

ANTONIO AVELAR XAVIER

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
ATIVIDADES CICATRIZANTE E ANTIBACTERIANA E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA
EXTRATOS DE *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (LOGANIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

X3p
2015

Xavier, Antônio Avelar, 1989-

Prospecção fitoquímica, avaliação *in vitro* de atividades cicatrizante e antibacteriana e desenvolvimento de método bioanalítico para extratos de *Strychnos pseudoquina* A. St. -Hil. (Loganiaceae) / Antônio Avelar Xavier. – Viçosa, MG, 2015. xiv, 104f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Inclui bibliografia.

1. *Strychnos pseudoquina*. 2. Fitoquímica. 3. Cicatrização. 4. Atividade antibacteriana. 5. Flavonóides. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 583.93

ANTONIO AVELAR XAVIER

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
ATIVIDADES CICATRIZANTE E ANTIBACTERIANA E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA
EXTRATOS DE *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (LOGANIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

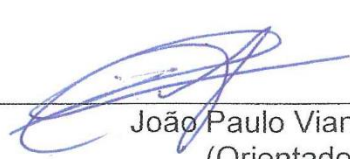
APROVADA: 25 de fevereiro de 2015.



Andréa de Oliveira Barros Ribon



Camilo Amaro de Carvalho



João Paulo Viana Leite
(Orientador)

***A Deus, porque nEle vivemos, nos movimentamos e existimos.
Aos meus pais, Maria Helena e Antonio Rodrigues,
pelos ensinamentos e amor.
Aos meus amigos, que me acompanharam nesta caminhada.***

***"When we are no longer able to change a situation,
we are challenged to change ourselves."***
Viktor Frankl, Man's Search for Meaning

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos que fomentam a pesquisa e o desenvolvimento da ciência brasileira. À CAPES, pelo fornecimento de bolsa, ao CNPq e à Fapemig pelo financiamento de projetos.

À egrégia Universidade Federal de Viçosa.

Ao meu orientador, Professor João Paulo Viana Leite, que me deu esta oportunidade.

Ao meu coorientador Leandro Licursi de Oliveira, pela transferência caudalosa de conhecimentos.

À botânica Andréia Fonseca Silva da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pelo acesso ao material vegetal e pelo preparo de exsicata e depósito em herbário.

Aos colaboradores do setor administrativo, técnico e gerencial do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro, Jean Rezende e Luciano Fietto.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFV pela colaboração para obtenção da autorização para acesso e remessa de amostras de componentes do patrimônio genético.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade, Letícia Farias e Alisson Andrade pelo companheirismo e cooperação.

Aos colaboradores do Laboratório de Imunovirologia Molecular, Prof. Leandro Licursi, discentes Natasha Maia e Isabella Bebert.

Aos colaboradores do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), Prof. Luciano Fietto, Profa. Andreia Ribon e discente Danielle Silva.

Aos colaboradores do Laboratório de Metabolismo e Fermentações (LMF), Prof. José Humberto, discentes Monica Magalhães e Marcos Vidal.

Aos colaboradores do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), Prof. Gustavo Bressan e discente Gabriela Alves.

Aos colaboradores do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Prof. Regina Mendonça e discente Sérgio Carvalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho,

meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2. REVISÃO DA LITERATURA	3
1.2.1. BIOPROSPECÇÃO FARMACÊUTICA.....	3
1.2.2. A FAMÍLIA Loganiaceae	5
1.2.3. <i>Strychnos</i> spp. NATIVAS DO BRASIL.....	5
1.2.3.1. FITOQUÍMICA DE <i>Strychnos</i> spp.	7
1.2.4. <i>Strychnos pseudoquina</i> A.St.-Hil.	12
1.2.5. RESGATE HISTÓRICO DA TRADICIONALIDADE DE USO DE <i>S.</i> <i>pseudoquina</i> NO BRASIL	15
1.3. OBJETIVO GERAL	17
1.4. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I – ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE EXTRATOS DE <i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.....	20
2.1. INTRODUÇÃO	20
2.2. OBJETIVOS.....	23
2.2.1. OBJETIVO GERAL	23
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	23
2.3.1. MATERIAL VEGETAL	23
2.3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	24
2.3.2.1. EXTRAÇÕES POR PERCOLAÇÃO (SERIADA E ETANÓLICA).....	24
2.3.2.2. EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES.....	25
2.3.3. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	26
2.3.3.1. SOLVENTES.....	26
2.3.3.2. REAGENTES REVELADORES E PADRÕES.....	27
2.3.4. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS EM HPLC.....	28

2.3.5.	QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DE EAEC, EEDC E EEBC	
		29

2.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.4.1.	RENDIMENTO DOS EXTRATOS	31
2.4.1.1.	EXTRAÇÃO POR PERCOLAÇÃO E EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES	31
2.4.2.	ANÁLISE QUALITATIVA DAS CLASSES DE COMPOSTOS PRESENTES EM CASCAS E FOLHAS DE <i>S. pseudoquina</i>	31
2.4.3.	FINGERPRINT DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>S. pseudoquina</i>	35
2.4.4.	FLAVONOIDES TOTAIS DE EAEC, EEDC E EEBC	40
2.5.	REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO II – ESTUDO BIOMONITORADO DAS ATIVIDADES PROLIFERATIVA PARA FIBROBLASTOS E ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE <i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.		44
3.1.	INTRODUÇÃO	44
3.2.	OBJETIVOS	50
3.2.1.	OBJETIVO GERAL	50
3.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3.3.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	51
3.3.1.	MATERIAL VEGETAL	51
3.3.2.	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	51
3.3.3.	SOLVENTES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS	51
3.3.4.	BIOMONITORAMENTO DAS FRAÇÕES	52
3.3.4.1.	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DO ESTÍMULO À PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS PELO EXTRATO DE <i>S. pseudoquina</i> ENRIQUECIDO EM FLAVONOIDES	52
3.3.4.2.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. pseudoquina</i> FRENTE AOS MICRORGANISMOS GRAM POSITIVOS E NEGATIVOS	54
3.3.4.3.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) EM <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. fluorescens</i>	54
3.3.4.4.	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO PELO MÉTODO <i>CHECKBOARD</i> ASSOCIADO À CONSTRUÇÃO DE ISOBOLOGRAMAS	59
3.3.5.	TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS	63
3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.4.1.	RENDIMENTO DOS EXTRATOS	63
3.4.2.	ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE FIBROBLASTOS	63
3.4.3.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	65

3.4.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE EAEC, EEDC, EEBC E EALC EM <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> E <i>P. fluorescens</i>	69
3.4.5.	SINERGISMO ENTRE O EAEC E AMPICILINA.....	72
3.5.	REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA O CONTROLES DE QUALIDADES QUÍMICO E BIOANALÍTICO EM AMOSTRAS DE <i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.		
4.1.	INTRODUÇÃO	82
4.1.1.	CONTROLES QUÍMICOS DA QUALIDADE.....	84
4.1.2.	CONTROLE BIOLÓGICO DA QUALIDADE	86
4.2.	OBJETIVOS	87
4.2.1.	OBJETIVO GERAL	87
4.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	87
4.3.	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	87
4.3.1.	MATERIAL VEGETAL	87
4.3.2.	EXTRAÇÃO DOS ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i> PARA CONTROLE POSITIVO.....	88
4.3.3.	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	88
4.3.4.	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DOS ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i>	88
4.3.5.	QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	89
4.3.6.	TESTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DOS ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i> DE JABOTICATUBAS E RIO VERDE	90
4.3.7.	TESTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DE ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i>	91
4.3.8.	TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS	91
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.4.1.	RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES	92
4.4.2.	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	92
4.4.3.	FLAVONOIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DOS ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i>	95
4.4.4.	CONTROLE BIOLÓGICO PARA OS ACESSOS DE <i>S. pseudoquina</i>	96
4.4.5.	CONTROLE BIOLÓGICO PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS.....	100
4.5.	REFERÊNCIAS	102
5.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das Loganiáceas no mundo (PROGRAMA REFLORA, 2014).	5
Figura 2: Alcaloides de <i>Strychnos</i> spp. nativas do Brasil.	10
Figura 3: <i>Strychnos pseudoquina</i> , região de Jaboticatubas (MG), com detalhe de sua floração	13
Figura 4: Dispersão geográfica de <i>Strychnos pseudoquina</i> na América do Sul (PROGRAMA REFLORA, 2014).	14
Figura 5: Estrichnobilavona (1) e quercetina-3-O-metil-éter (2).	15
Figura 6: Processos de extração utilizados para a percolação seriada (A) e percolação etanolólica (B) das folhas e cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	25
Figura 7: CCD do extrato alcaloídico das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> (EALC) e padrão P (quinina).	33
Figura 8: CCD do extrato alcaloídico das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	34
Figura 9: CCD do extrato alcaloídico das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> (EALC) e padrão P (quinina).	34
Figura 10: <i>Fingerprint</i> dos extratos das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	37
Figura 11: Varreduras dos picos obtidos no <i>fingerprint</i> das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> para os picos presentes no EAEC (extrato em acetato de etila das cascas).	38
Figura 12: <i>Fingerprint</i> dos extratos das folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	39
Figura 13: Varreduras dos picos obtidos no <i>fingerprint</i> das folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	40
Figura 14: Curva padrão de rotina para o teste espectrofotométrico de flavonoides totais.	40
Figura 15: Redução da resazurina (responsável pela coloração azul) a resorufina (responsável pela coloração rosa).	57
Figura 16: Diluições adotadas para o antibiótico (esquerda) e os extratos (direita) testados na avaliação do sinergismo por meio da metodologia <i>checkboxboard</i> (x= concentração de interesse).	60
Figura 17: Esquema de diluições das amostras nos poços após as diluições seriadas de ampicilina e EAEC para o método <i>checkboxboard</i> . Concentrações de ampicilina em azul e do extrato em laranja (x= concentração de interesse).	61
Figura 18: Absorbância versus concentração dos estímulos utilizados no teste de proliferação de fibroblastos. Nota: * indica os estímulos estatisticamente relevantes para p<0,05 em comparação com o controle de soro fetal bovino (SFB) a 10%. EAEC - extrato em acetato de etila das cascas, EEDC - extrato etanólico desengordurado das cascas, EEBC - extrato etanólico bruto das cascas, SPEA1/2 – quercetina-3-O-metil-éter e estrichnobilavona.	64
Figura 19: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de cascas e folhas de <i>Strychnos</i> <i>pseudoquina</i> frente às bactérias <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (1) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 (2). Nota: EHC (extrato hexânico das cascas), EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EAQC (extrato aquoso das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas), EHF (extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folhas), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBF (extrato etanólico bruto das folhas), EAQF (extrato aquoso das folhas), EALF (extrato alcaloídico das folhas), SPEA 1 (quercetina-3-O- metil éter), SPEA 2 (estrichnobilavona), DMSO (dimetilsulfóxido), AMP (ampicilina).	66
Figura 20: Controle de toxicidade do DMSO e concentração inibitória mínima para os extratos de <i>Strychnos pseudoquina</i> frente à <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525.	71
Figura 21: Controle de toxicidade do DMSO e concentração inibitória mínima para os extratos de <i>Strychnos pseudoquina</i> frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.	71
Figura 22: Gráfico de correlação de Pearson entre os teores de flavonoides presentes nos extratos das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> e as atividades antibacterianas observadas frente a <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525.	72

