



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA CABRAL

**CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE
Spondias mombin (ANACARDIACEAE)**

Natal
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA CABRAL

**CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE *Spondias mombin*
(ANACARDIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADORA: Prof^a Dr^a: Silvana Maria
Zucolotto Langassner**

**CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a: Raquel Brandt
Giordani**

Natal
2014

Catálogo da publicação na fonte

C117ci

Cabral, Bárbara.

Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombim* / Bárbara Cabral. – Natal/RN, 2014.

95f.

Orientadora: Profª Drª Silvana Maria Zucolloto Langassner.

Coorientadora: Profª Drª Raquel Brandt Giordani.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde.

1. *Spondias mombim* – Dissertação. 2. Ácidos fenólicos – Dissertação. 3. Antiinflamatório – Dissertação. 4. Antioxidante – Dissertação. 5. Antimicrobiano – Dissertação. 6. Antiproliferativo – Dissertação. I. Langassner, Silvana Maria Zucolloto. II. Giordani, Raquel Brant. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA CABRAL

CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Spondias mombin* (ANACARDIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA :Profª Drª: Silvana Maria Zucolotto Langassner

CO-ORIENTADORA: Profª Drª: Raquel Brandt Giordani

Aprovado em:

Banca examinadora

Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
(presidente)

Profa. Dra. Karen Luise Lang
(membro externo)

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo
(membro interno)

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a minha família, em especial a minha mãe Jucinete Vicente Cabral e meu pai José Averaldo Cabral, por todo amor, dedicação e principalmente por me incentivar e acreditar nos meus sonhos. Ao meu namorado João Ferreira Cabral Neto pela paciência e amor. Sem o apoio de vocês a batalha teria sido muito mais árdua.

AGRADECIMENTOS

Á Deus que é o autor da minha vida, para ele e por ele seja todas as coisas.

Á minha família por todo apoio e confiança, em especial a minha mãe Jucinete Vicente Cabral por todo seu esforço, apoio e por sempre acreditar em mim e me incentivar a lutar pelos meus objetivos. Ao meu pai José Averaldo Cabral, pela confiança e orgulho depositados em mim. A minha irmã Raquel Cabral e primas Alany Cabral e Jéssica Caroline pelo apoio durante a minha jornada acadêmica.

Ao meu namorado João Ferreira Cabral Neto, pelo apoio, amor e companheirismo e por está presente neste momento tão especial da minha vida. Amo você!

Á minha orientadora Silvana Maria Zucolotto, pelas orientações durante todo esse período e pela confiança e oportunidade concedida para a realização desse sonho. Muito obrigada!

Á minha co-orientadora Raquel Brandnt Giordani, pelas orientações, conselhos e ensinamentos fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos meus colegas do Pnbio pela a amizade, ajuda, troca de experiências e por todos os momentos de alegrias que passamos juntos. Sentirei saudades de vocês! Em especial gostaria de agradecer a Emerson que me ajudou, quando eu estava iniciando meus primeiros passos no laboratório. A minha aluna de iniciação Ana Cássia por me ajudar na fase final do meu trabalho. Obrigada a todos!

Ao técnico do laboratório de farmacognosia, Walteçá, pela amizade, conselhos e experiências repassadas durante esse período.

Ao laboratório de farmacognosia da UFSC na pessoa do professor Flávio Henrique Reginatto pela colaboração nas análises Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Ao laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica da UFRN na pessoa do professor Matheus Fernandes pedroso pela colaboração nos experimentos de atividade anti-inflamatória.

Ao professor Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica/UFRN e da Profa. Dra. Katia Castanho Scortecci, do Departamento de Biologia pela colaboração nos ensaios de atividade antioxidante e antiproliferativa.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE QUADROS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA ANACARDIACEAE	20
2.2 ESPÉCIE <i>Spondias mombin</i>	19
2.2.1 Descrição botânica	21
2.2.3 Uso popular	21
2.2.4 Composição Química	22
2.2.4.1 Compostos Fenólicos simples	22
2.2.4.2 Taninos	23
2.2.4.3 Flavonoides	23
2.2.4.4 Triterpenos	24
2.2.4.5 Alcaloides; saponinas; antraquinonas glicosiladas	24
2.2.5 Atividades biológicas	24
2.3 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E VALIDAÇÃO DE MÉTODO	28
2.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO	29
2.4.1 Modelo de inflamação	31
2.5 PROCESSO OXIDATIVO X ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
2.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 MATERIAL VEGETAL	34
3.2 EXTRAÇÃO	34
3.3 FRACIONAMENTO	35
3.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	35

3.5	ANÁLISE DO EXTRATO DE <i>S. mombin</i> POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) ...	35
3.6	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	37
3.6.1	Análise quantitativa do extrato das folhas de <i>S. mombin</i> por CLAE	38
3.7	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	39
3.7.1	Atividade Anti-inflamatória.....	39
3.7.1.1	Animais	39
3.7.1.2	Peritonite aguda induzida por carragenina	39
3.7.2	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	41
3.7.2.1	Atividade sequestradora de radicais livres DPPH	41
3.7.2.2	Teste do sequestro do íon superóxido (O ₂ ⁻)	42
3.7.2.3	Poder redutor	42
3.7.2.4	Atividade sequestradora do íon hidroxila (OH ⁻)	42
3.7.3	Atividade antiproliferativa	43
3.7.3.1	Teste de Viabilidade Celular – MTT	43
3.7.4	Análise estatística	44
3.7.5	Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato de folhas e dos frutos de <i>S. mombin</i>	44
3.7.5.1	Cepas bacterianas	44
3.7.5.2	Difusão em disco	45
3.7.5.3	CIM (Concentração Inibitória Mínima)	45
3.7.5.4	CBM (Concentração Bactericida Mínima)	46
3.7.5.5	Bioautografia	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	48
4.2	ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>S. mombin</i> POR CLAE	52
4.2.1	Análise do extrato hidroetanólico das folhas	52
4.2.2	Análise do extrato hidroetanólico dos frutos	56

4.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	58
4.3.1	Análise quantitativa do extrato de <i>S. mombin</i> por CLAE	60
4.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	61
4.4.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória	61
4.4.2	Avaliação da atividade antioxidante	65
4.4.2.1	Sequestro do Radical DPPH	65
4.4.2.2	Sequestro do radical superóxido.....	66
4.4.2.3	Poder redutor	68
4.4.2.4	Sequestro de radicais hidroxilas	70
4.4.3	Atividade antiproliferativa	72
4.4.3.1	Avaliação da viabilidade celular.....	72
4.4.4	Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>S. mombin</i>	74
4.4.4.1	Difusão em disco	74
4.4.4.2	Determinação do MIC e MBC.....	75
4.4.4.3	Bioautografia.....	76
5.	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Árvore e frutos de <i>S. mombin</i>	21
Figura 2:	Derivados de ácido carboxílico isolados das folhas de <i>S. mombin</i>	23
Figura 3:	Estrutura química do ácido elágico isolado do extrato metanólico das folhas de <i>S. mombin</i>	23
Figura 4:	Estrutura química do flavonoide quercetina, isolado do extrato metanólico das folhas de <i>S. mombin</i>	24
Figura 5:	CCD do extrato hidroetanólico das folhas; frações: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol.....	49
Figura 6:	Co-CCD do extrato hidroetanólico das folhas e dos padrões ácido elágico (a) quercetina (b).....	50
Figura 7:	Co-CCD do extrato hidroetanólico, extrato hidroetanólico + Canferol e Canferol.....	50
Figura 8:	CCD do extrato hidroetanólico dos frutos e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e <i>n</i> -butanol	51
Figura 9:	Cromatograma obtido por CLAE acoplado a detector DAD (analisado a 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de <i>S. mombin</i>	53
Figura 10:	Cromatograma obtido por CLAE acoplado a detector DAD (UV 340 nm) do EHfl com padrões: 1-ácido clorogênico, 2-ácido elágico. 3- isoquercetrina	54
Figura 11:	Cromatograma obtido por CLAE acoplado a detector DAD (UV 340 nm) do EHfl (a) e das frações:diclorometano (b), acetato de etila (c), butanol (d) e fração residual (e).....	56
Figura 12:	Cromatograma obtido por CLAE acoplado a detector DAD (analisado a 340 nm) do EHfr com padrões: 1- ácido clorogênico , 2- rutina.....	57
Figura 13:	Curva analítica do ácido clorogênico / 10-50 µg/mL	58
Figura 14:	Curva analítica do ácido clorogênico / 10-50 µg/mL	58

- Figura 15: Efeito do EHfl de *S. mombin* na migração leucocitária induzida por carragenina. Extrato hidroetanólico das folhas, testado nas doses de 100, 200, 300 e 500 mg/Kg, i.p. Dexametazona. Dados expressos como média \pm desvio padrão. * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais 62
- Figura 16: Efeito das frações das folhas de *S. mombin* na migração leucocitária induzida por carragenina. Frações testadas na concentração de 200 mg/Kg, i.p. Dexametazona (Dexa), diclorometano, acetato de etila, butanol, fração residual. Dados expressos como média \pm desvio padrão. *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais..... 62
- Figura 17: Efeito do ácido elágico e do ácido clorogênico das folhas de *S. mombin* na migração leucocitária induzida por carragenina. Compostos testados nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/Kg, i.p. Dexametazona (Dexa). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais..... 63
- Figura 18: Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas; frações: diclorometano, acetato de etila, butanol, fração residual e extrato hidroetanólico dos frutos, medida pelo ensaio de sequestro do radical DPPH, nas concentrações de 60, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos como média do percentual de sequestro de DPPH..... 66
- Figura 19: Atividade antioxidante dos compostos: ácido clorogênico, ácido elágico e a rutina, medida pelo ensaio de sequestro do radical DPPH, nas concentrações de 5, 15. 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados são expressos como média do percentual de sequestro de DPPH..... 66

Figura 20:	Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de frações: diclorometano, acetato de etila, butanol, fração residual e do extrato hidroetanólico dos frutos e padrão de ácido ascórbico, medida pelo ensaio de poder redutor nas concentrações de 60, 125, 250, 500 µg/mL e para o padrão em concentração de 25 µg/mL.Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de poder redutor.....	69
Figura 21:	Atividade antioxidante dos compostos Ác. clor, Ác. elág , Rut e o padrão de ácido ascórbico, medida pelo ensaio de poder redutor nas concentrações de 5, 15, 30, 60 µg/mL e para o padrão em uma concentração de 25 µg/mL. Os resultados são expressos como média do percentual de poder redutor.....	69
Figura 22:	Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas e frações: diclorometano, acetato de etila, butanol, fração residual e do extrato hidroetanólico dos frutos, medida pelo ensaio de sequestro de radicais hidroxilas nas concentrações de 60, 125, 250, 500 µg/mL.Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de radicais hidroxilas.....	70
Figura 23:	Atividade antioxidante dos compostos Ác. clor, Ác. elág e Rut, medida pelo ensaio de radicais hidroxilas nas concentrações de, 5, 15, 30 e 60µg/mL. Os resultados são expressos como percentual de radicais hidroxilas.....	71
Figura 24:	Ensaio Biautográfico frente ao <i>S. aureus</i> do EHfl de <i>S. mombin</i> . (a) Placa bioautografia; (b) Placa controle	77
Figura 25:	Esquema representativo da atividade inflamatória	78
Figura 26:	Esquema representativo da atividade antioxidante e antiproliferativa	79
Figura 27:	Esquema representativo da atividade antimicrobiana	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estudos pré-clínicos <i>in vitro</i> relatados para a espécie <i>S. mombin</i>	25
Tabela 2:	Estudos pré-clínicos <i>in vivo</i> relatados para a espécie <i>S. mombin</i>	26
Tabela 3:	Repetibilidade e precisão intermediária do ácido clorogênico e do ácido elágico.....	59
Tabela 4:	Ensaio de recuperação.....	60
Tabela 5:	Limite de detecção e quantificação do ácido clorogênico e do ácido elágico.....	60
Tabela 6:	Quantificação do ácido clorogênico e do ácido elágico.....	61
Tabela 7:	Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas; frações: diclorometano, acetato de etila, butanol, fração residual e extrato hidroetanólico das folhas, medida pelo ensaio de sequestro de radicais superóxidos, nas concentrações de 60, 125. 250 e 500 µg/mL. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de sequestro do radical superóxido.....	68
Tabela 8:	Atividade antioxidante dos compostos ácido clorogênico, ácido elágico e rutina, medida pelo ensaio de sequestro de radicais superóxidos, nas concentrações de 5, 15. 30 e 60 µg/mL. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de sequestro do radical superóxido.....	68
Tabela 9:	Efeitos dos extratos e frações de <i>S. mombin</i> nas concentrações de 60, 125 e 250 µg/mL, e do ácido elágico, ácido clorogênico e rutina(5, 15 e 60 µg/mL), na viabilidade de fibroblasto 3T3, no tempo de 24 h. Resultados expressos em porcentagem de proliferação ± desvio padrão.....	73
Tabela 10:	Atividade antimicrobiana do EHfl e das frações (Dcm, AcOEt, ButOH, Frs) de <i>S. mombin</i> na concentração de 2 mg/disco. Diâmetro (mm) do halo de inibição do crescimento microbiano de cepas Gram positivas e Gram negativas.....	75

Tabela 11: Determinação da CIM e CBM das bactérias em diferentes concentrações do EHfl de *S. mombin*.....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Distribuição dos grupos no modelo de peritonite induzido por carragenina, para avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de <i>S. mombin</i>	40
Quadro 2:	Distribuição dos grupos do modelo de peritonite induzido por carragenina, para avaliação da atividade antiinflamatória das frações das folhas de <i>S. mombin</i>	40
Quadro 3:	Distribuição dos grupos do modelo de peritonite induzido por carragenina, para avaliação da atividade antiinflamatória do ácido clorogênico e do ácido elágico.....	41
Quadro 4:	Parâmetros de desempenho cromatográfico.....	54

RESUMO

S. mombin é uma espécie frutífera que se encontra dispersa em regiões tropicais da América, África e Ásia. No Brasil a espécie pode ser encontrada em vários estados tendo maior prevalência nas regiões norte e nordeste do país. Foram descritos poucos estudos químicos e farmacológicos para a espécie *S. mombin* e até o momento não foram analisados os marcadores químicos da espécie. Diante desse contexto, este trabalho buscou caracterizar os marcadores químicos para as folhas e frutos de *S. mombin* e avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa e antimicrobiana. O extrato das folhas (EHfl) secas e dos frutos (EHfr) *in natura* foram preparados por maceração em meio hidroalcoólico. Para a caracterização dos compostos ativos da espécie *S. mombin*, os extratos hidroetanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente *n*-hexano (Hex), diclorometano (Dcm), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (ButOH). A avaliação do perfil químico das folhas por CCD e CLAE mostrou que a espécie é rica em compostos fenólicos. Na análise por CCD foi observada a presença de quercetina, ácido elágico e canferol. A análise por CLAE permitiu a identificação e a quantificação de ácido elágico e ácido clorogênico no EHfl. A metodologia analítica foi validada segundo os parâmetros estabelecidos pela RDC 899/2003 e pela ICH. Na análise qualitativa por CLAE do EHfr foram identificados o ácido clorogênico e a rutina. Os resultados da avaliação da atividade antiinflamatória mostraram que o EHfl das folhas, nas doses de 100, 200, 300 e 500 mg/kg, apresentou efeito de inibição da migração de leucócitos no modelo de peritonite aguda induzida por carragenina. Todas as frações foram ativas, no entanto, a fração AcOEt na dose de 200 mg/kg apresentou melhor atividade em relação às outras frações testadas. O EHfl e a fração AcOEt apresentaram importante perfil de inibição bacteriana no teste de difusão em disco, principalmente frente à bactéria *S. flexneri*. O EHfl e as frações (Dcm, AcOEt, ButOH) das folhas assim como o EHfr apresentaram importante atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, sequestro de radicais superóxidos, sequestro de radicais hidroxilas e poder redutor. No que se refere à avaliação da citotoxicidade do EHfl, das respectivas frações e do EHfr frente à cultura de células de fibroblastos 3T3 não foi observada citotoxicidade significativa. Os resultados mostraram que o EHfl possui atividade antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Verificou-se que o ácido clorogênico e o ácido elágico podem ser usados como marcadores biativos das folhas de *S. mombin*. O EHfr apresentou atividade antioxidante e foi observada a presença de ácido clorogênico e rutina. Além disso, não foi observada atividade citotóxica para o EHfr e para o EHfl.

Palavras chaves: *Spondias mombin*, ácidos fenólicos, antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiano e antiproliferativo.

ABSTRACT

Spondias mombin is a fruitful species dispersed in tropical regions of America, Africa and Asia. In Brazil, the species can be found mainly in the northern and northeastern regions. Scarce chemical and pharmacological studies have been reported for *S. mombin* and until this moment studies about chemical markers were not developed. In this context, the aims of this study were to characterize the chemical markers from *S. mombin* leaves and evaluate their anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative potentials. The chemical profile of the hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves analyzed by HPLC-DAD, through a validated method, allowed the identification and quantification of ellagic acid and chlorogenic acid. This extract showed anti-inflammatory potential in acute peritonitis model induced by carrageenan. The hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves was subjected to a liquid-liquid partition with the solvents: *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. Regarding the anti-inflammatory potential of the fractions obtained they were active; however, ethyl acetate fraction at 200 mg/kg showed highlighted results. The compounds ellagic acid and chlorogenic acid also inhibited the leukocyte migration to the site of inflammation at 2.5, 5 and 10 mg/kg. The hydroethanolic extract, fractions and the chemical markers showed significant antioxidant potential when evaluated in different assays: DPPH Free-Radical Scavenging, Superoxide Radical Scavenging, Hydroxyl Radicals Scavenging and Reducing Power. Taken together our results showed that hydroethanolic extract of *S. mombin* leaves has ellagic acid and chlorogenic acid as bioactive markers and it demonstrated anti-inflammatory and antioxidant properties besides no cytotoxicity against 3T3 cells. It enables us to suggest *S. mombin* as an important species to develop herbal drugs.

Key words: *Spondias mombin*, phenolic acid, antiinflammatory, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte de princípios ativos, que produzem uma variedade de compostos denominados metabólitos secundários, responsáveis por atividades biológicas clinicamente importantes (YAM et al., 2008). Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo são derivados de plantas. Do total de 252 medicamentos na lista de medicamentos essenciais da OMS, 11% é exclusivamente de origem vegetal (SAHOO; MANCHIKANTI e DEY, 2010).

A etnofarmacologia associada com o estudo químico tornou-se uma ferramenta importante na bioprospecção. Muitos estudos têm associado às informações sobre o uso tradicional de plantas medicinais a fitoquímica e estudos farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos fitoterápicos (MEDEIROS et al. 2013).

O Brasil tem uma enorme biodiversidade, incluindo várias plantas de interesse econômico (ALBUQUERQUE et al. 2007). As regiões Norte e Nordeste do país são as que concentram a maior parte da biodiversidade existente, o que permite acesso a inúmeros tipos de plantas e espécies frutíferas (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010).

Devido à biodiversidade existente, as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos são atualmente as classes de produtos com maior potencialidade de crescimento no Brasil, onde as vendas têm crescido de 10 a 15% ao ano, porém ainda com participação de 2%, em média, no mercado de medicamentos (BRASIL, 2011 d).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e fitoterápicos consiste na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Uma das ações realizadas por esse órgão para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade (CARVALHO et al., 2008).

Medicamento fitoterápico, de acordo com a ANVISA, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado

pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2011c).

Para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico, a atual legislação sobre fitoterápicos, a RDC 14/2010 preconiza a utilização de um marcador que seria um composto ou uma classe de compostos químicos presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2011c). Os marcadores químicos devem ser utilizados em várias fases do desenvolvimento e fabricação de um medicamento à base de plantas, para a autenticação e diferenciação de espécies (LI et al. 2008).

Diante desse contexto, este trabalho buscou caracterizar marcadores para as folhas e frutos de *S. mombin* e avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa e antimicrobiana de extratos, frações e compostos isolados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

A família Anacardiaceae compreende 55 espécies sendo que 9 delas apresentam interesse medicinal (MEDEIROS et al. 2013). Tal família é de origem nativa, no entanto, não é endêmica do Brasil. É distribuída por todas as regiões do país tendo maior prevalência nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste (BRASIL, 2012 f). Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea* (CORREIA; DAVID; DAVID JORGE, 2006).

Dentro do gênero *Spondias*, as espécies que mais se destacam são: *Spondias mombin* L (cajazeira), *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro), *Spondias duleis* Parkinson (cajaraneira), *Spondias purpurea* L. (serigueleira), *Spondias* sp. (umbu-cajazeira) (BRASIL, 2009 e).

2.2 A ESPÉCIE *Spondias mombin*

S. mombin é uma espécie frutífera que se encontra dispersa em regiões tropicais da América, África e Ásia (SOARES, 2005). No Brasil a espécie pode ser encontrada em vários estados tendo maior prevalência nas regiões norte e nordeste do país (BRASIL, 2013 f).

