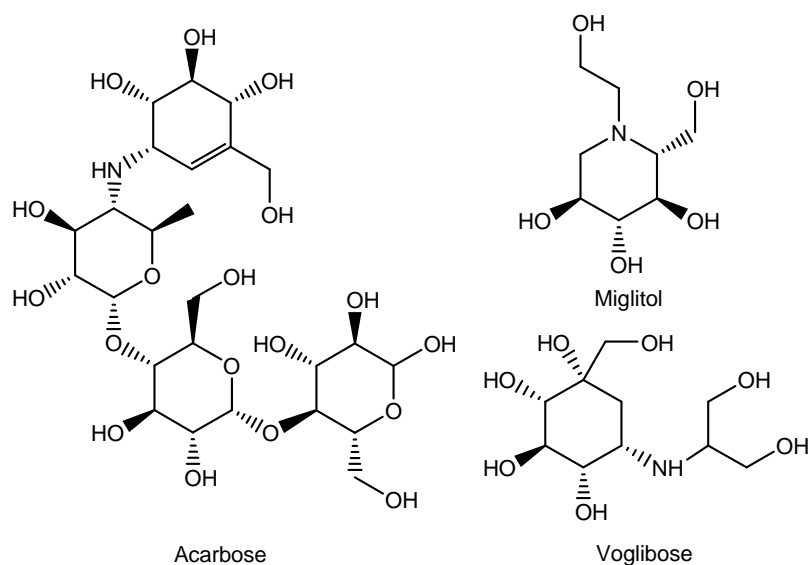


Figura 4 - Estruturas químicas da acarbose, miglitol e voglibose.

As α -amilases (α -1,4-glicano-4-glicanohidrolases; EC 3.2.1.1), enzimas pertencentes à família das endoamilases, catalisam a hidrólise de polissacarídeos, como amido ou glicogênio, em animais, microrganismos e plantas. São enzimas chave no sistema digestivo, pois promovem a hidrólise inicial do amido ao clivarem suas ligações glicosídicas α -1,4 formando unidades menores de carboidratos, os oligossacarídeos e dissacarídeos (WHITCOMB; LOWE, 2007).

As α -glicosidases (α -D-glicosídeo glicohidrolase; EC 3.2.1.20), presentes na membrana das células intestinais, são exo-glicosídeo hidrolases capazes de promoverem a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 dos oligo e dissacarídeos, gerando moléculas de monossacarídeos que podem dessa forma ser absorvidas pelo organismo (YIN et al., 2014). Essas enzimas estão amplamente distribuídas em microrganismos, plantas, insetos e mamíferos (OTA et al., 2009).

Atualmente, as plantas medicinais têm sido extensivamente estudadas na busca por inibidores mais específicos, seguros e eficazes das enzimas α -amilase e α -glicosidase, que possam vir a ser utilizados no tratamento do diabetes tipo 2.

1.4.6 Inibição da enzima tirosinase

As tirosinases (polifenol oxidase, difenol oxidase, catecolase; EC 1.14.18.1), enzimas amplamente distribuídas nas plantas, animais e microrganismos, catalisam duas etapas sequenciais de oxidação de vários substratos fenólicos. Na primeira

reação promovem a hidroxilação dos monofenóis para *o*-difenois (atividade monofenolase) e, na segunda reação, a oxidação dos *o*-difenois para *o*-quinonas (atividade difenolase), ambas utilizando oxigênio molecular. São enzimas tetraméricas que possuem dois sítios ativos por molécula, cada um deles contém dois locais de ligação de átomos de cobre, que interagem com oxigênio molecular e resíduos de histidina (Figura 5) (CHANG, 2009).

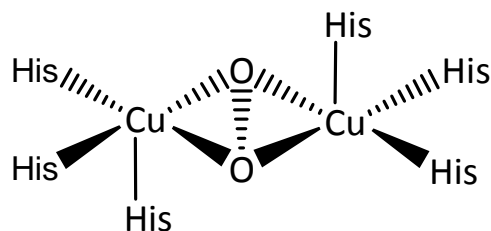


Figura 5 - Ligações dos átomos de cobre com oxigênio molecular e resíduos de histidina no sítio ativo da enzima tirosinase.

Fonte: Durán et al. (2002).

A tirosinase é uma enzima chave no processo de biossíntese da melanina a partir do monofenol L-tirosina. Na primeira etapa da síntese, a tirosinase catalisa a introdução de um grupo hidroxila na posição *orto* do anel aromático da L-tirosina convertendo-a a L-Dopa (*o*-difenol), em seguida, essa mesma enzima, promove a oxidação da L-Dopa a *o*-dopaquinona (*o*-quinona). Na continuidade do processo, esse intermediário sofre uma ciclização espontânea não enzimática formando o leucodopacromo, o qual sofre rápida oxidação não enzimática formando dopacromo, que, após polimerização, forma a eumelanina (Figura 6) (KIM; UYAMA, 2005).

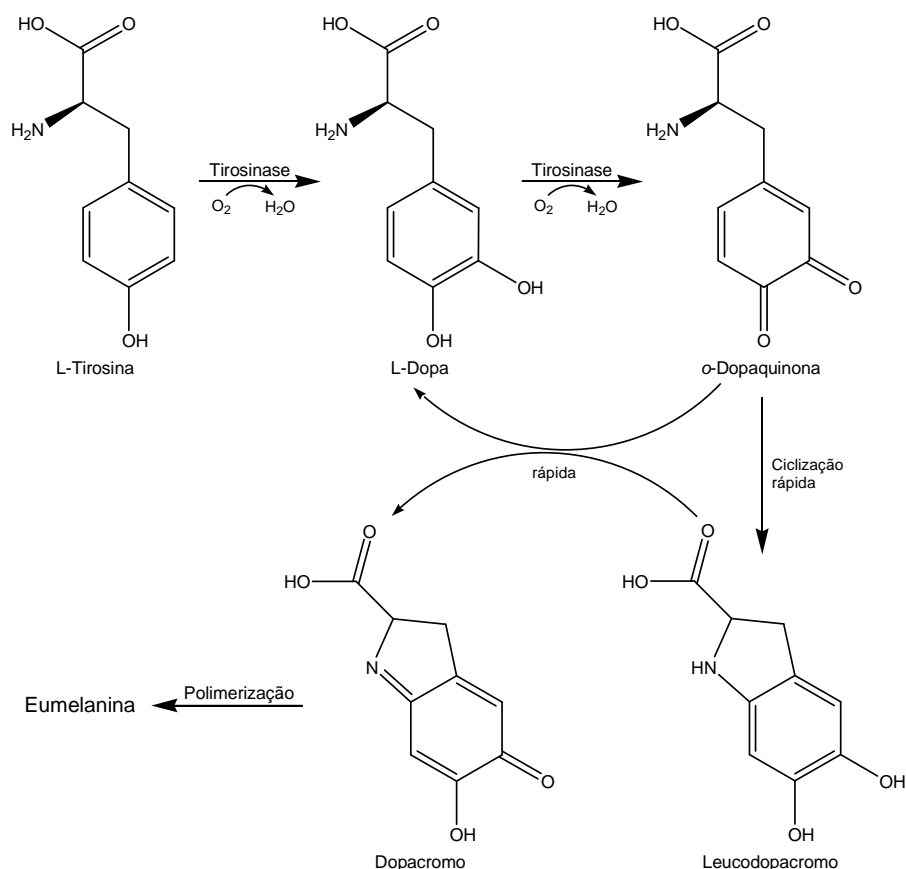


Figura 6 - Biossíntese da eumelanina.
Fonte: Adaptado de Faria et al. (2007).

A melanina é um biopolímero de alto peso molecular sintetizado dentro de organelas especializadas chamadas de melanossomas, as quais estão presentes nos melanócitos, células dendríticas especializadas. É o principal pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo, e exerce importante papel na proteção da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta, devido sua capacidade de absorver essa radiação e de remover possíveis espécies reativas geradas (KIM; UYAMA, 2005).

No entanto, o aumento da produção da melanina ou a sua distribuição anormal pode levar a modificações patológicas na coloração da pele, as chamadas hiperpigmentações (ORTONNE; PASSERON, 2005). Diversos fatores, como gravidez, distúrbios endócrinos, exposição ao sol, envelhecimento e tratamento com hormônios, são responsáveis por causar a produção ou distribuição desordenada de melanina. Dentre esses, a exposição à luz solar é a principal causa, seguida pelos hormônios e/ou fatores externos (NICOLETTI et al., 2002).

As hiperpigmentações são alterações dermatológicas que acometem um grande número de pessoas em todo o mundo e podem provocar significativo comprometimento psicossocial devido às alterações estéticas que elas provocam. Uma das principais estratégias de tratamento de tais desordens dermatológicas é a utilização de agentes despigmentantes, entre os quais se destacam os inibidores da enzima tirosinase, como a hidroquinona, o ácido kójico, substância natural produzida por fungos, e a arbutina, glicopiranosídeo natural derivado da hidroquinona (Figura 7), que são as substâncias mais empregadas clinicamente. Entretanto, o uso desses três agentes pode causar várias reações adversas, como irritação da pele, dermatites e até câncer. Além disso, a baixa estabilidade desses compostos também limita sua utilização clínica (KIM; UYAMA, 2005).

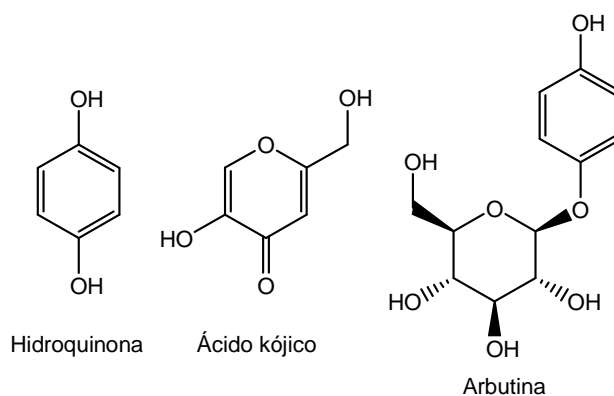


Figura 7 - Estruturas químicas da hidroquinona, ácido kójico e arbutina.

Assim, a descoberta de novos compostos inibidores da tirosinase, que sejam mais seguros e efetivos, pode trazer diversos benefícios, visto que possuem potencial de utilização clínica no tratamento das hiperpigmentações.

No gênero *Myrciaria* apenas um número limitado de espécies tem sido estudadas (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014) e, *Myrciaria strigipes*, por sua vez, é uma das que carecem de estudos no que se refere a sua caracterização química e possíveis atividades biológicas, conforme verificado por meio de levantamento bibliográfico. Diante disso, e considerando os potenciais químicos e biológicos de espécies desse gênero, se mostra de grande importância a caracterização química e a pesquisa de atividades biológicas que pode contribuir com a descoberta de protótipos a novos fármacos, bem como desenvolver o arsenal terapêutico já existente para as diversas enfermidades e também podem gerar ferramentas farmacológicas habilitadas na elucidação dos mecanismos de doenças.

1.5 ESPÉCIE ESTUDADA: *Myrciaria strigipes* O. Berg (MYRTACEAE)

Sinonímia botânica: *Paramyrciaria strigipes* (O. Berg) Sobral e *Plinia strigipes* (O. Berg) Sobral (LORENZI, 2009).

M. strigipes (Figura 8) é uma espécie nativa do Brasil e endêmica da Bahia e Espírito Santo (SOBRAL, 2014). Características morfológicas:

Altura de 4-9 m, de copa densa e ramos terminais achatados e glabros, de tronco tortuoso de 20-30 cm de diâmetro, com casca fina e lisa de cor pardo-amarronzada com manchas mais claras, descamando em placas finas e irregulares. Folhas de pecíolo pubérulo de 2-3 mm; lâmina lanceolada a oblongo-lanceolada, de ápice acuminado e base aguda ou obtusa, membranácea, glabra com pontuações (quando jovem, pubérula sobre a nervura central), com 2 nervuras marginais distantes dos bordos, de 1,5-6,6 x 0-6 1,6 cm. Pedúnculos de cerca de 1 cm, unifloros, aglomerados sobre o tronco e ramos, com 4 séries de brácteas ciliadas; botão floral glabro; cálice com lobos ciliolados de 1-2 mm; pétalas largamente oblongas de 2-3 mm de comprimento; ovário glabro. Fruto baga globosa, de 2,2-2,8 cm de diâmetro (LORENZI, 2009, p. 273).



Figura 8 - *Myrciaria strigipes* O. Berg. (A) Árvore adulta; (B) Detalhe de um ramo florífero; (C) Fruto; (D) Semente; (E) Tronco.

Fonte: Lorenzi (2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química das folhas e galhos de *Myrciaria strigipes*, bem como avaliar possíveis atividades biológicas dessa espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar as classes químicas presentes nos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes*;
- Realizar o isolamento/identificação de metabólitos secundários presentes no extrato das folhas de *M. strigipes*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes* frente ao método de letalidade de larvas de *Artemia salina* Leach;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes*;
- Avaliar o potencial trombolítico *in vitro* dos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes*;
- Determinar a atividade inibitória dos extratos das folhas e dos galhos de *M. strigipes* frente às enzimas α -amilase, α -glicosidase e tirosinase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e os galhos de *M. strigipes* foram coletados em junho de 2014, no município de São Mateus, Espírito Santo. O material vegetal foi devidamente identificado, com a posterior deposição de exsicata no Herbário VIES – Setorial São Mateus da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o número de identificação 25038. A coleta e a identificação botânica da espécie vegetal foram realizadas pelo Prof. Dr. Luis Fernando Tavares de Menezes do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da UFES.

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas e os galhos foram submetidos à dessecação por aproximadamente 72 horas em estufa a 40 °C e, em seguida, foram pulverizados, separadamente, em moinho de facas. O pó das folhas (267,5 g) e dos galhos (89,7 g) foram submetidos, separadamente, à extração por maceração passiva com etanol. O solvente foi eliminado sob pressão reduzida, com auxílio de um evaporador rotatório, a temperatura em torno de 60 a 70 °C. Os extratos obtidos, extrato etanólico das folhas (EEF) e extrato etanólico dos galhos (EEG), foram conservados em refrigerador (2 a 5 °C) até sua utilização nos ensaios químico e biológicos subsequentes.

3.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

3.3.1 Triagem fitoquímica preliminar dos EEF e EEG de *M. strigipes*

Os EEF e EEG de *M. strigipes* foram submetidos à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie em estudo. Para cada tipo de metabólito há reações específicas que indicam sua presença a partir de alteração ou formação de cor, espuma, fluorescência ou precipitado. Foi avaliada a presença de cumarinas, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides, antraquinonas, taninos e flavonoides (CUNHA, 2010).

Para a identificação de cumarinas, uma gota do extrato etanólico diluído em etanol foi aplicada em um pedaço de papel de filtro e, após secagem, o papel foi exposto sob luz ultravioleta para observação de manchas fluorescentes. Posteriormente, em cima da gota anteriormente aplicada, adicionou-se uma gota de hidróxido de potássio a 10% p/v. Após secagem, o papel foi novamente levado à luz ultravioleta para observação da fluorescência.

A detecção de alcaloides foi realizada a partir da adição em tubo de ensaio de 1 mL do extrato etanólico diluído em etanol e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Posteriormente, foram acrescentadas gotas do reagente Dragendorff, a fim de observar a formação de precipitado laranja.

A determinação da presença de saponinas no extrato foi realizada a partir da diluição de 20 mL do extrato etanólico solubilizado em etanol com 15 mL de água destilada. Para neutralizar a solução, foi adicionado 1 mL de solução de carbonato de sódio saturada. A solução foi, então, aquecida até a ebulição e, após o resfriamento, filtrou-se a solução com algodão separando cerca de 2 mL do filtrado numa proveta com tampa. Em seguida, o volume foi completado com água destilada para 100 mL e a proveta tampada foi submetida a forte agitação vertical durante 1 minuto. Após repouso de 15 minutos, foi observado se houve o aparecimento de espuma persistente com mais de 1 cm de altura.

Para a detecção de esteroides e triterpenos foram realizadas as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski. Na reação de Liebermann-Burchard, foram adicionados 2 mL de anidrido acético a 1 mL de solução clorofórmica filtrada do extrato. Em seguida, o tubo foi suavemente agitado e, posteriormente, adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração azul ou verde indica a presença de esteroides, enquanto coloração violeta, rósea ou vermelha indica a presença de triterpenos. Na reação de Salkowski, foram adicionadas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado a 1 mL de solução clorofórmica filtrada do extrato. O desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada indica a presença de esteroides.

A presença de antraquinonas foi verificada por meio da reação de Bornträger. Nesta reação, a 3 mL do extrato etanólico diluído em clorofórmio foram adicionados 2 mL

de solução de hidróxido de amônio 10% (v/v). Posteriormente, o tubo de ensaio foi agitado vigorosamente promovendo a separação em duas fases distintas (aquosa e orgânica). Coloração rósea ou avermelhada na fase aquosa indica a presença de antraquinonas.

Para a detecção de taninos foram adicionados, em um tubo de ensaio, 2 mL do extrato etanólico diluído em etanol e 5 mL de solução de gelatina e cloreto de sódio (Reagente 2 do Kit Quibasa: Matéria-prima vegetal). Foi observado se houve a formação de precipitado.

Para a detecção de flavonoides foram realizadas a reação com cloreto de alumínio (AlCl_3) e a de Shinoda. Na reação com AlCl_3 , foi adicionado, em cápsula de porcelana, 1 mL do extrato etanólico diluído em etanol e gotas de AlCl_3 à 2% p/v em etanol. As cápsulas foram aquecidas em bico de Bunsen até completa evaporação do solvente. Posteriormente as cápsulas foram observadas sob luz ultravioleta para observação de fluorescência. Na reação de Shinoda, 2 mL do extrato etanólico diluído em etanol foi adicionado em tubo de ensaio e, em seguida, foram acrescentados fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de flavonol.

3.3.2 Quantificação de flavonoides nos EEF e EEG de *M. strigipes*

O teor de flavonoides nos EEF e EEG foi quantificado por espectrofotometria na região do visível, segundo metodologia utilizada por Perdigão (2012), com algumas modificações.

Uma curva de calibração foi montada, utilizando rutina como padrão. Foram solubilizados 25 mg de rutina em metanol e, em um balão volumétrico, completou-se o volume para 50 mL com metanol, obtendo-se solução de rutina a 0,5 mg/mL. Desta solução foram retiradas seis alíquotas com diferentes volumes (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2 mL) e colocadas, separadamente, em balões volumétricos de 25 mL. A cada balão volumétrico foi adicionado metanol quantidade suficiente para 2 mL e, em seguida, foram acrescentados 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina e água (1:4, v/v), 2,5 mL de solução a 6,5% (p/v) de cloreto de alumínio em metanol e completou-se o volume para 25 mL com água destilada.

Após 30 minutos, as absorvâncias foram lidas a 420 nm em espectrofotômetro (modelo SP 2000, Bel Photonics® 2000 UV), utilizando cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm. Foi feito um branco utilizando-se todos os reagentes anteriores, com exceção da rutina e do cloreto de alumínio.

Para a quantificação de flavonoides, 25 mg do extrato foi solubilizado em metanol e, em um balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com metanol. Alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e, em seguida, foram adicionados 1 mL de metanol, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina e água (1:4, v/v), 2,5 mL de solução a 6,5% (p/v) de cloreto de alumínio em metanol e completou-se o volume para 25 mL com água destilada. Após 30 minutos, as absorvâncias foram lidas a 420 nm em espectrofotômetro. Foi feito um branco utilizando-se todos os reagentes anteriores, com exceção do extrato e do cloreto de alumínio.

As análises foram realizadas em triplicata, e os dados obtidos foram tabulados utilizando-se o software de tabulação eletrônica Excel® (Microsoft Office 2010).

3.3.3 Análise dos EEF e EEG de *M. strigipes* em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico dos EEF e EEG foi obtido utilizando-se equipamento CLAE-DAD (Hitachi), sistema LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo, Japão), composto por uma bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna L2300, mantido a 25°C, detector *diodo array* (DAD) L2455 e coluna de fase reversa C-18 (150 x 4,6 mm; tamanho da partícula 5 µm; Merck, Germany) combinada com pré-coluna apropriada (4 x 4,6 mm; tamanho da partícula 5 µm; Merck, Germany).

A amostra foi solubilizada em metanol (Grau HPLC) de forma a se obter concentração de 1 mg/mL e, em seguida, 10 µL dessa solução foi injetada no cromatógrafo. Como eluentes foram empregados solução a 1% de ácido fosfórico, na bomba A, e acetonitrila, na bomba B, em sistema de eluição por gradiente (Tabela 1), vazão de 0,6 mL/min e tempo de análise de 60 minutos. A captura dos dados foi realizada utilizando o software ExChrom Elite® (versão 3.3.2 SP1) (Scientific Software. Inc.). Os compostos presentes na amostra foram comparados,

de acordo com seu espectro de UV-Vis (230 a 400 nm) e pelo tempo de retenção, com diversos padrões comerciais. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 1 - Gradiente de eluição para a análise por CLAE - DAD.

Tempo (minutos)	(%) Solução de ácido fosfórico a 1% (Bomba A)	(%) Acetonitrila (Bomba B)
0	90	10
40	70	30
50	50	50
51	90	10
60	90	10

3.3.4 Fracionamento cromatográfico do EEF de *M. strigipes*

Parte do EEF (26,83 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna de sílica gel 60 (3,8 x 47 cm), coletando-se 420 frações de aproximadamente 225 mL cada. Os eluentes utilizados para o desenvolvimento da mesma foram:

Eluentes	Frações
Hexano	01 – 34
Hexano/clorofórmio 10%	35 – 97
Hexano/clorofórmio 20%	98 – 146
Hexano/clorofórmio 50%	147 – 185
Hexano/clorofórmio 80%	186 – 200
Clorofórmio	201 – 237
Clorofórmio/metanol 1%	238 – 265
Clorofórmio/metanol 5%	266 – 299
Clorofórmio/metanol 10%	300 – 355
Clorofórmio/metanol 20%	356 – 384
Clorofórmio/metanol 50%	385 – 409
Metanol	410 – 420

Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, os resíduos foram analisados por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel 60 ALUGRAM[®] SIL G/UV (MACHEREY-NAGEL), observadas sob radiação ultravioleta a 254 e 365 nm e reveladas com vapores de iodo e posteriormente com

anisaldeído sulfúrico (solução A: solução de anisaldeído a 2% em ácido acético; solução B: solução etanólica de ácido sulfúrico a 20%). Isto permitiu a reunião das frações que apresentavam perfis semelhantes em vários grupos, e as que apresentaram quantidade suficiente para trabalhar foram submetidas a processos usuais de purificação, como lavagens, recristalização e recromatografia, o que conduziu ao isolamento de 5 substâncias.

3.3.5 Isolamento de constituintes químicos do EEF de *M. strigipes*

3.3.5.1 Fração 109

O material dessa fração (21,92 mg) foi lavado sucessivamente com éter e depois com metanol fornecendo um sólido cristalino em forma de agulha denominado R₁ (11,1 mg).

3.3.5.2 Frações 110 - 116

O material dessas frações (219,6 mg) foi lavado sucessivamente com acetona fornecendo quantidade adicional de R₁ (188,1 mg).

3.3.5.3 Fração 117

O material dessa fração (35,7 mg) foi lavado sucessivamente com éter e depois com metanol fornecendo quantidade adicional de R₁ (7,3 mg).

3.3.5.4 Frações 132 - 137

O material dessas frações (126,2 mg) foi lavado sucessivamente com acetona fornecendo um sólido branco denominado R₂ (47,3 mg).

3.3.5.5 Frações 167 - 168

O material dessas frações (50,9 mg) foi lavado sucessivamente com acetona e depois com etanol, fornecendo um sólido branco (15 mg). Este sólido foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 (1,8 x 4,9 cm), coletando-se 40 frações de aproximadamente 5 mL cada. Os solventes utilizados na eluição foram hexano, clorofórmio e metanol na seguinte ordem e proporção:

Eluentes	Frações
Clorofórmio/hexano 20%	01 – 11
Clorofórmio	12 – 30
Metanol	31 – 40

Essas frações foram reagrupadas em sete grupos, após serem analisadas por CCD. O grupo das frações 19 – 22 (4,5 mg) foi lavado sucessivamente com metanol fornecendo um sólido cristalino, denominado R₃ (3 mg).

Das demais frações dessa coluna não foram isoladas substâncias em quantidades suficientes e/ou pureza acessível a qualquer determinação.

3.3.5.6 Fração 169

O material dessa fração (20,1 mg) foi lavado sucessivamente com acetona e depois com metanol fornecendo quantidade adicional de R₃ (3,8 mg).