Figura 23: Avaliação da interação entre o extrato em acetato de etila das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> (EAEC) e ampicilina para <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525.	73
Figura 24: Gráfico de prevalência da resazurina nos poços em que houve inibição da multiplicação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 para diferentes concentrações de EAEC.....	74
Figura 25: Isoblograma demonstrando o ponto de sinergismo entre EAEC e ampicilina (500 µg/mL e 3,673 µg/mL, respectivamente).	74
Figura 26: Avaliação da interação entre o extrato em acetato de etila das cascas de <i>Strychnos pseudoquina</i> (EAEC) e ampicilina para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	75
Figura 27: Gráfico de prevalência da resazurina nos poços em que houve inibição da multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 para diferentes concentrações de EAEC.	75
Figura 28: Isoblograma da interação entre EAEC e ampicilina frente a <i>S. aureus</i> demonstrando sinergismo.....	76
Figura 29: 5'-metoxihidnocarpina e berberina.....	77
Figura 30: Prospecção de triterpenos das amostras comerciais e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	93
Figura 31: Prospecção de alcaloides das amostras comerciais e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	93
Figura 32: Prospecção de flavonoides das amostras comerciais e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	94
Figura 33: Prospecção de fenólicos das amostras comerciais e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	94
Figura 34: Curva padrão expressa em rutina, para o teste de flavonoides totais.	95
Figura 35: Inibição de <i>Pseudomonas fluorescens</i> pelos extratos em acetato de etila e etanólicos brutos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	97
Figura 36: Correlação de Pearson para os extratos de acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i> das regiões de Rio verde (MG) e Jaboticatubas (MG).	100
Figura 37: Inibição de <i>P. fluorescens</i> frente às amostras comerciais (A1, A2 e A3) e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i> (SPM e SPJ).....	101
Figura 38: Correlação de Pearson entre as concentrações de flavonoides totais e o efeito inibitório causado pelos extratos de amostras comerciais (A1, A2 e A3) e acessos (SPM e SPJ) de <i>Strychnos pseudoquina</i> contra <i>P. fluorescens</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Strychnos</i> spp. brasileiras presentes no trabalho de Quentin-Leclercq et al., 1990, com seus relatos de uso etnobotânico.	6
Tabela 2: Alcaloides isolados de <i>Strychnos</i> spp. nativas do Brasil.	11
Tabela 3: Relatos de uso popular de <i>Strychnos pseudoquina</i>	16
Tabela 4: Estudos biológicos e farmacológicos realizados com extratos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	16
Tabela 5: Classes de metabólitos secundários investigadas nos extratos das cascas e folhas de <i>Strychno. pseudoquina</i>	26
Tabela 6: Rendimentos dos extratos de <i>Strychnos pseudoquina</i> obtidos por diferentes métodos.	31
Tabela 7: Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos das cascas e folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	33
Tabela 8: Concentração de flavonoides totais expressa em rutina, para EAEC, EEDC e EEBC.	41
Tabela 9: Microrganismos utilizados para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos das cascas e folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	54
Tabela 10: Resultados dos testes de presença de halos de inibição (mm) dos diferentes extratos de <i>Strychnos pseudoquina</i> frente às cepas bacterianas testadas.	68
Tabela 11: Rendimentos dos extratos do acesso de <i>Strychnos pseudoquina</i> da região de Rio Verde.	92
Tabela 12: Rendimentos dos extratos do acesso de <i>Strychnos pseudoquina</i> da região de Rio Verde.	92
Tabela 13: Resultados da prospecção fitoquímica.	95
Tabela 14: Concentrações de flavonoides totais para as amostras comerciais e acessos de <i>Strychnos pseudoquina</i>	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrofotometria de absorção atômica
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
AMP	Ampicilina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DV	Droga vegetal
EALC	Extrato alcaloídico das cascas
EALF	Extrato alcaloídico das folhas
EAEC	Extrato em acetato de etila das cascas
EAEF	Extrato em acetato de etila das folhas
EAQC	Extrato aquoso das cascas
EAQF	Extrato aquoso das folhas
EEBC	Extrato etanólico bruto das cascas
EEBF	Extrato etanólico bruto das folhas
EEDC	Extrato etanólico desengordurado das cascas
EEDF	Extrato etanólico desengordurado das folhas
EHC	Extrato hexânico das cascas

EHF	Extrato hexânico das folhas
EtOH	Etanol
F.M.	Fase móvel
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
H ₂ CO ₂	Ácido fórmico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-PDA	Cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector ultravioleta por arranjo de diodos
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MeOH	Metanol
MIC	Concentração inibitória mínima
min.	Minutos
NP/PEG	2-aminoetil-difenil-borinato/polietilenoglicol 4.000
PN	Produtos naturais
R.P.M	Rotação por minuto
SPEA 1	Quercetina-3-O-metil éter
SPEA 2	Estrichnobiflavona
TR	Tempo de retenção
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV	Ultravioleta

RESUMO

XAVIER, Antonio Avelar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Prospecção fitoquímica, avaliação *in vitro* de atividades cicatrizante e antibacteriana e desenvolvimento de método bioanalítico para extratos de *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae).** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Nativa do Brasil, a espécie *Strychnos pseudoquina*, conhecida popularmente como quina do campo ou quina cruzeiro, tem sido utilizada na medicina tradicional brasileira como antimalárica, febrífuga, digestiva e cicatrizante. O presente trabalho teve como objetivo esclarecer a composição química dos extratos das cascas e folhas de *S. pseudoquina* A.St.-Hil., utilizando técnicas de prospecção fitoquímica (CCD e HPLC-PDA), biomonitorar sua capacidade estimulatória de fibroblastos (*in vitro*), sua atividade antibacteriana e a interação da associação entre o extrato em acetato de etila (EAEC) e a ampicilina contra *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. O extrato seco ativo EAEC apresentou 181,58 mg/g de flavonóides totais, sendo constituído majoritariamente pelos flavonóides estrichnobiflavona e quercetina-3-O-metil-éter. Foram verificadas atividades proliferativas superiores ao controle positivo (10% Soro Fetal Bovino) para o EAEC (500, 250, 125 e 62,5 mg/mL) e para a quercetina-3-O-metil-éter (10 e 5 mg/mL) no teste de proliferação de fibroblastos. Não foram detectadas atividades proliferativas para os extratos das folhas. A atividade antibacteriana dos extratos das cascas e folhas também demonstrou que o fitocomplexo (flavonoides) encontra-se nas cascas. As bactérias sensíveis (*S. aureus* e *P. fluorescens*) foram testadas quanto a concentração inibitória mínima (MIC) (1000 µg/mL do EAEC para ambas) e a utilização simultânea deste extrato com a ampicilina demonstrou ação sinérgica para as duas bactérias (EAEC, 500 µg/mL + ampicilina a 3,6 µg/mL para *P. fluorescens* e EAEC 125 µg/mL + ampicilina a 7,2 µg/mL para *S. aureus*). Devido à sensibilidade da bactéria *P. fluorescens* ao fitocomplexo, foi estabelecida uma metodologia de controle biológico para os extratos das cascas de *S. pseudoquina*.

ABSTRACT

XAVIER, Antonio Avelar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Phytochemical prospection *in vitro* fibroblast proliferation and antimicrobial evaluation and development of a biological control method for *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil. (Loganiaceae) extracts.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-adviser: Leandro Licursi de Oliveira.

Brazilian native, *Strychnus pseudoquina*, popularly known as quina do campo, quina cruzeiro or quina do sertão, has been used in folk medicine as antimalarial, febrifuge, gastric diseases and wound healing. The present work aimed to clarify the chemical composition and the biological activity of the bark and leaf extracts using a phytochemical prospection (CCD and HPLC-PDA) and a bioguided assay for fibroblast proliferation (*in vitro*), antibacterial effect and the interaction between the flavonoid enriched fraction (EAEC) and ampicilina against *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. The dried active extrat EAEC showed 181,58 mg/g of total flavonoids, being majoritly constituted of the flavonoids strychnobiflavone and quercetin-3-O-methyl ether. The *in vitro* fibroblast proliferation test showed stimulant capacity below the positive control (10% Fetal Bovine Serum) for the EAEC extract (500, 250, 125 and 62,5 mg/mL) and the isolated compound quercetin-3-O-methileter (10 and 5 mg/mL). The antibacterial screening of the bark and leaf extracts also showed that the phytocomplex (flavonoids) are present only in the bark (EAEC, EEDC and EEBC). The minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained for sensible bacteria (*S. aureus* and *P. fluorescens*) (1000 µg/mL for both) and the interaction (EAEC and ampicilin) was also observed for both bacteria (EAEC, 500 µg/mL + ampicilin, 3,6 µg/mL for *P. fluorescens* and EAEC 125 µg/mL + ampicilin, 7,2 µg/mL for *S. aureus*). Due to the special sensibility of *P. fluorescens* to the phytocomplex, a biological control technique was established to the *S. pseudoquina* bark extracts.

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A sobrevivência dos seres vivos reside, principalmente, na habilidade de transformar e interconverter uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, utilizando-os, ora como fonte de energia, ora como unidades construtoras de grandes moléculas (DEWICK, 2002).

Apesar de possuírem características extremamente variadas, os organismos vivos possuem caminhos sintéticos muito semelhantes para modificação ou síntese dos chamados metabólitos primários (carboidratos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos), que normalmente são as moléculas mais abundantes nos seres vivos.

Em adição às rotas metabólicas primárias, existem caminhos reacionais específicos que originam compostos igualmente necessários para a sobrevivência dos seres. Os compostos provenientes destas rotas específicas não se apresentam de forma tão disseminada entre os organismos, sendo denominados metabólitos secundários (DEWICK, 2002).

A finalidade dos metabólitos secundários passou por diferentes avaliações desde que estes foram descobertos, sendo considerados desde produtos de mutações inertes, traços de uma evolução em processo, resíduos ou até mesmo produtos de detoxificação que, em algum ponto específico da vida, exerceriam alguma atividade importante no organismo (WILLIAMS et al., 1989). Estas hipóteses foram refutadas com o avanço do conhecimento científico na área. Mutações neutras, cujos efeitos não influenciam na aptidão dos seres vivos podem ocorrer e, de fato, persistir por gerações em uma população, porém não consistem em formas eficientes de adaptação dos organismos à vida, que é como realmente agem os metabólitos secundários (WILLIAMS et al., 1989).

Os metabólitos secundários, também denominados produtos naturais, são biossintetizados por meio de um vasto arsenal enzimático e, em razão disso, sua produção é finamente regulada. Torna-se incongruente sugerir, portanto, que um sistema tão ordenado e complexo seja fruto de uma série de mutações aleatórias. Esta alta carga de informações genéticas associada aos metabólitos secundários é que suporta a hipótese adaptativa da função destes produtos do metabolismo nos seres vivos (WILLIAMS et al., 1989).

Atuando no sentido de favorecer a adaptação das espécies, estes produtos naturais também podem ser utilizados para favorecer a saúde humana. Até onde há registros históricos, os metabólitos secundários presentes em extratos desempenharam importante papel na cura e prevenção de doenças. Provenientes das mais diversas fontes (bactérias, fungos, animais, vegetais ou organismos marinhos), estes produtos naturais continuam sendo valiosos para as ciências médicas. Adiciona-se a estas características a capacidade de agir como protótipos para a síntese orgânica e de fornecer ferramentas bioquímicas para a compreensão de processos celulares (DEWICK, 2002).

A importância das plantas para o isolamento de produtos naturais bioativos pode ser exemplificada facilmente. A quantidade de compostos provenientes de vegetais que integram o arsenal terapêutico que possuímos hoje é vasta, tanto para moléculas isoladas e utilizadas em sua forma natural, quanto para aquelas obtidas por hemisíntese. Os alcalóides da vinca (*Catharantus roseus*), por exemplo, são antineoplásicos de grande importância medicinal. Os glicosídeos digoxina e digitoxina, metabólitos secundários da planta *Digitalis lanata*, são amplamente utilizados para o tratamento de insuficiência cardíaca (IKAN, 2008).

Neste trabalho, os metabólitos secundários da espécie vegetal *Strychnos pseudoquina* foram prospectados e testados quanto a sua atividade biológica. Os testes biológicos realizados foram utilizados para a elaboração de uma técnica bioanalítica de controle de qualidade do extrato. Esta nova alternativa para o controle de qualidade de espécies vegetais brasileiras, reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por sua Resolução 26/2014, foi confrontada com uma técnica físico-química espectrofotométrica para quantificação de flavonóides totais, com o intuito de verificar a correlação entre ambos os métodos.

No Capítulo I, foi realizada uma investigação dos constituintes químicos de extratos das cascas e das folhas de *S. pseudoquina*. Foram avaliadas a presença de classes de compostos do metabolismo secundário por meio da técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) e a impressão digital (*fingerprint*) destes extratos em HPLC-PDA. A varredura dos picos obtidos nos

cromatogramas foi utilizada para identificar os metabólitos presentes nos extratos.

A fim de avaliar as propriedades farmacológicas desta espécie, os extratos orgânicos e o extrato alcaloídico das cascas e folhas de *S. pseudoquina* foram submetidos a um estudo biomonitorado de atividade proliferativa de fibroblastos e atividade inibitória em bactérias de interesse médico/veterinário (Capítulo II). O extrato enriquecido em flavonoides proveniente das cascas de *S. pseudoquina* (extrato em acetato de etila – EAEC) foi investigado quanto a atividade proliferativa de fibroblastos e a concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos obtidos por percolação foram determinados em bactérias. Para as linhagens bacterianas sensíveis aos extratos, foi avaliada a interação inibitória com uma ampicilina de segunda geração (ampicilina).