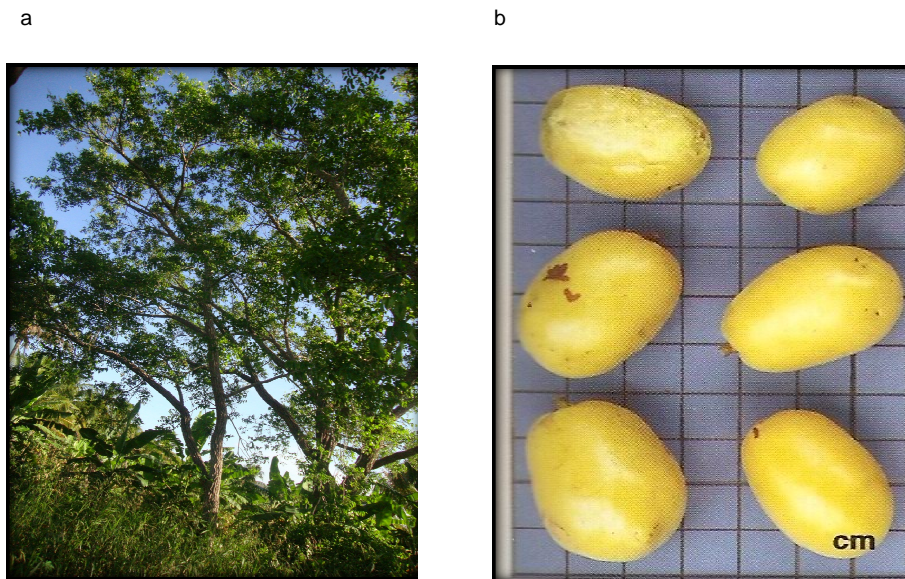
A espécie *S. mombin* se adapta muito bem às condições climáticas do nordeste brasileiro, produzindo, frutos nutritivos, saborosos e de grande aceitação pelo mercado consumidor nacional (BRITO et al. 2009). Seus frutos são conhecidos como taperebá, cajá-mirim e cajá verdadeiro e são utilizados na confecção de polpas, sucos, picolés, sorvetes, néctares e geléias (BRASIL, 2009 e).

Os frutos desempenham um importante papel na saúde humana, contribuindo para o fornecimento de calorias, sais minerais, vitaminas, fibras e água (BRASIL, 2009 e). O fruto do cajá é extremamente aromático, apresentando quantidades expressivas de carotenóides e compostos fenólicos quando comparado com outras frutas tropicais; como maracujá e abacaxi (CARVALHO et al. 2013).

2.2.1 Descrição botânica

De acordo com Lorenzi (2002), a árvore mede até 25 m de altura, com folhas compostas de 3 a 8 pares de folíolos de forma oval lanceolada com margens serradas quando bem jovens (Figura 1a). Os frutos são do tipo drupa, de cor amarelo-alaranjada e sabor ácido, com cerca de uma polegada de tamanho (Figura 1b).

Figura 1: Árvore (1a) e frutos (1b) de *S. mombin*



2.2.3 Uso popular

A literatura etnofarmacológica registra a utilização das cascas do caule de *S. mombin* como abortiva, como antídoto em picadas de serpentes e como emético. As raízes são utilizadas em problemas de estômago (TROPICOS, 2013). O uso das folhas é indicado em gargarejos como adstringente nas inflamações da boca e da garganta. Há relatos do uso oral em casos de prostatite e de herpes labial, uretrite, cistite e em tratamentos oculares de conjuntivite, além de ser usado como antidepressivo, antiborri-facient e para doenças venéreas e tumores (ALBUQUERQUE et al. 2007; LORENZI e MATOS, 2008; TROPICOS, 2013). Especificamente para o fruto de *S. mombin*, o suco é referido por alguns autores como febrífugo e diurético, porém é mais comumente utilizado como alimento (AYOKA et al. 2008; BRASIL, 2009 e).

2.2.4 Composição Química

Existem poucos estudos químicos para a espécie *S. mombin*, sendo na grande maioria realizados com as folhas. Para estas foi descrita a presença de compostos fenólicos simples (CORTHOUT et al. 1992; CORTHOUT et al. 1994), taninos (CORTHOUT et al. 1991; ABO, OGUNLEYE e ASHIDI, 1999; NJOKU e AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2011), flavonoides (NJOKU e AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2012), triterpenos (FRED-JAIYESIMI, KIO e WILKINS, 2009), alcaloides (NJOKU e AKUMEFULA, 2007), saponinas e antraquinonas glicosiladas (ABO, OGUNLEYE e ASHIDI, 1999; NJOKU e AKUMEFULA, 2007). Mais adiante, será apresentada de forma mais detalhada uma revisão sobre os compostos químicos já relatados para as folhas de *S. mombin*.

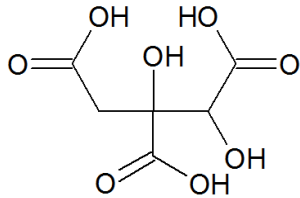
Em relação aos frutos foram encontrados quatro estudos sobre composição química. No primeiro estudo foi realizada uma triagem fitoquímica, sendo observado resultado positivo para a presença de saponinas, taninos, antraquinonas, esteroides, terpenoides, flavonoides e glicosídeos cardiotônicos (AKINMOLADUN; OBUOTOR e FAROMBI, 2010). O segundo estudo avaliou as propriedades nutricionais, verificando a presença de minerais como o potássio e cobre e um total de ácidos fenólicos que variaram de 17.5 mil TEAC g⁻¹ e 260 mg ácido gálico/100 g, além de carotenoides: β -creptoxantina, luteína, zeinoxantina α e β - caroteno, sendo β -creptoxantina considerado o composto majoritário (TIBURSKIS et al., 2011). No estudo realizado por Vieira et al. (2011), foi verificado um teor de compostos fenólicos equivalente a 70,92 mg de ácido gálico/100g de polpa do fruto de *S. mombin*. O ultimo estudo encontrado avaliou o teor de flavonoides totais no extrato dos frutos de *S. mombin*, pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo observado um teor de 2,02-2,90 mg/g do extrato (SILVA GOMES et al. 2012).

2.2.4.1 Compostos Fenólicos simples

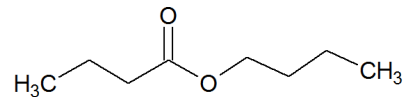
Os compostos fenólicos foram os primeiros constituintes químicos identificados em *S. mombin*. Em 1992 Corthout *et al.*, isolaram das folhas um éster do ácido caféico (ácido alohidroxicítrico) (Figura 2a), e um derivado do ácido clorogênico (éster butírico), (Figura 2 b). Em 1994 foi identificada pelos mesmos autores uma série de ácidos do tipo 6-alquenil-salicílico.

Figura 2: Derivados de ácido carboxílico isolados das folhas de *S. mombin*

(a) Ácido Alohidroxicítrico



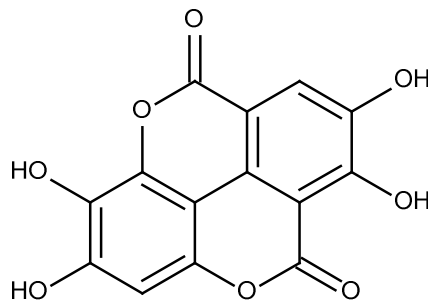
(b) Éster butírico



2.2.4.2 Taninos

Em 1991 Corthout et al. identificaram a presença de dois elagitaninos denominados geranina como componente principal, e galoilgeraniina, um novo didehidroelagitanino, no extrato obtido das folhas. Em 2012, foi identificado o ácido elágico (Figura 3) no extrato hidrometanólico das folhas (SILVA et al., 2012).

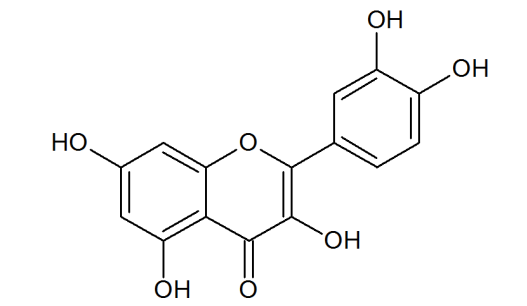
Figura 3: Estrutura química do ácido elágico isolado do extrato metanólico das folhas de *S. mombin*.



2.2.4.3 Flavonoides

O trabalho que descreve a presença de flavonoides nas folhas de *S. mombin* foi realizado por Silva et al. (2012), o qual identificou no extrato hidrometanólico, o flavonoide quercetina (Figura 4).

Figura 4: Estrutura química do flavonoide quercetina, isolado do extrato metanólico das follhas de *S. mombin*.



Há apenas uma citação sobre a ocorrência de triterpenos na espécie *S. mombin*, sendo descrito por Fred-Jaiyesimi, Kio e Wilkins (2009), o isolamento do *3 β -urs-12-en-3-il (9 z)-hexadec-9-enoato* no extrato metanólico das folhas.

2.2.4.5 Alcaloides, saponinas e antraquinonas glicosiladas

Conforme mostrado por Abo, Ogunleye e Ashidi (1999), em uma triagem fitoquímica preliminar do extrato das folhas de *S. mombin*, foi observada a presença de taninos, saponinas e antraquinonas glicosiladas. Posteriormente, em uma análise fitoquímica quantitativa das folhas, Njoku e Akumefula (2007), evidenciaram um teor de 6% de alcaloides, 3% de flavonoides, 3,82% taninos, 7,6% de saponinas e 1% de compostos fenólicos. No entanto, não foi descrito no artigo como foi realizada a determinação do teor desses metabólitos.

2.2.5 Atividades biológicas

No que se refere às atividades biológicas da espécie *S. mombin*, foram encontrados vários estudos, sendo a maioria desses realizados com as folhas e em modelos *in vitro*. Na tabela 1 e 2 estão descritos de forma sumarizada, os principais ensaios *in vitro* e *in vivo* conduzidos especificamente com a espécie.

Tabela 1: Estudos pré-clínicos *in vitro* relatados para a espécie *S. mombin*.

Parte da planta	Tipo do extrato	Concentração	Técnica	Atividade biológica	Referências
Folhas e caule	Etanólico	3-25 µg /mL	Difusão em disco	Atividade antimicrobiana contras as cepas: <i>Bacillus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Fortulium mycobacterium</i>	(CORTHOUT et al. 1994)
Partes aéreas	Hexânico	-	Inibição da enzima β-lactamase	Atividade antimicrobiana	(COATES et al. 1994)
Folhas	Metanólico	10 mg/mL	Difusão em disco	Atividade antimicrobiana contras as cepas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Shigella dysenteriae</i> ;	(ABO, OGUNLEYE e ASHIDI, 1999)
Caule	Metanólico	10 mg/mL	Difusão em disco	Atividade antimicrobiana contra as cepas: <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ABO, OGUNLEYE e ASHIDI, 1999)
Folhas	Hidrometanólico	125 mg/mL	Difusão em disco	Atividade antimicrobiana contras as cepas: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Morganella morganii</i> ; <i>Serratia liquefaciens</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i>	(SILVA et al. 2012)
Folhas e caule	Etanólico	3-25 µg/mL	-	Atividade moluscida contra o caramujo <i>Biophalaria glabrata</i>	(CORTHOUT et al. 1994)
Folhas e caule	-	-	-	Atividade antiviral contra o os vírus: <i>Coxsackie</i> e <i>Herpes simples</i> vírus	(CORTHOUT et al. 1991; CORTHOUT et al. 1992)
Folhas	Metanólico	500 µg/mL	-	Atividade antiviral Inibição da replicação do vírus da dengue sorotipo 2	(SILVA et al. 2011)

Folhas	Fração acetato: metanol (80:20, v/v)	-	-	Atividade leishmanicida Inibição das formas evolutivas promastigotas e amastigotas	(ACCIOLY, 2001)
Folhas	Metanólico	300 µg/mL 300 µg/mL 1 mg/mL 150 µg/mL	DPPH Sequestro de hidroxila Peroxidação lipídica Poder redutor	Atividade antioxidante	(AKINMOLAD UN; OBUOTOR e FAROMBI, 2010)
Folhas	Hidrometanólico (80:20, v/v)	- -	DPPH ABTS ⁺	Atividade antioxidante	(SILVA et al. 2012)
Frutos	Metanol e acetona	-	Ensaio TEAC	Atividade antioxidante	(TIBURSKI et al, 2011)

DPPH= radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila. ABTS= (2,2' – azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) sal diamônio), TEAC= atividade antioxidante equivalente ao Trolox

Tabela 2: Estudos pré-clínicos *in vivo* relatados para a espécie *S. mombin*

Parte da planta	Tipo do extrato	Dose e via de administração	Modelo	Atividade apresentada	Referências
Folhas	Metanólico	100, 200, 400 mg/kg Injeção intraplantar de carragenina	Edema de pata	Atividade antiedematogênica	(NWORU et al., 2011)
Folhas	Triterpeno isolado: <i>3β-urs-12-en-3-il (9z)-hexadec-9-enoato (triterpênico)</i> Extrato metanólico	1 g/kg	-	Atividade hipoglicemiante	(FRED-JAIYESIMI, KIO e WILKINS, 2009)

Folhas	Metanólico, etanólico e aquoso	12,5 - 100 mg/kg, i.p	Tempo de sono induzido pelo hexobarbita I; bloqueio do efeito do flumazenil; teste de <i>Porsolt Swim</i>	Atividade sedativa	(AYOKA et al. 2006)
Folhas	Etanólico e metanólico	(100 mg/kg) ; (50 mg/kg), i.p	Convulsão induzida por picrotoxina	Atividade anticonvulsivante	(AYOKA et al. 2006)
Folhas	Etanólico e metanólico	12,5-100 mg/kg, ip	Comportamento estereotipado induzido por apomorfina	Atividade antipsicótica	(AYOKA et al., 2006)
Folhas	Aquoso	8,4, 16,8, 33,6 mg/kg Via intragástrica	-	Atividade anti-fertilidade	(RAJI et al., 2006)
Folhas	Hidroetanólico	800 mg/kg, i.p	Porcentagem de mulheres grávidas por grupo	Atividade anti-fertilidade	(UCHENDU; ISEK, 2008)
Folhas	Hidroetanólico	250 -1500 mg/ kg, i.p	Método de probit gráfica de Miller e Tainter	Atividade anti-fertilidade	(IGWE et al., 2011)
Folhas	Metanólico	105,33 mg/kg	Efeitos estimulantes uterinos	Atividade oxitócica	(NWORU et al. 2007)
Folhas	Etanólico e aquoso	125, 250, 500 mg/ kg v.o	Infecção com nematódes gastrointestinais <i>Haemonchus spp.</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> , <i>Oesophagostomum spp.</i> , <i>Strongyloides spp.</i> e <i>Trichuris</i>	Atividade anti-helmíntica	(ADEMOLA; FAGBEMI; IDOWU e 2005)
Folhas	Metanólico	100, 200, 400 mg/kg	Injeção intraplantar	Atividade anti-inflamatória	(NWORU et al. 2011)

Uma vez que o trabalho teve como objetivo principal quantificar os compostos bioativos do extrato e avaliar o efeito anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano de *S. mombin*, é válido comentar sobre os medicamentos fitoterápicos e validação de metodologia, processo inflamatório, processo oxidativo *versus* atividade antioxidante e atividade antimicrobiana de produtos naturais.

2.3 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Os medicamentos fitoterápicos e suas preparações têm sido amplamente utilizados em todo o mundo. Entre as características dos medicamentos fitoterápicos é que eles são apresentados forma simples, com um único extrato vegetal ou na forma composta, que constitui uma combinação de vários extratos vegetais em sua formulação (GAD et al., 2012).

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade, provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2010 b).

Em geral, um ou mais marcadores químicos são utilizados para avaliar a qualidade e autenticidade de medicamentos fitoterápicos, tanto na identificação quanto na quantificação da droga vegetal, em preparações individuais e múltiplas (GAD et al., 2012).

Para medicamentos fitoterápicos é indispensável o estabelecimento dos marcadores químicos, pois esses são utilizados no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2011 c).

Os marcadores químicos são classificados em marcadores analíticos e bioativos. Marcadores analíticos são os constituintes ou grupos de constituintes que servem apenas para fins analíticos, enquanto marcadores ativos são os constituintes ou grupos de constituintes que contribuem para atividades terapêuticas (SAHOO; MANCHIKANTI e DEY, 2010).

Os compostos bioativos de plantas são produzidos como metabólitos secundários. Assim, os compostos bioativos em plantas seriam aqueles com efeitos farmacológicos ou toxicológicos em humanos e animais (BERNHOF, 2010).

Para fins de controle de qualidade e de registro do produto fitoterápico junto ao Ministério da Saúde, o método analítico deve estar validado para uma substância ou grupos de substâncias (BRASIL, 2011 a).

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, et al., 2004). Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2013 a).

2.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um conjunto de reações do organismo em resposta a uma lesão traumática, infecciosa, pós-isquêmica, tóxica ou autoimune. Essa resposta envolve vários fatores solúveis e células que podem surgir em qualquer tecido (NATHAN, 2002). A principal função da inflamação é controlar a infecção ou reparar o dano tecidual, fazendo com que o organismo volte para o estado de homeostasia. O ideal é que a resposta inflamatória seja rápida e consiga destruir o agente agressor (quando necessário), ela ainda deve ser específica e limitante (BARTON, 2008). Porém, quando a inflamação é desregulada leva a um processo patológico, ocasionando doenças (FOSTER e RUSLAN, 2009).

A principal função da inflamação é debelar a infecção ou reparar o dano, propiciando que o organismo volte para o estado de homeostasia.

A resposta inflamatória desregulada pode causar alterações dramáticas na fisiologia do tecido, podendo levar a uma variedade de condições patológicas, incluindo choque séptico, autoimunidade, aterosclerose e síndrome metabólica (FOSTER e RUSLAN, 2009).

A inflamação aguda é caracterizada pelo rápido recrutamento de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) para o local de inflamação, sendo que a contribuição relativa destes tipos celulares é dependente do local da inflamação em questão. A migração de granulócitos para local inflamatório é um requisito necessário para a neutralização e remoção de agentes nocivos (MASKREY, et al., 2011).

Os mediadores químicos endógenos liberados pelas células incluem os eicosanoides, tais como as prostaglandinas e os leucotrienos e componentes do complemento (como o C5a), os quais são importantes para defesa do hospedeiro, mas o também pode levar inadvertidamente a danos nos tecidos (SERHAN, CHIANG, DYKE, 2008).

A resolução da resposta inflamatória envolve a neutralização dos mediadores químicos, e consequente interrupção do extravasamento plasmático e da infiltração leucocitária. Essa interrupção, para a completa resolução do processo deve ser seguida pela remoção do edema, leucócitos e de debris celulares pelo tecido linfático e fagócito (CONTRAN et al., 1999)

As plantas produzem uma variedade de compostos chamados metabólitos secundários que possuem muitas atividades biológicas com destaque para a atividade anti-inflamatória (YAM et al., 2008)

A investigação atual em moléculas naturais pode ser facilitada com base na utilização da etnofarmacologia (VERPOORTE et al., 2005). O uso do conhecimento etnofarmacológico é uma maneira importante de reduzir o empirismo e aumentar a probabilidade de sucesso na busca de novos extratos e substâncias que tenham atividade terapêutica (PATWARDHAN, 2005; CORDELL e COLVARD, 2005).

A literatura relata a utilização popular do extrato das folhas de *S. mombin* em processos inflamatórios, de boca e garganta e em casos de prostatite (LORENZI; MATOS, 2008). Diante disso, pode-se dizer que essa espécie é promissora para o estudo de atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, baseado no seu uso popular. Um trabalho de NWORU e colaboradores (2011), relatou atividade anti-inflamatória para a espécie *S. mombin*, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina..

2.4.1 Modelo de inflamação

No presente trabalho, foi escolhido o modelo de inflamação de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos (VINEGAR et al., 1973). Esse modelo possibilita a avaliação da migração leucocitária, por meio da contagem de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$), presentes no exsudato e liberados na cavidade peritoneal, após a administração de carragenina, 4 horas antes da contagem das células (BARROS et al., 2004).

Os modelos que utilizam a carragenina como agente flogístico vem sendo amplamente utilizados, tanto para a investigação da fisiopatologia da inflamação, como também para a triagem de substâncias anti-inflamatórias (VINEGAR et al., 1982; WINTER et al., 1962). A peritonite induzida por carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda, empregado largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificação e correlação da migração celular e do exsudato inflamatório (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

Vários mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na inflamação aguda induzida por carragenina como neuropeptídeos, prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (DE CASTRO FRANCA et al., 2007). Em relação à participação de citocinas pró-inflamatórias neste modelo, está bem estabelecido que os leucócitos, entre outras células, produzem as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (PEREIRA, MEDEIROS, FRODE, 2006). Por outro lado, os macrófagos produzem IL-10, uma citocina anti-inflamatória que possui mecanismos importantes no controle da inflamação (MOSSER, ZHANG, 2008).

2.5 PROCESSO OXIDATIVO X ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais são espécies eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativas, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (NOGUEIRA; SOUSA; FREITAS, 2013).

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular,

sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares (ALVES et al., 2010).

Sabe-se que os radicais livres podem estar envolvidos em muitas doenças, como por exemplo, diabetes, hipertensão, arterosclerose, artrite, mal de Parkinson (XI et al., 2007; REED, 2011), ansiedade, depressão (LEITE et al., 2008), espasmos musculares (BLOXTON et al., 2002), epilepsia (HALLIWELL, 1995), inflamação, câncer (VALENÇA ; PORTO, 2008), dentre outras, assim como no processo senescente e senil do envelhecimento (CADENAS; DAVIES, 2000).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Como os sistemas antioxidantes endógenos muitas vezes são insuficientes para prevenir os danos causados pelos radicais livres, há necessidade de se utilizar antioxidantes de fonte externa (BERGER, 2005).