3.3.5.7 Frações 213 – 217

O material dessas frações (73,3 mg) foi lavado sucessivamente com acetona fornecendo um sólido branco (22,7 mg). Este sólido foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 (1,8 x 4,7 cm), coletando-se 35 frações de aproximadamente 5 mL cada. Os solventes utilizados na eluição foram clorofórmio e metanol na seguinte ordem e proporção:

Eluentes	Frações
Clorofórmio	01 – 24
Clorofórmio/metanol 50%	25 – 29
Metanol	30 – 35

Essas frações foram reagrupadas em seis grupos, após serem analisadas por CCD. A fração 2 (10,8 mg) foi lavada sucessivamente com acetona fornecendo um sólido cristalino, denominado R₄ (8,2 mg).

Das demais frações dessa coluna não foram isoladas substâncias em quantidades suficientes e/ou pureza acessível a qualquer determinação.

3.3.5.8 Frações 247 - 248

O material dessas frações, logo após a evaporação parcial do solvente sob pressão reduzida, apresentou um precipitado que foi lavado sucessivamente com metanol fornecendo um sólido branco denominado R₅ (5 mg).

Das demais frações da coluna do EEF não foram isoladas substâncias em quantidades suficientes e/ou pureza acessível a qualquer determinação.

As substâncias isoladas (R₁ a R₅) foram submetidas à análise espectrométrica por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação estrutural. Os espectros de RMN hidrogênio (¹H), carbono-13 (¹³C) e DEPT 135 foram obtidos em espectrômetro Varian 400 MHz, sonda 5 mm Broadband.

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

A toxicidade dos EEF e EEG foi avaliada frente às larvas de *A. salina*, de acordo com o método de Meyer et al. (1982). Ovos encistados de *A. salina* foram incubados por 48 horas em solução salina (36 g/L) a 28 °C, sob luz e aeração constantes, para sua eclosão e obtenção das larvas em estado nauplii. As larvas foram, então, distribuídas em tubos de ensaio contendo os extratos em diferentes concentrações (250, 500 e 1000 µg/mL). Foram utilizados, também, dicromato de potássio (25, 50 e 100 µg/mL), como controle positivo de letalidade, e apenas o veículo de solubilização dos extratos e do dicromato de potássio (dimetilsulfóxido, DMSO, a 1% v/v), como controle negativo. Os tubos foram mantidos sob luz e, após 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas. Os percentuais de letalidade para cada concentração foi calculado e, em seguida, por regressão linear, foram determinados os valores de dose letal 50% (DL₅₀), concentração de amostra necessária para promover a mortalidade de 50% das larvas. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos EEF e EEG de *M. strigipes*

As atividades antibacteriana e antifúngica dos EEF e EEG foram avaliadas frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25213 produtora de β -lactamase, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* NPM-M196 de isolado clínico, por meio do método de disco-difusão em ágar conforme as normas M2-A11 (CLSI, 2012) e M44-A2 (CLSI, 2009), com algumas adaptações.

3.4.2.1 Preparação das soluções dos extratos

Para a solubilização dos extratos foi utilizado como solvente uma solução de DMSO 5% em etanol. Inicialmente, preparou-se uma solução dos extratos a 50 mg/mL, a qual foi submetida a diluições seriadas de modo a se obter as concentrações finais dos extratos que variaram de 1000 até 62,5 μ g/disco.

3.4.2.2 Preparação dos discos

Discos de papel de 6 mm de diâmetro foram esterilizados e posteriormente impregnados com as diferentes concentrações dos extratos. Para isso, a cada disco adicionou-se 20 μ L da solução do extrato obtendo-se discos impregnados com extratos nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 μ g/disco. Os discos foram armazenados em placas de petri estéreis por 24 horas à temperatura ambiente, para secarem antes de serem utilizados. Como controle negativo do solvente foram preparados discos impregnados com 20 μ L da solução de DMSO 5% em etanol.

3.4.2.3 Preparação dos meios de cultura

Para a cultura de *S. aureus* e *E. coli* foram utilizados o caldo Mueller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) e o ágar Mueller Hinton (Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA). Os meios de cultura foram preparados a partir de uma base desidratada e conforme as instruções do fabricante.

Para a cultura de *C. albicans* foram utilizados o caldo Sabouraud Dextrose (Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA) e o ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia,

Neogen, Lansing, MI, USA). Os meios de cultura foram preparados a partir de uma base desidratada e conforme as instruções do fabricante.

3.4.2.4 Preparação dos inóculos

Para a preparação dos inóculos de *S. aureus* e *E. coli*, inicialmente reativou-se esses microrganismos por meio de incubação a 35°C por 24 horas em caldo Mueller Hinton. Em seguida, foi realizada cultura em meio ágar Mueller Hinton inclinado, contido em tubos de ensaio, incubando-se por mais 24 horas a 35°C. Então, foi feita suspensão direta dessas colônias em solução salina 0,9% estéril, seguida da padronização no espectrofotômetro a 625 nm de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da escala de 0,5 de solução padrão de MacFarland (10^8 UFC/mL para bactérias), obtendo-se, desse modo, a suspensão de trabalho.

A preparação do inóculo de *C. albicans* seguiu o mesmo procedimento realizado na preparação dos inóculos bacterianos, com algumas diferenças. Nesse caso, os meios de cultura utilizados foram o caldo Sabouraud Dextrose e o ágar Sabouraud Dextrose, a temperatura de incubação foi 28 °C, a solução salina utilizada foi a 0,85% e a padronização no espectrofotômetro foi realizada a 530 nm de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da escala de 0,5 de solução padrão de MacFarland (10^6 UFC/mL para leveduras).

3.4.2.5 Ensaio de disco-difusão em ágar

Inicialmente um swab estéril foi mergulhado na suspensão de trabalho recém-preparada do microrganismo e, então, a superfície da placa de petri (90 x 15 mm) contendo ágar Mueller Hinton, nos ensaios com *S. aureus* e *E. coli*, ou ágar Sabouraud Dextrose, nos ensaios com *C. albicans*, foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando o swab outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Em seguida, os discos foram colocados na superfície da placa de ágar e pressionados, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar. Por fim, as placas foram incubadas a 35°C, nos ensaios antibacterianos, ou 28°C, no ensaio antifúngico, e, após 24 horas,

os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros, incluindo o diâmetro do disco.

Como controle positivo, nos ensaios antibacterianos, foram utilizados discos comerciais de ampicilina 10 µg (Laborclin), enquanto, no ensaio antifúngico, utilizaram-se discos impregnados com solução de fluconazol (Sigma), nas concentrações de 32 e 64 µg/disco. Como controle negativo, foram empregados discos impregnados com o solvente, solução de DMSO 5% em etanol.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o diâmetro dos halos de inibição foi expresso pela média ± desvio padrão. Halos iguais e superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antimicrobiana (AGUIAR et al., 2008; SILVA et al., 2007).

3.4.3 Avaliação da atividade antioxidante dos EEF e EEG de *M. strigipes*

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada *in vitro* por meio de métodos químicos espectrofotométricos utilizando os radicais livres sintéticos 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS).

A capacidade de captura dos radicais foi calculada em porcentagem de inibição (%Δ) de acordo com a seguinte equação: $(\% \Delta) = [(A_0 - A_1) \times 100] / A_0$, onde A_0 é a absorbância da solução teste sem amostra (controle) e A_1 corresponde à absorbância verificada com a adição da amostra depois de ocorrida a reação. Determinou-se também, por regressão linear dos dados obtidos, a concentração eficaz 50% (CE_{50}), concentração requerida da amostra para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre sintético. Todos os resultados foram expressos como média de três triplicatas ± desvio padrão.

3.4.3.1 Ensaio de captura do radical DPPH

Neste ensaio, a atividade antioxidante dos EEF e EEG foi avaliada a partir da capacidade de estes sequestrarem o radical DPPH, reduzindo-o a 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (Figura 9). O radical DPPH apresenta coloração violeta com absorção em 517 nm, e sua redução por compostos antioxidantes o torna amarelo pálido com

concomitante diminuição da intensidade de absorção neste comprimento de onda, que pode ser determinada por espectrofotometria (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

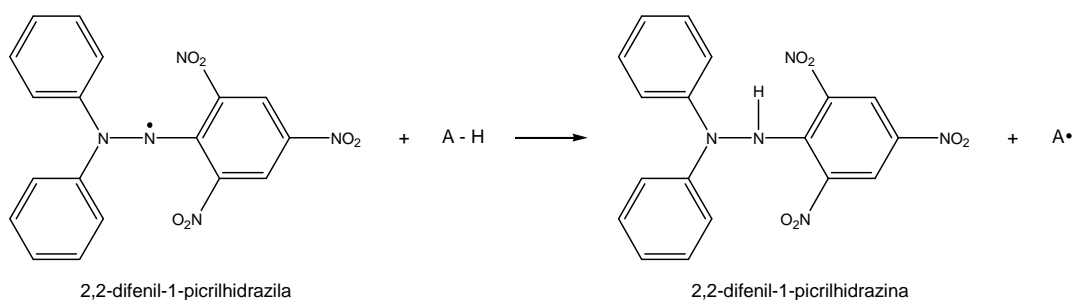


Figura 9 - Redução do radical DPPH por um composto antioxidante genérico (A-H).
Fonte: Adaptado de Pyrzyńska e Pełkal (2013).

O EEF (10 mg) foi solubilizado em 1000 μ L de etanol, enquanto o EEG (10 mg) foi inicialmente solubilizado em 300 μ L de DMSO e em seguida diluído com mais 700 μ L de etanol. A partir destas soluções mães dos extratos foram realizadas diluições seriadas com etanol de modo a se obter as concentrações finais de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 μ g/mL no ensaio.

O ensaio foi realizado conforme o método proposto por Gülçin et al. (2003), com algumas adaptações para viabilizar a realização em microplaca de 96 poços. Para isso, foi adicionado em cada poço 200 μ L de solução de DPPH[•] (SIGMA) a 0,004% (p/v) em etanol e, posteriormente, adicionado 100 μ L da solução do extrato nas diferentes concentrações. Após 10 minutos de reação à temperatura ambiente e protegida da luz, as absorbâncias foram lidas a 540 nm (Leitor de microplacas – iMark, BIO-RAD). Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida com 200 μ L da solução de DPPH[•] adicionados de 100 μ L de etanol. O branco consistiu de 300 μ L de etanol. O ensaio foi realizado em triplicata e repetido três vezes para cada um dos extratos.

Como controle positivo de atividade sequestradora do radical DPPH foi utilizado o antioxidante TROLOX. Para o cálculo da CE₅₀ do TROLOX foram utilizadas concentrações variando de 0,3125 a 10 μ g/mL. Além disso, o ensaio também foi realizado com esse padrão nas mesmas concentrações testadas dos extratos, para efeito de comparação com os mesmos.

3.4.3.2 Ensaio de captura do radical ABTS

Este método baseia-se na reação do ABTS com persulfato de potássio gerando assim o cátion radical ABTS, que apresenta cor azul esverdeado e possui absorção em 734 nm. A redução do ABTS^{•+} por compostos antioxidantes (Figura 10) promove a perda da coloração do meio reacional com concomitante diminuição da intensidade de absorção neste comprimento de onda, que pode ser determinada por espectrofotometria (RE et al., 1999).

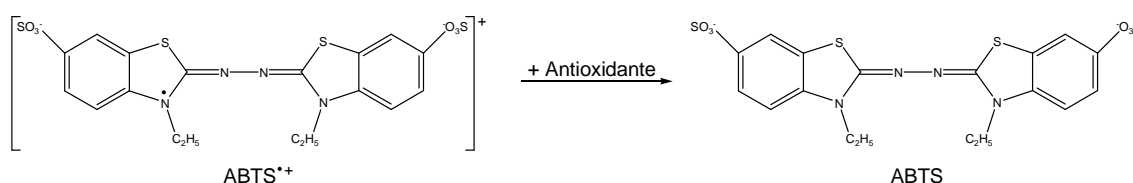


Figura 10 - Redução do ABTS^{•+} por um composto antioxidante.
 Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2007).

O EEf (10 mg) foi solubilizado em 1000 µL de etanol, enquanto o EEG (10 mg) foi inicialmente solubilizado em 300 µL de DMSO e em seguida diluído com mais 700 µL de etanol. A partir destas soluções mães dos extratos foram realizadas diluições seriadas com etanol de modo a se obter as concentrações finais de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL no ensaio.

O ensaio foi realizado conforme o método proposto por Re et al. (1999), com algumas adaptações para viabilizar a realização em microplaca de 96 poços. Inicialmente, uma mistura de 5 mL da solução aquosa de ABTS (7 mM) com 88 µL da solução aquosa de persulfato de potássio (2,45 mM) foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas. A solução de ABTS^{•+} formada foi diluída em etanol até obtenção de uma absorbância de 0,700 a 734 nm. Em uma placa de 24 poços, foi adicionado 1 mL da solução de ABTS^{•+} e 10 µL da solução do extrato nas diferentes concentrações. Em seguida, transferiu-se 200 µL desta mistura para os poços da microplaca e, após 10 minutos, as absorbâncias foram lidas a 750 nm (Leitor de microplacas – iMark, BIO-RAD). Como referência de máxima absorção foi utilizada a leitura obtida da reação de 1 mL da solução de ABTS^{•+} adicionados de 10 µL de etanol. O branco consistiu de 200 µL de etanol. O ensaio foi realizado em triplicata e repetido três vezes para cada um dos extratos.

Como controle positivo de atividade sequestradora do radical ABTS foi utilizado o antioxidante TROLOX. Para o cálculo da CE_{50} do TROLOX foram utilizadas concentrações variando de 0,3125 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, o ensaio também foi realizado com esse padrão nas mesmas concentrações testadas dos extratos, para efeito de comparação com os mesmos.

3.4.3.3 Análise estatística da atividade antioxidante

Os valores de porcentagem de inibição dos radicais sintéticos foram estatisticamente avaliados por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$, comparando os extratos com o padrão antioxidante. Em seguida, foi realizado, como teste *post hoc*, o Teste de Tukey, a fim de indicar em qual concentração foi possível observar resultados com diferença estatisticamente significativa. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0[®].

3.4.4 Avaliação da atividade trombolítica dos EEF e EEG de *M. strigipes*

A atividade trombolítica dos EEF e EEG de *M. strigipes* foi avaliada conforme o método proposto por Prasad et al. (2006), com algumas modificações. Em tubos de microcentrífuga previamente pesados foram adicionados 500 μL de sangue venoso humano e, então, foram incubados a 37 °C, por 45 minutos. Em seguida, o soro foi aspirado, de modo que o coágulo formado fosse preservado, e os tubos de microcentrífuga foram pesados, obtendo assim o peso inicial dos coágulos. Após a adição de 150 μL da solução a ser testada, os tubos foram incubados a 37 °C por 90 minutos e o fluido resultante da lise dos coágulos foi cuidadosamente aspirado. O peso dos coágulos foi novamente verificado, e o percentual de lise foi calculado. Os extratos foram avaliados na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados com propilenoglicol 10% v/v. Como controle de atividade trombolítica, foi utilizado estreptoquinase na concentração de 100.000 UI, solubilizada com água destilada. O ensaio foi realizado em quadruplicata, e os veículos também foram avaliados quanto à atividade trombolítica. A significância da porcentagem de lise dos coágulos promovida pelos extratos, quando comparados com a estreptoquinase, foi analisada por meio do Teste t de Student para amostras independentes, utilizando o programa

GraphPad Prism 6.0[®]. Esse ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFES sob número de parecer 148.873 (Anexo).

3.4.5 Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre as enzimas α -amilase, α -glicosidase e tirosinase

3.4.5.1 Determinação da atividade de inibição sobre a α -amilase

Nesse ensaio, a atividade da α -amilase foi avaliada através da formação de maltose resultante da ação dessa enzima sobre o amido presente no meio. A maltose reduz o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor alaranjada característica cuja absorvância é determinada a 540 nm (Figura 11) (SILVA et al., 2003).

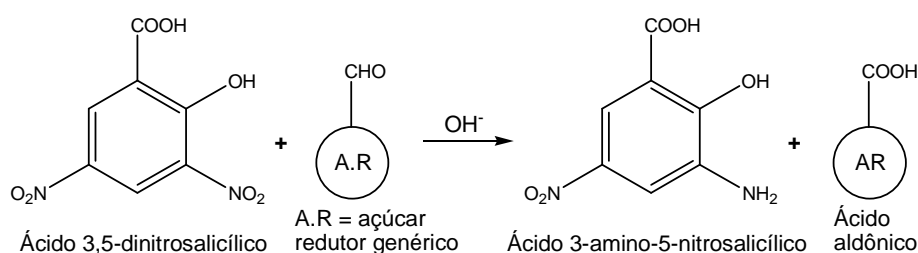


Figura 11 - Reação do DNS com o açúcar redutor.
Fonte: Adaptado de Silva et al. (2003).

A atividade de inibição da α -amilase foi determinada segundo o método descrito por Bernfeld (1955), com adaptações. Os EEF e EEG foram inicialmente solubilizados em solução de DMSO 5% em etanol, de modo a se obter uma concentração do extrato no meio reacional de 1000 μ g/mL. A α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7 mM para obter uma solução com concentração de 40 U/mL. Um total de 40 μ L de solução do extrato e 100 μ L da solução da enzima foram incubados em banho-maria por 30 minutos a 25 °C. Após a pré-incubação, 500 μ L do pré-incubado foram misturados com 1 mL de amido 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). A mistura de reação foi então incubada por 20 minutos a 40 °C em banho-maria. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. A atividade da α -amilase foi determinada pela absorvância em

espectrofotômetro a 540 nm (Shimadzu, UV-1601). Solução contendo DNS e tampão foi utilizada para zerar o aparelho antes da leitura da absorbância das amostras. O branco do extrato consistiu de solução de amido, extrato vegetal e DNS.

Como controle positivo de inibição da α -amilase foi utilizado a acarbose na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no meio reacional. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) com cloreto de sódio 6,7 mM.

3.4.5.2 Determinação da atividade de inibição sobre a α -glicosidase

A capacidade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a atividade enzimática de α -glicosidase foi determinada segundo Shinde et al. (2008), através da estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir do p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG). Esse ensaio é baseado na determinação da hidrólise contínua do pNPG em pNP, promovida pela enzima α -glicosidase. A formação do pNP produz uma coloração amarela dependente de carbonato de sódio, que é medida em espectrofotômetro a 405 nm.

Os EEF e EEG foram inicialmente solubilizados em solução de DMSO 5% em etanol, de modo a se obter uma concentração do extrato no meio reacional de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em microplacas de 96 poços, 20 μL da solução de α -glicosidase 1 U/mL (Sigma Aldrich) foi pré-incubada com 20 μL da solução do extrato durante 5 minutos a 25 °C. Foram adicionados 40 μL de solução de pNPG 1 mM (Sigma Aldrich) em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8). A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos em banho-maria. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância lida a 405 nm (Leitor de microplacas – DTX 800 Multimode Detector Beckman Coulter). Para o branco do extrato, foram utilizadas amostras contendo o extrato vegetal e pNPG.

A concentração eficaz (CE_{50}), concentração da amostra requerida para inibir a atividade da enzima α -glicosidase em 50%, dos EEF e EEG foram determinadas, com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0[®], por meio de regressão não linear dos dados obtidos com concentrações dos extratos variando entre 7,8125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como controle positivo de inibição da α -glicosidase foi utilizado a desoxinojirimicina (Sigma Aldrich) na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional. A CE_{50} da desoxinojirimicina foi determinada por meio de regressão não linear dos dados obtidos com concentrações variando entre 1,95 e 4000 $\mu\text{g/mL}$. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8).

3.4.5.3 Determinação da atividade de inibição sobre a tirosinase

O método utilizado para avaliar a atividade da enzima tirosinase se baseia na atividade difenolase dessa enzima. Nesse método, L-tirosina é convertida, pela ação da tirosinase, em L-Dopa, este sofre oxidação pela tirosinase produzindo o-dopaquinona. Após uma ciclização espontânea não enzimática a o-dopaquinona forma o leucodopacromo, o qual sofre rápida oxidação não enzimática originando um pigmento de cor laranja, o dopacromo, cuja formação é medida em espectrofotômetro a 475 nm (Figura 6) (KHATIB et al., 2005).

Os ensaios para avaliação da atividade de inibição dos EEF e EEG sobre a tirosinase foram realizados segundo o método utilizado por Khatib et al. (2005), com algumas modificações. Os EEF e EEG foram inicialmente solubilizados em solução de DMSO 5% em etanol, de modo a se obter uma concentração do extrato no meio reacional de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 30 μL de solução de tirosinase 25 U/mL (Sigma Aldrich), 60 μL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e 10 μL da solução de extrato. Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 25 °C. Então, foram adicionados 100 μL de solução de L-tirosina 2 mM (Sigma) em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) e, após 20 minutos a 25 °C, a absorbância foi medida a 475 nm (Leitor de microplacas – BioTek Synergy HT). Para o branco do extrato, foram utilizadas amostras contendo o extrato vegetal e L-tirosina.

Como controle positivo de inibição da tirosinase foi utilizado o ácido kójico (Sigma Aldrich) na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ no meio reacional. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5).

3.4.5.4 Determinação da porcentagem de inibição enzimática

As porcentagens de inibição (% Δ) sobre as enzimas foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras com a do controle da enzima. Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima referem-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: (% Δ) = $[(C-A) \times 100]/C$, onde C é a absorbância do controle da enzima subtraída do branco do substrato, e A corresponde à absorbância da amostra subtraída do branco do extrato.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL QUÍMICO

4.1.1 Rendimento dos extratos

Foram obtidos 37,52 g do EEF e 1,58 g do EEG, demonstrando um rendimento de 14 e 1,76% p/p, respectivamente.

4.1.2 Triagem fitoquímica preliminar dos EEF e EEG de *M. strigipes*

Os resultados dos testes fitoquímicos preliminares dos EEF e EEG de *M. strigipes* indicaram a presença de várias classes químicas, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classes químicas detectadas nos EEF e EEG de *M. strigipes*.

Classes Químicas	Resultados	
	EEF	EEG
Flavonoides	+	+
Cumarinas	+	+
Alcaloides	+	+
Saponinas	+	+
Taninos	+	+
Esteroides	+	+
Triterpenos	+	+
Antraquinonas	+	-

(+) presença da classe química; (-) ausência da classe química

4.1.3 Quantificação de flavonoides nos EEF e EEG de *M. strigipes*

Para a quantificação foi construída uma curva de calibração a partir dos valores de absorvância obtidos da solução padrão de rutina em diferentes concentrações (Figura 12). Utilizando a equação da reta obtida nessa curva de calibração foi calculado o teor de flavonoides totais expressos em rutina dos EEF e EEG de *M. strigipes*. Assim, determinou-se que no EEF o teor de flavonoides totais foi de 119,5 µg de equivalentes de rutina/mg de extrato, enquanto que no EEG o teor foi de 39,2 µg de equivalentes de rutina/mg de extrato.

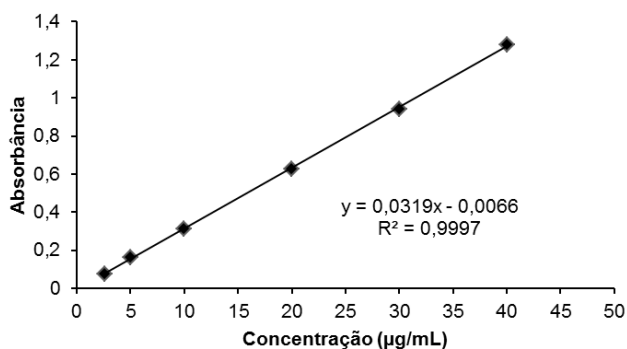


Figura 12 - Curva de calibração com rutina, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).

4.1.4 Análise dos EEF e EEG de *M. strigipes* em CLAE

O perfil cromatográfico do EEF a 354 nm está representado na Figura 13. Os sinais obtidos no cromatograma foram comparados, de acordo com seu espectro de absorção no UV-Vis (230 a 400 nm) e tempo de retenção (Tr), com diversos padrões comerciais. Essa análise permitiu inferir a natureza química dos três sinais enumerados no cromatograma. O perfil de absorção no UV-Vis do sinal 1 mostrou 100% de similaridade com o ácido elágico (Figura 14). Além disso, o sinal 1 apresentou Tr de 27,36 minutos e o espectro de UV-Vis mostrou $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 e 367 nm, permitindo assim afirmar que esse sinal se refere ao ácido elágico (Tr de 27,90 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ de 253 e 368 nm) (Figura 15).

O espectro de UV-Vis dos sinais 2 ($\lambda_{\text{máx}}$ de 256 e 353 nm) e 3 ($\lambda_{\text{máx}}$ de 256 e 352 nm) indicou que possuem grupos cromóforos iguais e característico de flavonoides da classe dos flavonóis com presença de grupo substituinte na hidroxila da posição 3 ($\lambda_{\text{máx}}$ entre 345 – 355 nm para banda I e entre 250 – 260 nm para banda II) (TIBERTI et al., 2007). A comparação do perfil de absorção no UV-Vis dos sinais 2 e 3 com padrões comerciais mostrou 99,75% de similaridade com os flavonoides hiperosídeo e isoquercitrina para o sinal 2 e 99,40% de similaridade com esses mesmos compostos para o sinal 3 (Figura 14). Esse perfil de absorção no UV-Vis associado ao Tr dos sinais 2 e 3 (28,27 e 28,83 minutos, respectivamente) permitiu inferir que esses sinais referem-se aos compostos hiperosídeo (Tr de 28,70 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ de 256 e 353 nm) e isoquercitrina (Tr de 28,89 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ de 256 e 354 nm) (Figura 16).