Por fim, no Capítulo III, os resultados dos testes biológicos obtidos no Capítulo II deram suporte à elaboração de um controle biológico para a droga vegetal de *S. pseudoquina*. Foram comparados diferentes acessos desta espécie e amostras comerciais de forma a verificar a correlação entre as técnicas analíticas de controles químicos e biológico de qualidade. A mensuração da atividade do fitocomplexo desta espécie empregando técnica bioanalítica *in vitro* pode tornar-se um método eficiente para controle de qualidade de futuros fitoterápicos contemplando esta espécie.

Espera-se contribuir para a investigação do potencial medicinal da espécie *S. pseudoquina* quanto ao seu uso cicatrizante que já vem sendo empregado, por longa data, na medicina popular brasileira.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. BIOPROSPECÇÃO FARMACÊUTICA

A bioprospecção pode ser definida como a exploração da biodiversidade em busca de novos produtos naturais de valor econômico e social (BEATTIE et al., 2011). Esta prática ainda encontra espaço mesmo diante dos avanços tecnológicos alcançados pela química moderna. Um dos fatores que justifica a bioprospecção farmacêutica encontra-se na diversidade química estrutural dos

produtos naturais que, se considerada estatisticamente, mostra-se muito superior àquela gerada pela química sintética (FEHER e SCHMIDT, 2003).

Os produtos naturais provenientes de espécies vegetais constituem uma fonte promissora para a descoberta de fármacos, sobretudo em países detentores de uma megabiodiversidade vegetal. O Brasil experimenta uma realidade singular, pois associada à riqueza natural de seu território está a valiosa sociodiversidade com grande conhecimento tradicional associado a biodiversidade, que fez da cura de doenças por espécies vegetais uma prática amplamente difundida.

Cordell (2011) chama a atenção para o fato de que a medicina popular e a pesquisa etnofarmacológica estão intrinsecamente conectadas, permitindo que a adoção de técnicas médicas baseadas neste conhecimento fossem recomendadas pela ONU (Organização das Nações Unidas) por meio da Estratégia de Medicina Tradicional - 2014-2023 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A investigação farmacológica das propriedades medicinais de espécies vegetais tradicionalmente utilizadas na cura de doenças é uma abordagem promissora, visto que, segundo Cragg e Newman (2013), analisando-se os fármacos presentes no mercado farmacêutico dos Estados Unidos no ano de 2013, apenas 36% das principais drogas utilizadas tinham sua origem exclusivamente sintética. Os demais fármacos possuíam alguma relação com os produtos naturais (PN): 14% eram compostos sintéticos apresentando inibição competitiva ao substrato de PN, 5% tratavam-se de compostos sintéticos com grupo farmacofórico de PN, 6% eram PN não modificados e 28% PN modificados.

Soma-se a isso o fato de que os PN provenientes de plantas ainda se encontram subinvestigados. Estimam-se que 6% de aproximadamente 300.000 espécies vegetais de plantas superiores tenham sido sistematicamente investigadas farmacologicamente e apenas 15% fitoquimicamente (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Harvey et al (2015) relatam que aproximadamente 15% das intervenções medicamentosas encontradas na plataforma ClinicalTrials.gov (base de dados de registro e resultados de estudos clínicos em humanos conduzidos em vários

países) estão relacionados com fármacos derivados de plantas pertencentes a apenas 10 famílias taxonômicas diferentes.

Pode-se concluir, portanto, que ainda existe uma grande quantidade de produtos naturais derivados de plantas desconhecidos pelos pesquisadores. Até mesmo as plantas relatadas em estudos etnobotânicos ainda constituem um nicho a ser explorado pela bioprospecção farmacêutica.

1.2.2. A FAMÍLIA Loganiaceae

A família Loganiaceae é composta por 13 gêneros e cerca de 350 espécies (ODUOYE et al., 2013). Distribuídas ao longo de diversas formações naturais brasileiras e ao longo de toda faixa tropical e subtropical mundial (Figura 1) (PROGRAMA REFLORA, 2014).

O fato de possuírem folhas opostas, estípulas interpeciolares, corola gamopétala e actinomorfa faz com que, muito frequentemente, as espécies de Loganiaceae sejam confundidas com as de Rubiaceae. Essas famílias podem ser prontamente distinguidas pela posição do ovário, que é súpero nas Loganiaceae e ínfero nas Rubiaceae (SOUZA, V. C.; LORENZI, 2005).



Figura 1: Distribuição das Loganiáceas no mundo (PROGRAMA REFLORA, 2014).

1.2.3. *Strychnos* spp. NATIVAS DO BRASIL

Ao todo, são 71 as espécies de *Strychnos* nativas do Brasil (ZAPPI, 2014). Aquelas que possuem dados etnobotânicos disponíveis na literatura (27) foram reunidas na Tabela 1, para uma melhor compreensão do potencial medicinal deste gênero. Todas as 27 espécies nativas do Brasil presentes

nesta análise (Tabela 1), tiveram suas informações retiradas do trabalho de Quentin-Leclercq et al (1990), artigo mais abrangente envolvendo o gênero *Strychnos*, que reúne 53 espécies encontradas em todo o continente sulamericano.

Para 45% das 71 espécies brasileiras de plantas do gênero *Strychnus* não foram encontrados dados de estudos no campo etnobotânico ou etnofarmacológico na literatura científica.

Tabela 1: *Strychnos* spp. brasileiras presentes no trabalho de Quentin-Leclercq et al., 1990, com seus relatos de uso etnobotânico.

Espécie	Bioma	Uso	Modo de preparo	Parte utilizada
<i>S. acuta</i> Progel	Mata Atlântica	Tônico	-	-
<i>S. brachiata</i> Ruiz & Pav	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. brasiliensis</i> Mart.	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica	Dor de estômago, Tônico, febrífugo	-	-
<i>S. bredemeyeri</i> (R.E.Schult.) Sprague & Sandwith	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. castelnaeana</i> Willd.	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. cogens</i> Benth.	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. darienensis</i> Seem.	Amazônia, Cerrado	Curare*	-	-
<i>S. erichsonii</i> Rich. ex R.H.Schomb.	Amazônia, Cerrado	Curare, veneno para peixes, afrodisíaco	-	-
<i>S. gardneri</i> A.DC.	Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica	Febrífugo	-	-
<i>S. glabra</i> Sagot ex Progel	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. guianensis</i> (Aubl.) Mart.	Amazônia, Mata Atlântica	Curare, anemia, debilidades gerais	Infusão oral ou usada externamente em banhos	Broto
<i>S. javariensis</i> Krukoff	Amazônia	Curare*, dor de dente	Mastigação	Casca
<i>S. jobertiana</i> Barlow	Amazônia	Curare*, perfume	Esmagadas e estocadas em rum (perfume)	Folhas
<i>S. melinoniana</i> Baill.	Amazônia	Curare*, afrodisíaco	-	-
<i>S. mitscherlichii</i> M.R.Schomb. var. <i>Mitscherlichii</i>	Amazônia, Mata Atlântica	Curare*, afrodisíaco	-	-
<i>S. mitscherlichii</i> var. <i>pubescentior</i> Sandwith	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. oiapocensis</i> Fróes	Amazônia	Afrodisíaco	Decocção	-
<i>S. panurensis</i> Sprague & Sandwith	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. peckii</i> B.L.Rob.	Amazônia, Cerrado	Curare*	-	-
<i>S. pseudoquina</i> A.St.-Hil.	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica	Antipirética, antimalárica, febre intermitente, hepatite	-	-
<i>S. rondeletoides</i> Spruce ex Benth	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. sandwithiana</i> Krukoff & Barneby	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. solerederi</i> Gilg	Amazônia	Curare*	-	-
<i>S. solimoesana</i> Krukoff	Amazônia, Mata Atlântica	Curare*	-	-

<i>S. tomentosa</i> Benth.	Amazônia, Mata Atlântica	Curare*	Extrato alcoólico	-
<i>S. toxifera</i> R.H.Schomb. ex Benth.	Amazônia	Curare, úlcera de contato (externamente), desordens convulsivas e espasmódicas (uso interno)	-	-
<i>S. trinervis</i> (Vell.) Mart.	Cerrado, Mata Atlântica	Febrífuga, tônico estomacal, substituto da quina		Casca

*Curare: assinalado para as espécies cujo uso relatado estava relacionado com o preparado de ervas utilizado na caça ou pesca, destinado a envenenar e paralisar as presas.

1.2.3.1. FITOQUÍMICA DE *Strychnos* spp.

Para o gênero *Strychnos* existem muitos registros científicos que mencionam a presença de alcaloides em diferentes partes da planta (BATTISTA et al., 1980, MARINI-BETTOLO et al., 1980, GALEFFI, MARINI-BETTOLO, 1981, NICOLETTI et al., 1984, FORGACS et al., 1986, KAPOOR et al., 1988, ANGENOT et al., 1990, QUENTIN-LECLERCQ et al., 1995, MAVAR-MANGA et al., 1996, OLIVEIRA et al., 1996, MUKHERJEE et al., 1997, PENELLE et al., 1999, SILVA et al., 1999, e PENELLE et al., 2001) (Figura 2). Os nomes das estruturas dos alcaloides isolados para as *Strychnos* spp. brasileiras presentes na Figura 2 encontram-se na Tabela 2.

Os alcaloides diabolina e 11-metoxidiabolina já foram isolados das cascas de *S. pseudoquina*. Estes alcaloides também estão presentes em outras espécies desse gênero e apresentam efeito hipotensor. Sugere-se que esse efeito seja relacionado à ação depressora do miocárdio (KAPOOR et al., 1988).

A verificação da atividade antiúlcera da fração alcaloídica de *S. pseudoquina* revelou que o extrato alcaloídico promoveu estímulo de fatores de proliferação celular e angiogênese. Além disso, esta fração apresentou um MIC de 75 µg/mL frente a *Helicobacter pylori* (*in vitro*). A eficácia da fração alcaloídica se deu livre de observações de possíveis efeitos tóxicos nos ratos utilizados no estudo, durante os 14 dias de experimento deste trabalho (BONAMIN et al., 2011).

Quanto à toxicidade dos alcaloides de *S. pseudoquina*, os relatos de Saint-Hilaire à respeito desta espécie vegetal nos trazem informações importantes:

-“Segalas, médico e hábil experimentador, constatou também que o ‘princípio amargo de *S. pseudoquina*, quando injetado nas veias dos animais, produz efeitos diferentes daqueles determinados pela estricnina. Ele constatou também, por experiências, que esse mesmo princípio amargo tem uma atividade muito mais fraca que o extrato alcólico da noz-vômica, e sobretudo que a brucina e a estricnina, e embora se torne venenoso ingerido em certa quantidade, como muitas outras substâncias utilizadas na medicina, ele pode ser administrado sem o menor temor nas doses em que é empregado habitualmente, e mesmo em doses mais fortes”(DATAPLAMT, 2015).

Os alcaloides constituem, portanto, os metabólitos secundários mais explorados para as *Strychnos* spp. brasileiras, sendo que a *S. pseudoquina* parece não manifestar a mesma toxicidade para esta classe de moléculas, como acontece para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Em contrapartida, esta espécie vegetal tem demonstrado que o principal fitocomplexo de seus extratos pode pertencer à classe dos flavonoides (LAGE et al., 2013). O presente trabalho tem o intuito de colaborar para investigação destas hipóteses.