Deste modo, o interesse na descoberta de substâncias naturais com atividade antioxidante tem aumentado significativamente, fazendo com que a comunidade científica busque novas fontes naturais de compostos com tal atividade.

2.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas ainda são uma grande ameaça para a saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina humana (OKEKE et al., 2005). O desenvolvimento da resistência a medicamentos antimicrobianos, tem se tornado um problema mundial com efeitos deletérios em longo prazo (PLANTA, 2007).

A pesquisa por novas substâncias antimicrobianas deve ser continuada e todas as estratégias possíveis devem ser exploradas. Além de moléculas sintéticas, os produtos naturais são ainda as maiores fontes de agentes terapêuticos inovadores para várias condições, incluindo doenças infecciosas (CLARDY e WALSH, 2004).

Os métodos de triagem disponíveis atualmente para avaliar atividade antibacteriana de produtos naturais enquadram-se dentro de três grupos:

1) métodos de difusão; 2) métodos bioautográficos; e 3) métodos de diluição. Os ensaios de difusão e/ou bioautográficos são considerados qualitativos. Já os métodos de diluição podem ser considerados semiquantitativos ou quantitativos (COS et al., 2006). Nesse trabalho foi utilizado o método de difusão em disco e métodos bioautográficos, e determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*.

Diante do exposto, este trabalho visa contribuir com informações farmacológicas de atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana do extrato das folhas de *S. mombin*, assim como de citotoxicidade.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

A matéria prima vegetal foi coletada em novembro de 2011. As folhas de *S. mombin* foram adquiridas numa fazenda particular na região de Tábua em Dom Marcolino Dantas/ RN com coordenadas (Tábua- RN S S° 28' 14" W 35° 27' 37"). Foi depositado material testemunho no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e identificado pelo botânico Alan Roque, com número de exsicata 12252. Pela indisponibilidade de frutos na época da coleta, os frutos foram obtidos comercialmente. Foram adquiridos frutos vendidos como "cajá". Para a coleta do material foi obtida autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio)/Ministério do Meio Ambiente (35017). Ainda, foi obtida autorização para acesso ao patrimônio genético com finalidade de pesquisa científica via Plataforma Carlos Chagas/CNPq (número do processo 010688/2012-9).

As folhas de *S. mombin* foram submetidas à secagem à sombra sob temperatura ambiente durante duas semanas. Após secas, as folhas foram trituradas em um moinho de facas. Os frutos de *S. mombin in natura* (pericarpo e a polpa) foram processados também em moinhos de facas.

3.2 EXTRAÇÃO

A partir de 450 g da droga vegetal de *S. mombin*, foi preparado um extrato por maceração, que consistiu em deixar a droga vegetal em contato com etanol: H₂O (70: 30, v/v) durante sete dias. Após esse período o extrato foi filtrado obtendo assim o extrato hidroetanólico das folhas (EHfl).

Para os frutos de *S. mombin* foi utilizado também como método de extração a maceração. Para isso, os frutos foram fragmentados e deixados em contato em etanol: H₂O (70:30, v/v), pelo período de sete dias. Após esse período, a solução foi filtrada, originando o extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr).

Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotatório à temperatura de 45° C até eliminação total do solvente orgânico.

Parte dos extratos foi liofilizada para a realização dos testes analíticos e biológicos.

3.3 FRACIONAMENTO

Para a caracterização dos compostos ativos da espécie *S. mombin*, os extratos hidroetanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente *n*- Hexano (Hex) (3× 300 mL), Diclorometano (DCM) (3× 300 mL), acetato de etila (AcOEt) (3× 300 mL) e *n*-butanol (ButOH) (3× 300 mL). Após a partição foram obtidas cinco frações Hex, DCM, AcOEt, ButOH e fração aquosa residual (Frs). As frações foram concentradas com o auxílio de um evaporador rotatório sob temperatura de 45°C até a eliminação total do solvente orgânico.

3.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O EHfl e o EHfr , juntamente com as frações (Hex, DCM, AcOEt, ButOH), de *S. mombin* foram analisados previamente por CCD utilizando como fase estacionária cromatoplaças de alumínio de sílica gel 60 GF₂₅₄ e como fases móveis, foram utilizados sistemas eluentes diversos de acordo com a classe de metabólitos de interesse (WAGNER; BLADT, 2001). Os reveladores utilizados foram: vanilina sulfúrica, reagente de Dragendorff, cloreto férrico e o Reagente Natural A (difenilboriloxietilamina 0,5% em metanol). Os cromatogramas foram visualizados sob luz UV 254 e 365 nm. Para a identificação dos compostos presentes no extrato foram utilizados padrões de referências adquiridos da Sigma Aldrich[®].

3.5 ANÁLISE DO EXTRATO DE *S. mombin* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise por CLAE do EHfl de *S. mombin* foi realizada no laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto e dos alunos Caroline Flach Ortmann e Vitor Clasem Chaves. O cromatógrafo líquido utilizado foi da marca PerkinElmer Série 200, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), bomba quaternária,

desgaseificador em linha e auto-amostrador Os dados foram processados usando o TotalChrom[®] software Workstation.

Primeiramente, foi realizada uma busca na literatura por sistemas de análise por CLAE para flavonoides e compostos fenólicos. Partiu-se desses sistemas para desenvolver o método de análise utilizado neste trabalho. Os principais sistemas eluentes testados na análise das folhas de *S. mombin* foram:

Sistema 1= Solvente A: (solução aquosa de tampão fosfato (pH 2,8) B: (acetonitrila) com início: AB (80:20) para AB (60:40) durante 12 min; 12-17 min isocrática AB (60:40); 17-23 min variação linear AB (20:80); 23-25 isocrático AB (20:80) (SILVA, 2012).

Sistema 2 = Solvente A (acetonitrila) e solvente B (ácido acético a 1%, ajustado a pH 3,0) como se segue: 0-30 min, variação linear de AB (5:95) para AB (20:80); 30-40 min, isocrática AB (20:80 v/v) (COSTA et al, 2011).

Sistema 3= Solvente A (acetonitrila) e solvente B (ácido acético a 1%, ajustado a pH 3,0) como se segue: 0-50 min, variação linear de AB (10:90) para AB (18:82); 50-70 min isocrático AB (18:82).

Solvente 4= Solvente A (acetonitrila) e B (ácido acético 1%, ajustado a pH 3,0) como se segue: 0-5 min, isocrático AB (13: 87; 5-25 min, variação linear AB (18:82); 25-30 min variação linear de AB (20:80); 30-35 min variação linear AB (79:21).

Dentre os sistemas testados selecionou-se as seguintes condições cromatográficas para a análise do EHfl: sistema 4; coluna Luna RP C18 (250 mm x 4,6 mm de diâmetro, 5 µm) (Phenomenex[®]). Foram utilizados como padrões de referência o ácido clorogênico, o ácido elágico e a isoquecetrina (Sigma Aldrich[®]).

A análise do EHfr foi realizada do laboratório Labmult da UFRN. O equipamento utilizado foi da marca Varian Prostan com detector de arranjo de diodos (DAD) e bomba quaternária. O sistema eluente desenvolvido foi adaptado do sistema 4 utilizado para a análise do EHfl de *S. mombin*. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna tipo Luna RP C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex[®]). A eluição foi realizada em gradiente, utilizando uma combinação de solventes: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1%, ajustado a pH 3,0) como se segue: 0-5 min, isocrático AB (13:87; 5-25 min, variação linear AB (18:82);

25-30 min variação linear de AB (20-80); 30-35 min variação linear AB (21:79). Foram utilizados como padrões de referência o ácido clorogênico e a rutina (Sigma Aldrich®).

A taxa de fluxo para todas as amostras e padrões foram mantidas constante a 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. A amostra e os padrões de referência foram filtrados antes da injeção com membrana de PVDF de 0,45 μ m.

A identidade dos picos foi confirmada pela:

i: análise do perfil do extrato;

ii: análise do perfil dos padrões (comparação do espectro de UV e do tempo de retenção);iii: análise da co-injeção (extrato + padrão) para verificar o aumento da área do pico de interesse.

3.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Foi desenvolvida uma metodologia analítica para a quantificação dos compostos presentes nas folhas de *S. mombin*. A metodologia foi validada segundo os parâmetros analíticos preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2003 a) e pela ICH *guideline* (2005). Os parâmetros analisados foram: linearidade; seletividade; precisão; exatidão; limite de detecção e limite de quantificação.

✓ Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção de curvas analíticas dos padrões do ácido clorogênico e do ácido elágico, contendo cinco níveis de concentrações diferentes, em cada uma delas. Cada solução foi analisada em triplicata. As médias das áreas obtidas através da análise das soluções foram utilizadas para a construção da curva padrão.

✓ Seletividade

A seletividade foi determinada através da análise da pureza dos picos cromatográficos. Para a sua determinação, foi utilizado o detector de arranjo de diodo para demonstrar que o pico cromatográfico analisado correspondia apenas a

um só composto. Para isso, foi utilizada a análise da pureza do pico através da varredura na região do ultravioleta e da comparação dos espectros com padrões de referência.

✓ Precisão

A precisão foi determinada através dos ensaios de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). Para a determinação da repetibilidade foram utilizadas três concentrações diferentes de soluções padrões. A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso pelo coeficiente de variação (CV). Uma boa repetibilidade foi obtida a partir de uma baixa, média e maiores concentrações da curva, com um C.V < 5%. O ensaio de precisão inter-corrídas foi determinado também por meio da análise de três concentrações diferentes em triplicata, obedecendo a linearidade do método, em dois dias diferentes.

✓ Exatidão

A exatidão do método foi determinada através dos ensaios de recuperação avaliando as concentrações da amostra e soluções padrão, bem como os valores médios de recuperação.

✓ Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi calculado pelo o método da relação sinal-ruído. Para a determinação da relação sinal-ruído, foi feita a comparação entre as medições dos sinais dos padrões de referência em baixas concentrações, com áreas dos ruídos da matriz. Assim, o limite de detecção foi a menor concentração do padrão que apresentou uma relação sinal: ruído 3:1.

O limite de quantificação foi determinado por meio do coeficiente de variação, em que a concentração da amostra foi reduzida até chegar a um coeficiente de variação que não ultrapassasse uma variação de 5%.

3. 6.1 Análise quantitativa do extrato das folhas de *S. mombin* por CLAE

Para a quantificação dos compostos de interesse foram preparadas soluções-padrão em concentrações diferentes de: ácido clorogênico, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0,

50,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e ácido elágico 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As soluções-padrão foram analisadas em triplicata considerando as áreas dos picos. Após a obtenção da equação da reta os compostos foram quantificados.

3.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.7.1 Atividade Anti-inflamatória

Os ensaios para avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados apenas com o extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* (EHfl). A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa e das doutorandas Mariana Angélica Oliveira Bitencourt e Maira Conceição Jerônimo de Souza Lima.

3.7.1.1 Animais

Para o experimento foram utilizados camundongos da espécie BALB/c com 6–8 semanas de idade, obtidos do biotério da Faculdade de Farmácia-UFRN. Os camundongos foram alojados em gaiolas (6 animais por gaiola), a uma temperatura ambiente de 22 ± 2 ° C, com ciclo claro/escuro de 12 h: 12 h. Os animais tiveram livre acesso à comida e água. Foram utilizados seis animais por grupo, sendo que o grupo controle recebeu apenas solução salina. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de em Animais (CEUA) com número de protocolo 013/2013.

3.7.1.2 Peritonite induzida por carragenina

A inflamação foi induzida nos animais por administração intraperitoneal (i.p.) com a carragenina (Sigma Aldrich®) a uma concentração de 1 mg/mL. Os animais foram divididos em grupos que foram pré-tratados intraperitonealmente com o veículo (salina, 0,1 mL/10 g) ou com dexametasona (Dexa) 0,5 mg/kg ou com o EHfl (100, 200, 300, 500 mg/kg) ou com 200 mg/kg das frações DCM, AcOEt, ButOH e Frs ou com os compostos ácido clorogênico e ácido elágico nas doses (2, 2,5 e 5 mg/kg). Trinta minutos após o tratamento com as amostras, os animais receberam a injeção na cavidade peritoneal de 50 μL de carragenina 1%. Após 4

horas, os animais foram sacrificados com overdose de tiopental na dose 80 mg/kg pela via intraperitoneal, seguido de deslocamento cervical. Os exsudatos peritoneais foram coletados com 2 mL de PBS gelado por laparoscopia abdominal. Os exsudatos foram centrifugados a 250 x g durante 5 min, a 4°C. O *pellet* celular foi diluído 1:10 em solução de Türk, e o número total de leucócitos foi determinado na câmara de Neubauer (adaptado de COSTA et al., 1988).

Quadro 1: Distribuição dos grupos no modelo de peritonite induzida por carragenina, para avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*.

Grupos	Tratamento, via i.p.	Agente flogístico via i.p., após 30'
Grupo 1 (6 animais)	Salina	50 µL de carragenina 1%
Grupo 2 (6 animais)	Extrato hidroetanólico (100 mg/kg)	
Grupo 3 (6 animais)	Extrato hidroetanólico (200 mg/kg)	
Grupo 4 (6 animais)	Extrato hidroetanólico (300 mg/kg)	
Grupo 5 (6 animais)	Extrato hidroetanólico (500 mg/kg)	
Grupo 6 (6 animais)	Dexametasona (0,5 mg/kg)	

Quadro 2 : Distribuição dos grupos do modelo de peritonite induzida por carragenina, para avaliação da atividade anti-inflamatória das frações das folhas de *S. mombin*.

Grupos	Tratamento, via i.p.	Agente flogístico via i.p., após 30'
Grupo 1 (6 animais)	Salina	50 µL de carragenina 1%
Grupo 2 (6 animais)	Fração Diclorometano (200 mg/kg)	
Grupo 3 (6 animais)	Fração Acetato de etila (200 mg/kg)	
Grupo 4 (6 animais)	Fração <i>n</i> - Butanol (200 mg/kg)	
Grupo 5 (6 animais)	Fração residual (200 mg/kg)	
Grupo 6 (6 animais)	Dexametasona (0,5 mg/kg)	

Quadro 3 : Distribuição dos grupos do modelo de peritonite induzida por carragenina, para avaliação da atividade anti-inflamatória do ácido clorogênico e do ácido elágico.

Grupos	Tratamento, via i.p.	Agente flogístico via i.p., após 30'
Grupo 1 (6 animais)	Salina	50 µL de carragenina 1%
Grupo 2 (6 animais)	Ácido clorogênico (2 mg/kg)	
Grupo 3 (6 animais)	Ácido clorogênico (2,5 mg/kg)	
Grupo 4 (6 animais)	Ácido clorogênico (5 mg/kg)	
Grupo 5 (6 animais)	Ácido elágico (2 mg/kg)	
Grupo 6 (6 animais)	Ácido elágico (2,5 mg/kg)	
Grupo 7 (6 animais)	Ácido elágico (5 mg/kg)	
Grupo 8 (6 animais)	Dexametasona (0,5 mg/kg)	

3.7.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os testes para a avaliação das atividades antioxidante foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica/UFRN e com a Profa. Dra. Katia Castanho Scortecci, do Departamento de Biologia/ UFRN e da doutoranda Ana Karina Lima.

Os ensaios para avaliação da atividade antioxidante foram realizados com o EHfl, com as frações (Dcm, AcOEt, ButOH e Frs) e com os compostos ácido elágico e ácido clorogênico. Em relação aos frutos, foi avaliada a atividade do EHfr e da rutina. Os extratos e as frações foram testados nas concentrações de 60, 125, 250, 500 µg/mL e, os compostos nas concentrações de: 5, 15, 30, 60 µg/mL. Foram realizados os testes de atividade sequestradora de radicais livres DPPH; sequestro do superóxido; sequestro de radicais hidroxilas e avaliação do poder redutor.

3.7.2.1 Atividade sequestradora de radicais livres DPPH

A atividade sequestradora do radical DPPH foi avaliada de acordo com o método de Shimada *et al.*(1992), com algumas modificações. Aos extratos, frações e

compostos foram acrescentados 1,5 mL de metanol e posteriormente adicionado 1 mL da solução metanólica de DPPH (Fluka) a 0,1 mM. Em seguida, a absorvância foi medida em 517 nm. A atividade de sequestro do radical (%) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade sequestradora (\%)} = (1 - A1/A0) \times 100\%$$

A0= a absorvância do controle

A1= absorvância das amostras

3.7.2.2 Teste do sequestro do íon superóxido (O_2^-)

O ensaio é baseado na capacidade de inibição da redução fotoquímica do tetrazólio (NBT) no sistema de riboflavina-luz-NBT (DASGUPTA; DE, 2004). Para cada 3 mL da solução reagente contendo tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, riboflavina 2 μ M, EDTA 100 μ M e NBT 75 μ M foram adicionados uma solução de 1 mL dos extratos, frações e dos compostos. A produção do azul de formazana foi verificada pelo monitoramento através da leitura da absorvância a 560 nm após 10 minutos de iluminação com lâmpada fluorescente. Toda reação foi realizada dentro de câmara dissipadora de luz. Para o branco, foram utilizados tubos idênticos contendo os reagentes que foram mantidos no escuro.

3.7.2.3 Poder redutor

O poder redutor das amostras foi quantificado previamente pela metodologia descrita por Athukorala et al. (2006). Os extratos, as frações e os compostos em diferentes concentrações foram incubados com tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1%) a 50° C. A reação foi finalizada pela adição da solução de TCA (10%), e posteriormente misturada com água destilada e cloreto férrico (0,1%). A absorvância foi medida a 700 nm.

3.7.2.4 Atividade sequestradora do radical hidroxila (OH^-)

A atividade sequestradora dos radicais hidroxilas foi investigada usando a reação de Fenton de acordo com a metodologia descrita por Smirnof e Cumbes

(1989), com pequenas modificações. Os extratos, as frações e os compostos em diferentes concentrações, foram colocados em 3 mL de tampão fosfato (150 mM pH 7,4), incubados com $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (10 mM), EDTA (10 mM) e sacilato de sódio (2 mM), H_2O_2 30% (200 μL). A solução foi incubada por 1 h e a reação detectada por monitoramento da absorbância a 510 nm. No branco o H_2O_2 foi substituído pelo tampão.

3.7.3 Atividade antiproliferativa

Os testes para a avaliação da atividade antiproliferativa foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica/UFRN e com a Profa. Dra. Katia Castanho Scortecci, do Departamento de Biologia/ UFRN e da doutoranda Ana Karina Lima.

3.7.3.1 Teste de Viabilidade Celular – MTT

Foi analisada a capacidade de células tratadas com extratos, frações e os compostos em reduzir o composto MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) a sais de formazana, a redução é realizada por desidrogenases mitocondriais de células com mitocôndrias íntegras. A redução do composto MTT a formazana foi verificada por espectrofotometria e foi considerada diretamente proporcional a atividade mitocondrial e viabilidade celular. As células utilizadas foram da linhagem de fibroblastos 3T3, o qual foram cultivadas em frascos de 75 cm^2 com 7 mL meio de cultura Eagle modificado Dulbecco (DMEM). Depois desse período, os extratos foram adicionados em diferentes concentrações, que foram padronizadas de acordo com as concentrações utilizadas nos testes antioxidantes (60, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e foi testada uma concentração maior de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a fim de verificar se os extratos, frações ou compostos apresentavam citotoxicidade com aumento da concentração, nos períodos de 24 h. Após a incubação, as amostras, foram removidas e posteriormente foi adicionado o reagente MTT (5 mg/mL) (Sigma-M5655) em meio fresco DMEM. As células foram então incubadas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Para solubilizar os cristais de formazana, foi adicionado 200 μL de álcool etílico absoluto em cada poço e cuidadosamente misturado, após 15 minutos de agitação em mesa agitadora a absorbância foi lida 562 nm usando o

leitor de ELISA (Biotec μ Quant). Como controle foram utilizadas células normais não tratadas, sendo cultivadas somente na presença do meio DMEM, o valor obtido com o controle foram considerado como 100% de proliferação. A porcentagem de proliferação celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de proliferação celular} = \frac{\text{Abs. da amostra 570 nm} \times 100}{\text{Abs. do controle 570 nm}}$$

3.7.4 Análise estatística

Foram utilizados no tratamento dos dados obtidos na avaliação da atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa a análise de variância (ANOVA) e o método paramétrico de Tukey e o teste-*t* de Student para determinar as diferenças entre os grupos. Para realização dessa análise foi utilizado o programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, Califórnia.

3.7.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de folhas e dos frutos de *S. mombin*

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em cooperação com o Prof. Dr. Flavio Henrique Reginatto, do Departamento de Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina e da doutoranda Tatiana Guimarães Rosa.