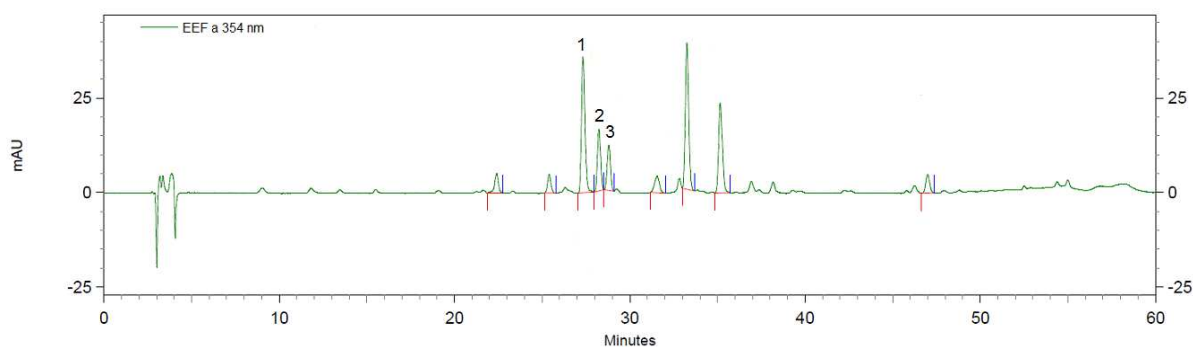


Figura 13 - Perfil cromatográfico do EEF a 354 nm em CLAE, destacando os sinais 1, 2 e 3.

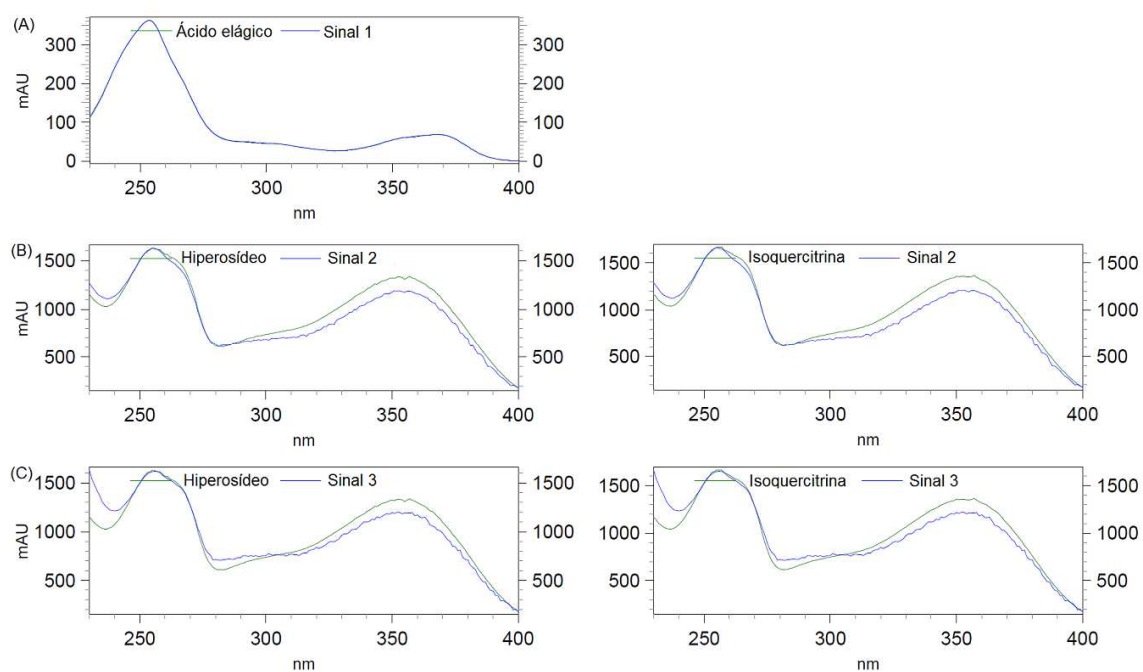


Figura 14 - Perfis de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do EEF, comparados com padrões. (A) Perfil de absorção do sinal 1 comparado com ácido elágico; (B) Perfil de absorção do sinal 2 comparado com hiperosídeo e isoquercitrina; (C) Perfil de absorção do sinal 3 comparado com hiperosídeo e isoquercitrina.

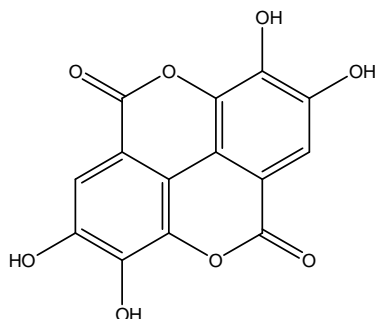


Figura 15 - Estrutura química do ácido elágico.

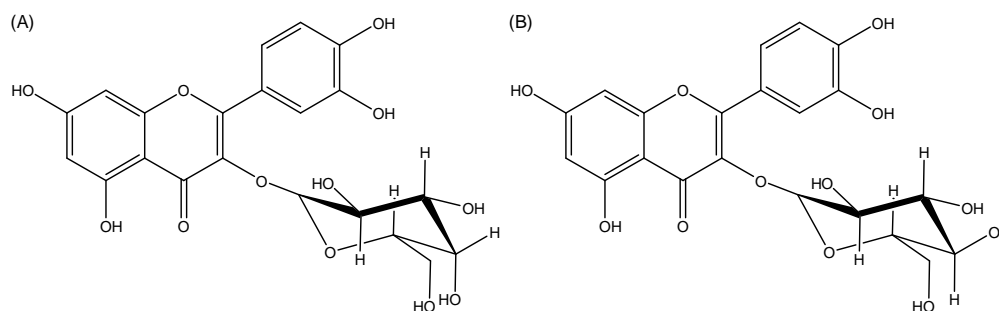


Figura 16 - Estrutura química do hiperosídeo (A) e da isoquercitrina (B).

O perfil cromatográfico do EEG a 354 nm está representado na Figura 17. Os sinais obtidos no cromatograma foram comparados, de acordo com seu espectro de absorção no UV-Vis (230 a 400 nm) e Tr, com diversos padrões comerciais. O perfil de absorção no UV-Vis do sinal 1 mostrou 100% de similaridade com o ácido elágico (Figura 18). Além disso, o sinal 1 apresentou Tr de 27,28 minutos e o espectro de UV-Vis mostrou $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 e 368 nm, permitindo assim afirmar que esse sinal se refere ao ácido elágico (Tr de 27,90 minutos, $\lambda_{\text{máx}}$ de 253 e 368 nm) (Figura 15).

Por outro lado, o sinal 2 (Tr de 34,96 min, $\lambda_{\text{máx}}$ de 254 e 366 nm) (Figura 19) não pôde ser identificado, pois, dentre os padrões utilizados no estudo, nenhum apresentou Tr e perfil de absorção no UV-Vis semelhantes aos dele.

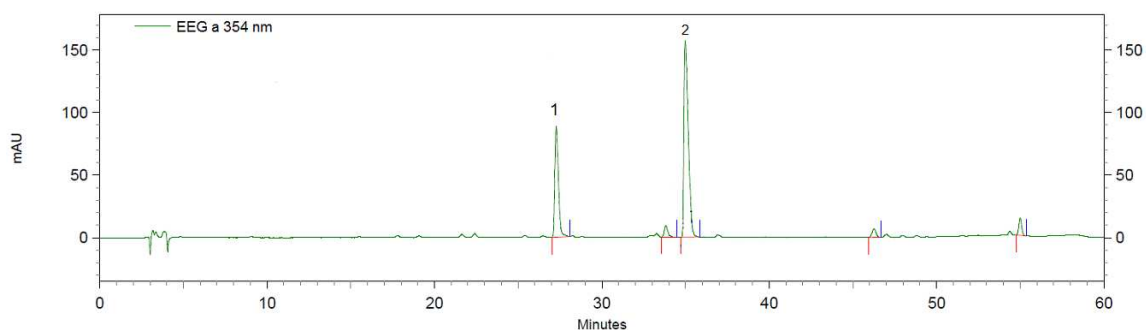


Figura 17 - Perfil cromatográfico do EEG a 354 nm em CLAE, destacando os sinais 1 e 2.

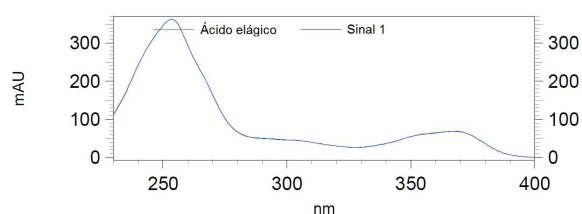


Figura 18 - Perfil de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) do sinal 1 do cromatograma do EEG, comparado com ácido elágico.

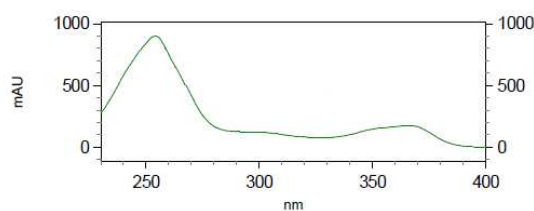


Figura 19 - Perfil de absorção no UV-Vis (230 – 400 nm) do sinal 2 do cromatograma do EEG.

4.1.5 Quantificação de ácido elágico por CLAE nos EEF e EEG de *M. strigipes*

O teor de ácido elágico nos EEF e EEG foi quantificado por CLAE-DAD a 354 nm, segundo o método do padrão externo. Foram realizadas injeções, em triplicata, de soluções padrão de ácido elágico nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. As condições cromatográficas dessas análises foram as mesmas utilizadas para os extratos (Item 3.3.3). A curva de calibração foi construída a partir dos valores das médias das áreas obtidas dos cromatogramas das soluções padrão de ácido elágico nas diferentes concentrações (Figura 20). Utilizando a equação da reta obtida e a média das áreas dos sinais identificados como ácido elágico nos cromatogramas dos EEF e EEG (Item 4.1.4), foi calculado o teor de ácido elágico em cada extrato. Assim, determinou-se que o teor de ácido elágico nos EEF e EEG foi de 36,43 e 99,10 µg/mg de extrato, respectivamente. Os dados foram tabulados utilizando-se o software de tabulação eletrônica Excel[®] (Microsoft Office 2010).

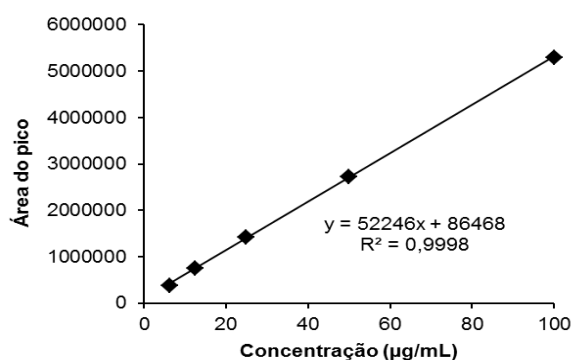


Figura 20 - Curva de calibração do ácido elágico, equação da reta e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2).

4.1.6 Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos isolados do EEF de *M. strigipes*

4.1.6.1 R₁

A substância R₁ foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

O espectro de RMN ¹H de R₁ (Figura 21) mostrou a presença de oito simpletos com deslocamentos entre δ 0,70 e 1,16 ppm, atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos, e apresentou perfil sugestivo de triterpeno, o que foi confirmado pelo espectro de RMN ¹³C (Figura 22). Este mostrou 30 sinais, entre eles tem-se a presença de um a δ 213,4 ppm, referente à presença de carbono carbonílico de cetona (C₃) no composto. O espectro de RMN DEPT 135 (Figura 23) revelou a presença de doze carbonos somando os metílicos e metínicos e onze metilênicos.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C de R₁ com dados da literatura (SOUSA et al., 2012) (Tabela 3), permitiu identificar essa substância como sendo o triterpeno pentacíclico friedelina (Figura 24).

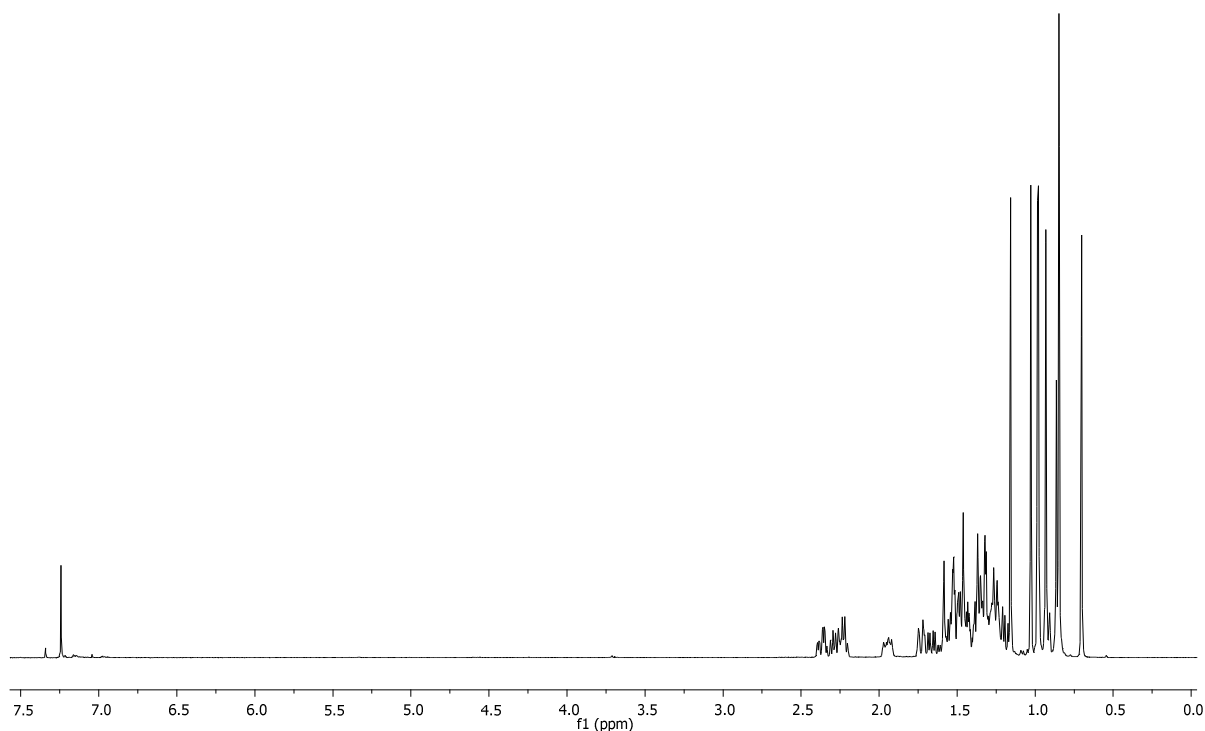


Figura 21 - Espectro de RMN ¹H de R₁ (CDCl₃, 400 MHz).

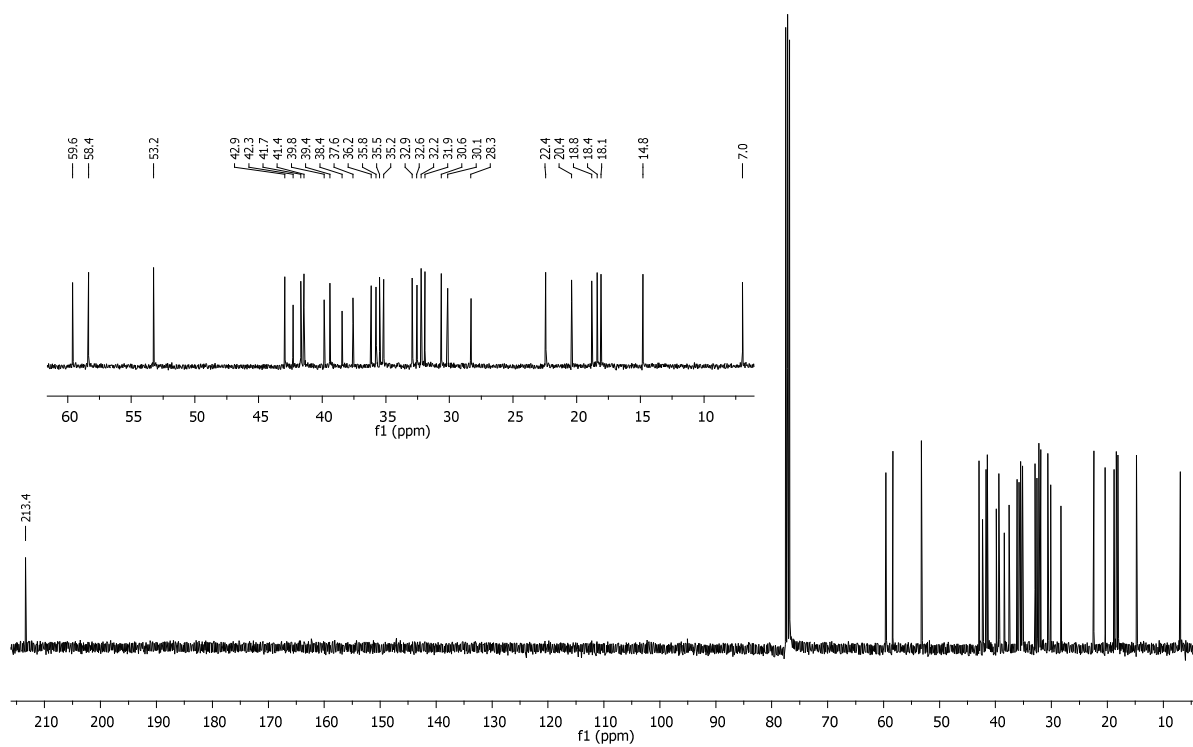


Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C de R_1 (CDCl_3 , 100 MHz).

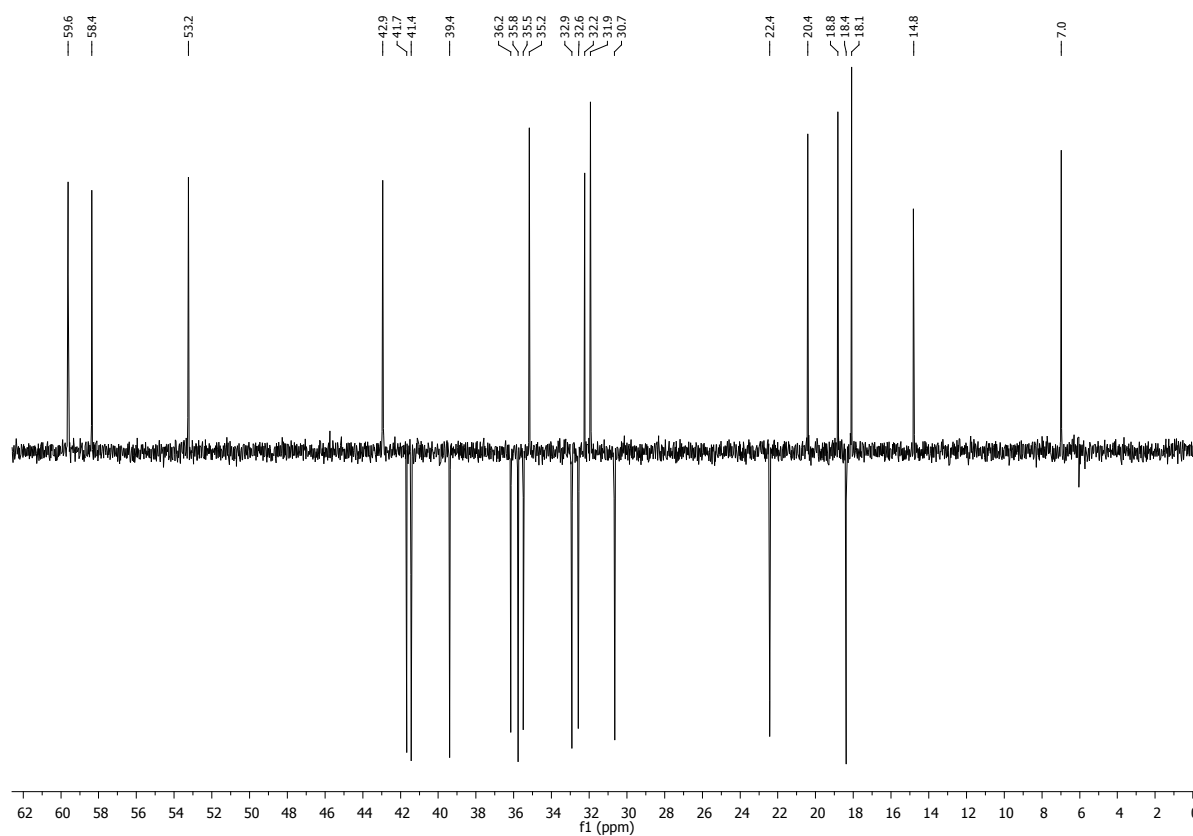


Figura 23 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_1 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 3 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R₁ em RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e friedelina (SOUSA et al., 2012).

Carbono	R₁ δ ¹³C	Friedelina δ ¹³C
1 (CH ₂)	22,4	22,3
2 (CH ₂)	41,7	41,5
3 (C)	213,4	213,2
4 (CH)	58,4	58,2
5 (C)	42,3	42,2
6 (CH ₂)	41,4	41,3
7 (CH ₂)	18,4	18,3
8 (CH)	53,2	53,1
9 (C)	37,6	37,5
10 (CH)	59,6	59,5
11 (CH ₂)	35,8	35,6
12 (CH ₂)	30,6	30,5
13 (C)	38,4	38,3
14 (C)	39,8	39,7
15 (CH ₂)	32,6	32,4
16 (CH ₂)	36,2	36,0
17 (C)	30,1	30,0
18 (CH)	42,9	42,8
19 (CH ₂)	35,5	35,4
20 (C)	28,3	28,2
21 (CH ₂)	32,9	32,8
22 (CH ₂)	39,4	39,3
23 (CH ₃)	7,0	6,8
24 (CH ₃)	14,8	14,7
25 (CH ₃)	18,1	18,0
26 (CH ₃)	20,4	20,3
27 (CH ₃)	18,8	18,7
28 (CH ₃)	32,2	32,1
29 (CH ₃)	35,2	35,0
30 (CH ₃)	31,9	31,8

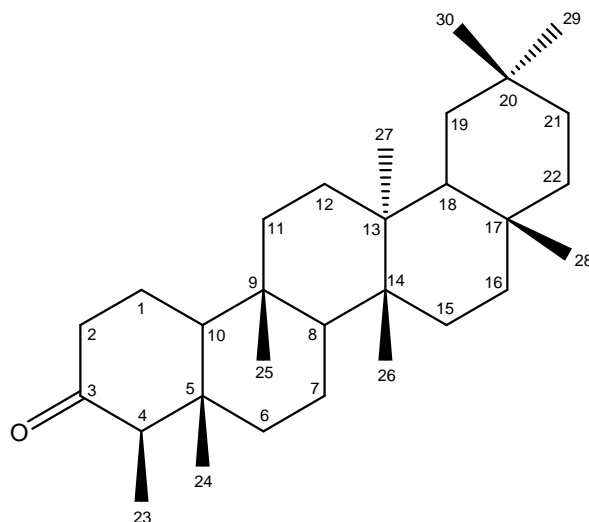


Figura 24 - Estrutura química da substância R₁, identificada como friedelina.

4.1.6.2 R₂

A substância R₂ foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

O espectro de RMN ¹H de R₂ (Figura 25) mostrou a presença de oito simpletos com deslocamentos entre δ 0,83 e 1,15 ppm, atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos. Destacam-se também o tripleto a δ 3,45 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono oximetínico, e o duplete a δ 5,61 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono olefínico.

O espectro de hidrogênio apresentou perfil sugestivo de triterpeno, o que foi confirmado pelo espectro de RMN ¹³C (Figura 26). Este mostrou 30 sinais, entre eles tem-se a presença de um a δ 76,5 ppm, referente à presença de carbono oximetínico (C₃) no composto. Além disso, dois dos sinais foram registrados em região típica para carbonos olefínicos, sendo um a δ 141,7 ppm (C₅) e outro a δ 122,2 ppm (C₆). O espectro de RMN DEPT 135 (Figura 27) revelou a presença de treze carbonos somando os metílicos e metínicos e dez metilênicos.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C de R₂ com dados da literatura (MIRANDA et al., 2012) (Tabela 4), permitiu identificar essa substância como sendo o triterpeno pentacíclico glutinol (Figura 28).