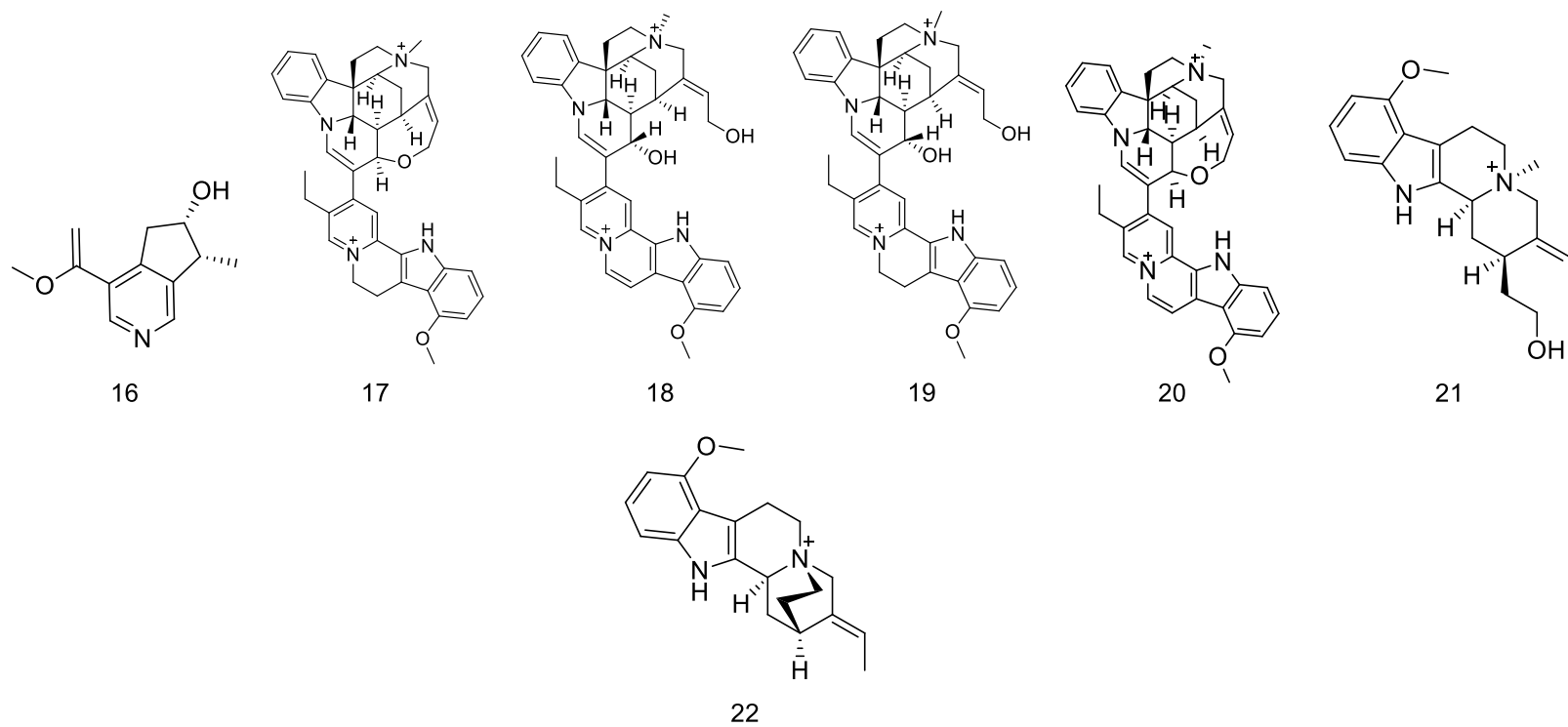


Figura 2: Alcaloides de *Strychnos* spp. nativas do Brasil.

Tabela 2: Alcaloides isolados de *Strychnos* spp. nativas do Brasil.

Número	Nome	R ₁	R ₂	R ₃	Referências
1	11-metoxidiabolina	Ac	OMe	OH	Marini-Bettolo et al (1980) e Kapoor et al (1988)
	W. G. aldeído	H	H	OH	Marini-Bettolo et al (1980)
	Isocondensamina	Ac	OMe	OAc(α)	
	Henningsamina	Ac	H	OAc(β)	
	Diabolina	Ac	H	OH	Marini-Bettolo et al (1980) e Kapoor et al (1988)
2	Estrichnorubigina	OMe	H	H	Marini-Bettolo et al (1980)
	O-Acetilestrichnorubigina	OMe	H	Ac	
	Isositziriquina	H	H	H	
	Hervina	H	OMe	H	
	Geissosquizina	H	H	H	
3	Normacusina B	H			Oliveira et al (1996), Marini-Bettolo et al (1980) e Mukherjee et al (1997)
	O-Acetilnormacusina B	Ac			Battista et al (1980)
4	Estrichnohirsutina	H	H		
	((3R,4S,4aS,5aS,13aS)-6-acetil-3-metil-1,3,4,4a,5,5a,6,7,8,13a-decahidroindolo[3,2,1-ij]pirano[3,4-b][1,5]naftiridin-4-yl)metil acetato	Ac	Ac		
5	((3R,4S,4aS,13aS)-3-metil-1,3,4,4a,5,13a-hexahidroindol[3,2,1-ij]pirano[3,4-b][1,5]naphthyridin-4-yl)metanol	H			Galeffi, Marini-Betollo (1981)
	((3R,4S,4aS,13aS)-3-metil-1,3,4,4a,5,13a-hexahidroindol [3,2,1-ij]pirano[3,4-b][1,5]naftiridin-4-yl)metil acetato	Ac			
6	Alstonidina				Forgacs et al (1986)
7	Talbotina				
8	Erichsonina				
9	16-epiafinina				
10	Mattogrossina	Ac			Angenot et al (1990)
	Desacetilmattogrossina	H			
11	Estrichnobrasilina	H	H		
	12-hidroxi-11-metoxiestrichnobrasilina	OMe	OH		
12	Guianensina				(Quentin-Leclercq et al (1995)
13	9-Metoxigeissoschizol				Mavar-Manga et al (1996)
14	Bisnordihidrotoxiferina				Mukherjee et al (1997)
15	Longicaudatina				
16	Canteliina				Silva et al (1999)
17	Guiaflavina				Penelle et al (1999) e Penelle et al (2001)
18	5',6'-Dihidroguiacrisina				Penelle et al (2001)
19	Guiacrisina				
20	5',6'-Dihidroguiaflavina				
22	9-metoxi-N _b -metilgeissoschizol				

1.2.4. *Strychnos pseudoquina* A.St.-Hil.

Esta espécie, nativa do Brasil, pode ser encontrada, principalmente, no bioma Cerrado, que é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando aproximadamente 25% do território nacional (IBGE, 2004).

O Cerrado concentra altos níveis de biodiversidade e sofre ameaças devido à expansão da agropecuária, sendo considerado um *hotspot*. Este termo foi introduzido no meio científico pelo ecólogo conservacionista britânico Norman Myers, em 1988, para caracterizar áreas que abrigam uma grande diversidade biológica além de alto endemismo de espécies, mas, em contrapartida, são também as regiões mais devastadas do planeta. O fator endemismo é sumariamente importante se considerar que as espécies restritas a uma determinada área estão mais vulneráveis a extinção que outras (MITTERMEIER et al., 1999).

A espécie *S. pseudoquina*, nativa do cerrado e, portanto, ameaçada juntamente com o bioma a que pertence, possui copa longa e densa, tronco grosso, tortuoso e casca espessa. As folhas são simples, opostas, coriáceas, que apresentam pilosidade em ambas as faces e cinco nervuras bem marcadas na face superior. As flores são pequenas, brancas, perfumadas, dispostas em cimeiras terminais. Os frutos são carnosos do tipo drupa, redondos, alaranjados e comestíveis. A época de floração vai de janeiro a abril e a de frutificação de abril a junho (MARONI et al., 2006).

Estima-se que uma entre cada três espécies de plantas deste bioma seja utilizada de alguma forma pelo homem (IBGE, 2004) e *S. pseudoquina* certamente encontra-se entre elas.

O principal responsável pela catalogação de achados etnobotânicos para *S. pseudoquina* foi o naturalista August de Saint-Hilaire, no início do século XIX, em suas expedições pelo sertão de Minas Gerais. Ele chegou a constatar, em 1828, que:

-“de todas as plantas medicinais do Brasil, *Strychnos pseudoquina*, ou Quina do campo talvez seja a de uso mais divulgado e cujas propriedades são melhor constatadas” (DATAPLAMT, 2015).

S. pseudoquina (Figura 3) é conhecida popularmente como pseudoquina, quina-de-medanha, quina-do-campo, quina-do-cerrado e quina-do-sertão é uma Angiosperma pertencente à família das Loganiáceas (CONSENZA et al., 2013). Saint-Hilaire relata que, com exceção da baga (fruto), que tem sabor adocicado, todas as demais partes do vegetal tem sabor amargo e adstringente, sendo estas propriedades concentradas nas cascas, que são a droga vegetal utilizada na medicina tradicional (DATAPLAMT, 2015).



Figura 3: *Strychnos pseudoquina*, região de Jaboticatubas (MG), com detalhe de sua floração

A *S. pseudoquina* não é endêmica do Brasil, sendo também encontrada na Bolívia e Paraguai. Conforme ilustra a Figura 4, *S. pseudoquina* distribui-se geograficamente pelas regiões nordeste (Maranhão), centro-oeste (Goiás, Mato Grosso), sudeste (Minas gerais, São Paulo), abrangendo os biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (PROGRAMA REFLORA, 2014).

Diferentemente de diversas espécies deste gênero, *S. pseudoquina* não possui relatos de utilização na composição do curare em tribos indígenas, porém esta espécie acabou sendo utilizada em substituição à *Cinchona officinalis*.

Saint-Hilaire descreve que *S. pseudoquina* era utilizada para todos os males em que se empregava a casca de *Cinchona officinalis* (quinina), principalmente para febre. As cascas eram utilizadas na forma de infusão ou pó (cerca de 1 a 3 g de pó das cascas). Saint-Hilaire acrescenta ainda que esta espécie vegetal poderia ser exportada comercialmente para a Europa, tornando-se uma substituta menos onerosa da *Cinchona officinalis* (quina do Peru) (DATAPLAMT, 2015).

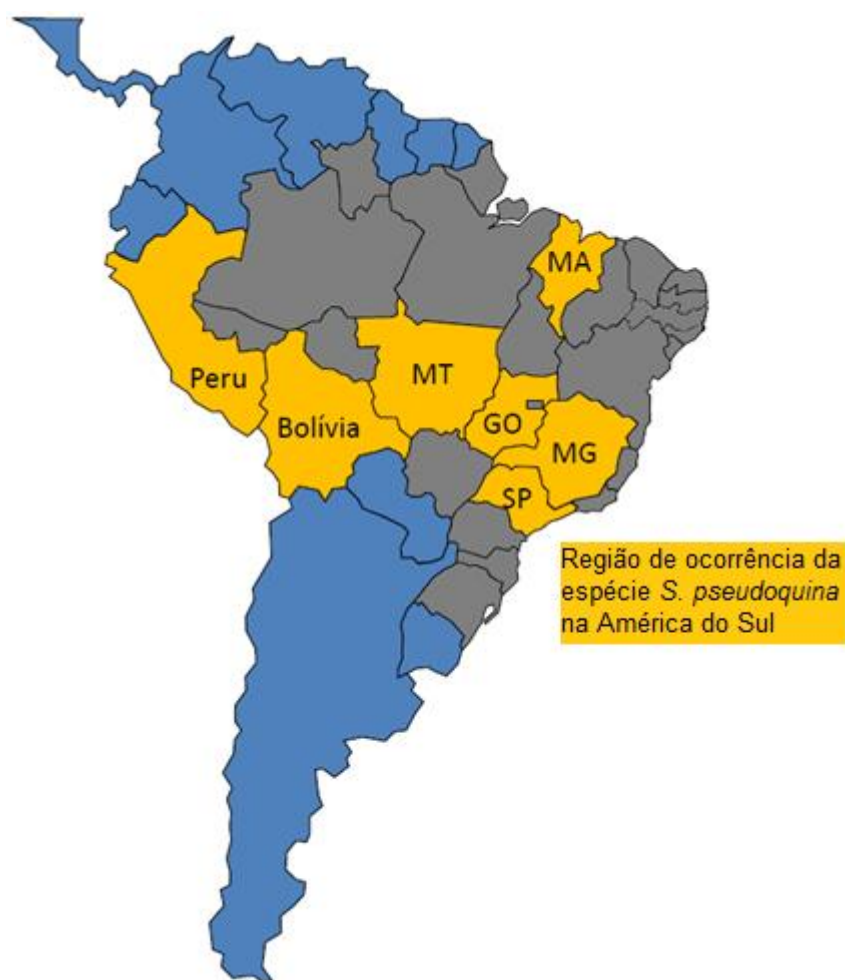


Figura 4: Dispersão geográfica de *Strychnos pseudoquina* na América do Sul (PROGRAMA REFLORA, 2014).

Lage et al (2013) verificou a presença de atividade inibitória dos extratos e de dois compostos purificados de *S. pseudoquina* contra *Leishmania amazonensis* em um ensaio biomonitorado *in vitro*. Os compostos purificados neste trabalho foram a estrichnobiflavona e a quercetina-3-O-metil éter (Figura 5).

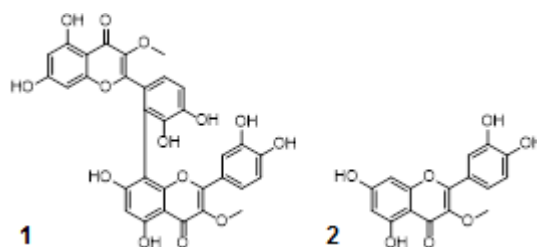


Figura 5: Estrichnobiflavona (1) e quercetina-3-O-metil-éter (2).