3.7.5.1 Cepas bacterianas

As cepas de bactérias testadas foram linhagens padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 94619), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Enterobacter Cloacae* (ATCC 137047), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

3.7.5.2 Difusão em disco

A atividade antimicrobiana do EHfl e EHfr de *S. mombin*, frente aos micro-organismos selecionados foi realizada, inicialmente, pelo método de difusão em disco conforme normas preconizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2003 a). Foram preparadas suspensões, através do método direto, inoculando-se colônias do micro-organismo a ser testado em solução fisiológica esterilizada até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, a qual foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 635 nm correspondendo a uma absorvância entre 0,08 a 0,10. Na placa de Petri contendo o meio de cultura adequado para o crescimento do microorganismo, a suspensão do microorganismo foi inoculada com o auxílio de swab, através da técnica de três direções. Discos redondos de papel adsorvente, com diâmetro de 6,0 mm, impregnados com 25 µL de extratos foram aplicados nas placas já inoculadas, juntamente com o controle positivo e negativo do teste. Como controle negativo foi utilizado um disco de papel impregnado com 25 µL de DMSO. Para controle positivo frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foi utilizado disco de oxacilina; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ampicilina; *Escherichia coli* (ATCC 25922), ceftazidina; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), ceftazidina; *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), ceftazidina; *Streptococcus pyogenes* (ATCC19615), levofloxacina; *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 94619), clorofenicol; *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), imipenem; *Enterobacter Cloacae* (ATCC 137047), clorofenicol; *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022), doxiciclina. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica (bactérias 16-18 h a 35°C) e em seguida foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. Todos os testes foram realizados em duplicata. Como o extrato apresentou halo de inibição frente a algumas bactérias testadas foi realizada a determinação da (CIM) e da (CBM).

3.7.5.3 CIM (Concentração Inibitória Mínima)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através do método de microdiluição em caldo conforme normas preconizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2003 b). A técnica de microdiluição em caldo foi realizada através de diluições sucessivas (diluição seriada em microplacas) do agente antimicrobiano que apresentou halo de inibição ≥ 9 mm. As microplacas

contendo o caldo foram adicionadas a suspensão bacteriana padronizada e as sucessivas diluições do extrato.

Após incubação em estufa bacteriológica, conforme tempo e temperatura adequados de crescimento para cada microorganismo, as microplacas foram examinadas visualmente observando a presença de turbidez ou precipitado. Este teste foi realizado em duplicata.

3.7.5.4 CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Para a determinação da CBM, foram selecionadas as culturas que apresentaram inibição do desenvolvimento bacteriano do ensaio de CIM. Foram feitos repiques em meio sólido dos poços das microplacas que apresentarem turbidez ou precipitado e foram colocadas em estufa bacteriológica. Após a incubação em estufa, as placas foram examinadas para a visualização do crescimento bacteriano.

Para a interpretação dos resultados foram considerados que a inibição no ensaio de (CIM) e o crescimento na subcultura (CBM) significam ação bacteriostática e a ausência de crescimento na subcultura significa ação bactericida (BARON; FINEGOLD, 1990).

3.7.2.5 Bioautografia

O ensaio de bioautografia foi realizado através do método de Homans; Fuchs (1970) adaptado de Alves e colaboradores (2009) e Holetz e colaboradores (2002). O extrato foi aplicado em uma cromatoplaça de alumínio de sílica gel 60 GF₂₅₄, a qual foi eluída com solventes de polaridade adequada para a amostra (AcOEt: Ác. fórm: H₂O/ 8,7: 0,7: 0,7). Após a evaporação do solvente, a cromatoplaça foi depositada em meio de cultura específico, contendo a suspensão do microorganismo, ajustada até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, a qual foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 635 nm correspondendo a uma absorbância entre 0,08 a 0,10. A placa foi incubada em estufa bacteriológica e os resultados foram avaliados mediante formação de halo(s) de inibição em torno da(s) banda(s) cromatográfica(s) correspondente(s) à substância(s) ativa(s) dos extratos testados, após nebulização da solução aquosa de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC). Foi feito também uma placa controle revelada com vanilina sulfúrica

para a análise do perfil fitoquímico do extrato. Essa placa foi comparada com a placa teste.

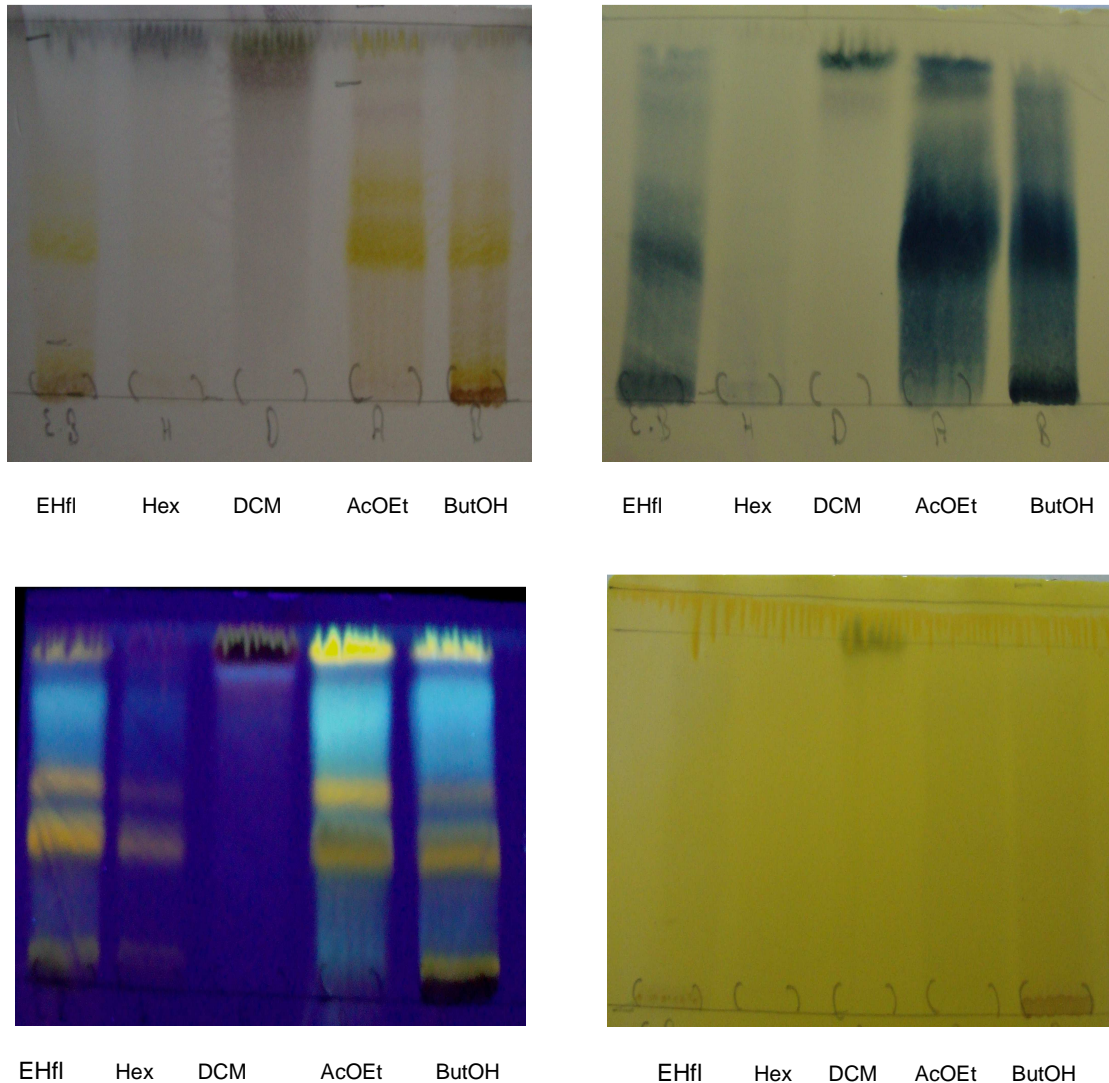
O critério empregado para a interpretação dos resultados da bioautografia foi o aparecimento de zonas claras em torno das bandas na CCD, indicando a respectiva atividade antimicrobiana (HAMBURGER; CORDEL, 1987).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O EHfl e as frações Hex, DCM, AcOEt, ButOH, obtidas da partição líquido-líquido foram previamente analisados por CCD. A análise mostrou após a revelação com a vanilina sulfúrica (Figura 5a) a presença de quatro bandas (R_f 0,4 a 0,9) de coloração amarela, que indicam a presença de flavonóides e também outros tipos de metabólitos com coloração rosácea sugestivo de ácidos fenólicos, taninos, esteroides ou terpenos. Após revelação com o cloreto férrico, foi observado o desenvolvimento de coloração escura para as mesmas bandas, indicando tratar-se de compostos fenólicos (Figura 5b). Quando revelado com o Reagente Natural A, foi observado o desenvolvimento de manchas amarelas fluorescente (R_f 0,4 a 0,9), confirmando a presença dos flavonoides no EHfl (Figura 5c). Ainda foi observado o desenvolvimento de uma mancha de coloração azul fluorescente com R_f 0,9, confirmando a presença de ácidos fenólicos. Após a revelação com o reagente de Dragendorff não houve o desenvolvimento de nenhuma banda característica de coloração alaranjada, indicativa da presença de alcaloides ou compostos nitrogenados (Figura 5d). No entanto, cabe ressaltar que o extrato foi preparado por maceração sem utilizar o método clássico de extração ácido-básico para alcaloides, o que pode mascarar o resultado obtido.

Figura 5: CCD do extrato hidroetanólico (EHfl) de *S. mombindas* folhas e das frações: hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (ButOH). Reveladores: (a) Vanilina sulfúrica; (b) Reagente Natural A; (c) Dragendorff; (d) Cloreto férrico. Fase móvel: Acetato de etila: ácido fórmico: H₂O (8, 6: 0,7: 0,7 v/v/v).



De acordo com o perfil cromatográfico observado no EHfl e nas frações, foram selecionados os padrões de canferol (Canf), quercetina (Querc) e ácido elágico, para análise comparativa quanto à coloração e ao valor do *R_f* no extrato e frações. A presença dos compostos quercetina e ácido elágico no extrato das folhas de *S. mombin* foi relatada previamente por Silva *et al.*, (2012). De acordo com a análise do EHfl realizada por CCD foi observada a presença de manchas com coloração e *R_f* similares ao ácido elágico (coloração azul, *R_f*= 0,28), a quercetina (coloração amarela, *R_f*= 0,46) e ao canferol (coloração azul, *R_f* 0,5). As amostras também foram analisadas por Co-CCD (Figura 6).

A análise do EHfl por CCD indicou a presença do ácido elágico, quercetina e canferol. Na literatura já existe o relato do isolamento do ácido elágico e da quercetina a partir do extrato metanólico das folhas (SILVA, 2012). Neste estudo adicionalmente a esses compostos foi identificada a presença do canferol no extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*.

Figura 6: Co-CCD do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) de *S.mombin* e dos padrões ácido elágico (AE) (a) quercetina (Q) (b). Revelador- Reagente Natural A/ UV 365 nm. Fase móvel: tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:5:0,5 v/v/v).

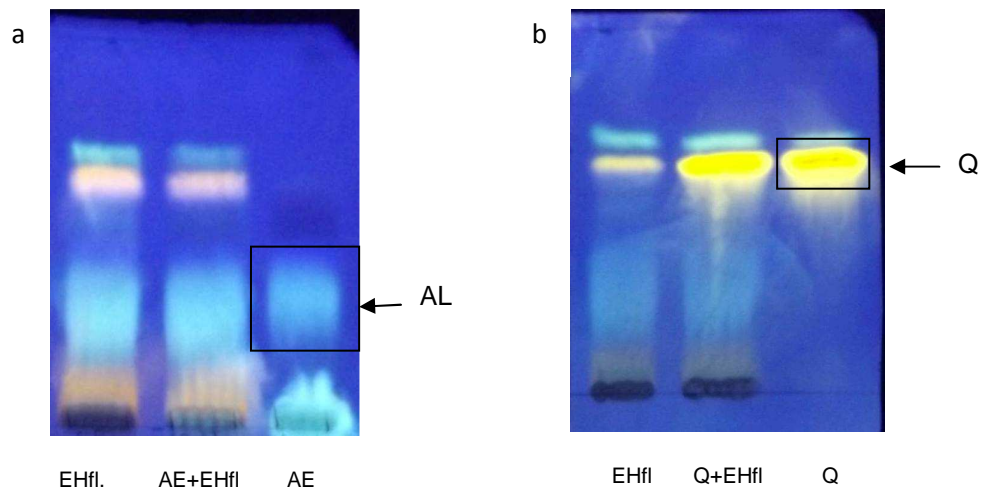
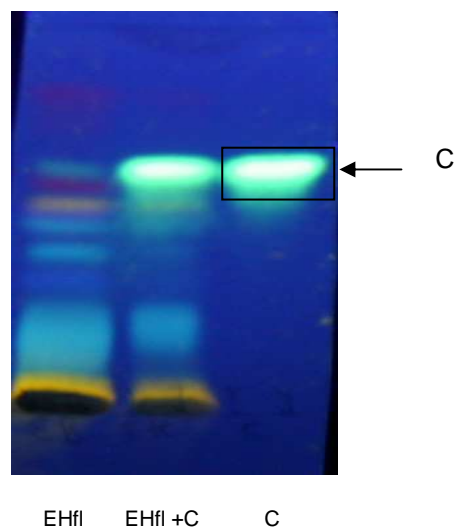
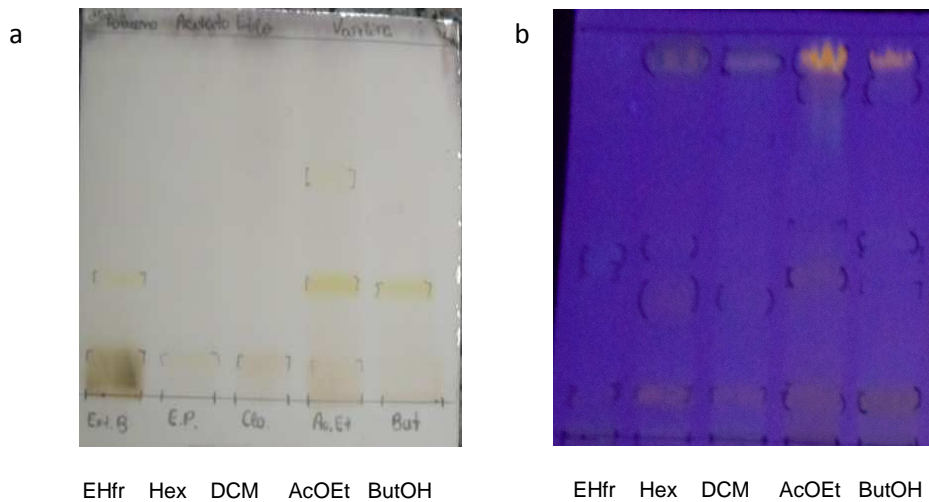


Figura 7: Co-CCD do extrato hidroetanólico de *S. mombin* (EHfl) e do canferol (C). Revelador: Reagente Natural A/ UV 365 nm. Fase móvel: Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5: 5: 0,5 v/v/v).



Em relação aos frutos, o EHfr e as frações foram analisados por CCD, utilizando como fase fixa sílica gel 60 GF₂₅₄. Após a eluição, as cromatoplacas foram reveladas com vanilina sulfúrica e Reagente Natural A e visualizadas sob luz UV 365 nm, e observada nas frações AcOEt e ButOH a presença de manchas de coloração amarela, característica de flavonoides (Figura 8).

Figura 8: CCD do extrato hidroetanólico dos frutos de *S.mombin* (EHfr) e das frações hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (ButOH). Reveladores: (a) Vanilina sulfúrica; (b) Reagente Natural A/ 365 nm. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: H₂O (9:0,5:0,5, v/v/v).



Na literatura foram encontrados quatro estudos químicos realizados com os frutos. No primeiro, foi avaliado o teor de flavonoides totais no extrato dos frutos de *S. mombin*, pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo observado um teor de 2,02-2,90 mg/g do extrato (SILVA GOMES et al, 2012). No estudo realizado por Vieira et al., (2011) foi verificado um teor de compostos fenólicos equivalente a 70,92 mg de ácido gálico/ 100g de polpa do fruto de *S. mombin*. Tiburskis et al., (2011) também avaliaram o teor de compostos fenólicos sendo encontrado 17,5 mil TEAC g⁻¹ e 260 mg equivalente a ácido gálico/100 g de extrato. Ainda foi detectada a presença de saponinas, taninos, antraquinonas, esteroides, terpenoides, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos nos frutos, por triagem fitoquímica (AKINMOLADUN; OBUOTOR e FAROMBI, 2010). Como pode ser observado, foram encontrados apenas estudos que avaliaram o teor de flavonoides e fenólicos totais e uma triagem fitoquímica. Portanto, até o momento não havia sido identificado nenhum composto nos frutos de *S. mombin*.

Dessa forma, destaca-se neste estudo a identificação do flavonoide rutina nos frutos de *S. mombin*. Uma análise qualitativa por CLAE foi realizada para a confirmação da presença desse composto no EHfr.

4.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *S. mombin* POR CLAE

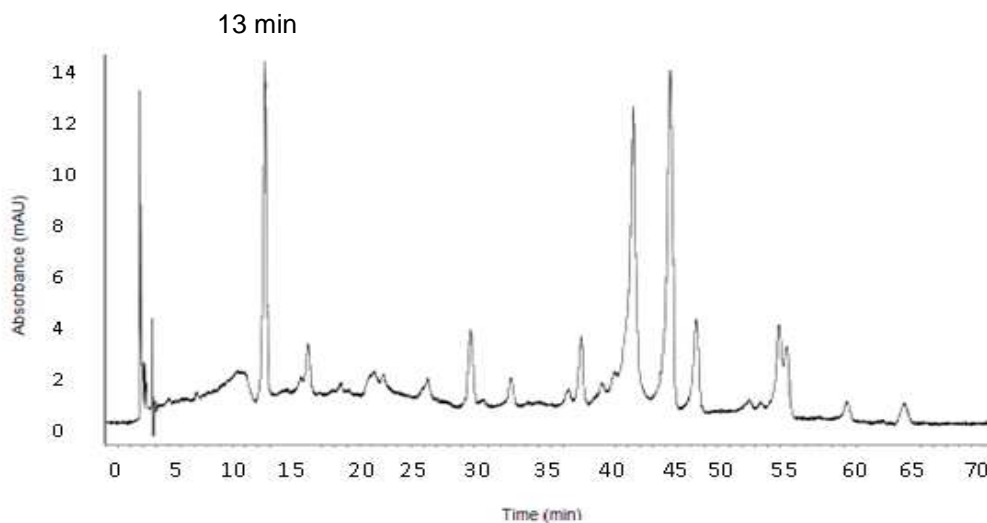
De acordo com os resultados obtidos na análise do EHfl e do EHfr de *S. mombin* por CCD, deu-se continuidade aos estudos por CLAE, para confirmar a presença dos compostos observados nos extrato e desenvolver e validar um método para quantificá-los. A validação do método e a quantificação dos compostos foi realizada apenas para o extrato das folhas.

4.2.1 Análise do extrato hidroetanólico das folhas

Através de uma busca na literatura foi verificado apenas um estudo que analisou por CLAE o extrato metanólico das folhas de *S. mombin* (SILVA et al., 2012). Esse sistema foi testado inicialmente para os extratos deste estudo, porém o cromatograma não apresentou boa resolução. Outras pesquisas na literatura também foram realizadas em busca de sistemas de análise para flavonoides e ácidos fenólicos, porém alguns dos sistemas testados resultaram em picos pouco simétricos e com baixa resolução, o que pode ser justificado por serem matrizes diferentes.

Depois de várias tentativas com os sistemas descritos na literatura, foi avaliado o sistema 2 (ver seção 3.6) descrito por Costa et al., (2011), na qual foi observada uma baixa resolução e tempo de análise curto. Então, foram realizadas modificações resultando no sistema 3 (ver seção 3.6), na qual o tempo de análise foi aumentando, o fluxo foi diminuído e o gradiente foi sendo alterado de forma mais lenta, para obter uma boa separação dos picos de interesse. Nessa primeira tentativa, foi observado que o pico que correspondia ao ácido elágico (Tempo de retenção (Rt)= 13 min apresentava baixa resolução (Figura 9), então foram feitas novas modificações.

Figura 9: Cromatograma obtido por CLAE- DAD (analisado a 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*.



Após várias modificações nas condições cromatográficas, obteve-se um sistema considerado adequado, por meio da análise dos parâmetros de desempenho cromatográfico (Quadro 5), que estavam de acordo com os valores preconizados pela literatura (RIBANI, et al., 2004).

Quadro 4 : Parâmetros de desempenho cromatográfico.