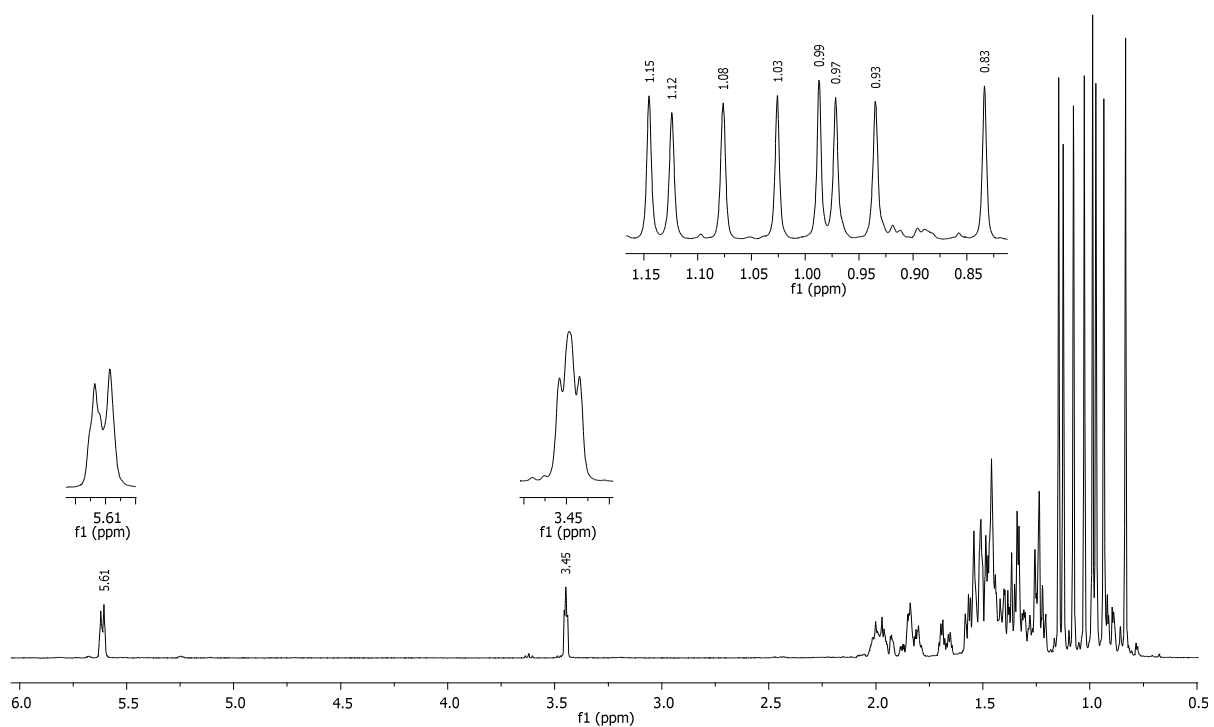


Figura 25 - Espectro de RMN ^1H de R_2 (CDCl_3 , 400 MHz).

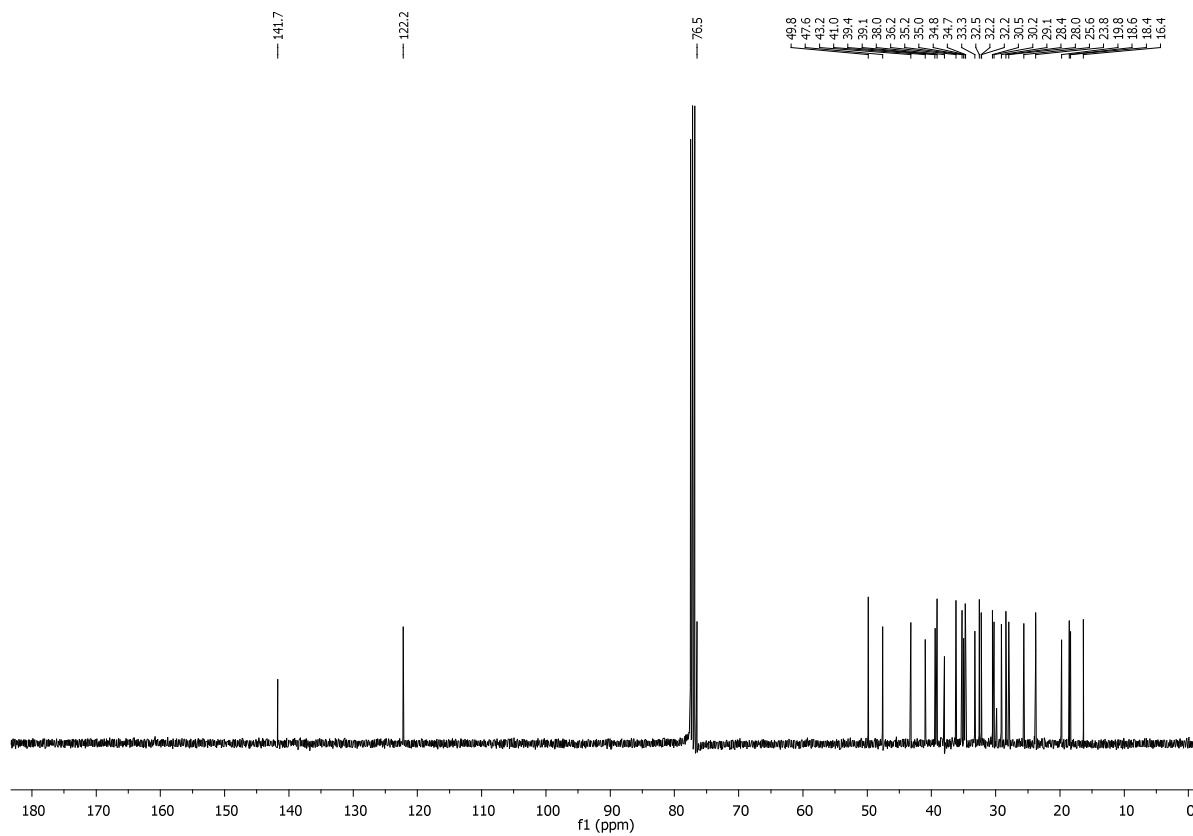


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C de R_2 (CDCl_3 , 100 MHz).

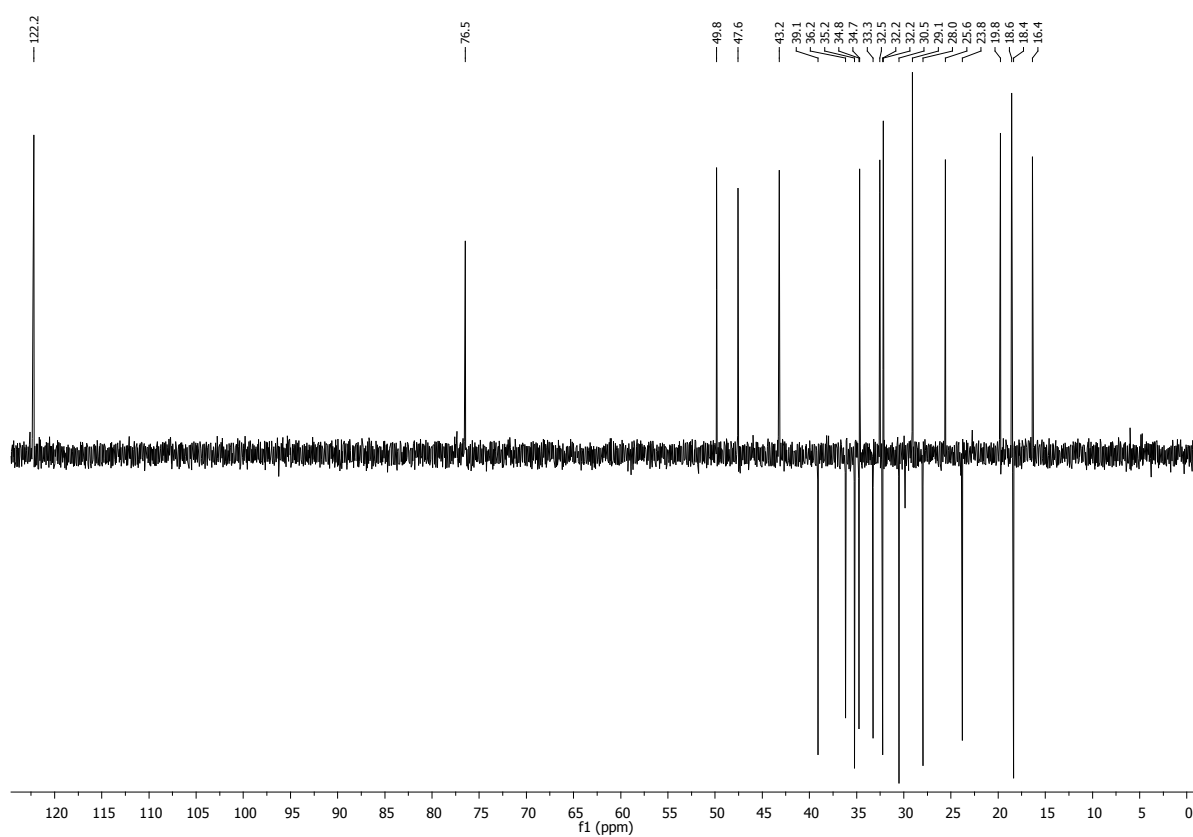


Figura 27 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_2 ($CDCl_3$, 100 MHz).

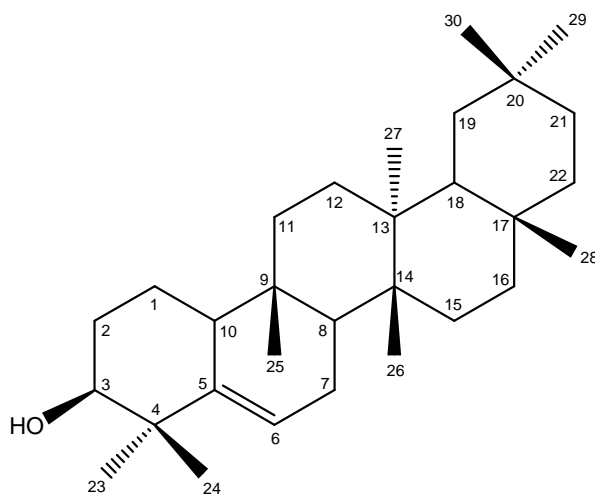


Figura 28 - Estrutura química da substância R_2 , identificada como glutinol.

Tabela 4 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R₂ em RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e glutinol (MIRANDA et al., 2012).

Carbono	R₂ δ ¹³C	Glutinol δ ¹³C
1 (CH ₂)	18,4	18,2
2 (CH ₂)	28,0	27,8
3 (CH)	76,5	76,3
4 (C)	39,4	39,2
5 (C)	141,7	141,6
6 (CH)	122,2	122,0
7 (CH ₂)	23,8	23,6
8 (CH)	49,8	49,6
9 (C)	35,0	34,8
10 (CH)	47,6	47,4
11 (CH ₂)	34,8	34,5
12 (CH ₂)	30,5	30,3
13 (C)	41,0	40,8
14 (C)	38,0	37,8
15 (CH ₂)	32,2	32,0
16 (CH ₂)	36,2	36,0
17 (C)	30,2	30,0
18 (CH)	43,2	43,0
19 (CH ₂)	35,2	35,0
20 (C)	28,4	28,2
21 (CH ₂)	33,3	33,1
22 (CH ₂)	39,1	38,9
23 (CH ₃)	29,1	28,9
24 (CH ₃)	25,6	25,4
25 (CH ₃)	16,4	16,1
26 (CH ₃)	19,8	19,6
27 (CH ₃)	18,6	18,4
28 (CH ₃)	32,5	32,3
29 (CH ₃)	34,7	34,4
30 (CH ₃)	32,2	32,1

4.1.6.3 R₃

A substância R₃ foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração esverdeada sugerindo natureza esteroidal do composto.

O espectro de RMN ¹H de R₃ (Figura 29) mostrou a presença de dois simpletos, um a δ 0,67 ppm e outro a δ 0,99 ppm, atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos (C₁₈ e C₁₉, respectivamente), e do duplete a δ 0,91 ppm, atribuído a hidrogênios de carbono metílico (C₂₁) (KOLAK et al., 2005). Destacam-se também o multiplete a δ 3,51 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono oximetínico, e o tripleto largo a δ 5,34 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono olefínico (SEN et al., 2012).

O espectro de RMN ¹³C (Figura 30) mostrou a presença de 28 sinais, revelando a natureza esteroidal do composto. Entre os sinais destacam-se a presença de um a δ 72,0 ppm, referente à presença de carbono oximetínico (C₃) no composto, e de dois em região típica de carbonos olefínicos, sendo um a δ 140,9 ppm (C₅) e outro a δ 121,9 ppm (C₆). O espectro de RMN DEPT 135 (Figura 31) revelou a presença de quinze carbonos somando os metílicos e metínicos e onze metilênicos. Além disso, esse espectro permitiu identificar que a substância R₃ possui um carbono a mais do que os mostrados no espectro de RMN ¹³C, pois revelou a presença de dois sinais a δ 32,1 ppm, referentes a um carbono metilênico e outro metínico. Portanto, a substância R₃ possui 29 carbonos em sua estrutura.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C de R₃ com dados da literatura (PATRA et al., 2010) (Tabela 5), permitiu identificar essa substância como sendo o esteroide tetracíclico β-sitosterol (Figura 32).

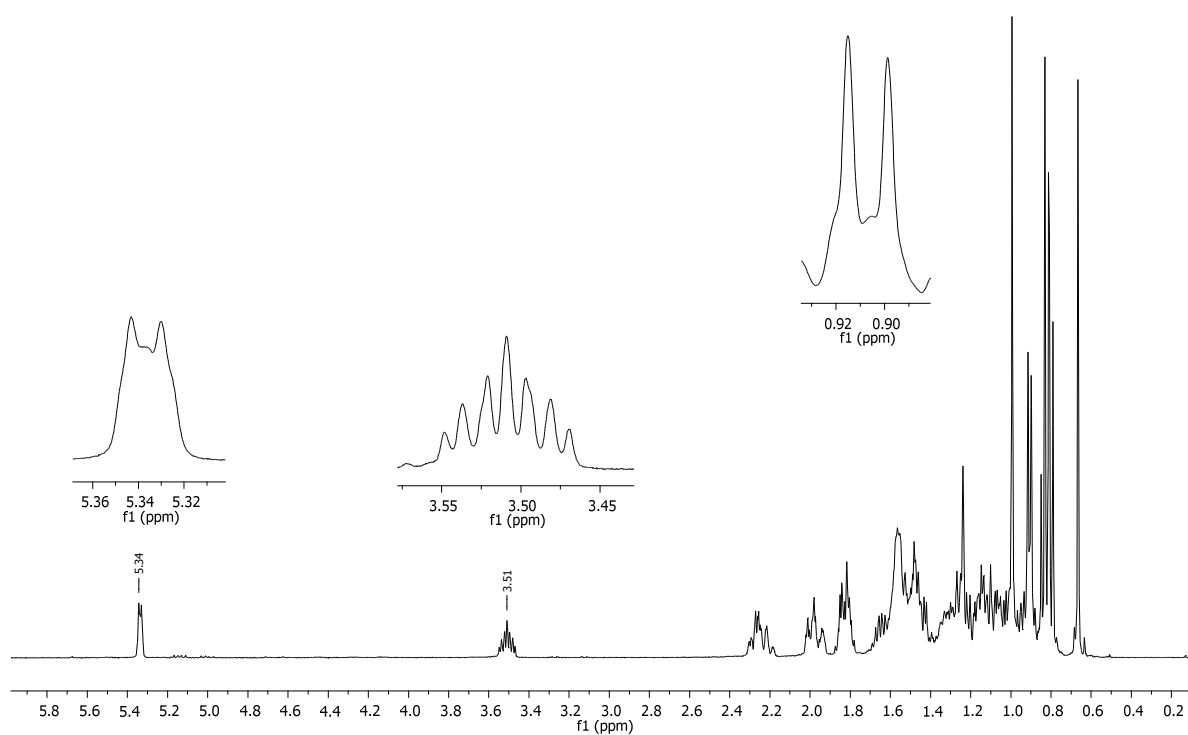


Figura 29 - Espectro de RMN ^1H de R_3 (CDCl_3 , 400 MHz).

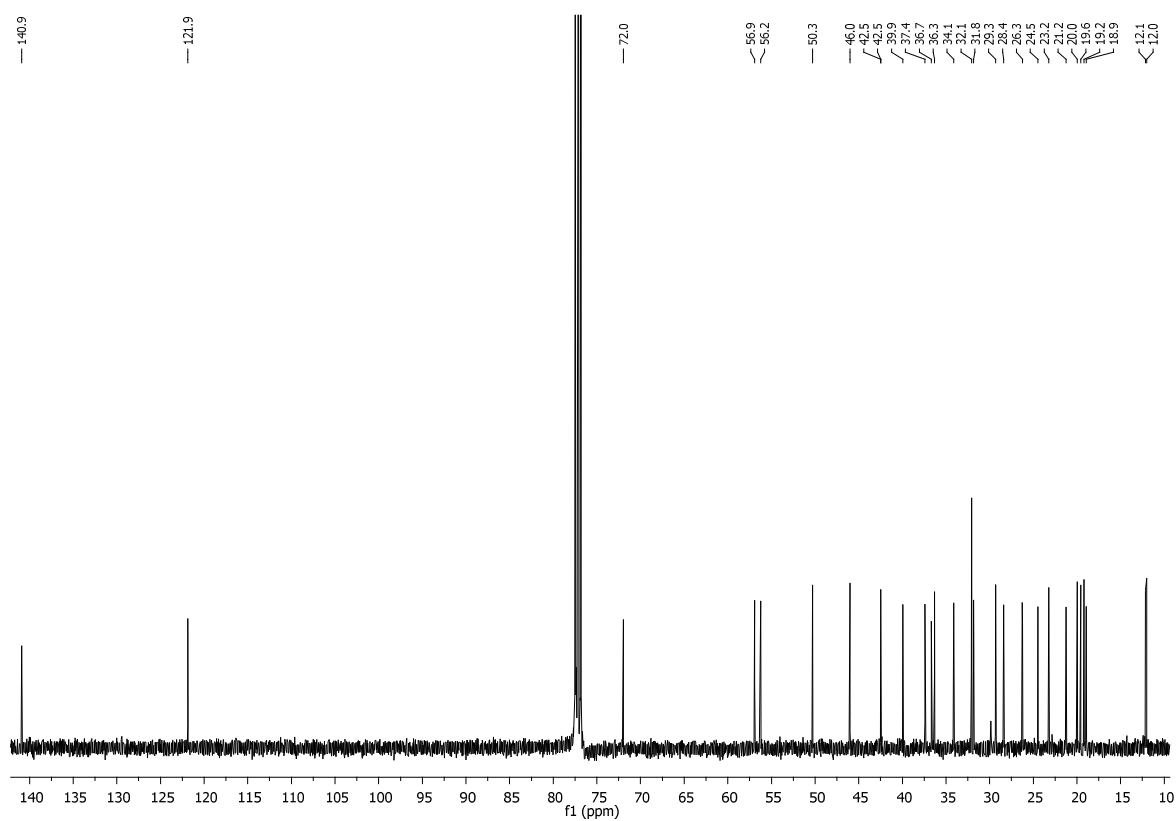


Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C de R_3 (CDCl_3 , 100 MHz).

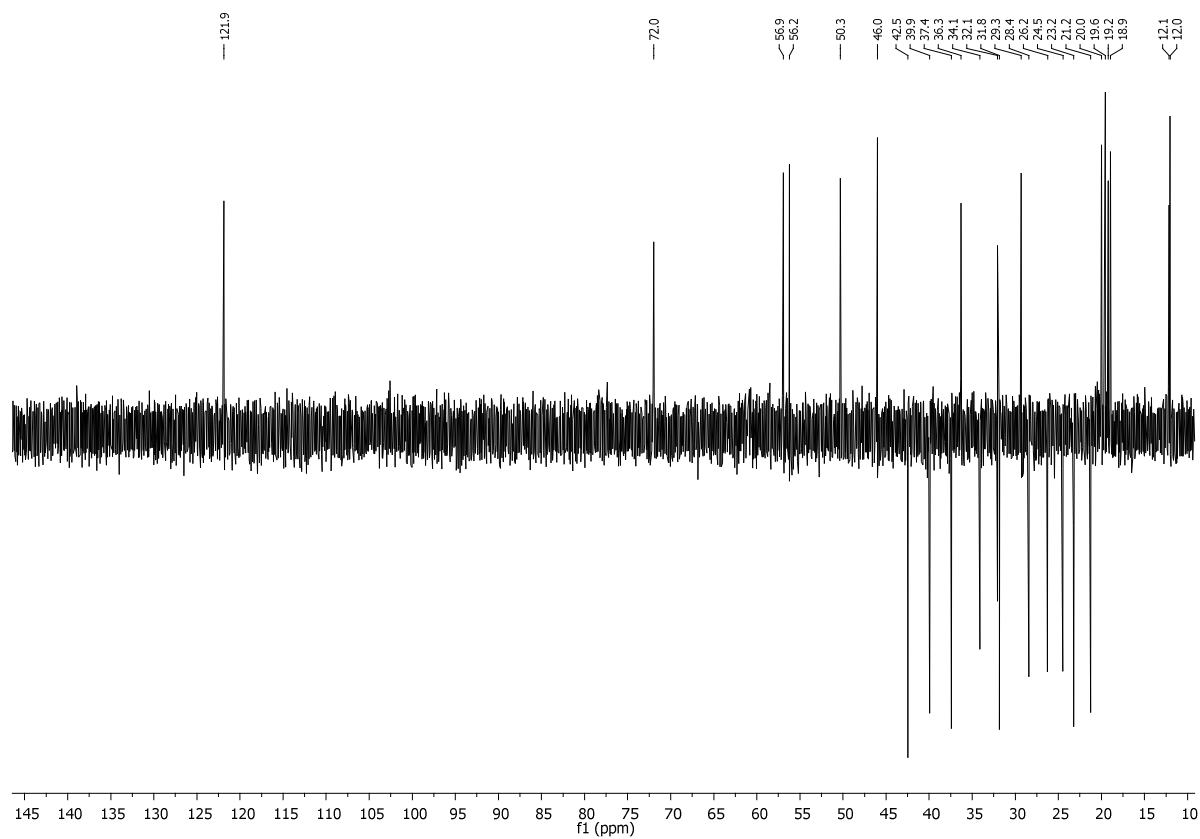


Figura 31 - Espectro de RMN DEPT 135 de R₃ (CDCl₃, 100 MHz).

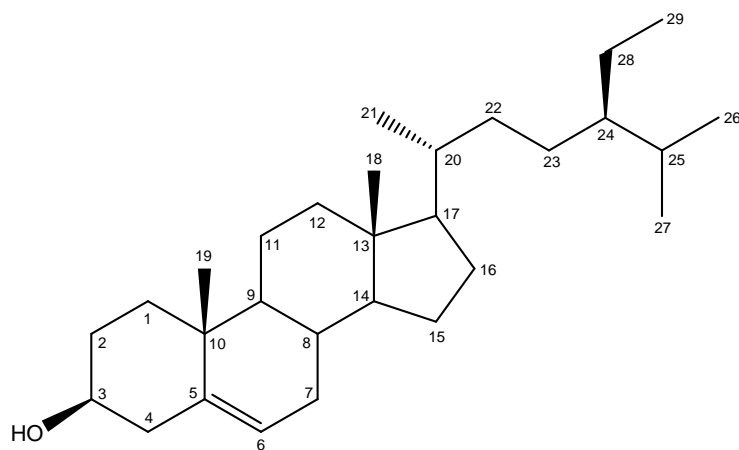


Figura 32 - Estrutura química da substância R₃, identificada como β-sitosterol.

Tabela 5 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R₃ em RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e β -sitosterol (PATRA et al., 2010).

Carbono	R ₃ δ ¹³ C	β - sitosterol δ ¹³ C
1 (CH ₂)	37,4	37,3
2 (CH ₂)	32,1	31,7
3 (CH)	72,0	71,8
4 (CH ₂)	42,5	42,3
5 (C)	140,9	140,7
6 (CH)	121,9	121,7
7 (CH ₂)	31,8	31,7
8 (CH)	32,1*	31,9
9 (CH)	50,3	50,2
10 (C)	36,7	36,5
11 (CH ₂)	21,2	21,1
12 (CH ₂)	39,9	39,8
13 (C)	42,5	42,3
14 (CH)	56,9	56,8
15 (CH ₂)	24,5	24,4
16 (CH ₂)	28,4	28,3
17 (CH)	56,2	56,1
18 (CH ₃)	12,0	11,9
19 (CH ₃)	19,6	19,4
20 (CH)	36,3	36,5
21 (CH ₃)	19,2	18,8
22 (CH ₂)	34,1	34,0
23 (CH ₂)	26,3	26,1
24 (CH)	46,0	45,9
25 (CH)	29,3	28,9
26 (CH ₃)	20,0	19,8
27 (CH ₃)	18,9	18,8
28 (CH ₂)	23,2	23,1
29 (CH ₃)	12,1	12,0

* Sinal mostrado pelo espectro de RMN DEPT 135.