1.2.5. RESGATE HISTÓRICO DA TRADICIONALIDADE DE USO DE *S. pseudoquina* NO BRASIL

A RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 (BRASIL, RDC nº 26 de 13.05.14) passou a permitir o registro de fitoterápicos baseado em seu uso tradicional. Segundo esta RDC, o uso tradicional pode ser definido como: aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação técnicocientífica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário.

A caracterização tanto macro, quanto microscópica da casca desta espécie consta na 1ª Edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 4 de novembro de 1926, demonstrando a importância medicinal desta espécie para a época (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1ª Ed., 1926). Contudo, sua monografia foi excluída das edições seguintes, assim como diversas outras plantas medicinais brasileiras.

Apesar de extremamente difundida em meio à população sertaneja de Minas Gerais devido a sua grande utilização etnobotânica desde o século XIX (Tabela 3), suas investigações farmacológicas só foram iniciadas recentemente (Tabela 4).

Em estudo realizado entre 1983 e 1988, foram reunidas entrevistas de pessoas e raizeiros que faziam uso e comércio de plantas medicinais em Minas Gerais, a fim de preservar o conhecimento popular. Para a única espécie da família Loganiaceae presente neste estudo, foi relatada a utilização das cascas de *S. pseudoquina* sob a forma de pó, como cicatrizante e, na cachaça, para o fígado (GRANDI et al., 1989).

Tabela 3: Relatos de uso popular de *Strychnos pseudoquina*.

Atividade	Modo de preparo	Parte utilizada	Referência
Antimalárica	Não registrado	Casca	Krukoff; Monachino, 1942
Febrífuga	Não registrado	Não registrado	Mello, 1980
Cicatrizante, fígado	Pó das cascas ou na cachaça	Casca	Grandi et al (1989)
Antipirética Antimalárica Febre intermitente Hepatite	Não registrado	Não registrado	Quentin-Leclercq et al (1990)
Antimalárico Febrífugo	Não registrado	Cascas	Neto et al (2003)
Abortivo	Decocção	Folha/casca	Rodrigues (2007)
Esplenomegalia, hepatomegalia, Febre intermitente, malaria, Problemas gástricos. Tônico, febrífugo, depurativo.	Não registrado	Cascas	Botsaris (2007)
Anorexígena e hipolipidêmica	Garrafada em água/infusão	Entrecasca	Jesus et al (2009)
Anemia, cicatrização de feridas, hipolipidêmica, limpar o sangue, dores estomacais, fraturas ósseas, gripe, inflamação na uretra, pneumonia, Relaxante muscular, tosse, ulcera, vermífugo	Decocção Maceração	Não registrado	Bieski et al (2012)

Tabela 4: Estudos biológicos e farmacológicos realizados com extratos de *Strychnos pseudoquina*.

Propriedade farmacológica	Tipo de extrato	Parte da planta	Teste realizado	Referência
Proteção da mucosa gástrica	Fração enriquecida de alcaloides	Folhas	Atividade de proteção gastrointestinal contra piroxicam, HCL e ETOH em ratos	Silva et al (2005)
Hipoglicemiante	Infusão do pó das cascas em água	Casca	Ratos diabéticos induzidos por aloxana	Honório-França et al (2008)
Não apresentou propriedade cicatrizante a nível macromolecular.	Microemulsão contendo o extrato etanólico	Casca	Cicatrização em ratos diabéticos	
Leishmanicida	Acetato de etila	Casca	Atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	Lage et al (2013)
Inviabilização dos ovos do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	Extrato etanólico	Tronco	Teste de imersão do adulto segundo Drummond et al. (1973).	Barbosa et al (2013)

Como demonstrado, *S. pseudoquina* mostra-se amplamente utilizada, fazendo desta uma boa candidata para a produção de fitoterápicos. A partir das informações obtidas, os extratos desta espécie podem ser direcionados a

testes biológicos para a verificação do potencial medicinal, como acontece no presente trabalho.

1.3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem o objetivo de contribuir para a comprovação farmacológica das propriedades medicinais descritas para *S. pseudoquina* pela medicina popular e comparar as metodologias de controle químico e biológico da qualidade de drogas vegetais provenientes de acessos e amostras comerciais de *S. pseudoquina*.

1.4. REFERÊNCIAS

ANGENOT, L.; BELEM-PINHEIRO, M. L.; ROCHA, A. F. I. DA; POUKENS-RENNERT, P.; QUENTIN-LECLERCQ, J.; WARIN, R. An indolic cryptoalkaloid from *Strychnos mattogrossensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2746-2749, 1990.

BARBOSA, C. S.; BORGES, L. M. F.; NICÁCIO, J.; ALVES, R. D.; MIGUITA, C. H.; VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. *In vitro* activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, p. 421-430, 2013.

BIESKI, I. G. C.; SANTOS, F. R.; OLIVEIRA, R. M. DE; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. DE O. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-36, 2012.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 18, p. 1-8, 2007.

CORDELL, G. A. Phytochemistry and traditional medicine - A revolution in process. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 391-398, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

DATAPLAMT. Disponível em <<http://www.dataplamt.org.br/bd2.php?id=123>>. Acesso em: 15 Jan. 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. Edição, Nova York, John Wiley & Sons Ltd., 2002. 539 p.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, p. 218-227, 2003.

- GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A. da; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais. **Acta Botânica Brasilica**, v. 3 n. 2, p. 185-224, 1989.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 1- 19, 2015.
- HONORIO-FRANÇA, A. C.; MARINS, C. M. F.; BOLDRINI, F.; FRANÇA, E. L. Avaliação da atividade hipoglicemiante e cicatrizante de extrato da entrecasca da Quina do Cerrado (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 504-510, 2008.
- IKAN, R. **Selected topics in the chemistry of natural products**. 1. Edição, Singapura, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2008. 604 p.
- JESUS, N. Z. T. DE; LIMA, J. C. DA S.; SILVA, R. M. DA; ESPINOZA, M. M.; MARTINS, D. T. DE O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19(1A), p. 130-139, 2009.
- KRUKOFF, B. A.; MONACHINO, J. The american species of *strychnos*. **Brittonia**, v. 4, n. 2, p. 248-322, 1942.
- LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R. de; LOPES, A. de S.; FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; FILHO, J. D. de S.; TAVARES, A. A. P.; PÁDUA, R. M. de; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present na Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- MARINI-BETTOLO, G. B.; GALEFFI, C.; NICOLETTI, M.; MESSANA, I. Alkaloids of *Strychnos rubiginosa*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 992-994, 1980.
- MELLO, J. F. DE. Plants in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, p. 49-55, 1980.
- MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C. G.; ROBLES GIL, P. **Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. 1. Edição, Washington, Conservation International., 1999. 431 p.
- NETO, V. F. A.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 253-256, 2003.
- PROGRAMA REFLORA. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 13 Jan. 2014.
- QUENTIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; BISSET, N. G. South American *Strychnos* species. ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 28, p. 1-52, 1990.
- QUENTIN-LECLERCQ, J.; LLABRES, G.; WARINS, R.; BELEM-PINHEIRO, M.-L.; MAVAR-MANGA, H.; ANGENOT, L. Guianensine, a zwitterionic alkaloid from *Strychnos guianensis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1557-1560, 1995.
- RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 295-302, 2007.

SILVA, M. A. da; RAFACHO, B. P. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M. da; SANTOS, L. C. dos; SANNOMIYA, M.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* St. Hill. Leaves Extract on Gastrointestinal Activity in Mice. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v.52, n. 6, p. 1189-1208, 1989.

ODUOYE, O. T.; OGUNDIPE, O. T.; OLOWOKUDEJO, J. D. Systematic treatment and conservation of Loganiaceae in West Africa. **International Journal of Science and Nature**, n. 4, v. 3, p. 512-520, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine Strategy: 2014 - 2023. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 01 Fev. 2015.

CAPÍTULO I – ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE EXTRATOS DE *S. pseudoquina* A.St.-Hil.

2.1.INTRODUÇÃO

O primeiro passo para a investigação fitoquímica de espécies vegetais é o processo de extração. Esta etapa tem a finalidade de concentrar os compostos distribuídos pelo vegetal, além de atuar na seleção de classes específicas de compostos. Como exemplo, pode ser citado o processo de extração dos alcaloides, que baseado nas diferenças estruturais destas moléculas com os demais metabólitos vegetais, podem ser extraídos seletivamente (BRUSOTTI et al., 2014)

Nas últimas décadas, diversas técnicas de extração foram adicionadas às metodologias comumente empregadas: extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração por líquido super-crítico e extração por líquido pressurizado (BRUSOTTI et al., 2014).

Após o processo de extração, passa-se para a etapa de preparo de amostra. Esta etapa pode ser adotada tanto para testes biológicos quanto para técnicas analíticas. O preparo de amostras inclui os seguintes objetivos: simplificação da matriz, concentração do analito ou *clean-up* da amostra. Atualmente o método mais utilizado para cumprir estes objetivos, permitindo a análise de compostos, mesmo em baixas concentrações, é a microextração em fase líquida (YAN et al., 2014).

Dentre as diversas técnicas de separação e identificação de compostos naturais de última geração, como HPLC, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), espectrofotometria UV-visível (UV) e espectrofotometria de absorção atômica (AAS) (YAN et al., 2014), a cromatografia de camada delgada (CCD) resistiu ao tempo.

Técnicas de CCD são amplamente utilizadas para análise do perfil fitoquímico de preparações de drogas vegetais. Esta é uma técnica ágil para demonstrar a constituição química de uma droga vegetal e, neste sentido, além da detecção qualitativa, pode produzir informações quantitativas de compostos

presentes na droga vegetal. Estas informações podem ser utilizadas para fim de controle de qualidade de espécies vegetais. Para o monitoramento de processos de extração e fracionamento de extratos, esta técnica também pode ser útil (WAGNER; BLADT, 1996).

As técnicas atualmente empregadas utilizando os mesmos princípios da CCD são as chamadas cromatografias de camada delgada de alta performance (HPTLC). A HPTLC têm sido hifenada a detectores como espectrômetros de massa (injeção por eletrôn spray) (CHEN, SCHWACK., 2014).

Entre as metodologias analíticas empregadas para análise de extratos vegetais citadas anteriormente, a técnica de HPLC é a mais utilizada (DO et al., 2014). Porém, diante da complexidade das matrizes vegetais a performance desta técnicas de separação tornou-se um fator crítico. Para otimizar a performance de separação nestes aparelhos, estratégias como o acoplamento de colunas de fase reversa podem ser utilizadas (HERRERO et al., 2008). O aperfeiçoamento dos materiais que constituem as colunas cromatográficas pode otimizar o processo de separação.

Os últimos avanços nesta área compreendem a diminuição das partículas das fases estacionárias das colunas cromatográficas. No entanto, a diminuição destas partículas faz com que os aparelhos tenham de operar em pressões mais altas para impulsionar a fase móvel através da fase estacionária. Desta forma foram introduzidos no mercado aparelhos denominados cromatógrafos líquidos de ultra performance (UPLC), que suportam pressões superiores àquelas em que trabalham os HPLC (BUCKENMAIER et al., 2015).

Quanto mais as técnicas de extração, preparo de amostra e detecção de produtos naturais em extratos vegetais avançam, maior complexidade pode ser encontrada nos extratos vegetais. A constituição dos extratos pode variar até mesmo para as diferentes partes do vegetal analisadas, como no caso das folhas e raízes de *Agrimonia eupatoria* (FENG et al., 2013).

Soma-se a isso o fato de que a produção de metabólitos secundários pode variar, ainda, de acordo com as condições do ecossistema em que encontram-se as espécies vegetais. Diferentes níveis de radiação UV, composição atmosférica, herbivoria, ataque de patógenos, altitude, ritmo

circadiano, sazonalidade, entre outros fatores, podem alterar a produção de metabólitos secundários de plantas (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

No presente trabalho, foi realizada a prospecção fitoquímica por CCD de extratos da casca e das folhas de *S. pseudoquina*, uma espécie comumente utilizada na medicina popular brasileira, buscando qualificar as classes de compostos presentes nas diferentes partes analisadas do vegetal.

Uma análise mais específica da constituição química dos extratos das cascas e folhas de *S. pseudoquina* empregou a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (HPLC-PDA) para determinação da impressão digital (*fingerprint*) dos extratos da casca e folhas desta planta. O detector por arranjo de diodos permite que sejam capturadas as varreduras dos picos de absorção referentes aos compostos separados (CORRADINI, 2011).