Compostos	* N° pratos teóricos	* Resolução	* Fator de cauda
Ácido clorogênico	10.167	2,0	0,9
Ácido elágico	14.813	2,0	0,75
Isoquercetrina	20.174	2,69	0,87

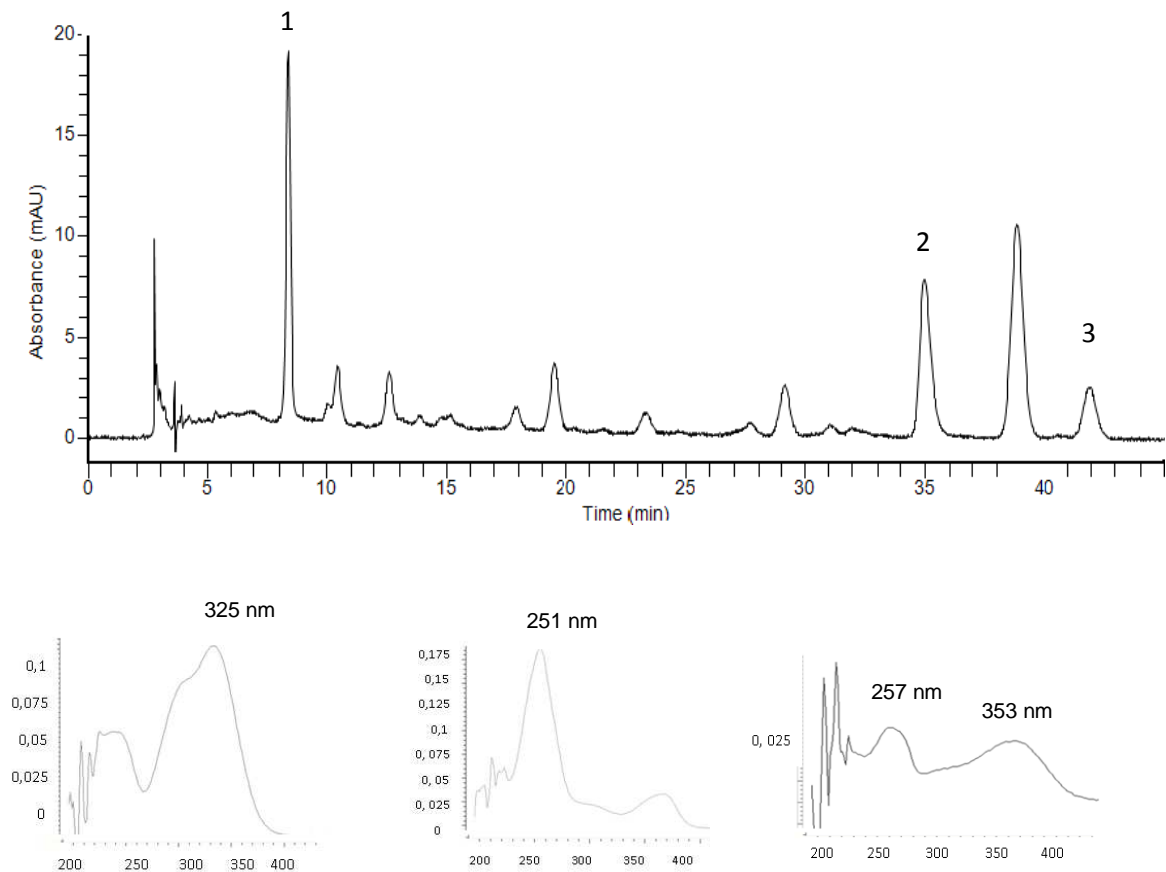
* Valores de referência: N° pratos teóricos > 2000; Resolução >1,5; Fator de cauda <2.

Fonte: (Ribani, et al., 2004).

O método desenvolvido permitiu a identificação de três picos principais a 340 nm. Os picos com tempos de retenção de 8,28, 34,21 e 41,29 min, foram identificados como ácido clorogênico, ácido elágico e isoquercetrina, respectivamente (Figura 10). A identidade dos picos foi confirmada através da comparação do tempo de retenção e do espectro de UV com o padrão de referência e também através do aumento da área do pico, com a co-injeção do extrato + padrão. Foi observado para o ácido clorogênico um máximo de absorção de 325 nm, para o ácido elágico máximo de 251 nm e para a isoquercetrina, dois máximos de

absorção em torno de 257 e 353 nm. Esses valores foram comparados com os máximos de absorção dos padrões de referência e com dados da literatura (RIVELLI, 2007), sendo observado similaridade nos valores encontrados.

Figura 10: Cromatograma obtido por CLAE - DAD (UV 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*. ácido clorogênico (1), ácido elágico (2), isoquercetrina (3).



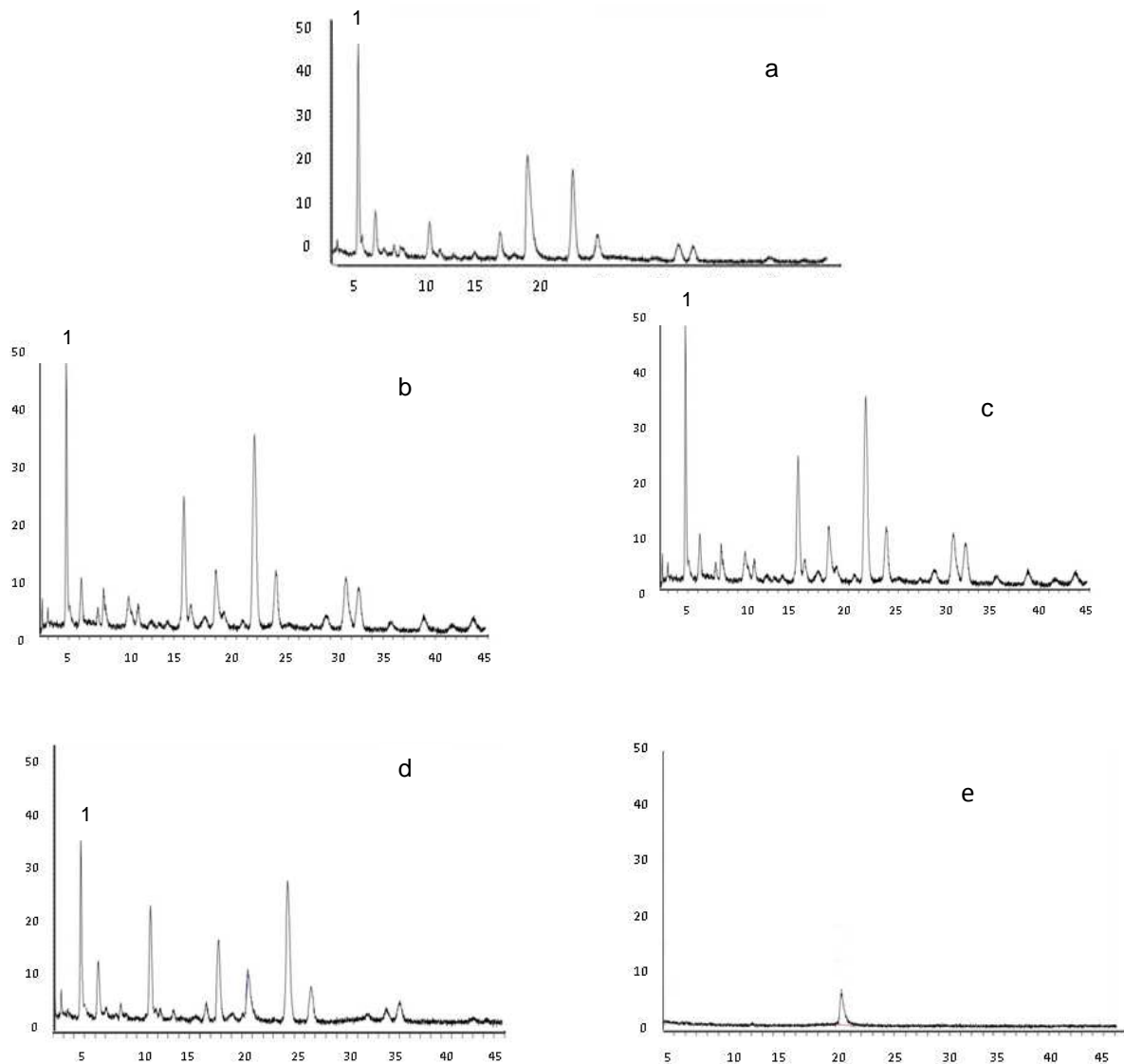
A análise qualitativa do EHfl por CLAE permitiu a identificação de três compostos, ácido clorogênico, ácido elágico e isoquercetrina. Na literatura não existe relato da identificação do ácido clorogênico e da isoquercetrina no extrato das folhas de *S. mombin*. Em relação ao ácido elágico, sua presença já foi identificada por CLAE no extrato metanólico das folhas (SILVA, 2012). Porém, o sistema utilizado pelos autores no trabalho citado, quando aplicado neste trabalho resultou em uma baixa resolução dos compostos analisados e os picos de interesse mostraram-se pouco simétricos. Desta forma, destacam-se os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez, já que o método desenvolvido permitiu a identificação de três compostos majoritários: o ácido clorogênico, o ácido elágico e a isoquercetrina, apresentando picos simétricos e com boa resolução.

Após a análise qualitativa do EHfl a metodologia foi validada para a quantificação do ácido clorogênico e ácido elágico nesse extrato. Devido a indisponibilidade de quantidade suficiente do padrão de isoquercitrina, esse composto não foi quantificado.

Adicionalmente, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, optou-se por analisar o perfil das frações obtidas da partição do extrato das folhas de *S. mombin* para a identificação inicial do ácido clorogênico e ácido elágico, compostos bioativos analisados nos ensaios de atividade anti-inflamatória. Para essa análise foi utilizado o mesmo sistema gradiente da análise das folhas e o mesmo cromatógrafo, porém a coluna utilizada foi de outra marca, pois essa análise foi realizada em período posterior. A troca da coluna ocasionou mudanças nos tempos de retenção e na resolução dos compostos e o ácido elágico não conseguiu se adaptar a coluna. No entanto mesmo com essas alterações pode-se observar nas frações DCM, AcOEt, ButOH a presença do ácido clorogênico com tempo de retenção de 5 min, no comprimento de onda UV de 340 nm (Figura 11). O ácido elágico não foi analisado, pois o padrão não conseguiu interagir com a coluna cromatográfica.

Após a análise, pode-se verificar que todas as frações apresentaram o ácido clorogênico, com tempo de retenção de 5 min, exceto a fração residual que apresentou apenas um composto não identificado no comprimento de onda de onda do UV de 340 nm. Foi ainda observado nas frações DCM, AcOEt, ButOH um perfil semelhante dos compostos, sendo observado apenas diferenças nos seus teores (Figura 11).

Figura 11: Cromatogramas obtido por CLAE acoplado a detector DAD (UV 340 nm) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* (a) e das frações: diclorometano (b), acetato de etila (c), *n*-butanol (d) e fração residual aquosa (e). Ácido clorogênico (1).



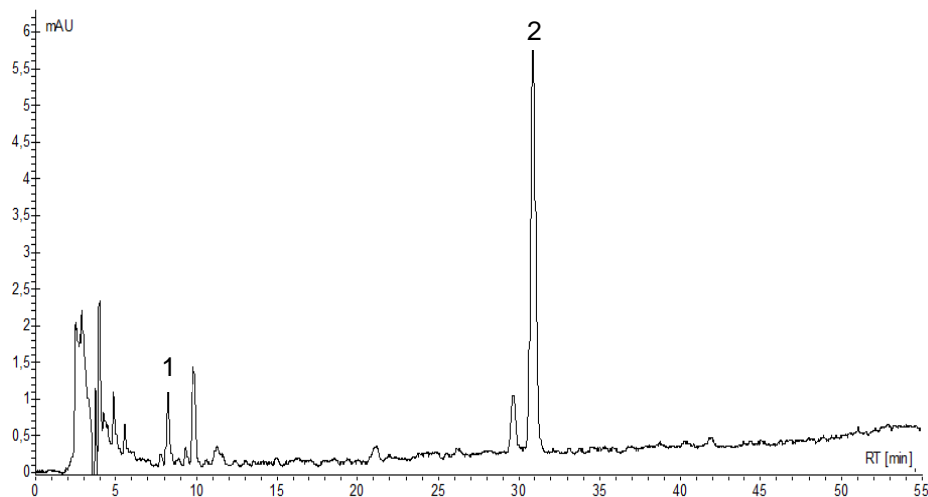
4.2.2 Análise do extrato hidroetanólico dos frutos de *S. mombin*

A metodologia de separação dos compostos do EHfr foi adaptada a partir da metodologia desenvolvida para o extrato das folhas, já relatada no item anterior. O sistema eluente que se mostrou mais eficiente (boa resolução e simetria nos picos) para a análise dos compostos presentes no EHfr foi composto pela seguinte combinação de solventes: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1%, ajustado a pH 3,0)

como se segue: 0-5 min, isocrático AB (13: 87; 5-25 min, variação linear AB (18:82 v / v); 25-30 min variação linear de AB (20-80); 30-35 min variação linear AB (79:21 v/ v).

O método desenvolvido permitiu a identificação de dois compostos o ácido clorogênico (Tr= 8 min) e rutina (Tr= 31 min) (Figura 12). A identidade dos picos foi confirmada através da comparação do tempo de retenção e do espectro de UV com o padrão de referência assim como através do aumento da área do pico, com a co-injeção do extrato + padrão. Na literatura não existe nenhum relato da identificação do ácido clorogênico e rutina no extrato dos frutos. Deste modo sugere-se que esses compostos poderão ser utilizados como marcadores químicos da espécie e a rutina poderá ser utilizada como marcador diferencial entre as folhas e os frutos de *S. mombin*, já que no extrato das folhas de *S. mombin* não foi identificado o flavonoide rutina

Figura 12: Cromatograma obtido por CLAE- DAD (340 nm) do extrato hidroetanólico dos frutos de *S. mombin*. Ácido clorogênico (1), rutina (2).



4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

O método foi validado para a quantificação dos compostos ácido clorogênico e ácido elágico no EHfl de *S. mombin*.

A linearidade do método foi demonstrada através da construção de curvas analíticas dos padrões de ácido clorogênico e ácido elágico (Figura 13 e 14).

Após a obtenção das curvas, a linearidade do método, foi verificada através do coeficiente de correlação (r^2) tanto para o ácido clorogênico como para o ácido elágico. A Resolução 899/2003 da ANVISA recomenda um coeficiente de correlação (r^2) igual ou maior que 0,99 para que o método seja considerado linear. Então de acordo com a resolução, o método desenvolvido foi considerado linear, já que apresentou para ambos os compostos um $r^2 > 0,99$.

Figura 13: Curva analítica do ácido clorogênico / 10-50 $\mu\text{g/mL}$.

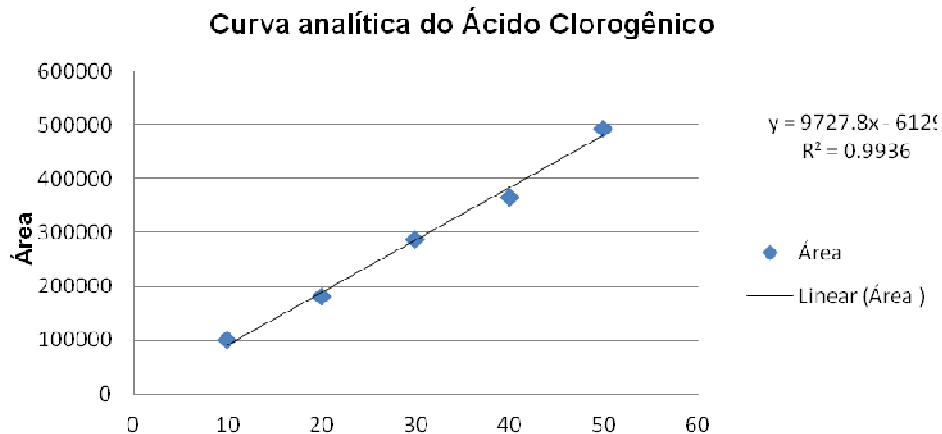
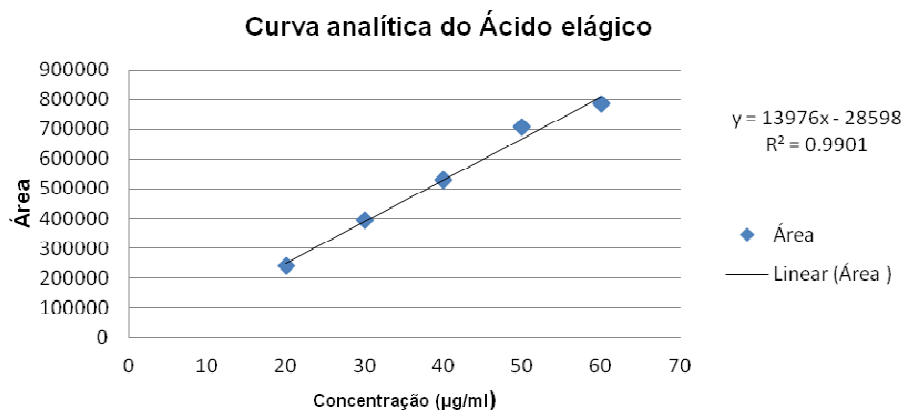


Figura 14: Curva analítica do ácido clorogênico / 10-50 $\mu\text{g/mL}$.



✓ Seletividade

Após a análise do grau de pureza através do espectro de UV gerado pelo detector de arranjo de diodos, foi verificado que os picos correspondiam a um só composto.

✓ Precisão

Os resultados mostraram que o método é preciso, com um C.V < 5%, na análise da repetibilidade e da precisão intermediária (Tabela 3).

Tabela 3: Repetibilidade e precisão intermediária do ácido clorogênico e do ácido elágico.

Compostos	Precisão repetibilidade ¹		Precisão intermediária ¹	
	Concentração (µg/mL)	C.V (%)	Concentração (µg/mL)	C.V (%)
Ácido clorogênico	10	1,0	10	1,0
	30	2,4	30	0,3
	50	0,4	50	1,0
Ácido elágico	20	0,8	20	2,5
	30	1,0	30	1,2
	50	4,5	50	0,8

¹ Limite : C.V < 5%

Fonte: Dados da pesquisa.

✓ Exatidão

A exatidão do método foi determinada através dos ensaios de recuperação. As concentrações da amostra e soluções padrão, bem como os valores médios de recuperação, mostraram que o método é exato, pois apresentou exatidão dentro dos limites especificados. Segundo a ICH (2005), para que o método seja considerado como exato seus valores devem estar entre 80-120% nos ensaios de recuperação (Tabela 4) e o C.V deve ser <5%.

Tabela 4: Ensaio de recuperação

Espécie	Compostos	Recuperação	
		%	C.V
<i>S. mombin</i> (2,5 mg/mL)	Ácido clorogênico (10 µg/mL)	110	1
	Ácido elágico (50 µg/mL)	102	0,8

Fonte: Dados da pesquisa.

✓ Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Limite de detecção e quantificação do ácido clorogênico e do ácido elágico.

Compostos	Limite de Detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
Ácido clorogênico	0,625	5,0
Ácido elágico	1,25	5,0

Fonte: Dados da pesquisa.

A validação garantiu, através de estudos experimentais, que o método atendeu às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

4.3.1 Análise quantitativa do extrato de *S. mombin* por CLAE

A concentração do extrato analisado foi 2,5 mg/mL. A quantificação dos compostos individuais foi realizada utilizando uma curva de regressão de cinco pontos ($r^2 > 0,991$). As soluções-padrão foram analisadas em triplicata e as áreas dos pico médios medidos. Após a obtenção da equação da reta os compostos foram quantificados de acordo com a área sob a curva (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação do ácido clorogênico e do ácido elágico.

Espécie	Compostos	Equação da reta	Teor dos compostos no extrato
Folhas de <i>S. mombin</i> (2,5 mg/mL)	Ácido clorogênico	$y = 37258x - 48484$	12 mg/g de extrato
	Ácido elágico	$y = 13976x - 28598$	19,4 mg/g de extrato

Fonte: Dados da pesquisa.

A análise por CLAE permitiu a identificação de três compostos, ácido clorogênico, ácido elágico e isoquercetrina. Na literatura só existe um registro da quantificação do ácido elágico para a espécie *S. mombin* (SILVA, 2012), que mostrou um teor de $(41,56 \pm 0,01 \text{ mg/g})$ no extrato das folhas. No presente trabalho encontrou-se um teor menor de ácido elágico (19,4 mg/g) para o extrato de *S. mombin*. Isso pode ser atribuído ao líquido extrator utilizado durante o processo extrativo. Neste trabalho a coleta do material vegetal foi realizada no verão e em mata atlântica e o líquido extrator utilizado foi composto por etanol:água (70:30, v/v), já no estudo de Silva et al. (2012) foi utilizado metanol:água (80:20 v/v) e as condições ambientais não foram descritas, ambos utilizaram a maceração como método extrativo. Desta forma acredita-se que os fatores ambientais podem ter interferido na quantidade desses componentes, assim como o líquido extrator. Não há relatos na literatura sobre a quantificação de ácido clorogênico na espécie *S. mombin*, assim destaca-se o resultado obtido uma vez que foi determinado 12 mg desse metabólito/g do extrato.

Em suma, é importante ressaltar que a metodologia desenvolvida permitiu a identificação de três compostos no EHfl de *S. mombin* e a quantificação de dois compostos fenólicos.