4.1.6.4 R₄

A substância R₄ foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

O espectro de RMN ¹H de R₄ (Figura 33) mostrou a presença de sete simpletos com deslocamentos entre δ 0,70 e 1,11 ppm, atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos. Destaca-se também o simpleto a δ 3,62 ppm, correspondente a hidrogênio de carbono oximetínico.

O espectro de hidrogênio apresentou perfil sugestivo de triterpeno, o que foi confirmado pelo espectro de RMN ¹³C (Figura 34). Este mostrou 30 sinais, entre eles tem-se a presença de um a δ 213,1 ppm, referente à presença de carbono carbonílico de cetona (C₃) no composto, e um a δ 68,0 ppm, referente à presença de carbono oximetínico (C₂₈) no composto. O espectro de RMN DEPT 135 (Figura 35) revelou a presença de onze carbonos somando os metílicos e metínicos e doze metilênicos.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C de R₄ com dados da literatura (SIDJUI et al., 2015) (Tabela 6), permitiu identificar essa substância como sendo o triterpeno pentacíclico 28-hidroxifriedelina (Figura 36).

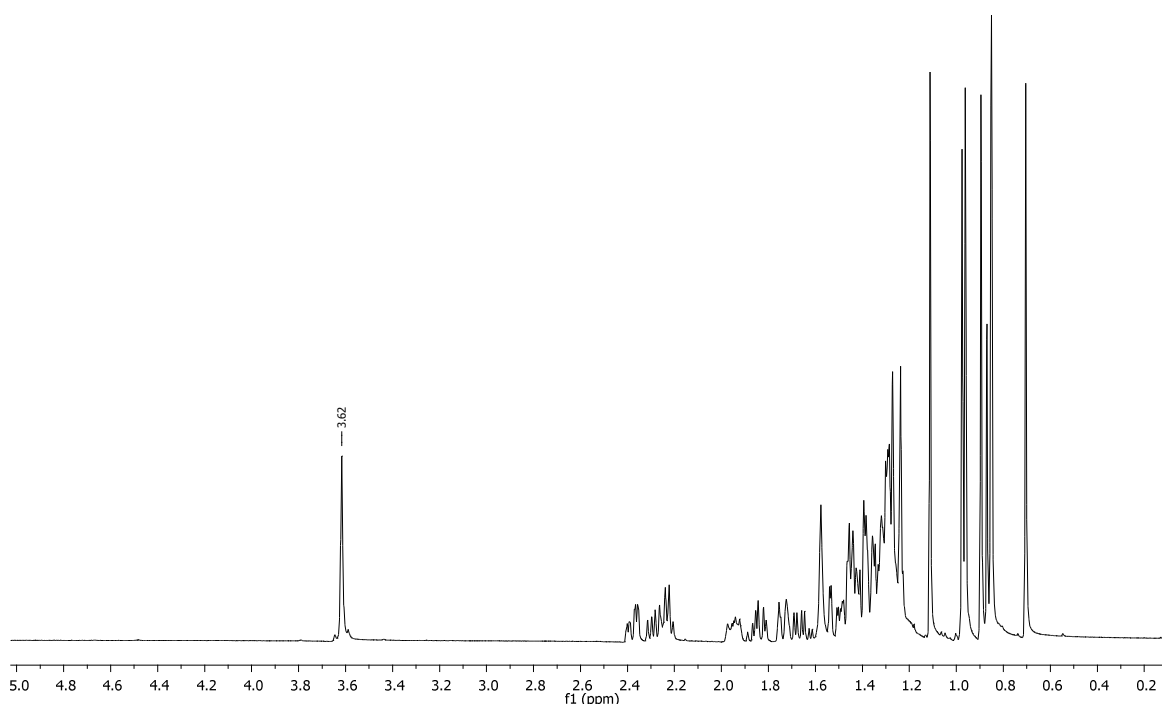


Figura 33 - Espectro de RMN ¹H de R₄ (CDCl₃, 400 MHz).

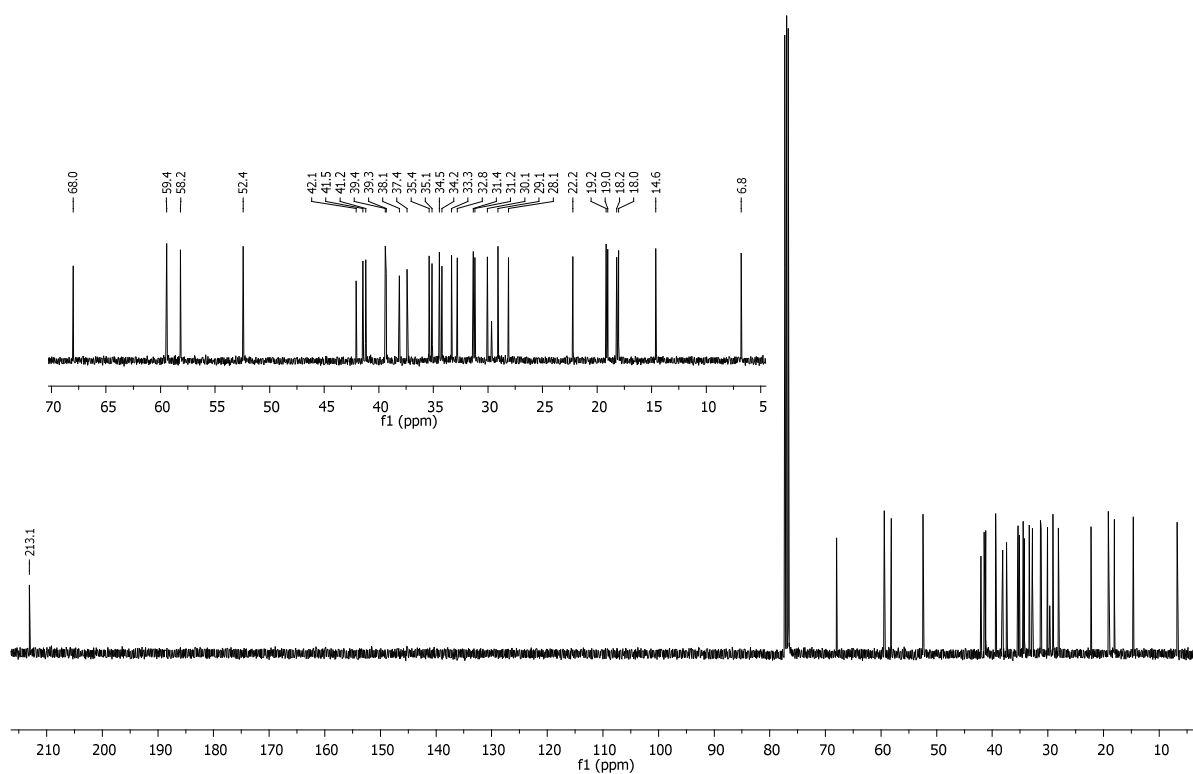


Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C de R_4 (CDCl_3 , 100 MHz).

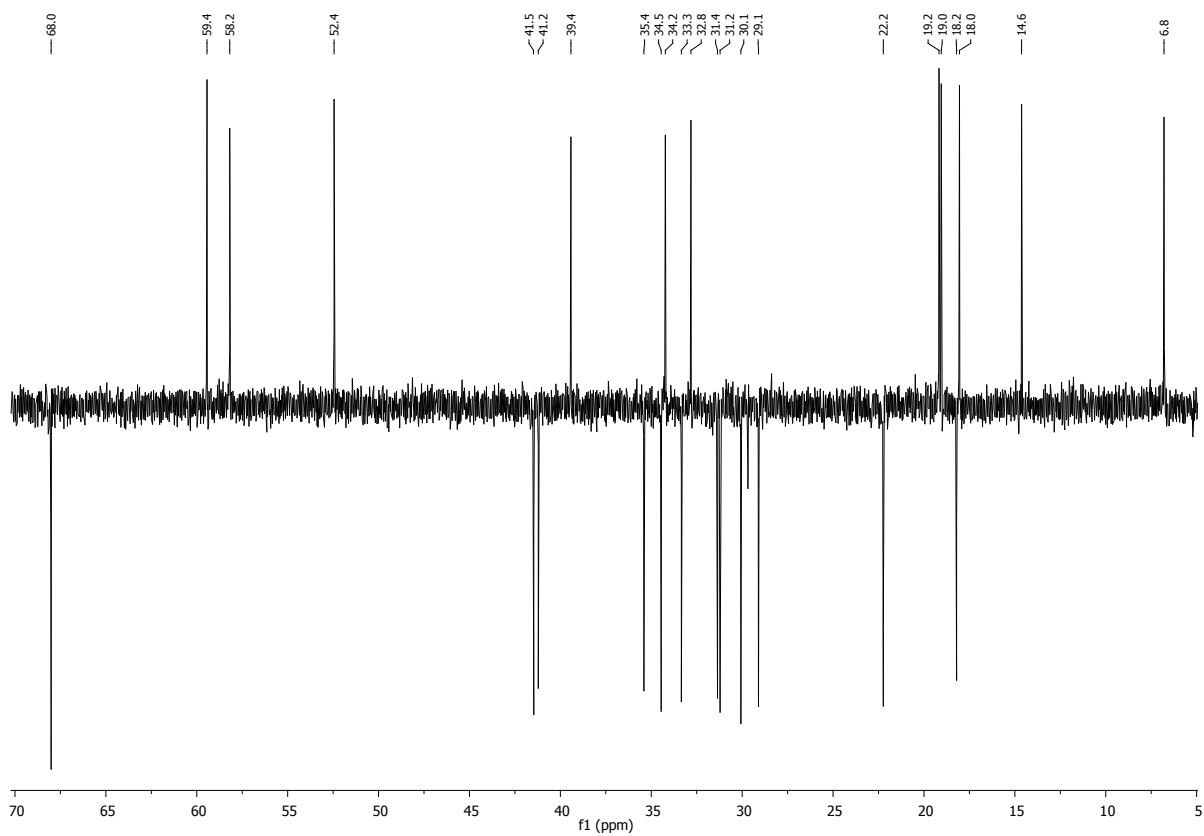


Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 135 de R_4 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 6 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R₄ em RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) e 28-hidroxifriedelina (SIDJUI et al., 2015).

Carbono	R₄ δ ¹³C	28- hidroxifriedelina δ ¹³C
1 (CH ₂)	22,2	22,4
2 (CH ₂)	41,5	41,7
3 (C)	213,1	213,3
4 (CH)	58,2	58,4
5 (C)	42,1	42,3
6 (CH ₂)	41,2	41,4
7 (CH ₂)	18,2	18,4
8 (CH)	52,4	52,6
9 (C)	37,4	37,6
10 (CH)	59,4	59,6
11 (CH ₂)	35,4	35,6
12 (CH ₂)	30,1	30,3
13 (C)	39,3	39,5
14 (C)	38,1	38,3
15 (CH ₂)	31,2	31,6
16 (CH ₂)	29,1	29,3
17 (C)	35,1	35,3
18 (CH)	39,4	39,6
19 (CH ₂)	34,5	34,7
20 (C)	28,1	28,3
21 (CH ₂)	33,3	33,5
22 (CH ₂)	31,4	31,4
23 (CH ₃)	6,8	7,0
24 (CH ₃)	14,6	14,8
25 (CH ₃)	18,0	18,2
26 (CH ₃)	19,0	19,2
27 (CH ₃)	19,2	19,3
28 (CH ₂)	68,0	68,2
29 (CH ₃)	32,8	33,0
30 (CH ₃)	34,2	34,4

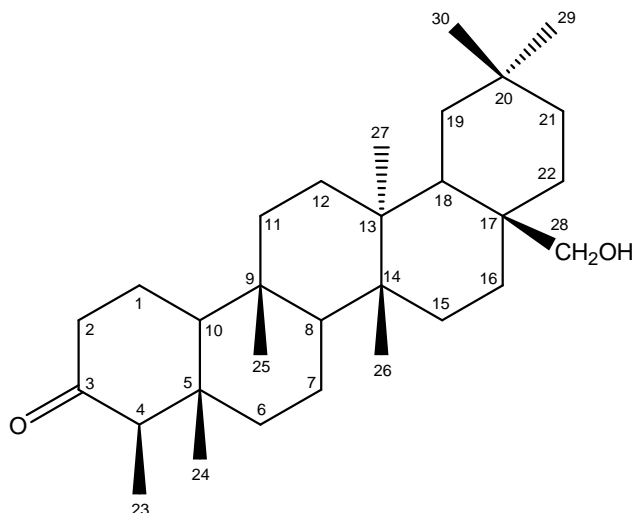


Figura 36 - Estrutura química da substância R₄, identificada como 28-hidroxifriedelina.

4.1.6.5 R₅

A substância R₅ foi submetida ao teste de Liebermann-Burchard, que exibiu coloração rósea-violácea sugerindo natureza triterpênica do composto.

O espectro de RMN ¹H de R₅ (Figura 37) mostrou a presença de seis simpletos com deslocamentos entre δ 1,17 e 1,49 ppm, atribuídos a hidrogênios de carbonos metílicos, e um duplete a δ 1,26 ppm, atribuído a hidrogênios de carbono metílico (C₃₀). Destacam-se também o duplo duplete a δ 3,58 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono oximetínico, e o tripleto a δ 5,63 ppm, atribuído a hidrogênio de carbono olefínico.

O espectro de hidrogênio apresentou perfil sugestivo de triterpeno, o que foi confirmado pelo espectro de RMN ¹³C (Figura 38). Este mostrou 30 sinais, entre eles tem-se a presença de um a δ 180,3 ppm, característico de carbono do ácido carboxílico (C₂₈), e um a δ 78,4 ppm, referente à presença de carbono oximetínico (C₃) no composto. Além disso, dois dos sinais foram registrados em região típica para carbonos olefínicos, sendo um a δ 138,0 ppm (C₁₃) e outro a δ 125,3 ppm (C₁₂). O espectro de RMN DEPT 135 (Figura 39) revelou a presença de quatorze carbonos somando os metílicos e metínicos e nove metilênicos.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ¹³C de R₅ com dados da literatura (MIRANDA; GARCEZ; GARCEZ, 2015) (Tabela 7), permitiu identificar essa substância como sendo o triterpeno pentacíclico ácido ursólico (Figura 40).

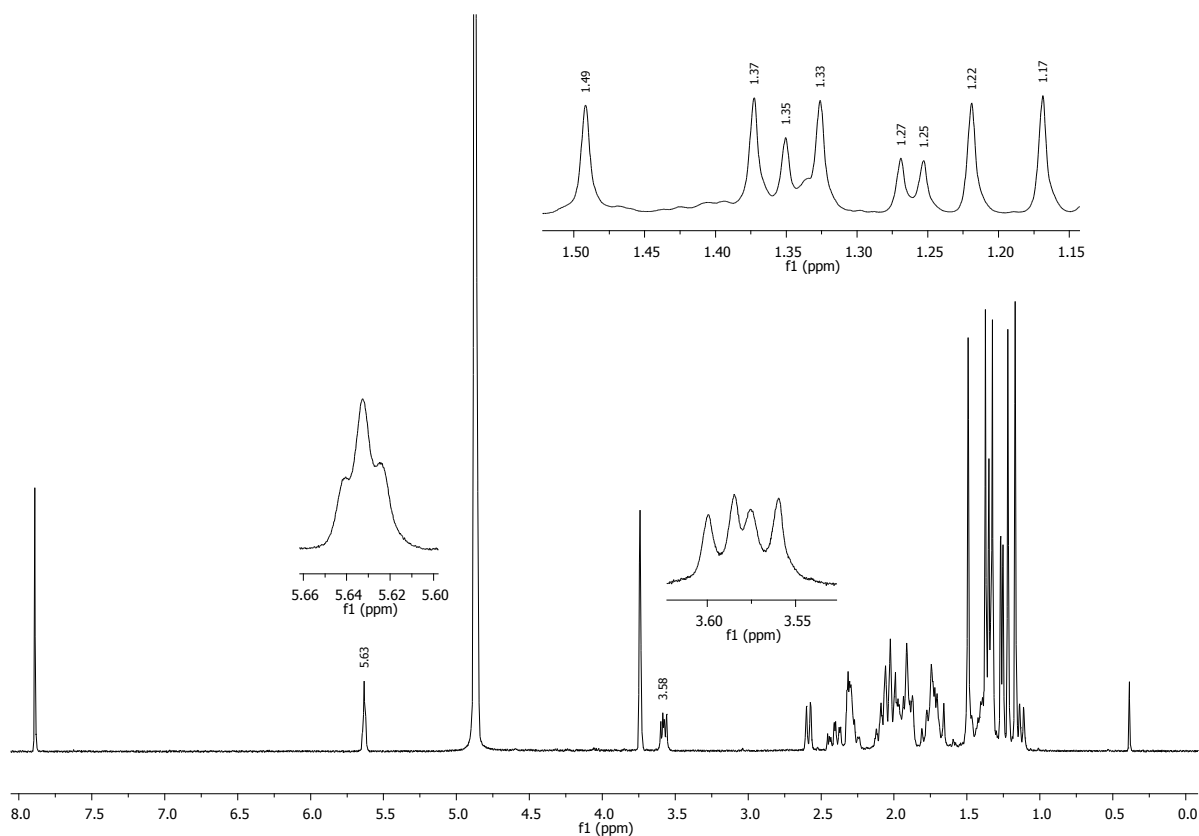


Figura 37 - Espectro de RMN ^1H de R_5 (CDCl_3 , CD_3OD , 400 MHz).

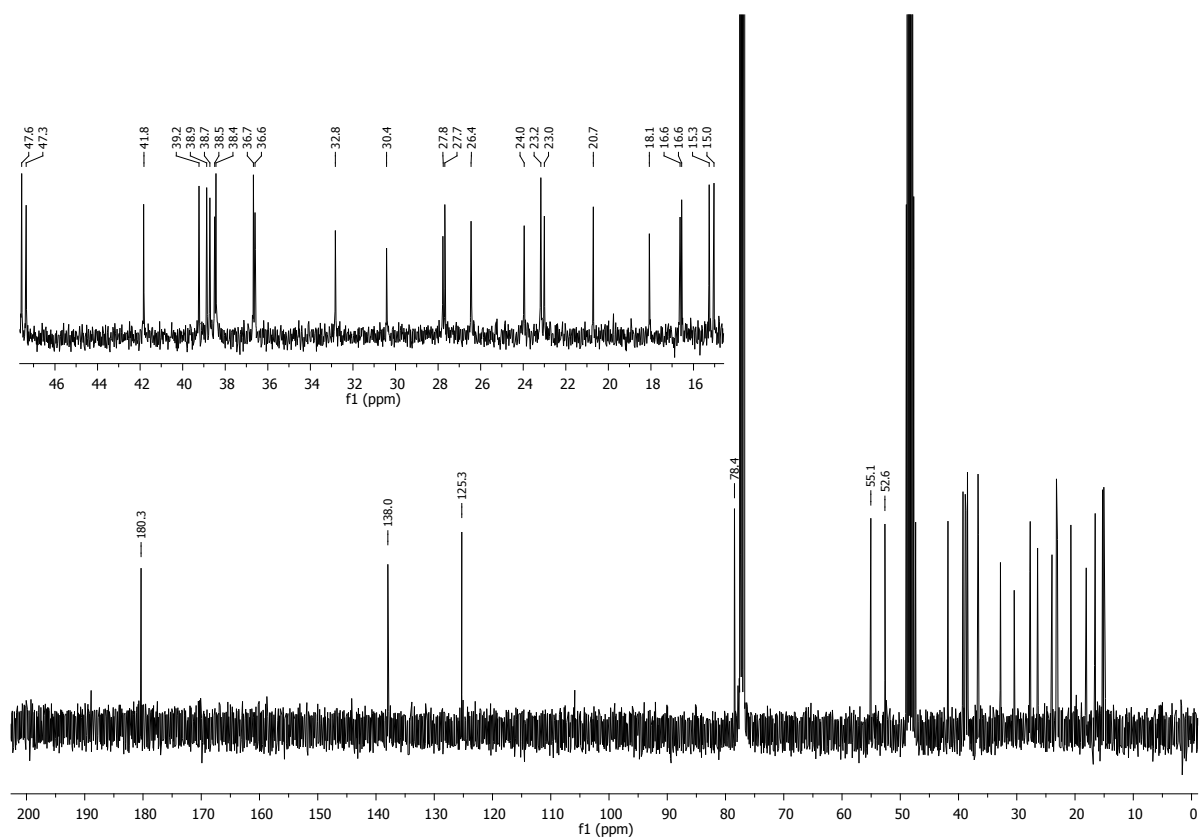


Figura 38 - Espectro de RMN ^{13}C de R_5 (CDCl_3 , CD_3OD , 100 MHz).

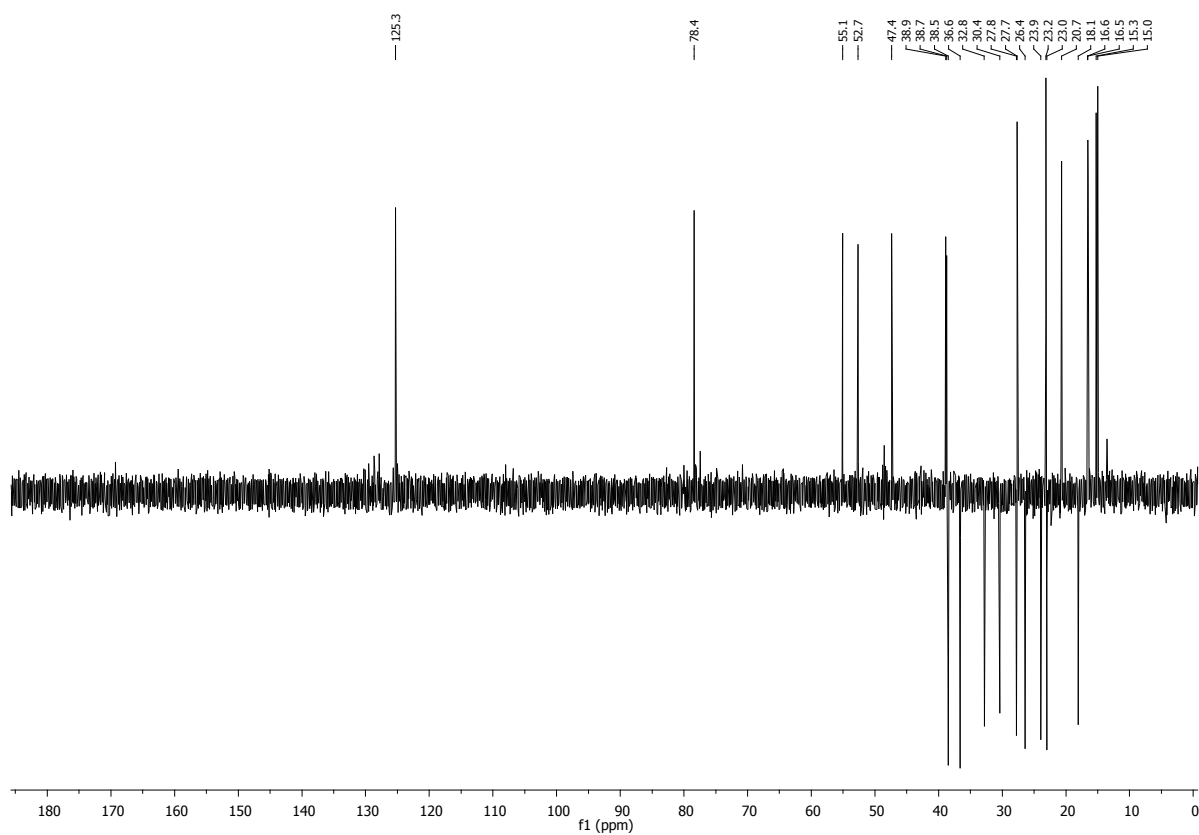


Figura 39 - Espectro de RMN DEPT 135 de R₅ (CDCl₃, CD₃OD, 100 MHz).

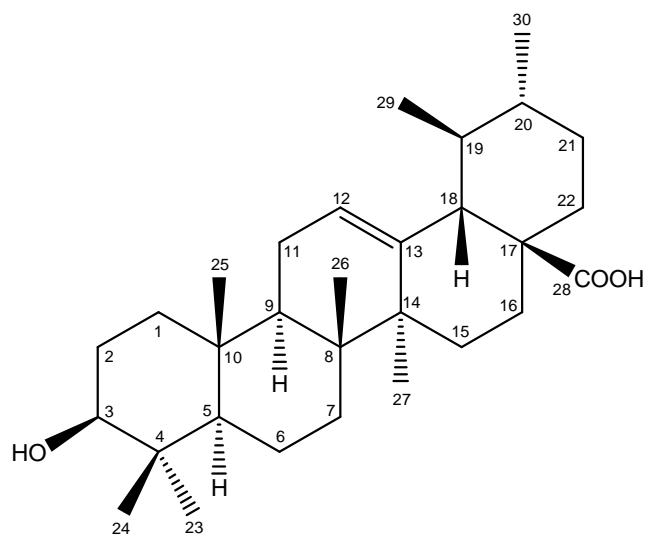


Figura 40 - Estrutura química da substância R₅, identificada como ácido ursólico.