Dois flavonoides, a estrichnobiflavona e a quercetina-3-O-metil-éter, foram isolados das cascas de *S. pseudoquina* (NICOLETTI et al., 1984, LAGE et al., 2013). Estes flavonoides mostraram atividade contra *Leishmania amazonensis* (LAGE et al., 2013).

Recentemente, Teijaro et al (2014) descreveram a modulação seletiva promovida por alcaloides do gênero *Strychnos* em bombas de efluxo que conferem resistência multidroga a tumores. Os alcaloides alstolucina B e F foram capazes de inibir a atividade de uma destas bombas de efluxo, a ABCC10 ATPase, na concentração de 12,5 µM.

Além dos alcaloides citados anteriormente para *S. pseudoquina* (diabolina e 11-metoxidiabolina), não foram encontrados trabalhos que reunissem dados estruturais de outros produtos naturais desta classe pertencentes a esta espécie. Este trabalho tem o intuito de reunir informações acerca dos alcaloides desta espécie vegetal, iniciando as investigações pela prospecção fitoquímica.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma investigação fitoquímica dos extratos de cascas e folhas da espécie *S. pseudoquina*.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção fitoquímica de extratos da casca e folhas de *S. pseudoquina*;
- Obter o perfil cromatográfico dos derivados vegetais de *S. pseudoquina* por HPLC-PDA;
- Quantificar os flavonoides totais dos extratos contendo esta classe de metabólitos;
- Contribuir para estabelecer técnicas analíticas (HPLC e espectrofotometria) da composição química dos derivados vegetais de *S. pseudoquina*.

2.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

2.3.1. MATERIAL VEGETAL

A autorização para acesso e remessa de amostras de componentes do patrimônio genético de *S. pseudoquina* foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): processo 010863/2014-1.

O material vegetal foi coletado na fazenda Barreiro D'antas, São José de Almeida, Jaboticatubas, MG (Coordenadas S 19°25'953" W 43°48'451. A espécie foi identificada pela botânica Andréia Fonseca Silva e uma exsicata foi depositada no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG) sob número 57515. As folhas e pedaços da casca do

caule foram secas separadamente em estufa ventilada a temperatura próxima de 40 °C, pulverizadas e pesadas.

2.3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

2.3.2.1. EXTRAÇÕES POR PERCOLAÇÃO (SERIADA E ETANÓLICA)

Como mostra a Figura 6, para a percolação seriada, foram empregados os solventes hexano, acetato de etila e etanol. Para a obtenção do extrato etanólico bruto foi realizada uma percolação etanólica empregando apenas etanol 98 °GL como solvente extrator. Ambas as percolações foram realizadas em percoladores de aço inox. As massas utilizadas foram de 200 g para as cascas e 100 g para as folhas.

A percolação seriada foi iniciada pelo solvente menos polar (hexano). Após o processo de extração, todos os extratos obtidos foram pesados para avaliação dos rendimentos. Primeiramente, foi utilizado hexano como solvente extrator, seguido dos solventes acetato de etila e, por último, etanol. As extrações foram realizadas de forma exaustiva. Ao final das extrações exaustivas, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório e liofilizados. Dessa forma, foram originados os extratos provenientes das cascas do caule em hexano (EHC), em acetato de etila (EAEC), o etanólico desengordurado (EEDC) e o extrato etanólico bruto (EEBC), assim como os extratos das folhas em hexano (EHF), em acetato de etila (EAEF), o etanólico desengordurado (EEDF) e o extrato etanólico bruto (EEBF) (Figura 6).

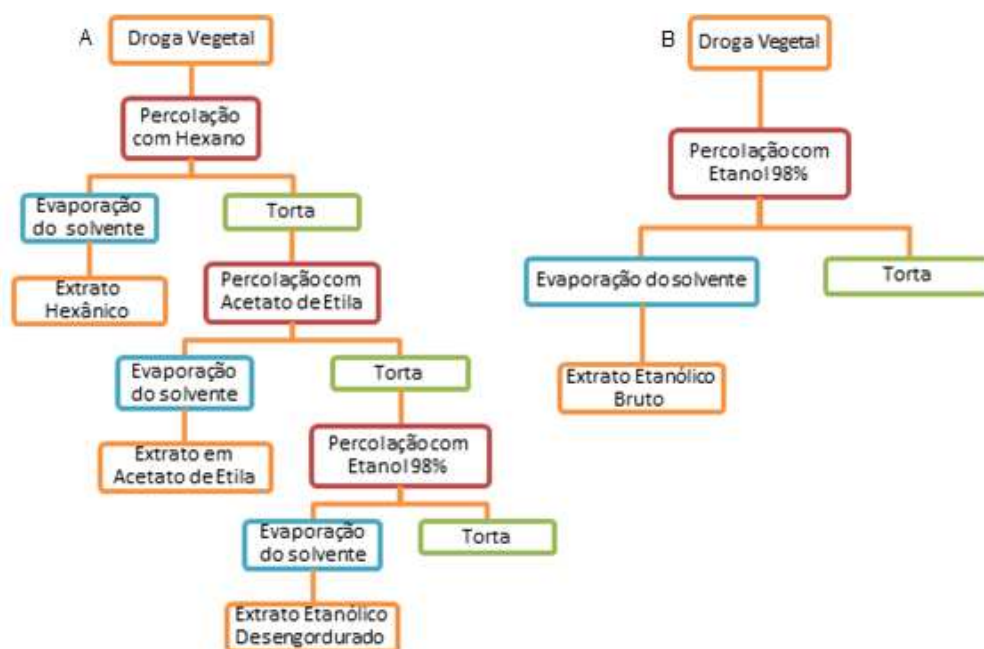


Figura 6: Processos de extração utilizados para a percolação seriada (A) e percolação etanolólica (B) das folhas e cascas de *Strychnos pseudoquina*.

2.3.2.2. EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES

Os alcaloides foram extraídos seletivamente das cascas e folhas do acesso de *S. pseudoquina* anteriormente descrito no item 2.3.2.1.

Os extratos alcaloídicos foram obtidos da seguinte forma: 10 g da droga vegetal seca e pulverizada foram alcalinizados com 10 mL de solução de NH_4OH 50% (v/v) em béquer de polietileno. Ao béquer foram adicionados 50 mL de CHCl_3 , seguindo-se de agitação da mistura por 10 min em cabine de segurança química.

O líquido extrator foi filtrado com auxílio de algodão e um funil de vidro, sendo então transferido para uma cápsula de porcelana para completa evaporação do solvente em banho-maria (50 °C).

Para acidificar o meio de forma a estabelecer os sais de alcaloides, o resíduo foi ressuspensionado em 60 mL de ácido clorídrico 2N, sendo em seguida transferido para um béquer de polietileno e alcalinizado com solução de NH_4OH 50% (v/v) até pH 9. O conteúdo do béquer foi transferido para um funil de separação, sendo posteriormente adicionados 60 mL de clorofórmio para partição. Após a coleta da fração orgânica, repetiu-se a partição com clorofórmio por mais duas vezes. As frações clorofórmicas foram reunidas,

transferidas para uma cápsula e evaporadas em banho-maria (50 °C) para completa remoção do solvente.

2.3.3. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Para a prospecção fitoquímica, aproximadamente 25 mg de cada um dos extratos foram transferidos para frascos de vidro (capacidade 5 mL) e solubilizados em etanol. Com o auxílio de capilares de vidro, os extratos foram dispostos em placas de vidro recobertas com sílica (sílica gel 60, MACHEREY-NAGEL®, espessura de 0,25 mm) ou em cromatofolhas em alumínio (com indicador fluorescente 254 nm, SIGMA-ALDRICH®). As prospecções fitoquímicas foram realizadas para as classes de compostos listadas na Tabela 5.

Tabela 5: Classes de metabólitos secundários investigadas nos extratos das cascas e folhas de *Strychno. pseudoquina*.

Classes	Padrão	Reagente Revelador
Fenólicos	Ácido pirogálico	Reagente de Barton
Flavonoides	Rutina	NP/PEG
Saponinas	Ácido 18- β -glicirretínico	Anisaldeído sulfúrico
Cumarinas e Antraquinonas	Venalot®	Hidróxido de potássio a 5%
Triterpenos/esteroides	β -sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
Alcaloides	Quinina	Reagente de Dragendorff

2.3.3.1. SOLVENTES

Todos os solventes P.A. utilizados para compor os sistemas de fases móveis utilizados na prospecção fitoquímica foram das marcas Vetec®, ECIBRA®, ISOFAR®, NEON® e Êxodo®.

Os solventes utilizados na obtenção dos *fingerprints* em HPLC foram das marcas Sigma-Aldrich®, grau HPLC.

2.3.3.2. REAGENTES REVELADORES E PADRÕES

- Reagente de Barton (Fenólicos)

Solução A: $[K_3Fe(CN)_6]$ a 1%]: dissolve-se 1 g de ferrocianeto de potássio (III) em 100 mL de água.

Solução B: $[FeCl_3]$ a 2%]: dissolvem-se 2g de cloreto férrico em 100 mL de água.

Nebulização: Faz-se uma mistura 1:1 das soluções A e B.

Padrão: Ácido pirogálico (pirogalol), Labsynth®.

- Reagente NP/PEG (Flavonoides)

Dissolvem-se 100 mg de difenilaminoborato (NP) em 500 mg de polietileno glicol (PEG) em 20 mL de metanol.

Padrão: Rutina (95 %), Sigma®.

- Reagente de Lieberman-Burchard (Triterpenos e Esteroides)

Em 50 mL de etanol absoluto, devem ser adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado pela borda do béquer, cuidadosamente, em banho de gelo. Posteriormente, misturam-se 5 mL de anidrido acético nessa solução. A mistura final deve ser preparada no momento do uso.

Padrão: β -sitosterol, Fluka® (Chemika®).

- Reagente de Dragendorff (Alcaloides)

Solução A: dissolvem-se 0,85 g de subnitrito de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial (98%) e 40 mL de água, sob aquecimento. Faz-se uma filtração em papel de filtro.

Solução B: dissolvem-se 8g de iodeto de potássio em 30 mL de água.

Solução estoque: mistura 1:1 das soluções A e B.

Nebulização: misturam-se 1,0 mL da solução estoque, 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água.

Padrão: Quinina, Fluka® (Chemika®).

- Hidróxido de potássio a 5% (Cumarinas e Antraquinonas)

Dissolvem-se 5g de hidróxido de potássio em 100ml de álcool etílico.

Padrão: Venalot (ALTANA®), troxerrutina.

- Reagente de Kedde (Cardiotônicos)

Solução A: dissolvem-se 3,0 g de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 100 mL de etanol.

Solução B: dissolvem-se 20,0 g de hidróxido de sódio em 250 mL, isenta de dióxido de carbono, obtendo-se uma solução de NaOH 2M.

Faz-se uma mistura 1:1 das soluções A e B. Deve-se usar reagente recém-preparada.

Padrão: Dgitoxina, Chemistry®.

2.3.4. PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS EM HPLC

O perfil cromatográfico, ou impressão digital (*fingerprint*), foi determinado com auxílio de HPLC com detector DAD Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions).

Para o preparo das amostras foram pesados 10 mg de cada extrato obtido, tanto da casca quanto das folhas de *S. pseudoquina* em microtubos de capacidade 2 mL. Aos microtubos foram adicionados 2 mL de MeOH grau HPLC. A solubilização dos extratos e frações ocorreu com auxílio de sonicação por 30 min em aparelho Unique® - Ultrasonic cleaner. O conteúdo dos microtubos foi transferido para balões volumétricos de 10 mL. Após o ajuste de volume, as amostras foram transferidas para frascos âmbar de capacidade 10 mL.

Soluções com padrões dos flavonóides estrichnobiflavona e quercetina-3-O-métíl-éter isolados e purificados de *S. pseudoquina* de acordo com Lage et al. (2013) (cedidos gentilmente para a realização desse trabalho) foram preparados em metanol grau HPLC na concentração de 1 mg/mL. Essas soluções foram injetadas no HPLC nas mesmas condições cromatográficas das amostras, de forma a monitorar suas presenças nos diferentes extratos.

Com o auxílio de seringas descartáveis (3 mL) e filtros *milipore* (20 µm) foram recolhidos aproximadamente 3 mL de cada extrato. O volume de primeira passagem no filtro foi descartado (1 mL) e o restante foi transferido para *viles* (1,5 mL), que foram, então, hermeticamente fechados e alocados no injetor automático de amostras do HPLC.