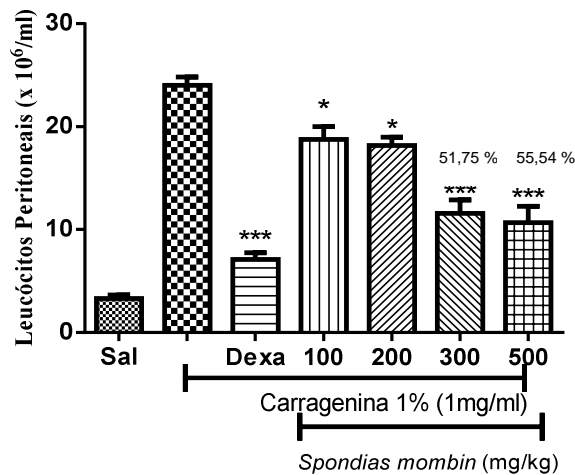
4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os resultados da atividade anti-inflamatória demonstraram que o EHfl de *S. mombin* nas doses de 100, 200, 300 e 500 mg/kg apresentaram redução no número de leucócitos no exsudato da cavidade peritoneal, sendo o efeito das doses

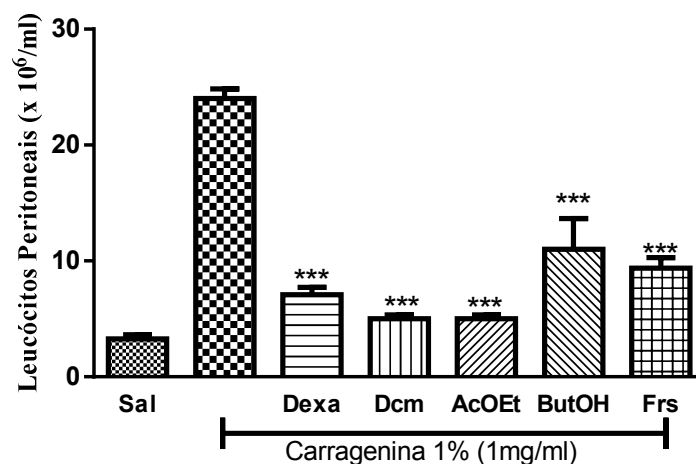
de 300 e 500 mg/kg mais significativos, com uma inibição da migração leucocitária de 51,75% ($11,58 \pm 1,307$) e 55,54% ($10,67 \pm 1,600$), respectivamente, quando comparado com o grupo controle, tratado apenas com a carragenina (Figura 15).

Figura 15: Efeito do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) de *S. mombin* na migração leucocitária no modelo de peritonite induzida por carragenina. EHfl administrado nas doses de 100, 200, 300 e 500 mg/kg, i.p. Dexametasona (5 mg/kg, ip.). Dados expressos como média \pm desvio padrão. * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais.



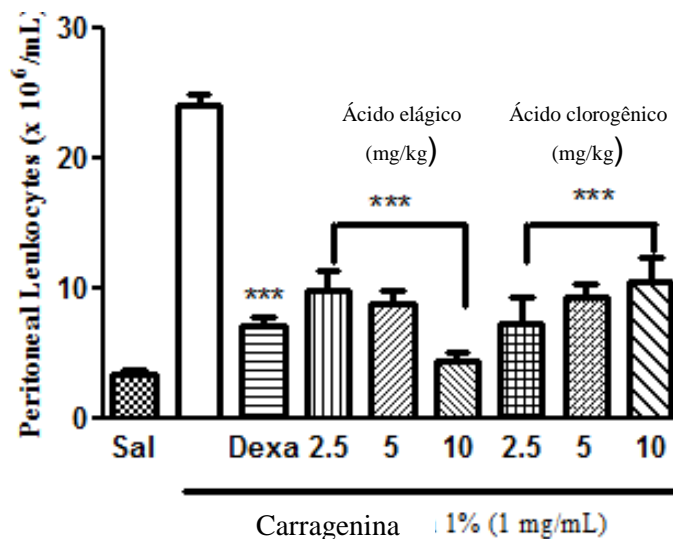
A análise das frações (DCM, AcOEt, ButOH, Frs) mostrou que a fração AcOEt foi a que apresentou melhor perfil de inibição de migração leucocitária com 83,67% ($3,917 \pm 0,4167$), quando comparado com o grupo controle, tratado apenas com a carragenina (Figura 16).

Figura 16: Efeito das frações das folhas de *S. mombin* na migração leucocitária induzida por carragenina no modelo de peritonite aguda. Frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanólica (ButOH) testadas na dose de 200 mg/kg, i.p. Dexametasona (Dexa) (0,5 mg/kg, i.p.). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais.



A atividade anti-inflamatória do ácido clorogênico e do ácido elágico, identificados no EHfl, também foram avaliadas nas doses de 2,5, 5, e 10 mg/kg. Porém a dose de 10mg/kg foi a que apresentou melhor perfil de inibição para o ácido elágico e ácido clorogênico, sendo observado um percentual de inibição de 82% e 70%, respectivamente (Figura 17).

Figura 17: Efeito dos compostos ácido elágico e ácido clorogênico na migração leucocitária induzida por carragenina no modelo de peritonite aguda, testadas na dose de 2,5, 5, e 10 mg/kg, i.p. Dexametasona (Dexa) (0,5 mg/kg, i.p.). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *** ($p < 0,001$) versus grupo controle positivo (grupo tratado apenas com carragenina). N= 6 animais.



Estudos mostram que o ácido clorogênico é capaz de reduzir *in vitro* a expressão de genes pró-inflamatórios, além de inibir significativamente a produção de óxido nítrico, e a expressão da COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 β e TNF- α) (ESPOSITO et al, 2014; HWANG, 2014). Ele atua também inibindo a translocação nuclear e a ativação do NF- κ B, um regulador mestre da inflamação (HWANG et al., 2014). Estudos *in vivo* mostram que ácido clorogênico em doses elevadas, de 50 e 100 mg / kg inibiram o edema de pata de ratos induzido pela carragenina (SANTOS et al., 2006). Outro estudo aponta que o ácido clorogênico possui forte atividade anti-inflamatória e antinoceptiva, tendo ação superior ao do ácido acetil salicílico (YONATHAN et al., 2006).

Para o ácido elágico estudos mostram que esse composto foi capaz de inibir a COX-2 e bloquear o NF- κ B (MARÍN, 2013). Outro estudo verificou que o ácido

elágico tem atividade anti-inflamatória na dose de 10 e 50 mg/kg, testados em modelo de artrite, não apresentando nenhum efeito no desenvolvimento da doença com dose mais baixa, mas inibiu o volume da pata ($P < 0,05$) com a dose mais elevada. Não foi encontrado relato da avaliação anti-inflamatória desses compostos pelo modelo de peritonite induzida por carragenina, utilizado neste estudo.

Neste estudo foi verificado que esses compostos apresentaram atividade na inibição da migração leucocitária no modelo de peritonite aguda, fornecendo assim outro parâmetro que comprova sua atividade anti-inflamatória. Diante do exposto, pode-se sugerir que os compostos ácido clorogênico e o ácido elágico identificados no EHfl por CLAE, estejam envolvidos com a ação anti-inflamatória do extrato, podendo ser considerados marcadores bioativos do extrato das folhas de *S. mombin*, segundo a resolução vigente. De acordo com Li et al., (2008) os marcadores bioativos são aqueles que contribuem para os efeitos terapêuticos e podem ser utilizados como marcadores químicos para a avaliação qualitativa ou quantitativa do extrato.

Na análise das frações foi observado que o ácido clorogênico estava presente nas frações Dcm, AcOEt, ButOH, porém não foi observado na fração residual. A análise do perfil químico dessas frações mostrou similaridades de compostos, diferindo apenas no teor. Então sugere-se que o ácido clorogênico esteja participando da ação farmacológica das frações, porém ele não é o único responsável pelo o efeito farmacológico, já que não foi detectado na fração residual e essa fração mostrou-se ativa. Provavelmente os metabólitos presentes nessas frações, estejam agindo em sinergia (BRUSOTTI, 2014).

No que se refere aos estudos sobre avaliação da atividade anti-inflamatória da espécie *S. mombin*, na literatura foi encontrado apenas um estudo de NWORU et al. (2011) que relata a atividade anti-inflamatória das folhas de *S. mombin*, pelo modelo de edema de pata. Esse estudo mostrou que o tratamento com o extrato metanólico das folhas nas doses de (100, 200 e 400 mg/kg) causou uma inibição dose dependente do edema de pata induzido por carragenina, além de provocar diminuição do TNF- α induzida por LPS- α e da produção de óxido nítrico.

Desta forma, pode-se destacar a importância dos resultados obtidos neste estudo, uma vez que não há relatos na literatura sobre a avaliação da atividade anti-

inflamatória do extrato das folhas de *S. mombin* pelo modelo de peritonite aguda, associado ao estudo químico qualitativo e quantitativo do extrato.

Na Figura 25 (Pag. 83) está apresentado um esquema representativo das etapas realizadas para a avaliação da atividade anti-inflamatória do EHfl, das frações e do ácido clorogênico e ácido elágico.

4.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.4.2.1 Sequestro do Radical DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi realizado o ensaio de sequestro de DPPH, sequestro de radicais superóxidos, poder redutor, sequestro de radicais hidroxilas. Foram analisados nesses ensaios o EHfl, as frações (Dcm, AcOEt, ButOH, Frs) e o EHfr, e os compostos ácido elágico, o ácido clorogênico e rutina.

No ensaio de sequestro de DPPH foi verificado que o EHfl, as frações e os compostos apresentaram potencial de doação de elétrons ou íons H^+ com valores de sequestro que variaram entre 10% a 70% (Figura 18 e 19). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para torna-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Todas as amostras testadas apresentaram capacidade sequestradora de radicais de DPPH.

Para o EHfr também foi observada uma atividade sequestradora de DPPH com uma porcentagem de sequestro de 73% para a maior dose testada (Figura 18). Os compostos ácido clorogênico, ácido elágico e rutina apresentaram atividade superior a 70% (Figura 19), sugerindo que esses compostos estejam participando da atividade antioxidante dos extratos.

Figura 18: Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl); frações: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanol (ButOH), fração residual aquosa (Frs) e do extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr) de *S. mombin*, medida pelo ensaio de sequestro do radical DPPH, nas concentrações de 60, 125, 250 e 500 µg/mL. Os resultados são expressos como média do percentual de sequestro de DPPH.

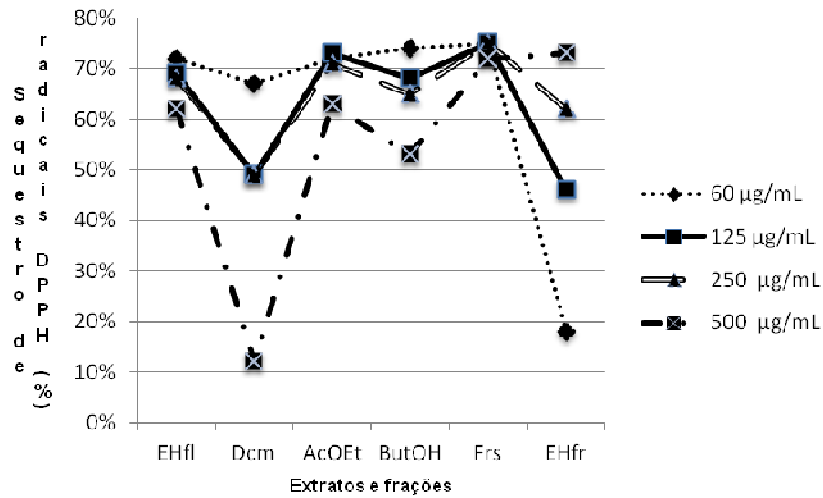
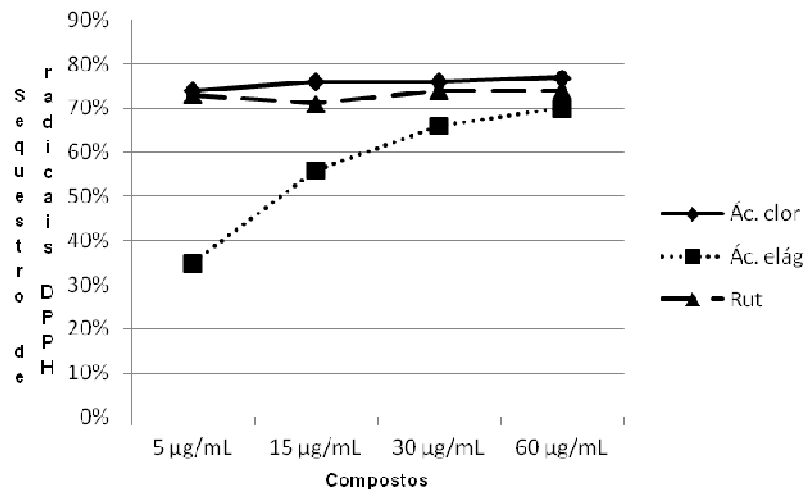


Figura 19: Atividade antioxidante dos compostos: ácido clorogênico, ácido elágico e rutina, medida pelo ensaio de sequestro do radical DPPH, nas concentrações de 5, 15, 30 e 60 µg/mL. Os resultados são expressos como média do percentual de sequestro de DPPH.



4.4.2.2 Sequestro do radical superóxido

O radical superóxido é uma espécie altamente tóxica que é produzida por inúmeras reações biológicas e fotoquímicas. Esse radical é uma espécie de oxigênio reativo que pode causar danos a várias moléculas levando a danos celulares, teciduais e a várias doenças (SAHREEN; KHAN; KHAN, 2010).

Os resultados mostraram que o EHfl e as frações DCM, AcOEt, ButOH e o ácido clorogênico tem a capacidade de sequestrar o radical superóxido, sendo o

EHfl e fração ButOH capaz de seqüestrar em 70% dos radicais superóxidos na menor concentração testada (60 µg/mL) Na Frs foi observado uma inibição de 75% na concentração de 500 µg/mL. Foi observado que o ácido clorogênico apresentou inibição de 85% nas doses de 30 e 60 µg/mL (Tabela 8), sugerindo que o mesmo esteja participando da ação antioxidante do extrato. Verificou-se ainda, que à medida que a concentração do extrato e frações vai aumentando, a atividade antioxidante vai diminuindo, exceto para a Frs, uma hipótese que poderia explicar esse comportamento, seria à complexidade do extrato vegetal, que pode conter componentes que inibem o efeito antioxidante em concentração elevada.

Para o extrato dos frutos foi observado uma inibição de 67% na concentração de 500 µg/mL (Figura 7). Para a rutina composto identificado nesse extrato, foi observado uma inibição de 87% na concentração de 60 µg/ml (Tabela 8). Deste modo sugere-se que a rutina esteja contribuindo com a atividade antioxidante do extrato.

Tabela 7: Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico (EHfl) e frações das folhas de *S. mombin*: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanol (BuOH), fração residual aquosa (Frs) e do extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr), medida pelo ensaio de sequestro de radicais superóxidos, nas concentrações de 60, 125, 250 e 500 µg/mL. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de sequestro do radical superóxido

Amostras	Concentrações (µg/mL)	% inibição
EHfl	60	70 ± 0,011
	125	61 ± 0,008
	250	35 ± 0,01
	500	30 ± 0,015
Dcm	60	62 ± 0,002
	125	59 ± 0,008
	250	62 ± 0,006
	500	5 ± 0,0075
ButOH	60	70 ± 0,0015
	125	57 ± 0,016
	250	22 ± 0,005
	500	28 ± 0,008
Frs	60	17 ± 0,0045
	125	67 ± 0,0005
	250	74 ± 0,0025
	500	75 ± 0,002
EHfr	60	23 ± 0,004
	125	41 ± 0,0025
	250	33 ± 0,008
	500	67 ± 0,004

Tabela 8: Atividade antioxidante do ácido clorogênico, ácido elágico e rutina, medida pelo ensaio de sequestro de radicais superóxidos, nas concentrações de 5, 15, 30 e 60 µg/mL. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de sequestro do radical superóxido.

Amostras	Concentrações (µg/mL)	% inibição
Ácido clorogênico	5	62 ± 0,002
	15	76 ± 0
	30	85 ± 0,003
	60	85 ± 0,003
Ácido elágico	5	30 ± 0,0055
	15	50 ± 0,0035
	30	43 ± 0,0105
	60	48 ± 0,0025
Rutina	5	54 ± 0
	15	73 ± 0,0005
	30	83 ± 0,0005
	60	87 ± 0,001

4.4.2.3 Poder redutor

No ensaio de avaliação da atividade redutora quanto maior a absorbância das amostras maior a capacidade redutora. O resultado é obtido através da absorbância da amostra subtraído da absorbância do branco. Neste estudo foi observado que o

EHfl, as frações (Dcm, AcOEt, ButOH) e o ácido elágico e o ácido clorogênico apresentaram atividade redutora significativa com absorvância maior que 0,7 quando comparada com o padrão de ácido ascórbico na concentração de 25 µg/mL, que apresentou uma absorvância de 0,8 (Figura 20 e 21). Para o EHfr também foi observada uma capacidade redutora com absorvância de 0,4 e para a rutina foi verificado absorvância maior que 0,7 próxima ao valor encontrado para o padrão ácido ascórbico.

Figura 20: Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) e frações de *S. mombin*: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanol (ButOH), fração residual aquosa (Frs) e do extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr) e do padrão de ácido ascórbico, medida pelo ensaio de poder redutor nas concentrações de 60, 125, 250, 500 µg/mL e para o padrão em concentração de 25 µg/mL. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão do percentual de poder redutor.

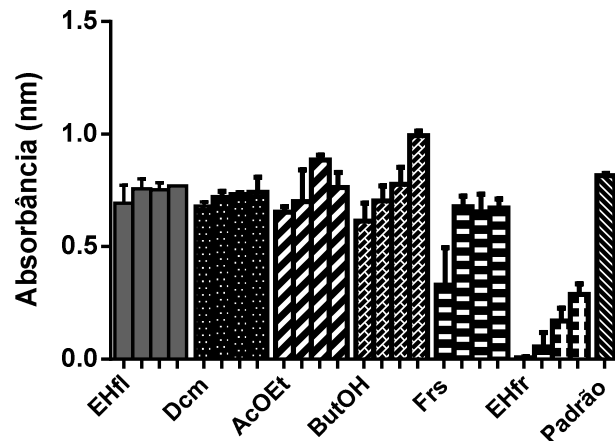
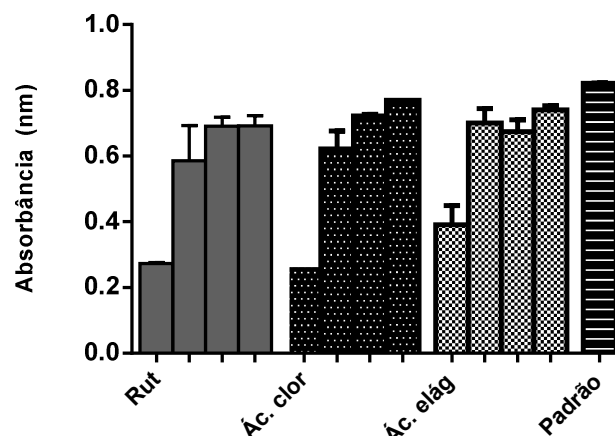


Figura 21: Atividade antioxidante do ácido clorogênico, ácido elágico, rutina e do padrão de ácido ascórbico, medida pelo ensaio de poder redutor nas concentrações de 5, 15, 30, 60 µg/mL e para o padrão em uma concentração de 25 µg/mL. Os resultados são expressos como média do percentual de poder redutor.



4.4.2.4 Sequestro de radicais hidroxilas

No ensaio de sequestro de radicais hidroxilas, foi observado que o EHfl, as frações (Dcm, AcOEt, ButOH, Frs) e o ácido elágico e o ácido clorogênico apresentaram porcentagem de sequestro maior que 100% para as concentrações testadas, demonstrando que as amostras testadas tem um grande potencial de sequestro de radicais hidroxilas (Figura 22). Para o EHfr também foi observado mais de 100% de sequestro, assim como para a rutina (Figura 23). O $\bullet\text{OH}$ é uma espécie extremamente reativa, capaz de causar danos ao DNA, proteínas e lipídios (HALLIWELL, 1995). Com base nos resultados, pode ser sugerido que as amostras, podem formar um complexo com um radical livre, provavelmente por um efeito quelante convertendo estes radicais em espécies menos reativas.

Figura 22: Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) e das frações: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanol (ButOH), fração residual aquosa (Frs) e do extrato hidroetanólico dos frutos de *S. mombin* (EHfr), medida pelo ensaio de sequestro de radicais hidroxilas nas concentrações de 60, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão do percentual de radicais hidroxilas.

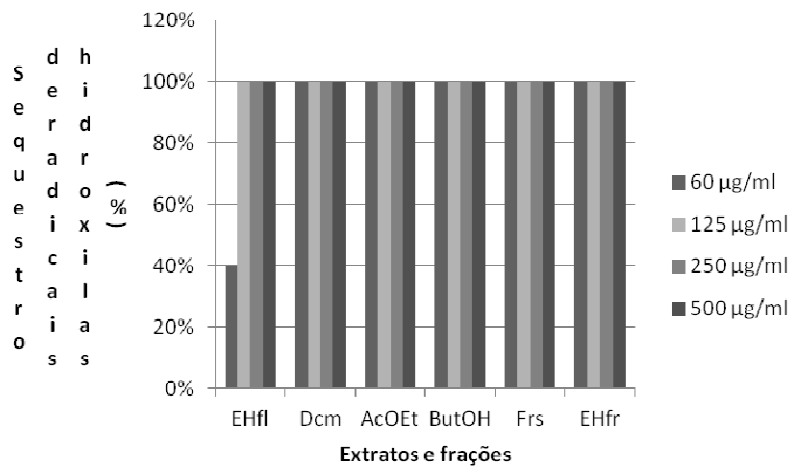
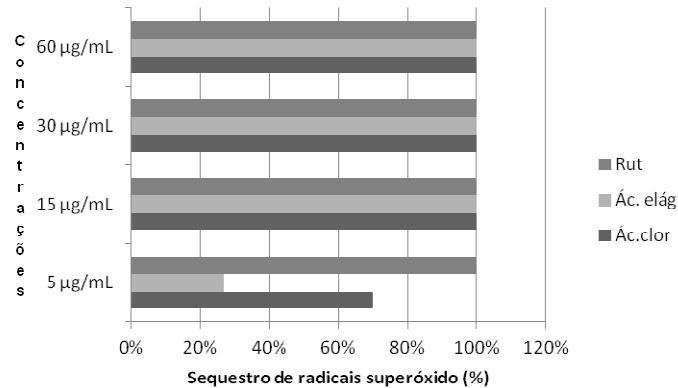


Figura 23: Atividade antioxidante do ácido clorogênico, ácido elágico e rutina, medida pelo ensaio de radicais hidroxilas nas concentrações de, 5, 15, 30 e 60 µg/mL. Os resultados são expressos como percentual de radicais hidroxilas.