Tabela 7 - Comparação entre os deslocamentos químicos (δ) de R₅ em RMN ¹³C (CDCl₃, CD₃OD, 100 MHz) e ácido ursólico (MIRANDA; GARCEZ; GARCEZ, 2015).

Carbono	R₅ δ ¹³C	Ácido ursólico δ ¹³C
1 (CH ₂)	38,5	38,6
2 (CH ₂)	26,4	27,9
3 (CH)	78,4	78,8
4 (C)	38,4	38,6
5 (CH)	55,1	55,2
6 (CH ₂)	18,1	18,2
7 (CH ₂)	32,8	32,9
8 (C)	39,2	39,3
9 (CH)	47,3	47,5
10 (C)	36,7	36,8
11 (CH ₂)	23,0	23,2
12 (CH)	125,3	125,5
13 (C)	138,0	138,1
14 (C)	41,8	41,9
15 (CH ₂)	27,8	27,9
16 (CH ₂)	24,0	24,1
17 (C)	47,6	48,2
18 (CH)	52,6	52,7
19 (CH)	38,9	39,0
20 (CH)	38,7	38,8
21 (CH ₂)	30,4	30,6
22 (CH ₂)	36,6	36,8
23 (CH ₃)	27,7	27,9
24 (CH ₃)	15,0	15,3
25 (CH ₃)	15,3	15,5
26 (CH ₃)	16,6	16,9
27 (CH ₃)	23,2	23,4
28 (C)	180,3	180,6
29 (CH ₃)	16,6	16,9
30 (CH ₃)	20,7	21,0

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Avaliação da toxicidade dos EEF e EEG de *M. strigipes* frente à *Artemia salina* Leach

Com os percentuais de letalidade calculados foi possível determinar os valores das DL₅₀ dos EEF e EEG como sendo de 648,17 µg/mL e maior que 1000 µg/mL, respectivamente.

4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos EEF e EEG de *M. strigipes*

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi aferida por meio do diâmetro dos halos de inibição do crescimento do microrganismo, considerando-se significativo quando houve desenvolvimento de halo maior ou igual a 10 mm e não significativo quando não houve desenvolvimento de halo ou este foi menor que 10 mm, conforme sugerido por alguns autores (AGUIAR et al., 2008; SILVA et al., 2007).

O EEF de *M. strigipes* não apresentou halo de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* NPM-M196, demonstrando que esse extrato não apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos nas concentrações avaliadas no teste de disco-difusão em ágar. Resultado semelhante foi obtido na avaliação da atividade do EEG frente às cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* NPM-M196. Por outro lado, o EEG apresentou halo de inibição de crescimento de *S. aureus* ATCC 25213 em todas as concentrações testadas, sendo que somente na concentração de 1000 µg/disco o halo de inibição foi considerado significativo de atividade antimicrobiana (10,31 ± 0,25 mm). O controle positivo ampicilina 10 µg apresentou halo de inibição de crescimento de *S. aureus* de 19,07 ± 0,46 mm.

4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante dos EEF e EEG de *M. strigipes*

4.2.3.1 Ensaio de captura do radical DPPH

Os resultados do ensaio de captura do radical DPPH demonstraram que os EEF e EEG apresentaram valores próximos para as porcentagens de inibição nas concentrações de 3,125 a 25 µg/mL. As maiores diferenças encontradas foram nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, nas quais o EEF apresentou 40,54 ± 1,97 e 73,34 ± 2,17% de inibição, respectivamente, enquanto o EEG obteve 61,10 ± 6,21 e 88,22 ± 1,01%, respectivamente (Figura 41). Os valores das CE₅₀ dos EEF e EEG (61,79 ± 2,97 e 40,67 ± 4,31 µg/mL, respectivamente) demonstraram que o EEG desempenhou uma melhor atividade antioxidante do que o EEF frente ao radical DPPH. Nesse ensaio o TROLOX apresentou CE₅₀ de 4,60 ± 0,82 µg/mL.

Os resultados da porcentagem de inibição do radical DPPH pelos EEF e EEG foram estatisticamente comparados com o TROLOX, demonstrando que, em todas as concentrações avaliadas, a atividade de captura do radical DPPH pelos extratos foi estatisticamente diferente do padrão antioxidante ($p < 0,05$) (Figura 41).

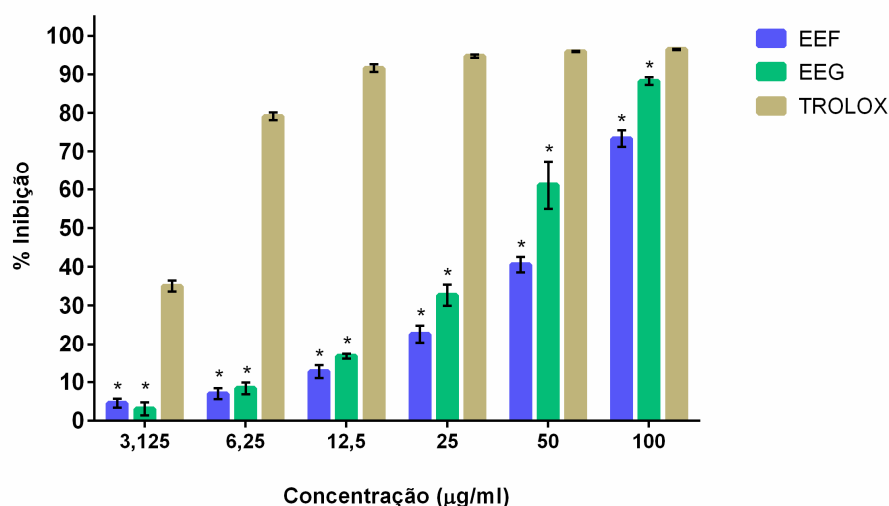


Figura 41 - Resultado dos ensaios de captura do radical DPPH pelos EEF, EEG e TROLOX. * $p < 0,05$, quando comparado ao TROLOX.

4.2.3.2 Ensaio de captura do radical ABTS

Os resultados do ensaio de captura do radical ABTS demonstraram que os EEF e EEG apresentaram valores próximos para as porcentagens de inibição nas concentrações testadas. Destaca-se o fato de que os dois extratos inibiram acima de 90% o radical ABTS já na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, tendo o EEF alcançado $91,79 \pm 0,78\%$ de inibição e o EEG $95,03 \pm 0,98\%$. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, os EEF e EEG apresentaram $98,95 \pm 0,49$ e $99,23 \pm 0,30\%$ de inibição, respectivamente (Figura 42). Da mesma forma, os valores das CE_{50} dos EEF e EEG ($23,72 \pm 0,48$ e $19,78 \pm 0,84$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) demonstraram que os extratos apresentaram atividade antioxidante próxima frente ao radical ABTS. Nesse ensaio o TROLOX apresentou CE_{50} de $1,08 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados da porcentagem de inibição do radical ABTS pelos EEF e EEG foram estatisticamente comparados com o TROLOX, demonstrando que a atividade de captura desse radical pelos extratos, nas concentrações de 3,125 a 50 $\mu\text{g/mL}$, foi estatisticamente diferente do padrão antioxidante ($p < 0,05$). Entretanto, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ os EEF e EEG não mostraram diferença estatisticamente significativa com o TROLOX ($p > 0,05$) (Figura 42).

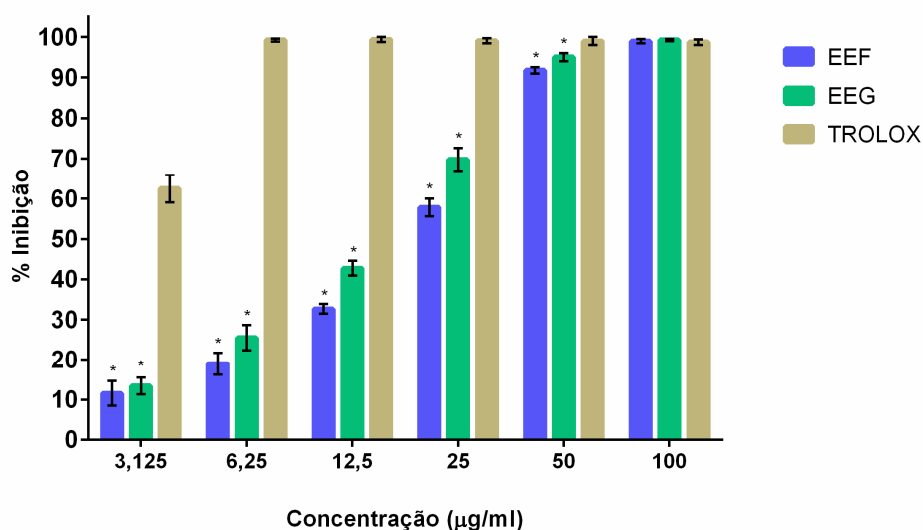


Figura 42 - Resultado dos ensaios de captura do radical ABTS pelos EEF, EEG e TROLOX. * $p < 0,05$, quando comparado ao TROLOX.

4.2.4 Avaliação da atividade trombolítica dos EEF e EEG de *M. strigipes*

As porcentagens de lise dos coágulos promovidas pelos EEF e EEG foram de 9,54 e 12,47%, respectivamente, enquanto a estreptoquinase 100.000 UI apresentou índice de 50,12%. O veículo propilenoglicol 10%, utilizado na solubilização dos extratos, promoveu 8,10% de lise dos coágulos, enquanto a água, veículo da estreptoquinase, apresentou índice de 6,42%. A análise estatística dos resultados demonstrou que a capacidade dos extratos em promover lise dos coágulos foi estatisticamente diferente do padrão estreptoquinase ($p < 0,05$). Todos os resultados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade trombolítica dos EEF e EEG de *M. strigipes*, estreptoquinase e veículos de solubilização.

Extratos e Controles	Lise dos coágulos (% \pm desvio padrão)	Valor de p quando comparado à estreptoquinase*
EEF de <i>M. strigipes</i>	9,54 \pm 1,97	< 0,05
EEG de <i>M. strigipes</i>	12,47 \pm 1,87	< 0,05
Estreptoquinase 100.000 UI	50,12 \pm 9,23	
Água	6,42 \pm 6,22	
Propilenoglicol 10%	8,10 \pm 0,73	

* $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.2.5 Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a α -amilase

A atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a enzima α -amilase foi avaliada na concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e os resultados mostraram que os extratos não apresentaram capacidade de inibição dessa enzima nos ensaios realizados. O controle positivo acarbose apresentou 87,44 \pm 0,9% de inibição sobre a atividade da enzima.

4.2.6 Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a α -glicosidase

A atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a enzima α -glicosidase foi avaliada inicialmente na concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados

demonstraram que os EEF e EEG foram capazes de influenciar na atividade enzimática da α -glicosidase, com atividade de inibição de $84,62 \pm 0,87$ e $93,17 \pm 1,24\%$, respectivamente. Estes valores de inibição demonstrados pelos extratos foram bem próximos ao que o controle positivo desoxinojirimicina apresentou sobre a atividade da enzima, $94,85 \pm 0,03\%$. Os valores da CE_{50} dos EEF e EEG foram de $40,66 \pm 0,81$ e $18,52 \pm 1,57 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto a desoxinojirimicina demonstrou CE_{50} de $37,30 \pm 4,41 \mu\text{g/mL}$. Estes resultados demonstraram o grande potencial de inibição dos extratos sobre a enzima α -glicosidase, visto que o EEF apresentou CE_{50} próxima à do controle positivo e o EEG cerca de duas vezes menor.

4.2.7 Determinação da atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a tirosinase

A atividade de inibição dos EEF e EEG de *M. strigipes* sobre a enzima tirosinase foi avaliada na concentração final de $1000 \mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram que o EEF de *M. strigipes* não apresentou capacidade de inibição sobre a enzima tirosinase no ensaio realizado. Por outro lado, o EEG teve uma atividade de inibição dessa enzima de $39,47 \pm 5,01\%$. O controle positivo, ácido kójico, apresentou uma atividade de inibição sobre a enzima de $97,28 \pm 0,29\%$.

5 DISCUSSÃO

A espécie vegetal *Myrciaria strigipes* é uma árvore recomendada para reflorestamentos e arborização urbana, além de produzir frutos comestíveis que são apreciados pela população (LORENZI, 2009). Ademais, é utilizada popularmente para fins medicinais no tratamento de cãibra, edema e dor de barriga (SOUZA et al., 2014). Não são encontrados registros na literatura referentes a estudos fitoquímicos e ensaios de atividade biológica dessa espécie.

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais e avaliar sua presença nas mesmas, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes, sendo uma ferramenta importante principalmente quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse. A análise fitoquímica em geral envolve diferentes etapas, como coleta e preparação do material vegetal, extração, análise fitoquímica preliminar, fracionamento e isolamento de substâncias e elucidação estrutural (SONAGLIO et al., 2007).

A análise fitoquímica preliminar dos EEF e EEG de *M. strigipes* indicou a presença de flavonoides, cumarinas, alcaloides, saponinas, taninos, triterpenos, esteroides e antraquinonas, sendo esta detectada somente no EEF. O estudo químico do EEF conduziu ao isolamento e identificação de cinco compostos da classe dos terpenos, sendo quatro triterpenos, friedelina, 28-hidroxifriedelina, glutinol e ácido ursólico, e um esteroide, β -sitosterol, bem como permitiu identificar três compostos fenólicos, ácido elágico, hiperosídeo e isoquercitrina.

Os terpenos, dentre os metabólitos secundários de plantas, são o grupo mais numeroso e diversificado, com mais de 40.000 substâncias diferentes pertencentes a essa classe (GARCÍA; CARRIL, 2009). Exercem funções variadas nas plantas, como proteção contra infecções por fungos e bactérias, atração de polinizadores e originam hormônios de crescimento vegetal (NIERO; MALHEIROS, 2014). Além disso, muitos representantes da classe são comercialmente interessantes pela possibilidade de uso como agentes aromatizantes e fragrâncias em bebidas, alimentos, sabonetes, cosméticos e perfumes, ou por sua importância como

inseticidas naturais, podendo ser utilizados para manter a qualidade de produtos agrícolas (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Grande parte dos terpenos demonstra alguma atividade biológica e, nesse sentido, um grupo que se destaca é o dos triterpenos, uma vez que apresentam um amplo espectro de atividades (PATOČKA, 2003), tais como analgésica e anti-inflamatória (ANTONISAMY; DURAIANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011) citotóxica (CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015), antitumoral (LEE et al., 2014), hipoglicemiante (ALQAHTANI et al., 2013), antifúngica (KUETE et al., 2007), antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2014), antiviral (HUANG et al., 2013), antioxidante (QIAO et al., 2014), cardioprotetora (MAPANGA et al., 2012) e gastroprotetora (PERTINO et al., 2007).

A presença de terpenos em espécies da família Myrtaceae é uma característica marcante (PADOVAN et al., 2014). Nessa perspectiva, o presente trabalho corrobora com essa afirmação, visto que foram isolados e identificados quatro triterpenos pentacíclicos. Apesar de serem substâncias já conhecidas e descritas em plantas, é a primeira vez que a friedelina, o glutinol e o ácido ursólico são relatados no gênero *Myrciaria*, mas esses já foram identificados na família Myrtaceae. A friedelina já foi isolada em espécies como *Syzygium jambos* (KUIATE et al., 2007), *Eugenia copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *Eugenia grandis* (MANOHARAN et al., 2007) e *Syzygium formosanum* (CHANG et al., 1999), sendo que nesta última também foi isolado o glutinol (CHANG et al., 1999). O ácido ursólico já foi identificado nas espécies *E. copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *Psidium guajava* (SHRUTHI et al., 2013) e *Plinia edulis* (ISHIKAWA et al., 2008). Por outro lado, verificou-se, por meio de levantamento bibliográfico, que é a primeira vez que a 28-hidroxifriedelina é relatada em uma espécie da família Myrtaceae.

A friedelina tem apresentado uma variedade de atividades biológicas descritas na literatura. Antonisamy et al. (2015) demonstraram significativo efeito gastroprotetor desse triterpeno em úlcera gástrica induzida por etanol em modelo animal, e Sunil et al. (2013) relataram a atividade antioxidante e o efeito hepatoprotetor. Ademais, estudos têm atribuído importante atividade antimicrobiana à friedelina, inibindo o crescimento de fungos e de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (KUETE et al., 2007). A friedelina apresentou também atividades anti-inflamatória, analgésica,

antipirética (ANTONISAMY; DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), antiplasmodial *in vitro* (NGOUAMEGNE et al., 2008) e antiparasítica contra duas espécies que provocam muitos prejuízos à agricultura (BASKAR; DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2014).

Nakagawa et al. (2004) ao investigarem possíveis efeitos antitumorais de 25 compostos isolados de *Maytenus laevis*, demonstraram que a 28-hidroxifriedelina apresentou a maior capacidade de indução de citocinas entre os compostos. Esse triterpeno demonstrou também atividade antiplasmodial *in vitro* (NGOUAMEGNE et al., 2008) e moderada atividade citotóxica contra linhagem de célula cancerígena (THAO et al., 2010).

Dentre as atividades biológicas relatadas na literatura para o glutinol estão as atividades anti-inflamatória e analgésica (GAERTNER et al., 1999), hipoglicemiante (SHARMA et al., 2015) e antifúngica (MADUREIRA et al., 2003).

O ácido ursólico tem sido extensivamente estudado e vários autores relatam significativo efeito antitumoral e atividade citotóxica desse triterpeno frente a diversas linhagens de células cancerígenas (SHANMUGAM et al., 2013; SHAO et al., 2011). Destaca-se também o estudo de Wu et al. (2014) que demonstrou o potencial hipoglicemiante do ácido ursólico, visto que este exibiu relevante capacidade de inibição da enzima α -glicosidase. Outras atividades biológicas promovidas por esse triterpeno são a anti-inflamatória (CHECKER et al., 2012), hepatoprotetora (SARASWAT; VISEN; AGARWAL, 2000), antibacteriana e antioxidante (NASCIMENTO et al., 2014).

Os esteroides vegetais são compostos presentes em um grande número de plantas e possuem estruturas químicas semelhantes à do colesterol, diferenciando-se deste pelas configurações no núcleo ou na cadeia lateral ou, ainda, pelos seus grupos polares (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014). Assim como o colesterol nas células animais, os esteroides vegetais desempenham importantes funções nas plantas, como regulação da fluidez e da permeabilidade à água e estabilização da membrana celular, atuação como substrato para uma ampla variedade de metabólitos secundários e ação como hormônios vegetais (PIIRONEN et al., 2000). Mais de 40 diferentes esteroides já foram identificados em plantas, sendo o β -

sitosterol um dos mais abundantes, já foi descrito em cerca de 500 espécies vegetais (AMBAVADE; MISAR; AMBAVADE, 2014).

Apesar de ser uma substância já conhecida e bem difundida nas espécies vegetais, o presente trabalho relatou pela primeira vez a presença de β -sitosterol no gênero *Myrciaria*. Entretanto, esse esteroide já foi identificado na família Myrtaceae, em espécies como *Eugenia jambolona* (SAHA et al., 2013), *E. copacabanensis* (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *E. grandis* (MANOHARAN et al., 2007) e *Psidium guajava* (SHRUTHI et al., 2013).

O β -sitosterol possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura, dentre elas, as atividades hipocolesterolêmica (WANG et al., 2015), analgésica e anti-inflamatória (NIRMAL et al., 2012), antibacteriana e antifúngica (ODIBA et al., 2014), antitumoral (MAHADDALKAR et al., 2015), antioxidante (LI et al., 2012) e imunomoduladora (AHERNE; O'BRIEN, 2008).

Além dos terpenos, foram identificados na espécie em estudo compostos fenólicos. Estes compostos são um dos grupos de metabólitos secundários mais numerosos, com mais de 8.000 estruturas conhecidas, e amplamente distribuídos no reino vegetal (CONFORTI; MENICHINI, 2011). Essa classe de compostos desempenha importantes funções nas plantas, como atração de polinizadores, proteção contra patógenos e predadores, proteção contra os efeitos deletérios da radiação UV e contribuem para o aroma e sabor (CHEYNIER, 2012). Ademais, possuem relevante importância econômica, sendo utilizados na produção de papel, tintas, cosméticos e na indústria de alimentos como corantes e conservantes (BRAVO, 1998).

Além disso, os compostos fenólicos se destacam por promoverem diversas atividades biológicas, como antioxidante (GUTIERREZ, 2013; LI et al., 2014), anti-inflamatória (LI et al., 2014), citotóxica (PENG et al., 2012), hepatoprotetora (GUTIERREZ, 2013), antitrombótica (TAO et al., 2012), antimicrobiana (RASHED et al., 2014), antiviral (HU et al., 2013) e cardioprotetora (RANGEL-HUERTA et al., 2015).

A análise do perfil químico de *M. strigipes* utilizando CLAE-DAD permitiu detectar a presença de ácido elágico, hiperosídeo e isoquercitrina. Apesar de serem substâncias já relatadas no gênero *Myrciaria*, é a primeira vez que são descritas

nessa espécie. O ácido elágico foi detectado nas espécies *Myrciaria dubia*, *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria vexator*, a isoquercitrina nas duas últimas e o hiperosídeo nessa última espécie (DASTMALCHI et al., 2012; FRACASSETTI et al., 2013; WU et al., 2012).

A isoquercitrina (quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo) é uma das principais formas glicosiladas do flavonol quercetina, e tem despertado cada vez mais interesse dos pesquisadores devido, principalmente, às atividades biológicas que tem demonstrado, como antioxidante (LI et al., 2011), antifúngica (YUN et al., 2015), anti-inflamatória (SOBERÓN et al., 2010), antitumoral (AMADO et al., 2014) e hipoglicemiante (PAULO et al., 2008).

O hiperosídeo (quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo) possui diversas atividades biológicas já descritas, como antioxidante (ZHOU et al., 2013), hipoglicemiante (VERMA et al., 2013), antitrombótica (KU et al., 2013), cardioprotetora (LI et al., 2013) e anti-inflamatória (KU et al., 2015).

Em relação ao ácido elágico, as principais atividades biológicas descritas são a antioxidante (HAYES et al., 2011), anti-inflamatória (KARLSSON et al., 2010), hipoglicemiante (YOU et al., 2012), antitumoral (UMESALMA; SUDHANDIRAN, 2011) e gastroprotetora (BESERRA et al., 2011).

Quanto à avaliação das atividades biológicas de *M. strigipes*, o primeiro ensaio realizado foi o de letalidade frente às larvas de *Artemia salina*. Este é considerado uma ferramenta útil para avaliação preliminar da toxicidade do extrato, pois suas larvas são altamente sensíveis a uma variedade de substâncias químicas. Ademais, pode direcionar novos estudos e sinalizar concentrações não tóxicas a serem utilizadas (OLIVA et al., 2007).

Nesse ensaio, de acordo com Nguta et al. (2011), extratos com valor de DL₅₀ menor que 100 μ g/mL demonstram alta toxicidade, DL₅₀ entre 100 e 500 μ g/mL moderada atividade, DL₅₀ entre 500 e 1000 μ g/mL apresentam leve toxicidade e DL₅₀ maior que 1000 μ g/mL não demonstram toxicidade. Considerando isto, o EEF de *M. strigipes* apresentou leve toxicidade, visto que o valor de DL₅₀ encontrado neste trabalho foi de 648,17 μ g/mL, ao contrário do EEG que não apresentou toxicidade (DL₅₀ > 1000 μ g/mL). A presença de antraquinonas no EEF, detectadas na

fitoquímica preliminar, pode estar relacionada com a leve toxicidade desempenhada. Montoya et al. (2003) verificaram toxicidade do extrato benzênico de *Heterophyllaea pustulata* frente às larvas de *A. salina*, e o estudo químico desse extrato, além de mostrar que as antraquinonas eram os compostos majoritários, conduziu ao isolamento e identificação de seis antraquinonas. Estudos demonstram que representantes dessa classe química possuem atividades biológicas como citotóxica (ALI et al., 2000; CUI et al., 2008), viruscida (ANDERSEN et al., 1991), antifúngica (AGARWAL et al., 2000), antibacteriana (ALI et al., 2000), antimalárica e antiproliferativa (HOU et al., 2009).

Toxicidade frente à *A. salina* já foi descrita também em outras espécies da família Myrtaceae, como em *Calycorectes psidiiflorus* (DOMINGUES et al., 2010), *Syzygium cumini* (DIAS et al., 2013), *Eugenia uniflora* (LEITE et al., 2009) e *Pimenta dioica* (PARRA et al., 2001).