A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®, 15 cm por 4,6 mm) foi de fase reversa (C-18). As condições de corrida foram: tempo de corrida: 60 min, Fase

Móvel gradiente de 5% a 95% de MeOH. Fase A: H₂O/ácido acético 0,5 % (v/v) e Fase B: MeOH.

Foram realizadas as varreduras dos picos presentes nos cromatogramas. As varreduras compreendem uma faixa de comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Os espectros gerados foram utilizados para determinar as classes de compostos que constituem os extratos.

2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DE EAEC, EEDC E EEBC

A quantificação de flavonoides foi realizada conforme metodologia descrita por Peixoto Sobrinho et al. (2008), com algumas modificações. O método baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo uma intensificação da absorção, permitindo que os flavonoides sejam quantificados sem a interferência de outros constituintes fenólicos (MARCUCCI et al., 2009)

Foi pesado 1,0 mg de cada um dos extratos em microtubos. Após a pesagem, os extratos foram ressuspensos em 1 mL de etanol 70%, tornando-se soluções de concentração 1 mg/mL. Para que as leituras de absorbância dos extratos resultassem em valores contidos dentro dos intervalos estabelecidos par a curva de calibração, fez-se necessário realizar diferentes diluições destes.

A fim de diluir o EAEC em 12x para que o valor de absorbância se encaixasse na curva, foi recolhida uma alíquota de 83 µL da solução 1 mg/mL e transferida para balão volumétrico de capacidade 25 mL. EEBC teve de ser diluído 3x, sendo transferidos 333 µL da solução 1 mg/mL para balão volumétrico de 25 mL. Para EEDC a solução anteriormente preparada (volume 1 mL e concentração 1 mg/mL) foi transferida inteiramente para balão volumétrico de 25 mL. As mesmas alíquotas de cada extrato foram utilizadas para fazer suas respectivas soluções de compensação. As soluções teste foram preparadas em triplicata.

Aos balões volumétricos de 25 mL anteriormente preparados contendo os extratos foram adicionados 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol. Para os balões contendo as soluções destinadas à leitura da

absorbância, foram adicionados 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. Finalmente, o volume foi completado com água purificada. Para os balões contendo as soluções de compensação houve apenas a complementação do volume com água purificada. Os balões contendo as soluções foram deixadas em repouso por 20 min antes da verificação das absorbâncias em aparelho espectrofotométrico.

A curva de calibração foi construída utilizando-se a rutina como padrão (2,0 a 30,0 µg/mL). Primeiramente foi preparada uma solução estoque de rutina, previamente dessecada. O padrão foi pesado (5,0 mg) e então dissolvido em metanol e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com este mesmo solvente (concentração de rutina 0,5 mg/mL).

Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL desta solução estoque para balões volumétricos de 25 mL, correspondendo às massas: 0,05 mg, 0,125 mg, 0,250 mg, 0,500 mg e 0,750 mg de rutina, respectivamente. Em seguida, foram adicionados, a cada um dos balões, volumes de 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol e 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. O volume dos balões foi completado pela adição de água purificada, obtendo-se soluções de concentração 2,5, 10, 20 e 30 µg/mL de rutina, respectivamente. As soluções foram homogeneizadas, deixadas em repouso por 20 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

O preparo do branco para a construção da curva se deu pela adição de 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol, 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água purificada.

Todas as leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, no comprimento de onda 420 nm.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS

2.4.1.1. EXTRAÇÃO POR PERCOLAÇÃO E EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES

De forma geral, os rendimentos dos processos de extração foram incluídos na Tabela 6. As cascas apresentaram maior rendimento que as folhas para os extratos em acetato de etila, etanólico bruto e alcaloídico.

Tabela 6: Rendimentos dos extratos de *Strychnos pseudoquina* obtidos por diferentes métodos.

Droga Vegetal	Percolação Seriada			Percolação Etanólica	Extração de Alcaloides*
	Ext. Hexânico	Ext. em Acetato de Etila	Ext. Etanólico Desengordurado		
Cascas (200 g)	0,216 g (0,108%)	8,98 g (4,49%)	24,43 g (12,21%)	27,65 g (13,82%)	0,154 g (1,54%)
Folhas (100 g)	1,314 g (1,314%)	1,435 g (1,435%)	24,43 g (24,43%)	8,286 g (8,286%)	0,092 g (0,92%)

*Para a extração de alcaloides foram empregados 10 g de droga vegetal para casca e folhas.

2.4.2. ANÁLISE QUALITATIVA DAS CLASSES DE COMPOSTOS PRESENTES EM CASCAS E FOLHAS DE *S. pseudoquina*

Saint-Hilaire apresenta em seus relatos uma investigação semelhante à proposta neste trabalho, promovida por um químico de sua época M. Vauquelin:

-“M. Vauquelin fez a análise da casca de *S. pseudoquina* e considerou que ela continha principalmente: 1º uma matéria amarga que forma a maior parte dos seus princípios solúveis, e que, segundo nosso ilustre químico, parece ser aquela na qual residem as propriedades febrífugas; 2º uma substância resinosa especial muito solúvel no álcool a 36º, e pouco solúvel no álcool absoluto; 3º uma matéria gomosa colorida e unida a um princípio animalizado que modifica suas propriedades físicas; 4º um ácido particular que, como a infusão das galhas, precipita o sulfato de ferro e a cola forte, mas com modificações que não permitem considera-lo como o ácido gálico... O que parece muito

estranho é que não se tenha descoberto, na planta que nos ocupa, nem brucina, nem quinina...” (DATAPLAMT, 2005).

A prospecção fitoquímica realizada verificou a presença de dois compostos descritos neste relato. Estes compostos foram utilizados como padrões para a revelação das placas de CCD. Estes resultados podem estar em conformidade com as observações descritas por Saint-Hilaire.

Não foram encontrados compostos pertencentes às classes das saponinas, cumarinas e antraquinonas para os extratos das cascas e folhas de *S. pseudoquina* nas concentrações de extratos utilizadas para a investigação por cromatografia de camada delgada. Já a prospecção fitoquímica dos extratos quanto à presença de triterpenos, alcaloides, flavonoides, e taninos apresentou os resultados reunidos na Tabela 7.

O teste de triterpenos demonstrou a presença desta classe de compostos em EHC, EHF e EAEF. Estes compostos foram anteriormente relatados para *S. pseudoquina* em Matos (2009) e Carvalho (2009).

O teste de identificação de flavonoides revelou uma riqueza constitucional para esta classe de produtos naturais, tanto para as cascas quanto para as folhas, sendo que na casca houve a predominância de flavonoides mais apolares, enquanto nas folhas houve maior retenção destes constituintes. Carvalho (2009) também verificou a presença desta classe de moléculas nas cascas de *S. pseudoquina*.

Quanto aos constituintes fenólicos, pôde-se perceber sua presença tanto nas cascas quanto nas folhas. O padrão utilizado neste teste foi o ácido pirogálico (pirogálico). De fato, não foram encontradas manchas cujo fator de retenção (R_f) se aproximasse daquele apresentado pelo pirogalol. Este achado dá suporte à análise presente nos relatos de Saint-Hilaire (esta constatação também pode ser verificada posteriormente, pela imagem da cromatofolha do teste de identificação de fenólicos no Capítulo III, item 4.4.2.).

Tabela 7: Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos das cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina*.

Classes	EHC	EAEC	EEDC	EEBC	EHF	EAEF	EEDF	EEBF
Fenólicos	+	+	+	+	-	+	+	+
Flavonoides	-	+	+	+	-	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas e Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos/esteroides	+	-	-	+	+	+	-	-
Alcaloides	-	-	+	+	-	-	-	-

Nota: EHC (extrato hexânico das cascas), EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EHF (extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folha), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBF (extrato etanólico bruto das folhas).

Alcaloides não foram identificados nos diferentes extratos das folhas nas concentrações de extratos utilizadas para a prospecção fitoquímica. Já para as cascas, sua presença foi observada nos extratos etanólicos (EEDC e EEBC), indicando que esta classe de compostos se concentra no solvente mais polar. A prospecção de alcalóides também foi realizada para a fração alcaloídica das cascas e folhas de *S. pseudoquina*, resultando na detecção destes compostos apenas para as cascas. Os perfis cromatográficos em CCD das cascas podem ser visualizados nas Figuras 7, 8, e 9.

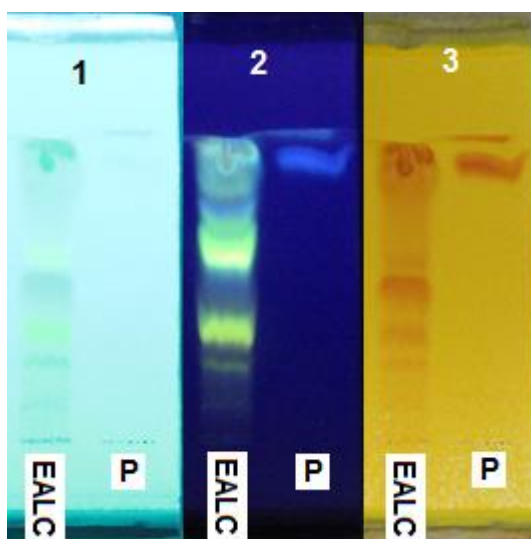


Figura 7: CCD do extrato alcaloídico das cascas de *Strychnos pseudoquina* (EALC) e padrão P (quinina).

Nota: FM: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15). Revelador: UV 254 nm (1) e UV 365 nm (2) e coloração com reagente de Dragendorff (3). Placa de vidro (5x10 cm) recoberta com sílica gel 60 G – F254 de espessura 0,25 cm.

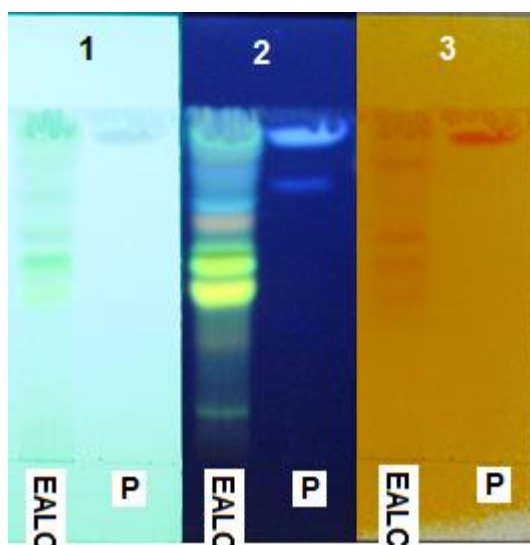


Figura 8: CCD do extrato alcaloídico das cascas de *Strychnos pseudoquina* (EALC) e padrão P (quinina).

Nota: FM: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15). Revelador: UV 254 nm (1), UV 365 nm (2) e coloração com reagente de Dragendorff (3). Cromatofolha (5x10 cm) em alumina com indicador fluorescente 254 nm (SIGMA-ALDRICH®).

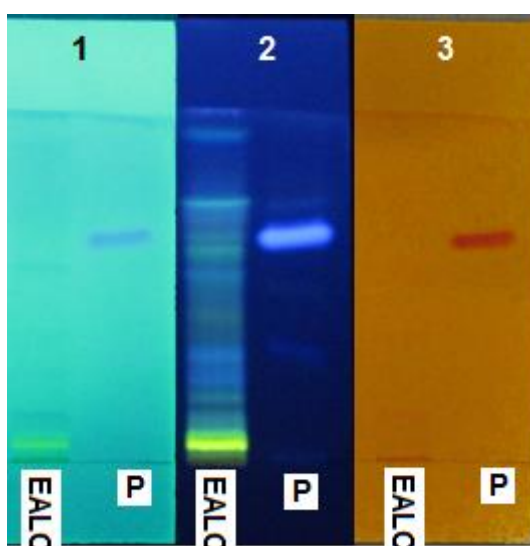


Figura 9: CCD do extrato alcaloídico das cascas de *Strychnos pseudoquina* (EALC) e padrão P (quinina).

Nota: FM: Tolueno/ $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (28,5:57:14,5). Revelador: UV 254 nm (1) e UV 365 nm (2) e coloração com reagente de Dragendorff (3). Cromatofolha (5x10 cm) em alumina com indicador fluorescente 254 nm (SIGMA-ALDRICH®).