Os resultados da avaliação da atividade antioxidante mostraram que o EHfl, as frações (Dcm, AcOEt, ButOH) e o ácido elágico e o ácido clorogênico apresentaram potencial antioxidante expressivo, apresentando atividade sequestradora de radicais DPPH, radicais superóxidos, radicais hidroxilas, além de apresentar atividade redutora. A literatura mostra que os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Essa atividade deve-se principalmente as suas propriedades redutoras e pela sua estrutura molecular, mais especificamente, pela posição e grau de hidroxilação da estrutura do anel, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUZA, 2007; RIVELLI, 2007).

Deste modo pode-se dizer que os ácidos fenólicos presentes no extrato e frações das folhas de *S.mombin* estão contribuindo para a atividade antioxidante do extrato.

Em relação aos estudos de atividade antioxidante relatados na literatura para as folhas, foi verificada a avaliação do extrato metanólico das folhas pelos métodos de DPPH, sequestro de radical hidroxila, peroxidação lipídica e poder redutor. Observa-se que o extrato metanólico na concentração de 300 µg/ml inibiu em 88,58 e 55,81% o sequestro de DPPH e o sequestro de radical hidroxila, respectivamente. Na peroxidação lipídica, foi verificado, na concentração de 1 mg/mL, uma inibição de 54,03%. Para o poder redutor, foi observada atividade redutora na concentração

150,0 µg/mL (AKINMOLADUN; OBUOTOR; OBUOTOR, 2010). Silva (2012) descreveu atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas utilizando os ensaios de DPPH e ABTS, sendo observado um $IC_{50} = 0,417$ mg/mL e de $IC_{50} = 0,451$ para o ABTS.

Comparando o nosso estudo com os dados obtidos na literatura observou-se que o extrato hidroetanólico das folhas obteve uma menor inibição de sequestro de DPPH com (73%) quando comparada com extrato metanólico descrito na literatura com (88,58%), já para o sequestro de radical hidroxila foi observado uma inibição maior para o extrato hidroetanólico com mais de 100% de inibição quando comparado com a literatura (55,81%). Outro dado importante é que o extrato apresentou mais de 70% de inibição de radical superóxido, fato esse importante já que durante o processo inflamatório ocorre formação desses radicais. O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos, sendo observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2^- (seja enzimático, fagocítico ou químico), contribuindo desta forma para o aumento do processo inflamatório (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Diante disso pode-se dizer que os resultados obtidos mostraram que o EHfl possui atividade antioxidante e sugere-se que ele esteja participando como sequestrador de superóxidos no processo inflamatório, contribuindo deste modo para a atividade antiinflamatória observada no extrato.

4.4.3 Atividade antiproliferativa

4.4.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Foi realizada também a avaliação da viabilidade celular dos extratos (folhas e frutos), frações obtidas do extrato das folhas e do ácido clorogênico, ácido elágico e rutina. Para esse estudo foi utilizada uma linhagem de célula de fibroblastos 3T3 para avaliar a capacidade dessas células em reduzir o composto MTT a sais de formazan após serem expostas as concentrações de 60, 125 e 500 µg/mL para os extratos e frações e de 5, 15 e 60 µg/mL para o ácido elágico, ácido clorogênico e rutina. Na Tabela 9 são mostrados os resultados obtidos no período de 24 h.

As células 3T3 são comumente utilizadas para se avaliar a toxicidade de compostos frente a células normais. Os dados mostraram que o EHfl e EHfr e as frações Dcm, AcOEt, ButOH e os compostos ácido clorogênico, ácido elágico e a rutina não apresentaram toxicidade. Uma discreta intervenção na proliferação celular para a Frs nas concentrações de 60 e 500 µg/mL foi observada, sendo a inibição da proliferação para essa fração de 33% na máxima concentração utilizada. Foi observado também que houve um aumento no metabolismo mitocondrial dos fibroblastos 3T3, com uma proliferação de 25 -100% a mais que o controle, para o EHfl, EHfr, Dcm, AcOEt, ButOH e rutina, podendo inferir que essas amostras possuem atividade mitogênica.

Na literatura não há relato dos testes de viabilidade celular com células de fibroblastos 3T3 para a espécie *S. mombin*, destacando-se dessa forma os resultados obtidos, já que esse ensaio mostrou que o extrato hidroetanólico das folhas e frutos não apresentou citotoxicidade. Além disso, os extratos induziram a proliferação de fibroblastos 3T3 e isso pode ser indício de atividade cicatrizante que precisa ser comprovada por ensaios *in vivo*.

Na Pag. 84 está representado um desenho esquemático com os resultados obtidos da avaliação das atividades antioxidante e antiproliferativa.

Tabela 9: Efeitos do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl), frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanólica (ButOH) e fração residual aquosa (Frs) de *S. mombin* nas concentrações de 60, 125 e 250 µg/mL, e do ácido elágico e ácido clorogênico (5, 15 e 60 µg/mL) e do extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr) (60, 125 e 250 µg/mL) e da rutina (5, 15 e 60 µg/mL), na viabilidade de fibroblasto 3T3, no tempo de 24 h. Resultados expressos em porcentagem de proliferação ± desvio padrão.

Fibroblastos 3T3 (24 h)			
	60 µg/mL	125 µg/mL	500 µg/mL
EHfl	125 ± 0,0205	129 ± 0,0095	181 ± 0,0185
Dcm	253 ± 0	128 ± 0,0005	142 ± 0,0025
AcOEt	168 ± 0,0205	204 ± 0,034	128 ± 0,0445
ButOH	141 ± 0,0195	93 ± 0,0005	158 ± 0,048
Frs	100 ± 0,01	108 ± 0,0025	67 ± 0,022
EHfr	100 ± 0,0325	151 ± 0	103 ± 0,0095

	5 µg/ml	15 µg/ml	60 µg/ml
ácido clorogênico	122 ± 0,0355	106 ± 0,002	105 ± 0,0025
ácido elágico	154 ± 0,0535	127 ± 0,0015	181 ± 0,1205
rutina	146 ± 0,0145	116 ± 0,071	117 ± 0,0015

4.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de *S. mombin*

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do EHfr e frações e do EHfl.

4.4.4.1 Difusão em disco

O EHfl e EHfr de *S. mombin* foram testados frente a cepas Gram positivas e Gram negativas. A concentração do extrato vegetal e das frações no disco foi de 2 mg por disco. A avaliação da atividade do EHfl e EHfr foi realizada com base no diâmetro do halo de inibição formado ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado como resultado positivo frente às bactérias um halo de inibição ≥ 7 mm. Como pode ser observado na (Tabela 10) os ensaios de atividade antimicrobiana revelaram que o EHfl apresentou uma atividade significativa contra bactérias Gram positivas, demonstrando que o extrato tem um maior potencial de inibição contra esse grupo de bactérias. As bactérias que se mostraram com maior susceptibilidade a ação do extrato de *S. mombin* foram *S.pneumonie*, *S.pyogenes* e *S.flexneri* com halo ≥ 9 (Tabela 10).

O perfil de seletividade antimicrobiana contra Gram-positivos, não é uma característica restrita de substâncias obtidas de plantas, mas é um fenômeno comumente observado em vários antimicrobianos (BASILE et al.,2000; PRETTO et al., 2004), pois as bactérias Gram positivas possuem um envelope celular, menos complexo quando comparados às Gram negativas, o que as tornam mais susceptíveis à ação dos antimicrobianos, justificando então um maior potencial do extrato na inibição contra esse grupo de bactérias.

O perfil da atividade antimicrobiana para a espécie *S. mombin* corrobora com os resultados obtidos na literatura, o qual mostra atividade antimicrobiana para as cepas *K. pneumoniae* e *S. pyogenes* (ABO, OGUNLEYE e ASHIDI, 1999; SILVA, 2012). No presente trabalho, adicionalmente foi verificada atividade do EHfl contra quatro cepas (*E.faecalis*; *S.aureus*; *S.pneumonie* e *S.flexneri*), ainda não testadas em estudos anteriores. Para o EHfr não foi observado atividade contras as cepas testadas (Tabela 10).

Além do EHfl as frações: Dcm, AcOEt, ButOH, também demonstraram importante atividade antimicrobiana para algumas cepas (Tabela 10). É importante salientar que o EHfl e a fração AcOEt demonstraram um maior potencial de inibição

no ensaio de difusão em disco, sendo a cepa *S. flexneri* a que apresentou melhor halo de inibição quando comparado com a padrão.

Os resultados encontrados são bastante promissores no que se diz respeito aos tratamentos futuros de infecções bacterianas causadas pela *S. flexneri*, já que atualmente essa cepa é responsável pela a maioria dos casos de shigelose em países desenvolvidos, sendo uma causa comum de diarreia bacteriana em todo o mundo (GOLDBERG, 2013). Infecções por *Shigella* são uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. No mundo todo, cerca de 165 milhões de casos ocorrem anualmente com 1 milhão de mortes associadas (AGHA; GOLDBERG, 2013).

Tabela 10: Atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) e das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), butanólica (ButOH) e fração residual aquosa (Frs) e extrato hidroetanólico dos frutos (EHfr) de *S. mombin* na concentração de 2 mg/disco. Diâmetro (mm) do halo de inibição do crescimento microbiano de cepas Gram positivas e Gram negativas.

	EHfl	EHfr	Dcm	AcOEt	ButOH	Frs
Gram positiva						
<i>S.aureus</i>	7,5 mm	S/A	8,5 mm	11 mm	10 mm	S/A
<i>S.epidermidis</i>	7,5 mm	S/A	S/A	7,5 mm	S/A	S/A
<i>S.pneumonie</i>	9,25mm	S/A	N/T	N/T	N/T	S/A
<i>S.pyogenes</i>	9 mm	S/A	7,5 mm	9 mm	9 mm	S/A
<i>E.faecalis</i>	7,5mm	S/A	8 mm	10 mm	7 mm	S/A
Gram negativa						
<i>K.pneumonie</i>	6,5 mm	S/A	S/A	9 mm	S/A	S/A
<i>S.flexneri</i>	10 mm	S/A	8,5mm	12 mm	9 mm	S/A
<i>S. typhimurium</i>	S/A	S/A	S/A	S/A	N/T	S/A
<i>E. coli</i>	S/A	S/A	N/T	N/T	N/T	S/A
<i>P. aeruginosa</i>	S/A	S/A	N/T	N/T	N/T	S/A

S/A = sem atividade. N/T = ainda não testado. Controles positivos: *S. aureus*: oxacilina (1µg) 18-24 mm; *E. faecalis*: ampicilina (10µg) >17 mm; *S. epidermidis*: ceftazidima (30µg) >17 m; *K. pneumonie*: doxicilina (30µg) >14 mm; *S. flexneri*: Doxicilina (30µg) >14 mm; *S.pyogenes*: Levofloxacino(5µg) >17 mm.

4. 4.4.2 Determinação do CIM e CBM

Após a determinação da atividade antimicrobiana do EHfl e das frações pelo método de difusão em disco, foi efetuada uma nova etapa, que consistiu em testar o EHfl contra determinados micro-organismos em diferentes concentrações obtendo-se a CIM e posteriormente a CBM. Foi realizada a microdiluição somente para a

determinação da CIM e CBM do extrato para as bactérias que apresentaram halo de inibição ≥ 9 mm. A Tabela 8 exibe os resultados das CIM e CBM. Como pode ser observado o EHfl de *S. mombin* apresentou a menor concentração inibitória mínima contra *S. pneumoniae*. Nas concentrações bactericidas mínimas (CBM), o perfil da atividade antimicrobiana foi diferente dos valores encontrados para o CIM, sendo os valores de CIM menores que o da CBM (Tabela 11).

Os resultados da determinação do CIM mostraram que o extrato tem propriedades bacteriostáticas para as cepas testadas (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. flexneri*), uma vez que o CIM foi menor que o CBM.

Tabela 11: Determinação da CIM e CBM das bactérias em diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) de *S. mombin*.

Cepas	CIM	CBM
<i>S. pneumoniae</i>	62,50 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. pyogenes</i>	125 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. flexneri</i>	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$

4. 4.4.3 Bioautografia

A avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias presentes no extrato das folhas de *S. mombin*, foi também realizada através do ensaio de bioautografia. Este método permitiu a visualização das substâncias antimicrobianas em um cromatograma. Inicialmente, foram testados vários sistemas de solventes para a realização da CCD e obtenção de um cromatograma de boa resolução. Dentre os sistemas testados o que apresentou melhor resolução foi: AcOEt; Ácido fórmico:H₂O (8, 6: 0,7: 0,7 v/v/v).

A (Figura 24a) mostra a bioautografia do EHfl, utilizando um inóculo do microorganismo *S. aureus*. Na figura 24b é apresentado a CCD controle, que foi revelada com vanilina sulfúrica. Utilizando esse sistema de solvente foi possível observar quais os compostos do extrato de *S. mombin* são responsáveis pela atividade antimicrobiana, localizados no ponto de aplicação, o que pode indicar que os compostos ativos apresentem caráter mais polar.

Figura 24: Ensaio Biautográfico frente ao *S. aureus* do extrato hidroetanólico das folhas (EHfl) de *S. mombin*. (a) Placa bioautografia; (b) Placa controle.



Os resultados da bioautografia mostraram que o EHfl apresentou forte atividade antimicrobiana no ponto de aplicação da CCD, ou seja, nesse caso as substâncias mais polares são as principais responsáveis pela atividade antibacteriana. Através da comparação com a placa revelada com a vanilina sulfúrica foi verificado que as substâncias ativas pertencem a diferentes classes de metabólitos secundários. Pela coloração sugere-se que sejam flavonoides (bandas de coloração amarela) e taninos (banda de coloração rosa).

Portanto, após os resultados parciais, pode-se observar que EHfl apresenta atividade antimicrobiana para algumas cepas bacterianas e que a fração AcOEt apresentou um maior percentual de inibição das cepas no método de difusão em disco. Futuras análises serão realizadas para a determinação do MIC e MBC da fração AcOEt, com as bactérias que apresentaram maior halo de inibição a *S. flexneri*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Serão ainda testados os compostos, ácido clorogênico e o ácido elágico frente a essas cepas.

Na Pag. 85 está apresentado um desenho esquemático com os resultados obtidos da avaliação da atividade antimicrobiana.