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada por meio do teste de disco-difusão em ágar, técnica qualitativa que pode ser utilizada como uma triagem preliminar (MORENO et al., 2006). Os resultados demonstraram que somente o EEG apresentou atividade frente a um dos três microrganismos testados, promoveu halo de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 25213.

Essa atividade do EEG pode estar relacionada com a presença de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, como taninos, flavonoides e terpenos. A ação antimicrobiana dos taninos pode ser explicada, principalmente, devido sua capacidade de inibição das enzimas dos microrganismos pela complexação com íons metálicos e/ou com os substratos das enzimas, e também pela sua ação modificadora sobre o metabolismo dos microrganismos, devido à quelatação de elementos essenciais ou ação sobre as membranas celulares (SANTOS; MELLO, 2007).

A atividade antimicrobiana dos flavonoides tem sido reportada na literatura ao longo de várias décadas. Sugere-se que a ação antibacteriana direta dessa classe está relacionada com diferentes mecanismos, como danos à membrana citoplasmática causados por rompimento e/ou redução na fluidez da mesma, inibição do

metabolismo energético e da síntese de ácidos nucléicos promovidas pela inibição de enzimas chave nesses processos, e inibição da síntese da parede e da membrana celular (CUSHNIE; LAMB, 2011). Em relação aos terpenos, o mecanismo de ação antimicrobiano proposto está relacionado com sua capacidade de promover perturbação da fração lipídica da membrana plasmática do microrganismo, resultando em rompimento e/ou alteração da permeabilidade (TROMBETTA et al., 2005).

Por outro lado, devido à limitação da técnica, a formação de halo de inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25213, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* NPM-M196, promovida pelo EEF, pode ter sido prejudicada. Tal afirmação deve-se ao fato de que, nessa técnica, a atividade é dependente da difusão da(s) substância(s) ativa(s) em todas as direções do ágar, e, dessa forma, as substâncias menos polares, como alguns terpenos, e as de maior peso molecular, como alguns taninos, podem ter sua ação prejudicada, pois se difundem mais lentamente no meio de cultura (MORENO et al., 2006).

O estudo de Bona et al. (2014) demonstra essa limitação na prática. Os autores compararam as atividades antimicrobianas de três espécies pertencentes à família Myrtaceae, determinadas por diferentes técnicas. Dessa forma, puderam verificar que alguns extratos que não apresentaram atividade no método de disco-difusão, demonstraram ser ativos na técnica de microdiluição em caldo. As espécies *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* não apresentaram halo de inibição do crescimento de *Candida albicans* no teste de disco-difusão enquanto na microdiluição apresentaram atividade. Esse mesmo fato aconteceu com a avaliação da atividade de *S. cumini* frente a *S. aureus*.

Diversos estudos destacam a capacidade antioxidante de espécies do gênero *Myrciaria*. No estudo de Gonçalves, Lajolo e Genovese (2010) a atividade antioxidante de *M. dubia* mostrou ser a maior entre as dezesseis espécies pesquisadas. Essa relevante atividade da espécie também é demonstrada entre as dezoito que foram estudadas por Rufino et al. (2010), sendo que nesse estudo destaca-se também a atividade antioxidante de *M. cauliflora*. Reynertson et al. (2008), ao avaliarem a atividade antioxidante de quatorze representantes da família Myrtaceae, demonstraram que três espécies do gênero *Myrciaria*, *M. cauliflora*, *M.*

vexator e *M. dubia*, se destacaram, sendo que as duas primeiras foram as que apresentaram atividade antioxidante mais intensa dentre todas as espécies estudadas.

A atividade antioxidante de uma planta pode estar associada com os efeitos sinérgicos de diferentes compostos ativos que contribuem em graus diferentes para a atividade. Estudos demonstram que a atividade antioxidante apresenta forte correlação positiva com a presença de compostos fenólicos (MUSTAFA et al., 2010), dentre os quais se destacam os flavonoides, devido sua reconhecida capacidade antioxidante (PIETTA, 2000).

Diferentes mecanismos de ação já foram descritos para explicar essa potencialidade antioxidante dos flavonoides, entre eles, capacidade de inibição de enzimas envolvidas na produção de ER, quelação de metais que catalisam reações de formação de ER e atividade sequestradora direta sobre as ER (HAVSTEEN, 2002). Muitos estudos discutem as relações da estrutura dos flavonoides que contribuem para a capacidade antioxidante, e alguns pontos-chave na estrutura estão bem definidos, como as presenças de hidroxilas fenólicas em posição orto (grupo catecol), principalmente no anel B, dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 conjugada com grupo carbonila no carbono 4 do anel C, e hidroxilas fenólicas nos carbonos 3 e 5 dos anéis C e A, respectivamente (Figura 43) (PIETTA, 2000). As hidroxilas fenólicas, principalmente as do grupo catecol, funcionam como um potente doador de elétrons para as ER, estabilizando-as e formando o radical livre flavonil. Apesar de possuir um elétron desemparelhado, essa molécula formada mantém-se estável devido à capacidade de deslocalização desse elétron, que é conferida pelas características estruturais mencionadas acima (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PIETTA, 2000).

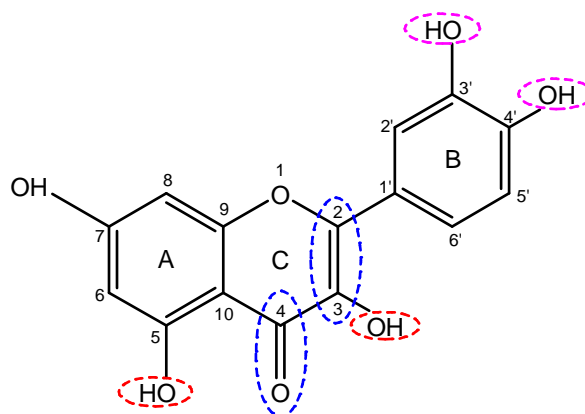


Figura 43 - Grupos químicos importantes para o desempenho da atividade antioxidante de flavonoides.

Fonte: Adaptado de Pietta (2000).

Diante do exposto, era de se esperar que o EEF de *M. strigipes* demonstrasse uma melhor capacidade antioxidante que a do EEG, pois o resultado da quantificação de flavonoides totais mostrou uma quantidade em torno de três vezes maior para aquele em relação a esse. Entretanto, os dois extratos apresentaram atividade antioxidante próxima frente ao radical ABTS, inibiram acima de 90% o radical já na concentração de 50 µg/mL, demonstraram não ter diferença estatisticamente significativa com o controle positivo TROLOX na concentração de 100 µg/mL, e apresentaram valores das CE₅₀ próximos. Frente ao radical DDPH, o EEG apresentou uma melhor atividade antioxidante do que o EEF, obtendo maiores porcentagens de inibição desse radical, principalmente nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, e sua CE₅₀ foi menor que a do EEF.

Esses resultados podem ser explicados, em parte, pelo fato de que a atividade antioxidante dos flavonoides depende de algumas características estruturais. Assim, o EEG, apesar de possuir um teor de flavonoides totais menor, pode ter flavonoides com características que proporcionem maior atividade antioxidante do que os presentes no EEF. O fato de ter sido detectada a presença de dois flavonóis glicosilados no EEF pode reforçar essa argumentação, uma vez que a glicosilação da hidroxila da posição 3 do anel C leva a uma diminuição considerável na capacidade antioxidante do composto dessa classe (PIETTA, 2000).

Com base no perfil cromatográfico do EEF (Figura 13) e do EEG (Figura 17), obtidos por CLAE, pode-se inferir que o EEG apresenta um teor de compostos fenólicos maior que o presente no EEF, o que também justifica sua maior capacidade

antioxidante. Além disso, o teor de ácido elágico determinado por CLAE foi cerca de três vezes maior no EEG em relação ao EEF, fato este que também pode estar contribuindo para a atividade antioxidante, visto que estudos também demonstram essa atividade exercida por esse composto (HAYES et al., 2011).

A pesquisa de atividade trombolítica visa dar contribuição à busca por novos compostos da classe dos agentes trombolíticos, visto que o arsenal terapêutico atualmente disponível é limitado. Os agentes trombolíticos são comumente usados nos casos de trombose venosa, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, tromboembolismo arterial e acidente vascular cerebral, condições clínicas que representam um sério problema de saúde pública (ALI et al., 2014b).

As plantas têm sido alvo de inúmeros estudos recentes na busca de compostos com promissora atividade trombolítica (ALI et al., 2014a; HUSSAIN et al., 2014), entretanto, não há estudos na literatura sobre a atividade trombolítica de espécies da família Myrtaceae. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a atividade trombolítica dos EEF e EEG de *M. strigipes*, tendo os dois extratos apresentado porcentagem de lise dos coágulos, 9,54 e 12,47%, respectivamente, menor que a do controle positivo estreptoquinase, 50,12%. A análise estatística destes resultados confirmou que a diferença apresentada pelos extratos em relação à estreptoquinase foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos ingeridos na dieta, constitui uma importante estratégia para o tratamento do diabetes tipo 2. Os principais compostos disponíveis para uso clínico com esse mecanismo de ação são a acarbose, o miglitol e a voglibose, entretanto, possuem utilização terapêutica limitada devido aos diversos efeitos colaterais gastrointestinais que provocam. Estes efeitos estão relacionados com a falta de especificidade de ação desses compostos, uma vez que a excessiva inibição da α -amilase pode levar a uma fermentação bacteriana anormal do carboidrato não digerido por essa enzima, provocando então os efeitos gastrointestinais indesejáveis. Diante disso, existe uma grande busca por compostos com atividade de inibição sobre a enzima α -glicosidase e com efeito mínimo ou sem efeito sobre a α -amilase para serem utilizados no tratamento do diabetes tipo 2 (PINTO et al., 2010).

Nesse sentido, os EEF e EEG de *M. strigipes* demonstraram um grande potencial, visto que apresentaram atividade de inibição da α -glicosidase, 84,62% e 93,17%, respectivamente, bem próxima à do controle positivo desoxinojirimicina, 94,85%. Ademais, os extratos não apresentaram qualquer atividade de inibição sobre a α -amilase, demonstrando assim uma grande especificidade de ação desses extratos sobre a α -glicosidase. Os valores calculados das CE_{50} dos extratos, no ensaio de inibição da α -glicosidase, confirmam o grande potencial de inibição, visto que o EEF apresentou CE_{50} próxima à do controle positivo desoxinojirimicina, e o EEG cerca de duas vezes menor.

Na literatura, outras espécies da família Myrtaceae também apresentaram inibição sobre a enzima α -glicosidase. O extrato hidroalcoólico da semente de *Syzygium cumini* demonstrou um potencial de inibição com valor de CE_{50} de 120,9 $\mu\text{g/mL}$ (SHINDE et al., 2008). O extrato metanólico das folhas de *Myrcia multiflora* inibiu a α -glicosidase com CE_{50} de 225 $\mu\text{g/mL}$ (YOSHIKAWA et al., 1998). Frações polares do extrato hidroalcoólico da *Eugenia uniflora* mostraram percentuais de inibição da α -glicosidase que variaram de 84,6 a 95% (ARAI et al., 1999). Souza et al. (2012a) demonstraram que o extrato de *Eugenia dysenterica* apresentou atividade de inibição dessa enzima com CE_{50} de 0,46 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade de inibição da α -glicosidase pelos EEF e EEG de *M. strigipes* pode estar relacionada com a presença de compostos pertencentes a diferentes classes químicas, visto que vários estudos relatam o potencial de inibição dos taninos (GUNAWAN-PUTERI; KAWABATA, 2010), triterpenos (WANG et al., 2013), flavonoides (PEREIRA et al., 2011) e ácidos fenólicos (YOU et al., 2012). Em relação aos flavonoides, algumas características estruturais são importantes para a atividade de inibição, como a presença de hidroxila no carbono 3 do anel C, entretanto, a glicosilação dessa posição não provocou um decréscimo acentuado na atividade, e a presença e o número de hidroxilas no anel B (WANG; DU; SONG, 2010). Dentre os ácidos fenólicos, o ácido elágico se destaca por possuir uma elevada atividade inibitória sobre a α -glicosidase (YOU et al., 2012), então, esse composto pode estar contribuindo para a maior atividade inibitória do EEG comparado ao EEF, uma vez que a quantificação mostrou maior quantidade de ácido elágico no EEG. O ácido ursólico também é um composto com reconhecida

capacidade de inibição dessa enzima e pode estar contribuindo para a atividade inibitória dos extratos (WANG et al., 2013).

Em relação à inibição da enzima tirosinase, compostos com essa capacidade podem ser clinicamente úteis no tratamento de distúrbios de hiperpigmentação da pele relacionadas com a melanina (KIM; UYAMA, 2005). Nos ensaios de inibição dessa enzima, realizados neste trabalho, o EEF não apresentou qualquer atividade de inibição, enquanto o EEG de *M. strigipes* demonstrou atividade de inibição de 39,47%, e o padrão positivo ácido kójico de 97,28%.

Estudos com outras espécies da família Myrtaceae também demonstraram essa variação na atividade. Baurin et al. (2002) relataram uma atividade de inibição de 2% para o extrato das folhas de *Myrcia sphaerocarpa*. Da mesma forma, estudo com a flor da espécie *Eugenia caryophyllata* mostrou inibição da tirosinase de 12% (LEE et al., 1997). As espécies *Syzygium cumini* e *Syzygium aromaticum* apresentaram atividade de inibição de 3,4% e 69,4%, respectivamente (ADHIKARI et al., 2008). Por outro lado, os extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas de *Eugenia dysenterica* mostraram destacada atividade de inibição da tirosinase, 90,5%, 100% e 100%, respectivamente (SOUZA et al., 2012b).

Os compostos fenólicos são os mais relatados como inibidores da enzima tirosinase, estando os flavonoides entre os mais estudados (CHANG, 2009). Flavonoides que contêm os grupos substituintes 3-hidroxi-4-ceto ou 5-hidroxi-4-ceto e/ou catecol podem quelar o cobre presente no sítio ativo da enzima, inibindo-a de maneira competitiva (KIM; UYAMA, 2005). Outro fato que reforça a importância da presença da hidroxila livre na posição 3 é que a glicosilação nessa posição leva à uma diminuição na atividade do flavonoide (CHANG, 2009). Diante disso, uma possível diferença na composição de compostos fenólicos dos EEF e EEG de *M. strigipes* pode ser responsável pela diferença encontrada na atividade de inibição da tirosinase.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho relatou pela primeira vez aspectos químicos e atividades biológicas da espécie vegetal *Myrciaria strigipes* O. Berg. O estudo químico indicou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, triterpenos, esteroides, cumarinas, alcaloides, saponinas e antraquinonas. Foram isolados e/ou identificados cinco compostos da classe dos terpenos, quatro triterpenos pentacíclicos (friedelina, 28-hidroxifriedelina, glutinol e ácido ursólico) e um esteroide tetracíclico (β -sitosterol), e três compostos fenólicos (isoquercitrina, hiperosídeo e ácido elágico). Os extratos vegetais são misturas complexas e muitas vezes os compostos encontram-se em baixas concentrações, dificultando o isolamento e identificação dos mesmos. Dessa forma, faz-se necessária a continuidade dos esforços para um maior conhecimento químico da espécie.

Este trabalho demonstrou que a espécie pode ser considerada como fonte de compostos bioativos por apresentar efeitos antimicrobiano, antioxidante e de inibição das enzimas tirosinase e α -glicosidase. O EEF demonstrou leve toxicidade às larvas de *Artemia salina*, o que desperta maior atenção à segurança do uso dessa planta medicinal e também mostra a necessidade de mais estudos relacionados com essa atividade. Apenas o EEG apresentou as atividades inibitória da enzima tirosinase e antimicrobiana, porém, a técnica que foi utilizada na avaliação antimicrobiana pode levar a resultado falso negativo, assim, faz-se necessária a avaliação por outras técnicas mais sensíveis. A espécie apresentou atividade antioxidante frente a radicais sintéticos, direcionando a continuidade da avaliação dessa atividade frente a espécies reativas de interesse biológico. Os EEF e EEG de *M. strigipes* apresentaram promissora atividade de inibição sobre a α -glicosidase, enzima envolvida na doença diabetes. Esses resultados demonstram a necessidade de mais estudos que proporcionem esclarecimentos quanto ao(s) mecanismo(s) responsável(is) pelas atividades demonstradas.

Portanto, este trabalho contribuiu para o conhecimento das propriedades químicas e biológicas de *M. strigipes*, espécie vegetal nativa do Brasil e endêmica da Bahia e do Espírito Santo. Dessa forma, o estudo está em consonância com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos,

promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento de tecnologias e inovações e o fortalecimento das cadeias e arranjos produtivos.

7 REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, A. et al. Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: *in vitro* tyrosinase inhibition. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 5, p. 353–360, 2008.
- AGARWAL, S. K. et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 43–46, 2000.
- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436–440, 2008.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Modulation of cytokine production by plant sterols in stimulated human Jurkat T cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 6, p. 664–673, 2008.
- ALI, A. M. et al. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elleptica*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 298–301, 2000.
- ALI, R. et al. Evaluation of thrombolytic potential of three medicinal plants available in Bangladesh, as a potent source of thrombolytic compounds. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 6, p. 430–436, 2014a.
- ALI, R. et al. Aspect of thrombolytic therapy: a review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 1, p. 1–8, 2014b.
- ALQAHTANI, A. et al. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 908–931, 2013.
- AMADO, N. G. et al. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth *in vitro* by targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 51, p. 35456–35467, 2014.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo farmacognóstico, fitoquímico e citotóxico do extrato etanólico e frações obtidos do caule de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 2, p. 60–65, 2011.
- AMBAVADE, S. D.; MISAR, A. V.; AMBAVADE, P. D. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 1–19, 2014.
- ANDERSEN, D. O. et al. *In vitro* virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**, v. 16, n. 2, p. 185–196, 1991.
- ANTONISAMY, P. et al. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 167–175, 2015.

- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.
- APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 433–438, 2010.
- ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 307–314, 1999.
- ARCANJO, D. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505–509, 2012.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BASKAR, K.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Bioefficacy of the triterpenoid friedelin against *Helicoverpa Armigera* (hub.) and *Spodoptera Litura* (fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 70, n. 12, p. 1877–1883, 2014.
- BAURIN, N. et al. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2-3, p. 155–158, 2002.
- BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149–158, 1955.
- BESERRA, A. M. S. E S. et al. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6957–6965, 2011.
- BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BONA, E. A. M. DE et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. **Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico**. 2012. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/media/Tabela_10_2012.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2015.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. Chapecó: Argos, 2001.
- CARVALHO JUNIOR, A. R. DE et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477–482, 2014.
- CHANG, C. W. et al. Terpenoids of *Syzygium formosanum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 327–328, 1999.
- CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.
- CHECKER, R. et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-15, 2012.
- CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 2, p. 213–226, 2005.
- CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, 2012.
- CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1610–1625, 2015.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **M44-A2**: Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline - Second Edition. Wayne, 2009.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **M2-A11**: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; Approved Standard - Eleventh Edition. Wayne, 2012.
- CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 1137–1145, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs). **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: UNIVALI, 2014. p. 55–84.

CUI, X. R. et al. Comparison of the cytotoxic activities of naturally occurring hydroxyanthraquinones and hydroxynaphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1206–1215, 2008.

CUNHA, A. P. DA (Org). **Farmacognosia e fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 670 p.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99–107, 2011.

DASTMALCHI, K. et al. Edible *Myrciaria vexator* fruits: bioactive phenolics for potential COPD therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4549–4555, 2012.

DIAS, C. N. et al. Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) skeels from Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1133–1141, 2013.

DINIZ, D. N. et al. Efeito antifúngico *in vitro* do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 151–156, 2010.

DOMINGUES, E. A. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 23–27, 2010.

DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 907–931, 2002.

FARIA, R. O. DE et al. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 287–294, 2007.

FLORES, G. et al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1256–1262, 2012.

FOROUZANFAR, M. H. More than 10% of global death and disability due to cardiovascular diseases. **European Heart Journal**, v. 34, p. 947–948, 2013.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 578–588, 2013.

GAERTNER, M. et al. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 41–44, 1999.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119–145, 2009.

GONÇALVES, A. E. DE S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.

GÜLÇİN, İ. et al. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 371–382, 2003.

GUNAWAN-PUTERI, M. D. P. T.; KAWABATA, J. Novel α -glucosidase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 384–389, 2010.

GUTIERREZ, R. M. P. Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 4, p. 1846–1855, 2013.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67–202, 2002.

HAYES, J. E. et al. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 948–955, 2011.

HOU, Y. et al. Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 2871–2876, 2009.

HU, Q. F. et al. Antiviral phenolic compounds from *Arundina graminifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 2, p. 292–296, 2013.

HUANG, Q. et al. Antiviral activity of methyl helicterate isolated from *Helicteres angustifolia* (Sterculiaceae) against hepatitis B virus. **Antiviral Research**, v. 100, n. 2, p. 373–381, 2013.

HUSSAIN, F. et al. *In vitro* thrombolytic potencial of root extracts of four medicinal plants available in Bangladesh. **Ancient Science of Life**, v. 33, n. 3, p. 162–164, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 6. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2013. 160 p.

- ISHIKAWA, T. et al. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 527–529, 2008.
- KARLSSON, S. et al. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. **The British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 8, p. 1102–1109, 2010.
- KHATIB, S. et al. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 433–441, 2005.
- KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 15, p. 1707–1723, 2005.
- KOLAK, U. et al. Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 177–186, 2005.
- KU, S. K. et al. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 197–204, 2013.
- KU, S. K. et al. Anti-inflammatory effects of hyperoside in human endothelial cells and in mice. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 784–799, 2015.
- KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 372–379, 2007.
- KUIATE, J. R. et al. Antidermatophytic triterpenoids from *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p. 149–152, 2007.
- LEE, H. et al. Celastrol inhibits gastric cancer growth by induction of apoptosis and autophagy. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, n. 12, p. 697–702, 2014.
- LEE, K. T. et al. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 19, n. 6, p. 291–298, 1997.
- LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 842–846, 2009.
- LI, M. et al. Biochemical composition and antioxidant capacity of extracts from *Podophyllum hexandrum* rhizome. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 263, p. 1-8, 2012.
- LI, R. et al. *In vivo* antioxidative effect of isoquercitrin on cadmium-induced oxidative damage to mouse liver and kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, n. 5, p. 437–445, 2011.

- LI, W. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from *Desmodium caudatum* leaves and stems. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 6, p. 721–727, 2014.
- LI, Z. L. et al. The effect of hyperoside on the functional recovery of the ischemic/reperfused isolated rat heart: potential involvement of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 132–140, 2013.
- LIVERMORE, D. M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1941–1944, 2011.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009.
- LUNA, J. DE S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 2005.
- MACEDO-COSTA, M. R. et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 565–571, 2009.
- MADUREIRA, A. M. et al. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Natural Product Research**, v. 17, n. 5, p. 375–380, 2003.
- MAHADDALKAR, T. et al. Biochemical characterization and molecular dynamic simulation of β -sitosterol as a tubulin-binding anticancer agent. **European Journal of Pharmacology**, v. 760, p. 154–162, 2015.
- MANOHARAN, K. P. et al. Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 279–281, 2007.
- MAPANGA, R. F. et al. Oleanolic acid : a novel cardioprotective agent that blunts hyperglycemia-induced contractile dysfunction. **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 1–17, 2012.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 32, n. 2, p. 513–524, 1998.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.
- MIRANDA, M. L. D. et al. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306–1311, 2012.
- MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, S. Triterpenos e outros constituintes dos frutos de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2597–2605, 2015.

- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.
- MONTOYA, S. C. N. et al. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 569–574, 2003.
- MORENO, S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.
- MUSTAFA, R. A. et al. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 28–35, 2010.
- NAKAGAWA, H. et al. Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1919–1924, 2004.
- NASCIMENTO, P. G. G. DO et al. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1317–1327, 2014.
- NASCIMENTO, O. V et al. Effects of diet supplementation with camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 355–363, 2013.
- NGOUAMEGNE, E. T. et al. Endodesmiadiol, a friedelane triterpenoid, and other antiplasmodial compounds from *Endodesmia calophylloides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 374–377, 2008.
- NGUTA, J. M. et al. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology & Therapeutics**, v. 2, p. 458–478, 2011.
- NICOLETTI, M. A. et al. Hiperpigmentos: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 14, p. 46–51, 2002.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs). **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: UNIVALI, 2014. p. 299–322.
- NIRMAL, S. A. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbor-tristis* leaves. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 4, p. 219–224, 2012.
- ODIBA, J. O. et al. Antimicrobial activity of isolated stigmast-5-en-3- β -ol (β -sitosterol) from honeybee propolis from North-Western, Nigeria. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 5, n. 12, p. 908–918, 2014.
- OLIVA, M. DE LAS M. et al. Cytotoxic activity of Argentinean essential oils on *Artemia salina*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 4, p. 259–262, 2007.

- OLIVEIRA, C. C. Trombolíticos. **Revista da SOCERJ**, v. 14, n. 1, p. 47–52, 2001.
- ORTONNE, J. P.; PASSERON, T. Melanin pigmentary disorders: treatment update. **Dermatologic Clinics**, v. 23, n. 2, p. 209–226, 2005.
- OTA, M. et al. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 287–291, 2009.
- PADOVAN, A. et al. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 695–716, 2014.
- PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.
- PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 7–12, 2003.
- PATRA, A. et al. Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 2, p. 95–100, 2010.
- PAULO, A. et al. The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isoled from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 539–543, 2008.
- PENG, F. et al. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 568–585, 2012.
- PERDIGÃO, T. L. **Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Derg exposta a diferentes concentrações de alumínio**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
- PEREIRA, D. F. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition**, v. 27, n. 11-12, p. 1161–1167, 2011.
- PERTINO, M. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug “yagua rova” (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 553–559, 2007.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.
- PIIRONEN, V. et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 939–966, 2000.
- PINTO, M. DA S. et al. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa*

Duch) using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1027–1035, 2010.

PRASAD, S. et al. Development of an *in vitro* model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. **Thrombosis Journal**, v. 4, n. 14, p. 1-4, 2006.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288–4295, 2013.

QIAO, A. et al. Triterpenoids of sour jujube show pronounced inhibitory effect on human tumor cells and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 98, p. 137–142, 2014.

RANGEL-HUERTA, O. et al. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: phenolic compounds. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5177–5216, 2015.

RASHED, K. et al. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 210–215, 2014.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883–890, 2008.

RÍOS, J.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Planta Medica**, v. 81, n. 12-13, p. 975–994, 2015.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D–49D, 2008.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2015.

RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAHA, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 651–661, 2013.

- SANTOS, S. DA C.; MELLO, J. C. P. DE. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2007. p. 615–647.
- SARASWAT, B.; VISEN, P. K. S.; AGARWAL, D. P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 163–166, 2000.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. p. 371–397.
- SEN, A. et al. Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia*. **Science Secure Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 9–13, 2012.
- SHANMUGAM, M. K. et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1579–1587, 2013.
- SHAO, J. et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2652–2661, 2011.
- SHARMA, K. R. et al. Potent insulin secretagogue from *Scoparia dulcis* Linn of Nepalese origin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 10, p. 1672–1675, 2015.
- SHINDE, J. et al. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 7, p. 1278–1281, 2008.
- SHRUTHI, S. D. et al. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). **Journal of Drug & Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 162–168, 2013.
- SIDJUI, L. S. et al. Triterpenes and lignans from *Kigelia africana*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. Suppl 2, p. 1–6, 2015.
- SILVA, J. G. DA et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572–577, 2007.
- SILVA, R. D. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337–341, 2003.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844–855, 2006.
- SOBERÓN, J. R. et al. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 329–333, 2010.

SOBRAL, M. **Myrciaria in Flora do Brasil 2020 em construção**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10801>. Acesso em: 24 mar. 2016.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2007. p. 289–323.

SOUSA, G. F. et al. New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 13439–13456, 2012.

SOUZA, P. M. et al. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 4, p. 393–399, 2012a.

SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1–8, 2012b.

SOUZA, R. K. D. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99–104, 2014.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

SUNIL, C. et al. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. leaves. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 860–865, 2013.

TAO, W. W. et al. Antithrombotic phenolic compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 422–425, 2012.

THAO, N. T. P. et al. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 121–124, 2010.

TIBERTI, L. A. et al. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 100–105, 2007.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Myrciaria dubia* (H. B. & K.) McVaugh. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7–8, p. 652–656, 2004.

- UMESALMA, S.; SUDHANDIRAN, G. Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1,2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, p. 249–258, 2011.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VERMA, N. et al. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 1, p. 65–72, 2013.
- WANG, H.; DU, Y. J.; SONG, H. C. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 6–13, 2010.
- WANG, W. H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- WANG, X. et al. Blockage of hydroxyl group partially abolishes the cholesterol-lowering activity of β -sitosterol. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 199–207, 2015.
- WANG, Z. W. et al. α -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata*. **Fitoterapia**, v. 90, p. 30–37, 2013.
- WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12 p.
- WU, P. P. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 502–508, 2014.
- WU, S. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.
- YIN, Z. et al. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3-4, p. 136–174, 2014.
- YOSHIKAWA, M. et al. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113–119, 1998.
- YOU, Q. et al. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 164–168, 2012.

YUN, J. et al. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, n. 2, p. 695–701, 2015.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Orgs). **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: UNIVALI, 2014. p. 9–37.

ZANI, C. L. et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47–50, 1995.

ZHOU, W. et al. Phytochemical studies of Korean endangered plants: a new flavone from *Rhododendron brachycarpum* G. Don. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 8, p. 2535–2538, 2013.

ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo biomonitorado com ênfase na atividade trombolítica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas de espécies vegetais brasileiras

Pesquisador: Claudia Masrouah Jamal

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 07431812.6.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde ((CCS-UFES))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 148.873

Data da Relatoria: 28/11/2012

Apresentação do Projeto:

A investigação caracteriza-se por um estudo biomonitorado de espécies vegetais, de caráter multidisciplinar, que utiliza a abordagem etnobotânica/etnomedicinal na expectativa de avaliar a possível atividade trombolítica de extratos vegetais, frações e moléculas potencialmente úteis na terapêutica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar as atividades antioxidante e trombolítica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas de espécies vegetais brasileiras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo hipótese da pesquisa, o isolamento de compostos responsáveis pela atividade trombolítica por determinada espécie, além de corroborar, em uma base científica, o uso popular de determinada planta, fornece subsídios valiosos para a modelagem de novos fármacos estruturalmente e biologicamente semelhantes àquele de origem natural.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta uma considerável fundamentação teórica, bibliográfica e metodológica não carecendo de ulteriores observações por parte do Colegiado. As alterações sugeridas no parecer

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**

anterior foram realizadas pela pesquisadora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A hipótese de pesquisa é promissora visto que poderá fornecer subsídios valiosos para a modelagem de novos fármacos no combate do tromboembolismo. Os objetivos do estudo são claros, a metodologia é pertinente e o TCLE apresenta um razoável detalhamento das informações a serem transmitidas e coletadas pelos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Sem ulteriores recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

VITORIA, 20 de Novembro de 2012

Assinador por:
Adauto Emmerich Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: S/N
UF: ES **Município:** VITORIA
Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO



**PHYTOCHEMICAL SCREENING, CYTOTOXIC AND THROMBOLYTIC ACTIVITY
EVALUATION OF *MYRCIARIA STRIGIPES* O. BERG, *IPOMOEA ALBA* L. AND
SOLANUM CORDIFOLIUM DUNAL LEAVES**

Faitanin, R.D.¹; Gomes, J.V.D.¹; Menezes, L.F.T.²; Brasileiro, B.G.³; Jamal, C.M.^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, Vitória, Brazil.

²Department of Agrarian and Biological Sciences, Federal University of Espírito Santo, 101 BR North, São Mateus, Brazil.

³Federal Institute of Southeast Minas Gerais, Muriaé Campus, Av. Cel. Monteiro de Castro, Muriaé, Brazil

*cmjama@gmail.com

Abstract

The popular use of medicinal plants is an advantageous resource on the chemical-biological research in natural products area. *Ipomoea alba* L. (Convolvulaceae), *Solanum cordifolium* Dunal (Solanaceae) and *Myrciaria strigipes* O. Berg (Myrtaceae) are naturally occurring species in Brazil, used for snake bites treatments, liver disorders and abdominal pain, respectively. The aim of this study was to evaluate the chemical profile, the cytotoxicity and thrombolytic activity of ethanolic extracts of this species leaves. The chemical profile was characterized from the performance of phytochemical tests of metabolites classes identification. The cytotoxicity of the extracts was determined by brine shrimp lethality bioassay (*Artemia salina* Leach.), and the in vitro thrombolytic activity was evaluated through the extracts capacity to cause lysis in human blood clot. The phytochemical tests indicated the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, tannins and coumarins in all three extracts. Saponins was detected in *I. alba* and *M. strigipes*, while naphthoquinones only in *M. strigipes*. *I. alba* and *S. cordifolium* extracts did not show cytotoxicity front *A. salina*, in contrast to *M. strigipes* extract (LD50 = 648.17 ppm). In thrombolytic test, *S. cordifolium* extract exhibited higher activity than *I. alba* and *M. strigipes* extracts (17.65, 10.60 and 3.88% lysis, respectively). This species extracts did not present promising thrombolytic activity. Only *M. strigipes* demonstrated cytotoxicity to *A. salina*, which evoke increased attention to the safety of this medicinal plant use.

Keywords: Thrombolytic activity; Medicinal plants; Phytochemical screening; Cytotoxicity activity

Introduction

The popular use of medicinal plants is an advantageous resource on the chemical-biological research in natural products area. The plant secondary metabolism is a large library of chemical compounds, whose structural diversity is continuously evolving and hence discovery [1]. In a preliminary investigation, natural products are subjected to in vitro assays for biological activity screening and chemical characterization tests. This makes it possible to infer which chemical classes may be involved to the biological response evaluated [2]. Historically, natural products have been a leading source of antithrombotic compounds (heparin, vitamin K antagonists, streptokinase, urokinase) [3]. Recent studies evaluate the in vitro thrombolytic activity of herbal extracts, aimed at finding new and promising natural compounds for this purpose [4-9].

Several discussions involving the clinical use of thrombolytic agents. Hypotension and cerebrovascular accident have been observed recurrently, after thrombolytic drugs administration. In addition, aged over 65, previous cardiopulmonary resuscitation and diabetes evoke the inhibition of this drugs use [10-13]. In sight of the clinical restrictions and therapeutic risks associates in thrombolytic therapy, there is a need to search for new molecules with this biological activity. Just as the industrially drugs, the natural products use for therapeutic purposes also requires care, considering their biosafety. In this regard, studies evaluate the plant extracts toxicity, in order to ensure the medicinal plants safe use [14-15].

Myrciaria strigipes O. Berg (Myrtaceae) is known as "cambucá-da-praia", "ubanaxica", "manaxica", "cabeludinha-da-praia" and popularly used for cramps, edema and abdominal pain [16]. The *Myrciaria* genus has around 99 known species, which 21 are native in Brazil, including *M. strigipes*. These species are widespread in several Brazilian biomes as Amazon Forest, Caatinga, Cerrado, Atlantic Forest, Pampa and mainly cultivated in Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais and Espírito Santo [17]. *Ipomoea alba* L., popularly known as "dama-da-noite" and "boa-noite" in Brazil, belongs to Convolvulaceae family and it is a native species to tropical and subtropical regions of America, from Argentina to Florida. This specie is utilized in gardening due to its beauty, although also others purposes are related, such as treatment of paralysis and soft tissue swelling, snake bites and religious rituals [18-20]. *Solanum cordifolium* Dunal, known as "jurubeba" and "joá-manso", is helpful for

anemia and hepatic and digestive disorders [21]. This specie is a representative from Solanaceae family, which consists of approximately 3000 species and 90 genus, including *Solanum* genus that stands out with over 1.500 species [22]. *S. cordifolium* is native in Brazil and geographically distributed mainly in Rio de Janeiro, Minas Gerais and Espírito Santo [23].

This paper describes the phytochemical study and the cytotoxicity and thrombolytic activity evaluation of ethanolic extracts from *I. alba*, *S. cordifolium* and *M. strigipes* leaves, aiming to contribute to the chemical-biological knowledge of these species.

Methods

Collection and identification of plant material and preparation of ethanolic extracts

I. alba, *M. strigipes* and *S. cordifolium* leaves were collected in Governador Valadares (MG), São Mateus (ES) and Vila Velha (ES), Brazil, respectively. The plant material collected was identified and a voucher specimen of *I. alba* has been deposited in the herbarium at the Vale do Rio Doce University (Univale) under the identification number 744, and a voucher specimens of *M. strigipes* and *S. cordifolium* has been deposited in the VIES Herbarium at the Federal University of Espírito Santo under identification number 25.038 and 12.357-1, respectively. The collected leaves were separately dried for about 72 hours in an oven at 38-40 °C. The dried plant materials were ground into coarse powder and separately extracted by passive maceration with ethanol. It was then filtered, and the filtrate was then concentrated using a rotary evaporator. The three extracts obtained were preserved in a refrigerator (2 to 5 °C) until used in subsequent chemical and biological assays.

Preliminary phytochemical screening

The ethanolic extracts were subjected to preliminary phytochemical screening to identify major classes of secondary metabolites. For each class of metabolite there are specific reactions that indicate their presence from change or formation of color, foam, fluorescence or precipitate. These tests were evaluated the presence of flavonoids, triterpenes, steroids, naphthoquinones, saponins, alkaloids, tannins, coumarins and anthraquinone heterosides [24-25].

Artemia salina lethality assay

The cytotoxicity of the extracts was evaluated on *A. salina*, according to the methodology proposed by Meyer et al (1982) [26]. *A. salina* encysted eggs were incubated for 48 hours in saline solution

(36 g/L) at 28 °C, under constant light and aeration, for hatching of larvae in a nauplii state. Then the larvae were distributed into tubes containing extracts at different concentrations (250, 500, and 1000 ppm). Potassium dichromate (250, 500, and 1000 ppm) and extracts vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO, 1% v/v) were employed as positive and negative control, respectively. Survivors larvae were counted after 24 hours. The lethality percentage was calculated for each concentration and then the 50% lethal dose (LD50) values were determined by linear regression. The assay was performed in triplicate.

***In vitro* thrombolytic activity**

The *in vitro* thrombolytic activity of the extracts was evaluated according to the methodology proposed by Prasad et al. (2006) [27]. Small portions of human venous blood (500 µL) contained in microcentrifuge tubes were incubated at 37 °C for 45 minutes. After formation of clot, the remaining fluid was removed without disrupting the clot formed and each microcentrifuge tube was weighed to determine the clot weight. After the addition of 150 µL of thrombolytic agent, the tubes were incubated at 37 °C for 90 minutes and the resulting fluid clot lysis was carefully aspirated. Then, the clot was again weighed and the percentage of clot lysis was calculated. The extracts were evaluated at concentration of 1,0 mg/mL solubilized in propylene glycol 10% v/v. As thrombolytic activity control it was used streptokinase 100.000 UI, solubilized in distilled water and the thrombolytic activity of vehicles was evaluated too. The assay was performed in quadruplicate. The significance of the percentage of clot lysis promoted by plants extracts and streptokinase when compared with their vehicles was tested by the Student t test with independent samples, using IBM SPSS Statistics 20 program ($p < 0.05$). This assay was approved by the Ethics Committee at the Federal University of Espírito Santo, Brazil, under number 148.873.

Results

Preliminary phytochemical screening

Phytochemical tests revealed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, tannins, and coumarins in all three plants studied. Saponins was detected in *I. alba* and *M. strigipes*, while naphthoquinones only in *M. strigipes*.

***Artemia salina* lethality assay**

The ethanolic extracts from *I. alba* and *S. cordifolium* leaves did not show cytotoxicity on *A.*

salina (LD50 > 1000 ppm), as opposed to *M. strigipes* leaves ethanolic extract (LD50 648.17 ppm).

***In vitro* thrombolytic activity**

The *S. cordifolium* extract exhibited higher activity than *I. alba* and *M. strigipes* extracts (17.65, 10.60 e 3.88% lysis, respectively). The highest percentage of lysis was achieved by streptokinase, whose value was 50,12%. *S. cordifolium* extract and streptokinase showed significant differences ($p < 0,001$ and $p = 0.003$, respectively) when compared with the respective vehicles used for the solubilization. All results are presented in Table 01.

Discussion

The knowledge related to the presence of certain chemical classes in plant species facilitates the choice of the chromatographic process and isolation, as well as guides the possible biological assays [28]. Another application of the results obtained in the phytochemical screening is associated with the definition of chemical markers for quality control of these species [29]. Studies show that the chemical composition of plant species can be changed, according to climatic factors (circadian cycle and seasonality), herbivory, or even the human action [30], which can influence directly the therapeutic action promoted by using of medicinal plant.

Among the three species, *M. strigipes* shows a greater variety of chemical classes. The presence of naphthoquinones may be related to the cytotoxicity performed by this extract in the *A. salina* bioassay. This chemical class is known for its toxicity, because of their bioactive properties, such as antitumor, microbicides trypanocidal activities [31].

The *A. salina* toxicity assay is widely used for predicting important pharmacological activities such as enzyme inhibition, ion channels interference and antimicrobial, cytotoxic and anti-*Trypanosoma cruzi* activities [32-34]. In this respect, extracts that have higher toxicity on *A. salina* can be most promising for these activities. However, plant species which expressing toxicity on *A. salina* may also present risks to human health [35-36]. Among the species evaluated in this study, only *M. strigipes* showed cytotoxicity to the *A. salina* larvae, which arouses greater attention to the safety use of this medicinal plant and leads new studies to investigate the bioactive potential of this extract.

Approximately 29.6% of all deaths worldwide in 2010 were due to cardiovascular diseases, among them there is the ischaemic heart disease that was most responsible for this percentage [37]. In the ischemic diseases treatment an alternative for the restoration

of blood flow is the thrombolysis promoted by drugs [10]. The thrombolytic drugs arsenal is still limited when compared to other therapeutic classes, such as the antiplatelet agents used in cardiovascular diseases [38]. Thus, research in order to discover new thrombolytic agents are needed in attempt to expand the list of drugs in this pharmacological class. The three plant species studied showed clots lysis ability of weak to moderate, and only *S. cordifolium* extract had statistical difference when compared to the vehicle. Similar results with other plant species have been described by several researchers. Khatun et al in 2014 [13] evaluated the thrombolytic activity of *Cestrum diurnum*, reaching 8.78% as a result of clots lysis. Hussain et al 2014 [10] studying the thrombolytic activity of four medicinal plants available in Bangladesh found results ranging from 15.1% to 21.26% of clots lysis. On the other hand, the six plants studied by Prasad et al 2007 [15] two, *Bacopa monnieri* and *Fagonia Arabica*, showed promising clots lysis capacity, 41.8% and 75.6%, respectively, which then proves the existence of plant molecules with such a bioactive property. The results found in this paper contribute to the chemical-biological knowledge of *Myrciaria strigipes*, *Ipomoea alba* and *Solanum cordifolium*. In view of the literature, this study is the first report to assess the thrombolytic activity of these plant species. The bioassay with larvae of *A. salina* allowed to infer that *M. strigipes* species has cytotoxic potential, which arouses attention to the secure use of this medicinal plant.

Acknowledgments

UFES and Postgraduate Program in Pharmaceutical Science – UFES (PPGCFAR).

References

- Pupo, M.T., Gallo, M.B.C., Vieira, P.C., *Biologia química: uma estratégia para a pesquisa em produtos naturais*. Quim Nova 2007;30(6):1446–1455.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga, J.V.F., et al., *Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares*. Quim Nova 2002;25(3):429–438.
- Beretz, A., Cazenave, J.P., *Old and New Natural Products as the Source of Modern Antithrombotic Drugs*. Planta Med 1991;57(7):68–72.
- Ali R, Hussain M, Runa JF. Evaluation of thrombolytic potential of three medicinal plants available in Bangladesh, as a potent source of thrombolytic compounds. *Avicenna J Phytomed* 2014;4(6):430–436.
- Chowdhury, S.R., Sharmin, T., Hoque, M., et al. Evaluation of thrombolytic and membrane stabilizing activities of four medicinal plants of Bangladesh. *Int J Pharm Sci Res* 2013;4(11):4223–4227.
- Hussain F, Islam A, Bulbul L, Moghal MR, Hossain MS. *in vitro* thrombolytic potential of root extracts of four medicinal plants available in Bangladesh. *Anc Sci Life* 2014;33(3):162–164.
- Khatun, A., Chowdhury, U.K., Jahan, A., et al., *Cytotoxic and thrombolytic activity of the aerial part of Cestrum diurnum L. (Solanaceae)*. Pharmacologyonline 2014;1:109–113.
- Kuddus, M.R., Aktar, F., Miah, M.K., et al., *Polyphenols Content, Cytotoxic, Membrane Stabilizing and Thrombolytic activities of Sarcolobus globosus: A Medicinal Plant from Sundarban Forest*. Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát 2011;10(4):363–368.
- Prasad, S., Kashyap, R.S., Deopujari, J.Y., et al. Effect of *Fagonia arabica* (Dhama) on *in vitro* thrombolysis. *BMC Complement Altern Med* 2007;7(36).
- Oliveira, C.C., *Trombóticos*. Rev SOCERJ 2001;14(1):47–52.
- Collins, R., Peto, R., Baigent, C., et al., *Aspirin, heparin and fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction*. N Engl J Med 1997;336:847–860.
- Langer, B., Wolosker, M., *Coagulação e fibrinólise: idéias atuais e suas aplicações clínicas*. Rev Med (São Paulo) 2006;85(4):157–164.
- Ali. R., Hossain, M.S., Islam, A., et al. *Aspect of Thrombolytic Therapy: A Review*. Sci World J 2014;2014.
- Brasileiro, B.G., Pizzolo, V.R., Raslan, D.S., et al., *Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district*. Brazilian J Pharm Sci 2006;42(2):195–202.
- Fennell, C.W., Lindsey, K.L., McGaw, L.J., et al. *Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology*. J Ethnopharmacol 2004;94(2-3):205–17.
- Souza, R.K.D., *Etnofarmacologia de plantas medicinais do carrasco no Nordeste do Brasil [dissertação de mestrado]*. Crato: Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, 2012.
- Borges, L.L., Conceição, E.C., Silveira, D., *Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus*. Food Chem 2014;153:224–233.
- Barrella, G.E., Younes, R.N., Varella, A.D., et al. *Toxicity of Ipomoea alba L. (Convolvulaceae)*. Pharmacologyonline 2012;3:29–41.
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gomez, J., Figueroa-González G, et al. *Mammalian Multidrug Resistance Lipopentaccharide Inhibitors from Ipomoea alba Seeds*. J Nat Prod 2012;75:1603–1611.
- Camargo, M.T.L.A., *Contribuição ao estudo da Ipomoea purpurea Roth., I. alba L. e I. pes-caprae Sw. empregadas na medicina popular e em rituais de religiões de origem e influência africana no Brasil*. Rojasiana 1998;5(1):37–50.
- Jamal, C.M., Silveira, D., Ronchi, R., et al., *O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós-colheita da banana*. In: IX Simpósio Nacional do Cerrado, 2008. ParlaMundi Anais Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados. 2008;1-9.
- Marsiglia, J.D.C., Loss, A.C.C., Stange, V.S., et al., *Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de Solanum cordifolium Dunal e Solanum torvum Sw*. Nat line 2011;9(1):30–34.
- Stehmann, J.R., Mentz, L.A., Agra, M.F., et al., *Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Costa, A.F.. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.
- Wagner, H., Bladt, S., *Plant drug analysis*. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1996.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al. *Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*.

- Planta Med 1982;45:31–34.
27. Prasad, S., Kashyap, R.S., Deopujari, J.Y., et al., Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thromb J* 2006;4:14.
 28. Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., et al., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.
 29. Veiga, J.V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., *Plantas medicinais: cura segura?* *Quim Nova* 2005;28(3):519–28.
 30. Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., *Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários*. *Quim Nova* 2007;30(2):374–81.
 31. Silva, M.N., Ferreira, V.F., Souza, C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim Nova* 2003;26(3):407–16.
 32. Arcanjo, D.D.R., Albuquerque, A.C.M., Melo-Neto, B., et al., Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian J Biol* 2012; 72(3):505–9.
 33. McLaughlin, J.L., Rogers, L.L., Anderson, J.E., The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* 1998;32:513–24.
 34. Zani, C.L., Chaves, P.P., Queiroz, R., et al., Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine* 1995;2(1):47–50.
 35. Hirota, B.C.K., Paula, C.S., Miguel, O.G., Miguel, M.D., Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. *Visão Acadêmica* 2012;13(2):42–48.
 36. Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardiñas, I.G., et al., Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 2001;8(5):395–400.
 37. Forouzanfar, M.H., More than 10% of global death and disability due to cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2013;34:947–948.
 38. Cheng, J.W.M., Updates in antiplatelet agents used in cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012;18(6):514–524.
 39. Agargun, M.Y., Cartwright, R., REM sleep, dream variables and suicidality in depressed patients. *Psychiatry Res* 2003;119:33–39.

Table 1. Thrombolytic activity of *I. alba*, *S. cordifolium* and *M. strigipes* extracts

Extracts, Control and Vehicles	Clot lysis (%)	p value (compared to vehicle)
<i>Ipomoea alba</i>	10.60 ± 2,62	0.116
<i>Solanum cordifolium</i>	17.65 ± 3,88	0.003
<i>Myrciaria strigipes</i>	9.54 ± 1,97	0.247
Streptoquinase	50.12 ± 9,23	<0.001
Water	6.42 ± 6,22	-
Propylenoglycol 10%	8.10 ± 0,73	-