Figura 25: Esquema representativo da atividade inflamatória

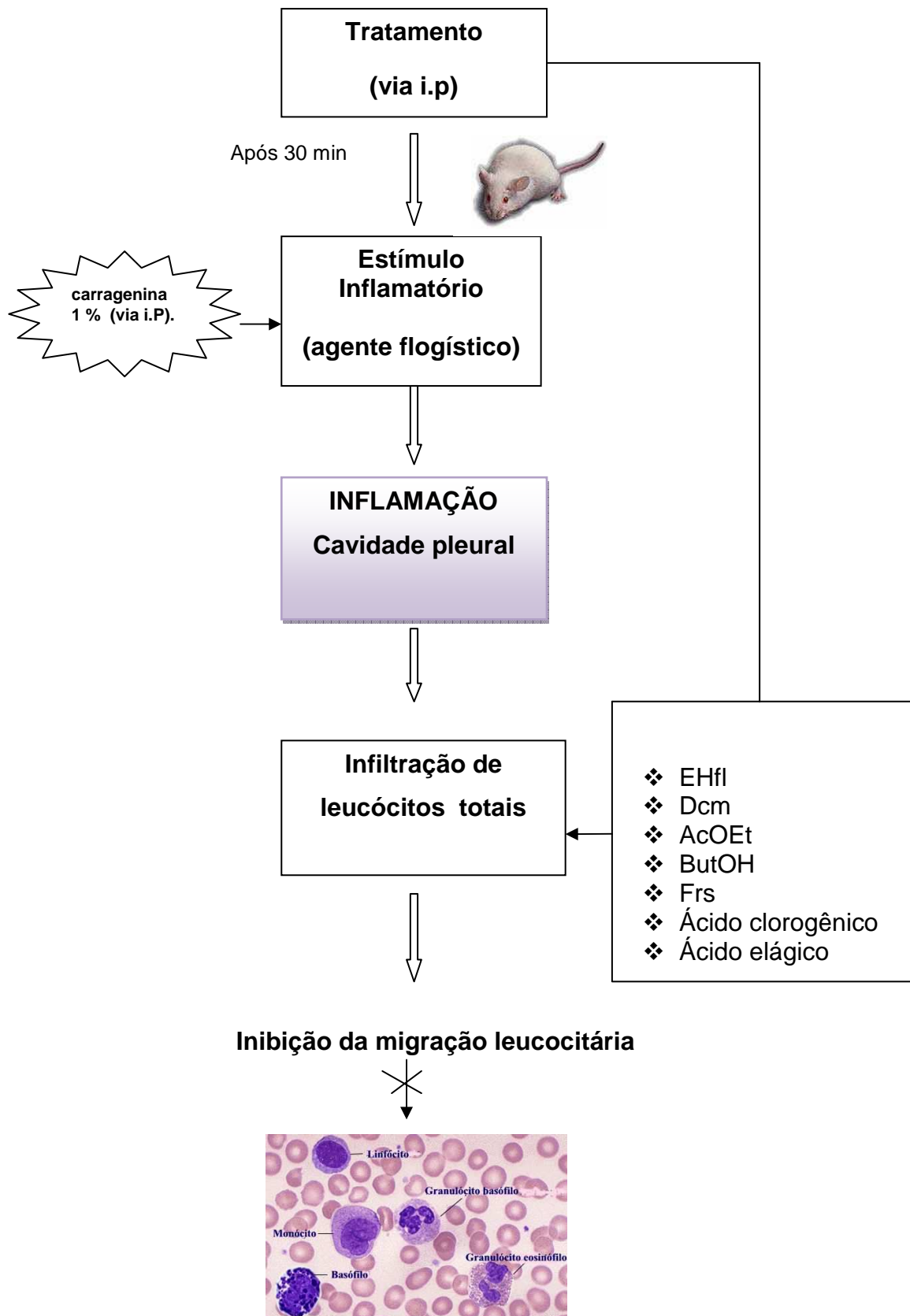


Figura 26: Esquema representativo da atividade antioxidante e antiproliferativa

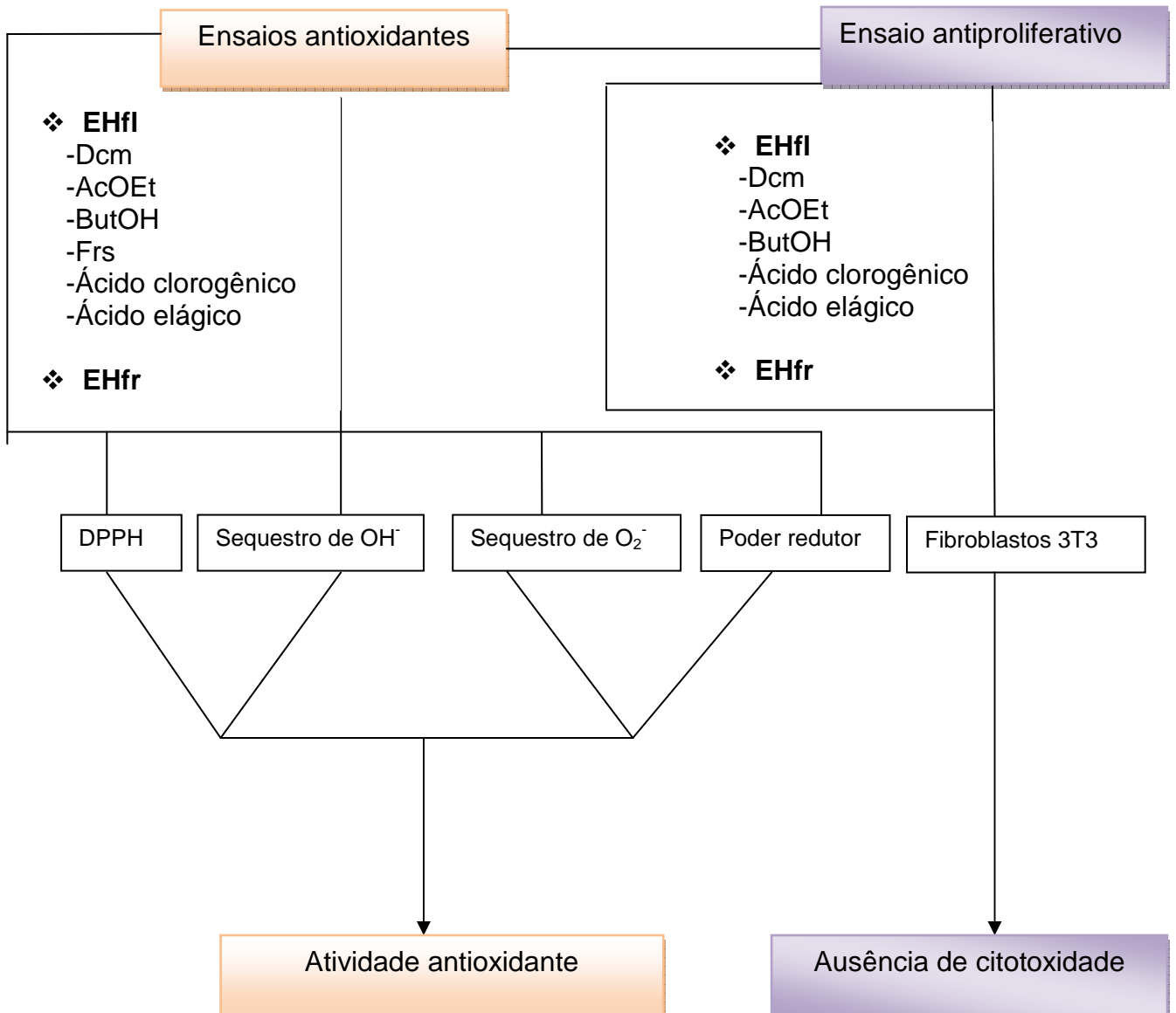
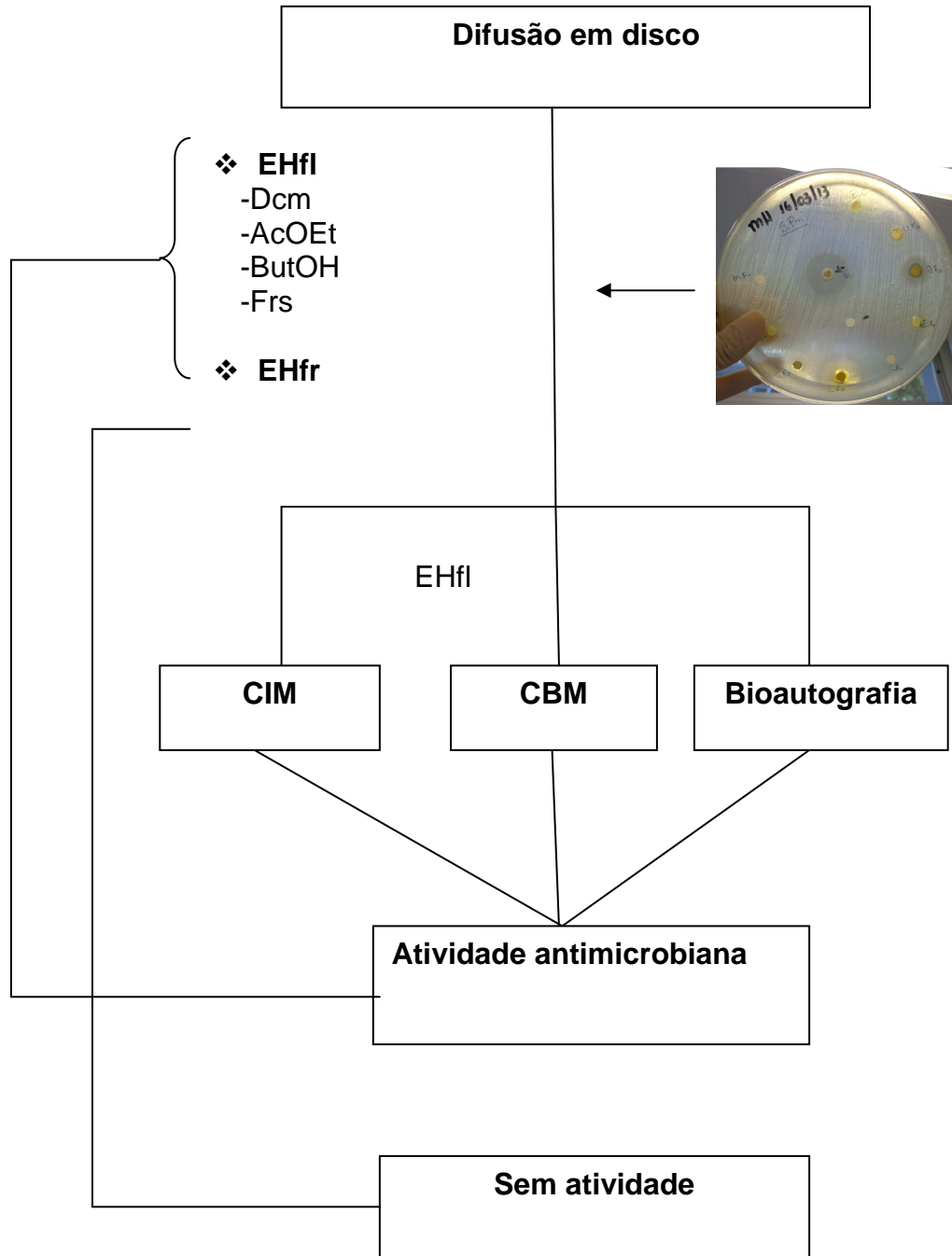


Figura 27: Esquema representativo da atividade antimicrobiana



5 CONCLUSÕES

1. A avaliação do perfil químico das folhas de *S. mombin* por CCD e CLAE mostrou que a espécie é rica em compostos fenólicos. A análise por CLAE permitiu a identificação e a quantificação de ácido elágico e ácido clorogênico no EHfl, podendo esses compostos serem utilizados como marcadores químicos da espécie *S. mombin*. Na análise por CLAE do EHfr foram identificados o ácido clorogênico e a rutina.
2. O método desenvolvido por CLAE apresentou-se eficiente para quantificar e analisar ácido clorogênico e ácido elágico no EHfl. A metodologia analítica foi validada segundo os parâmetros estabelecidos pela RDC 899/ 2003 e pela ICH.
3. Os resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória mostraram que o EHfl das folhas de *S. mombin*, apresentou efeito de inibição da migração de leucócitos no modelo de peritonite aguda induzida pela carragenina, sendo os efeitos mais pronunciados nas doses de 300 e 500 mg/kg. A fração AcOEt apresentou melhor atividade em relação às outras frações testadas e, ainda, os compostos ácido elágico e ácido clorogênico apresentaram importante atividade de inibição da migração leucocitária, sugerindo que os mesmos estejam envolvidos na atividade anti-inflamatória apresentada pelo o EHfl de *S. mombin*.
4. O EHfl e as frações (Dcm, AcOEt, ButOH) das folhas assim como o EHfr apresentaram importante atividade antioxidante.
5. O EHfl e EHfr e as frações, exceto a fração Frs, e os compostos ácido clorogênico, ácido elágico e rutina não apresentaram citotoxicidade significativa frente a cultura de células de fibroblastos 3T3.

6. O EHfl e a fração AcOEt apresentaram importante perfil de inibição bacteriana no teste de difusão em disco, principalmente frente à bactéria *S. flexneri*. A técnica de bioautografia revelou que os compostos ativos antimicrobianos presentes na espécie são de caráter polar.

7. O estudo ainda mostrou importante atividade antimicrobiana para o EHfl, e a fração AcOEt apresentou melhor perfil de inibição bacteriana no teste de difusão em disco, principalmente para a bactéria *S. flexneri*. A bioautografia revelou que os compostos ativos antimicrobianos presentes na espécie são de caráter polar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V.O.; ASHIDI, J.S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Cróton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 494-497, 1999.
- ADEMOLA, I.O; FAGBEMI, B.O; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 223-235 2005.
- ACCIOLY, M. P. **Atividade leishmanicida in vitro de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisíaca* sobre *Leishmania chagasi***. 2001.73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2001.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J. M.; LINS, E.M.F.N.; MELO, J.G; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 325–354 2007.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O. Antibacterial effects of aqueous and alcohol extracts of *Spondias mombin* and *Abchornea cordifolia*: two local antimicrobial remedies. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 23, p .67-72, 1985.
- AKINMOLADUN, Afolabi C.; OBUOTOR ,Efere M.; FAROMBI, Ebenezer O.. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Some Nigerian Indigenous Medicinal Plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 444-51, 2010.
- ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J. M.; LINS, E.M.F.N; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p.325-354, 2013.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, K.N.; JEON, Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, p. 1065–1074, 2006.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M. ; DAVID,J.P.; BAHIA,Marcus V.; AGUIAR, Rosane M.. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.3, p. 1-20, 2010.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 222-224, 2009.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMUB, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p.166-75 2006.

AYOKA, A.O; AKOMOLAFE, R.O; AKINSOMISOYE, O.S; UKPONMWAN O.E . Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, v.11, p. 129-136, 2008.

AKINMOLADUN, A. C.; OBUOTOR, E. M.; FAROMBI, E. O. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 444-51, 2010.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M.; Bailey & Scott s-Diagnostic microbiology, 8°. ed. THE C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BARTON, G. M..A. Calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420, 2008.

BARROS, F.E.V.; SOUSA , M.G.T; COSTA, J. L; OLEA, R. S.G; FREIRE, S. Maria F.; BORGES, A.C.R.; BORGES , M. O. R. Avaliação das atividades analgésica e Antinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis Procera*, R. BR. (Ciúme). **Infarma**, v.16, p. 60-64, 2004.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; RICCIARDE, L.; FERRERA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHE, C. R.;VUOTTO, M.L.; FERRARA, L.. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea Sativa* leaves. **Fitoterapia**, v.71, p. 110-116, 2000.

BERGER, M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition**, v. 24, p.172-83, 2005.

BERNHOF, A..A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters. The Norwegian Academy of Science and Letters: **Aksel Bernhoft**, p. 7-255, 2010.

BLOXTON, JD.; MARDEROSIEN, AD.; GIBBS R. Bioactive constituents of Alaska devil's root (*Opopanax horridus*, Araliaceae). **Economy Botany**, v.56, n.3, 2002.

BRASIL (a). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução-RE N° 889/2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 08 de dezembro de 2011.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução-RE N° 14/2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect?contentIDR=75177c80402d00d082488654e035b7cb&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>>. Acesso no dia 8 de dezembro de 2011.

BRASIL (c). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medicamentos Fitoterápicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos/>>. Acesso no dia 8 de dezembro de 2011.

BRASIL (d). Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medicamentos Fitoterápicos- Nota técnica do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d37e2180474580a88c98dc3fbc4c6735/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+1+do+CNPMF_06+10+2010.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>. Acesso em: 08 de dezembro de 2011.

BRASIL (e). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Informações Tecnológica. Floricultura tropical espécies regionais e exóticas. Brasília-DF, 2009. Disponível em: <<http://livraria.sct.embrapa.br/liv2/consultaProduto.do?metodo=detalhar&codigoProduto=00083730>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

BRASIL(f). Ministério do Meio Ambiente. Suframa Investe. Biodiversidade. Brasília-DF, 2011. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/investimentos/brasil_biodiversidade.cfm> Acesso em: 14 jan. 2012.

BRASIL (f). **Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2012**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>>. Acesso em 14 jan. 2013.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza: **Ed. Universitária UFRN**, 1960. 540 p.

BRITO, C.H. de; COSTA, N.P.; BATISTA, J. L.; SILVA, A.B.; LIMA, A.N.. Tratamento térmico de frutos da cajazeira utilizando vapor d' água, visando ao controle de *Ceratitis capitata* e à qualidade do fruto. **Ciência Rural**, v. 39, p. 407-411, 2009.

BRUSOTTI,G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; Caccialanza, G.; Massolini, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

CADENAS, E; DAVIES, KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, p. 222-30, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A. ;PERFEITO,J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p. 1-9, 2008.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; FONSECA, A. V. V.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. **Journal of Food Science And Technology**, p. 1-2, 2013.

COATES, N. J.; GILPIN, M. L; GWYNN, M. N.; LEWIS, D. E.; MILNER, P. H.; SPEAR, S. R.; TEYLE, J. W. SB-202742, A novel β - lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v.57, p. 654–657,1994.

CORDELL, Geoffrey A.; COLVARD, Michael D.. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.5-14, 2005.

CORREIA, S. de J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p .1-10, 2006.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M. ; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A.J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v.30, p.1129-1130,1991.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v.31, p.1979-1981 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS ,St.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 5, p. 460-463, 1994.

COSTA, G. M. ; ORTMANN, C. F. ; SCHENKEL, E.P. ; REGINATTO, F. H. . An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of Cecropia Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1-10, 2011.

CLARDY, J.; WALSH, C.. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

CONTRAN,R,S.; KUMAR,V,;COLLINS, T..**Robbins pathologic basis of disease**. 6ª edição. USA-Saunders Copany. 1999. p. 69-75.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 88, p. 219-224,2004.

DE CASTRO FRANCA, S.; CORREA, M. M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; GARCIA LEME, J.; GIGLIO, J. R. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, p.87-96, 2007.

ESPOSITO, D; CHEN, A; GRACE, MH; KOMARNYTSKY, S; LILA, MA. Inhibitory Effects of Wild Blueberry Anthocyanins and Other Flavonoids on Biomarkers of Acute and Chronic Inflammation in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M; SANTOS, R. J ; GENOVESE, M. I; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2, p.446-452, 2006.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 12.

FERREIRA, A.L.A.; Matsubara L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-10, 1997.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W. α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. **Food Chemistry**, v.116, p. 285-288, 2009.

FOSTER, S. L.; RUSLAN, M. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, v. 130, p. 7-15, 2009.

FRANCISCO, V; COSTA, G; FIGUEIRINHA, A; C, Marques; PEREIRA, P; MIGUEL, N. B; CELESTE, L. M; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C; TERESA, C. M, TERESA B. M.. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p. 126-34, 2013.

GAD, H. A.; SHERWEIT H. EI-A.; MOHAMED, I.A.-S.; MOHAMED, M. A.-A. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 1-24, 2013.

GOLDBERG, Marcia B. Epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Shigella* infection. **UpTo Date**, 2014.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A.. A direct bioatographic assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 50, p.19-22,1987.

HALLIWELL B. Antioxidant characterization. methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p.1341-1348,1995.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.

Homans, A. L.; Fuchs, A. Direct biautography on thin layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v.51, p.327-329, 1970.

HWANG, SJ; KIM, YW; PARK, Y; LEE, HJ; KIM, KW. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 1, p. 81-90, 2014.

YAM, M.F.; ASMAWI, M.Z.; BASIR, R.. An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 362-368, 2008.

YONATHAN , M ; ASRES, K ; ASSEFA, A ; BUCAR, F. In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v. 3, n. 108, p .462-470, 2006.

IGWE, CU,; ONWULIRI, VA,; OSUAGWU ,CG; ONYEZE ,GOC ; OJIAKO, OA. Biochemical and Haematological Studies on the Ethanol Leaf Extract of *Spondias mombin* L. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v.1, p.1-5, 2011.

ICH - International Conference on Harmonization. 2005. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology** - Q2 (R1). London.

JEAN-GILLES, D ;LI, L ; VAIDYANATHAN ,VG ; REI, R; CHO, B ; WORTHEN, DR ; CHICHESTER ,CO ; SEERAM, NP . Inhibitory effects of polyphenol punicalagin on type-II collagen degradation in vitro and inflammation *in vivo*. **Chemical Biological Interactions**, v.2, p. 90-99, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. 368 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 544 p.

LEITE MP, FASSIN JRJ, BAZILONI EMF, ALMEIDA RN, MATTEI R, LEITE JR. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 1-10, 2008.

LI ,Songlin; HAN, Quanbin; QIAO, Chunfeng; SONG, Jingzheng, CHENG, Chuen Lung; XU, Hongxi. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an Overview, **BioMed Central**, v. 3, p. 1-16, 2008.

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

MARÍN, M ; MARÍA, G.R ; RÍOS, J.L ; RECIO, M.C. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p. 925-934, 2013.

MASKREY ,B.H. ; MEGSON, L. L.; WHITFIELD ,P.D. ; ROSS, A.G.. Mechanisms of Resolution of Inflammation: A Focus on Cardiovascular Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 31, p. 1001-1006, 2011.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A.S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Journal Brazilian of Food Technology**, v.13, p.156-164, 2010.

MATOS, J.M.D.; MATOS, M.E.O. **Farmacognosia: Curso teórico-prático**. Fortaleza: Edições UFC, 1989.

MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; SANTOS, A. M. M; ALBUQUERQUE, U. P. Does the selection of medicinal plants by Brazilian local populations suffer taxonomic influence? **Journal of Ethnopharmacology**, Recife-PE-Brasil. v. 146, p.842-852, 2013.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 205-18, 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NCCLS/CLSI **b** - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003(a). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003 (b). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; - Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; Solange T.C. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 107-110, 2009.

NJOKU, P.C.; AKUMEFALA, M.I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Nutrition**, v. 6, p. 613-615, 2007.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, p.10-16, 2011.

NOGUEIRA, J.D.N.; SOUSA, D.P.; FREITAS, Rivelilson Mendes de. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, 2013.

NWORU, C.S.; AKAH, PA; OKOLI, C.O.; OKOYE, T.C.. Oxytocic Activity of Leaf Extract of *Spondias mombin*. **Pharmaceutical Biology**, v.45, p.366-371, 2007.

OKEKE, I.N .; LAXMANINARAYAN , R.; BHUTTA , A.Z.; DUSE , A.G.; JENKINS, P.; O'BRIEN F.T.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN P.K. Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. **Lancet Infectious Diseases**, v.5, p. 481-493, 2005.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50-52, 2005.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRODE, T.S. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. **Transplant Immunology**, v. 16, p.105-11, 2006.

PLANTA, E.M. The role of poverty in antimicrobial resistance. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 20, p. 533-539, 2007.

PRETTO, J.B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; SARTORI, MR.; ISAIAS D.E.; CRUZ, A.B.. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59, p. 657-62, 2004.

RAJI ,Y.; GBADEGESIN, M. A.; OSONUGA O. A.; ADISA, R. A.; AKINSOMISOYE, O. S.; AWOBAJO, F.O.; KUNLE-ALABI, O. T.; ESEGBUE, P.P. R. C.; OSONUGA I. O.; LAMIDI, A. F.. Reproductive, Haematologic and Biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark. **International Journal of Pharmacology**, v. 2 , p.126-130, 2006.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues**, v.15, p. 3-17, 2004.

REED TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1302-1319, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 1-10, 2004.

RIVELLI, D.P.; SILVA, V. V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA R.L.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH- reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p.1-10, 2007.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 261-267, 2000.

SANTOS, M.D ; ALMEIDA, M.C; LOPES, N.P; Souza G.E . Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.11, p. 2236-2240, 2006.

SAHREEN,S; KHAN,M. R; KHAM, R.A. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts if *Carissa opaca* fruits. **Food chemistry**, v.122, 2010.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; SAHOO, S. D. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**. v. 81, p. 462-471, 2010.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 371-400.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, F. V. G. ; SILVA, S. M.; SILVA, G.C.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E.; DANTAS, A. L.. Bioactive compounds and antioxidant activity in fruits of clone and ungrafted genotypes of yellow mombin tree. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, p.685-691, 2012.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* espécies from Northeastern Brasil. **Pharmaceutical Biology**, v. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; LIMA D. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue vírus. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p.406-413, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. da UFSC, 1999.

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K. ;YAHARA, K. ;NAKAMURA, T. Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p.945–948, 1992.

SOARES, E. B. **Avaliação de genótipos de cajazeira (*Spondias mombin* L.): Caracterização físico-química dos frutos e repetibilidade de caracteres morfoagronômicos**. 2005. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Departamento de Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. 2005.

SOUSA, C. M.M.; SILVA, H. R.; MAGELA VIEIRA, G.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p.1-10, 2007.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G; PETROVICK, P.R; BASSANI, V. L.. Desenvolvimento **Tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R..(Org.). **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Florianópolis:Editora da UFSC, 2007. p. 290-326

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. de O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p.2326-2331, 2011.

TROPICOS.GLOBAL Plants. Entry for *Spondias mombin* Linn. [family ANACARDIACEAE], 2013. Acesso em: 04 de outubro de 2013. disponível em: <http://plants.jstor.org/upwta/1_210?s=t>.

UCHENDU, C. N.; ISEK, T.. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**, v.8, p.163-167, 2008.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H; KIM, H.K.. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.53-56, 2005.

VIEIRA, L. M. ; SOUSA, M. S. B. ; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p.1-10, 2011.

VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.23, p. 127-49, 1988.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; VOELKER, F.A.Pathway of on onset, development, and decay of carrageenam Pleurisy in the rat. **Federation Proceedings**,v.41, p. 2588-2595,1982.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, 3th edition, Editor Springer, 2001.

WINTER, C.A.; RISLEY,E.A.;NUSS, G.W.. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v.111, p. 544-547, 1962.

XI, H.; AKISHITA, M.; NAGAI, K; YU, W.; HASEGAWA, H.; ETO, M.; KOZAKI, K.; TOBA, K.. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.191, p .281-289, 2007.

ZHANG,J.; WIDER, B.; SHANG, H.; LI, X.; ERNST, E. Quality of herbal medicines: Challenges and Solutions. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 20, p.100-106, 2012.

Zhou, J.L.; Qi, L.W.; Li, P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7582-7594, 2009.