O padrão cromatográfico utilizado para o teste de verificação da presença de alcaloides foi a quinina. Apesar da visualização de manchas características de alcaloides sob luz UV (365 nm) (Figuras 7, 8 e 9), a

revelação pelo reagente de Dragendorff não indicou a presença de quinina no extrato alcaloídico de *S. pseudoquina* (Figura 9), como descrito por Saint-Hilaire. O padrão quinina também mostrou-se fluorescente sob luz UV 254 nm (Figura 9), porém não foi verificada mancha semelhante para o extrato alcaloídico de *S. pseudoquina* no mesmo Rf que o padrão.

Os resultados obtidos demonstram que maiores investigações desta classe de metabólitos secundários deve ser realizada para *S. pseudoquina*. Apenas dois alcaloides foram isolados e identificados desta espécie vegetal (NICOLETTI et al., 1984) e, segundo a prospecção fitoquímica, podem existir outros alcaloides neste extrato que ainda não foram identificados.

2.4.3. *FINGERPRINT* DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE *S. pseudoquina*

Por se tratar de um instrumento analítico importante para monitorar a qualidade das matérias primas de produtos fitoterápicos, o *fingerprint* dos extratos das cascas e das folhas trouxe considerações relevantes quanto à composição química nas diferentes partes da planta (Figuras 10, 11, 12 e 13).

As condições cromatográficas aplicadas mostraram-se adequadas para a obtenção de cromatogramas que permitissem a visualização de diferentes picos nos extratos, exceto para os extratos hexânicos das cascas e das folhas (EHF e EHC). Para os extratos da casca, dois picos identificados nos tempos de retenção 31 e 33 min puderam ser visualizados para EAEC, EEDC e EEBC. Após a comparação dos picos majoritários do cromatograma destes extratos com os tempos de retenção obtidos para flavonoides isolados em Nicoletti et al. (1984) e Lage et al. (2013), disponíveis para o nosso laboratório, pode-se dizer que os compostos majoritários destes extratos são a estrichnobiflavona (31,168 min) e a quercetina-3-O-metil-éter (33,403).

Estes flavonoides apresentaram atividade inibitória perante *Leishmania amazonensis* (LAGE et al., 2013), tornando-se então marcadores biológicos da espécie *S. pseudoquina*. A estrichnobiflavona, testada quanto a atividade antiviral contra *herpes simplex virus*, também apresentou atividade anti-herpética *in vitro* (FARIAS et al., 2014).

No EHC (Figura 10), concentraram-se os constituintes mais apolares. Pode-se perceber que, ao final da corrida, com a diminuição percentual da água na FM e aumento do solvente orgânico utilizado (MeOH), as moléculas apolares retidas na coluna C18 (fase-reversa) foram eluídas. Os picos obtidos para esta fração não puderam ser separados adequadamente, sendo necessários mais estudos para uma investigação aprofundada de sua natureza. Os marcadores: estrichnobiflavona e quercetina-3-O-metil-éter não foram identificados nesta fração. Estes flavonoides também não puderam ser identificados nos extratos das folhas.

Nos extratos EAEC, EEDC e EEBC (Figura 10), ambos provenientes das cascas, pode-se verificar que os picos majoritários, referentes aos flavonoides estrichnobiflavona e quercetina-3-O-metil-éter, encontram-se em escalas diferentes. A escala alcançada é diretamente proporcional à concentração destes compostos nos extratos. Concentrações mais elevadas (presentes em EAEC) provocaram uma maior absorção da luz pelo cromóforo destas moléculas, ao passo que baixas concentrações absorveram a luz com menor intensidade, diminuindo a escala dos picos no cromatograma (Como para EEBC e EEDC). Portanto, pode-se perceber que os flavonoides encontram-se mais concentrados em EAEC, seguido de EEBC e EEDC.

Esta quantidade intermediária de estrichnobiflavona e quercetina-3-O-metil-éter em EEBC, quando comparada àquelas presentes em EAEC e EEDC, deve-se ao fato de que, para o solvente etanol, a extração de flavonoides não foi tão eficiente quanto para o acetato de etila na extração seletiva desta classe de compostos. A eficiência de EAEC para a extração de flavonóides frente à EEBC pode ser demonstrada no cromatograma, quando são comparados os picos referentes aos flavonoides nos três extratos.

Os cromatogramas obtidos por HPLC corroboram os resultados obtidos por CCD, mostrando que a casca contém uma mistura de flavonoides, cujos compostos majoritários são a estrichnobiflavona e a quercetina-3-O-metil-éter (extratos EALC, EEDC, EEBC).

Como houve pequenas variações dos tempos de retenção para os compostos que apresentavam o mesmo perfil na varredura de picos, os tempos de retenção indicados na Figura 11, que reúne os espectros de varredura dos compostos presentes nos extratos da casca, referem-se àqueles obtidos para o

extrato em acetato de etila (EAEC). Esta abordagem permite afirmar que a casca de *S. pseudoquina* é constituída por diversos compostos pertencentes à classe dos flavonoides (presença de 2 máximos de absorção nas regiões de 220-254nm e 320-354nm, referentes aos cromóforos desse grupo de metabólitos secundários, benzoíla e cinamoíla).

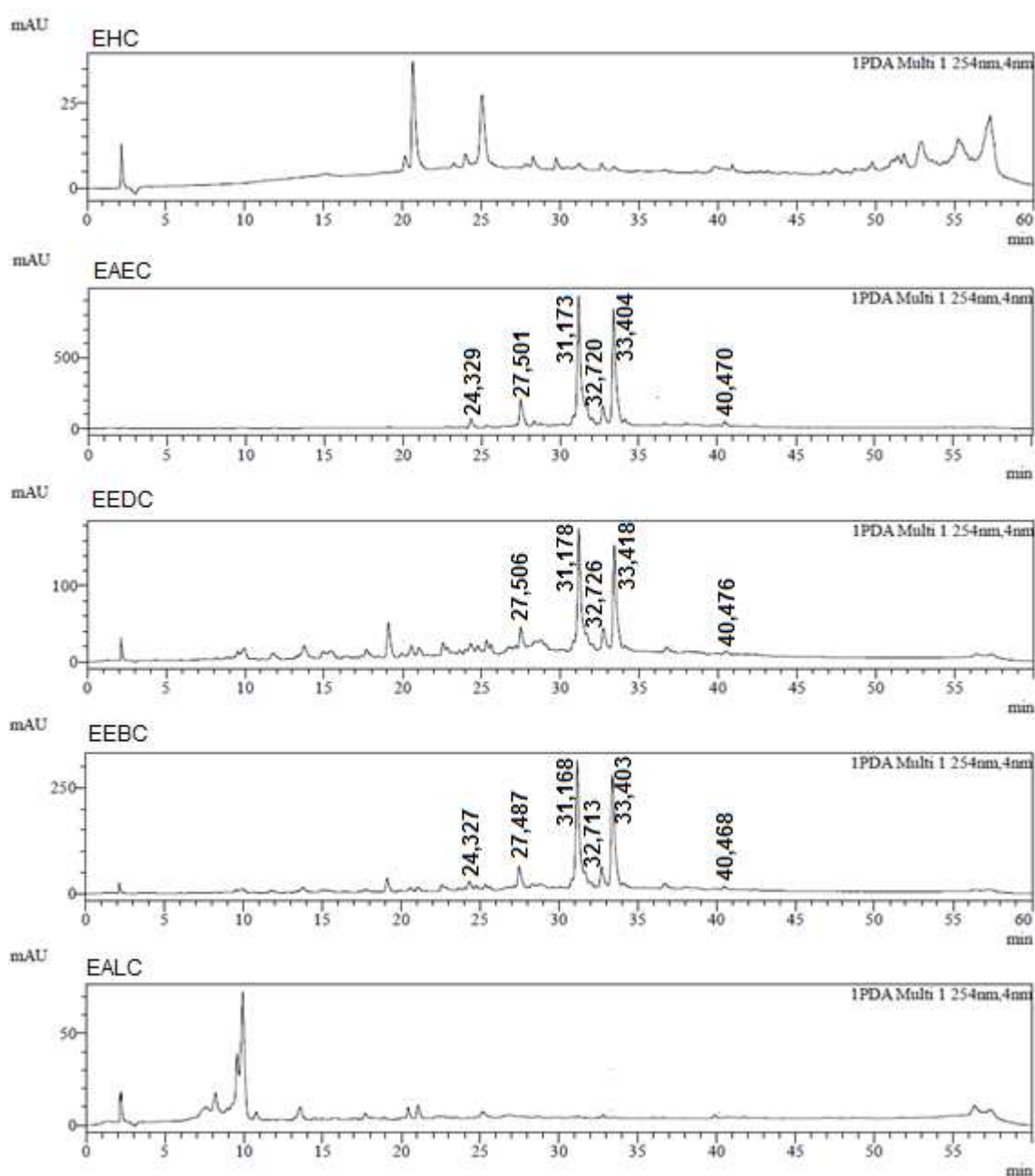


Figura 10: *Fingerprint* dos extratos das cascas de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: Os tempos de retenção foram assinalados acima dos picos cujas varreduras puderam ser obtidas. EHC (extrato hexânico das cascas), EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas).

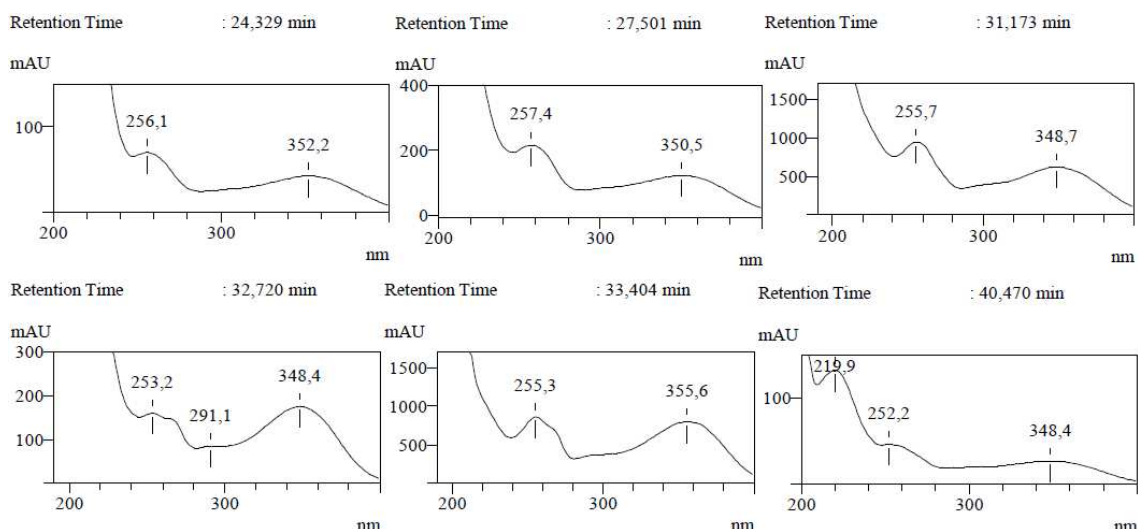


Figura 11: Varreduras dos picos obtidos no *fingerprint* das cascas de *Strychnos pseudoquina* para os picos presentes no EAEC (extrato em acetato de etila das cascas).

A investigação dos cromatogramas referentes aos extratos das folhas (Figura 12) e a varredura obtida para os picos (Figura 13), revelam que os extratos das folhas não apresentaram os flavonoides anteriormente isolados em Lage et al. (2013), encontrados na casca de *S. pseudoquina*. Entretanto, a varredura dos picos encontrados em EAEF, EEDF e EBEF possuem características de flavonoides (com a presença de 2 máximos de absorção nas regiões de 220-254nm e 320-354nm, referentes aos cromóforos desse grupo de metabólitos secundários, benzoíla e cinamoíla). Os flavonoides encontrados nesta parte do vegetal apresentam tempos de retenção diferentes daqueles encontrados na casca. Investigações posteriores serão realizadas a fim de determinar as estruturas químicas destas moléculas.

A legislação brasileira para registro de fitoterápicos (RDC nº 26) torna a obtenção do *fingerprint* dos extratos vegetais um instrumento necessário para se avaliar a qualidade de fitoterápicos. Segundo a legislação, torna-se obrigatória a obtenção do perfil cromatográfico para droga vegetal, derivado vegetal e produto acabado no momento do registro, notificação ou renovação do registro do produto.

O fracionamento dos extratos e os achados referentes à composição química das frações permitirão que as avaliações das atividades biológicas sejam relacionadas com a constituição metabólica dos extratos. O monitoramento das frações biologicamente ativas contribuirá para a

identificação das classes de metabólitos ou produtos naturais candidatos a marcadores visando o controle de qualidade de fitoterápicos.

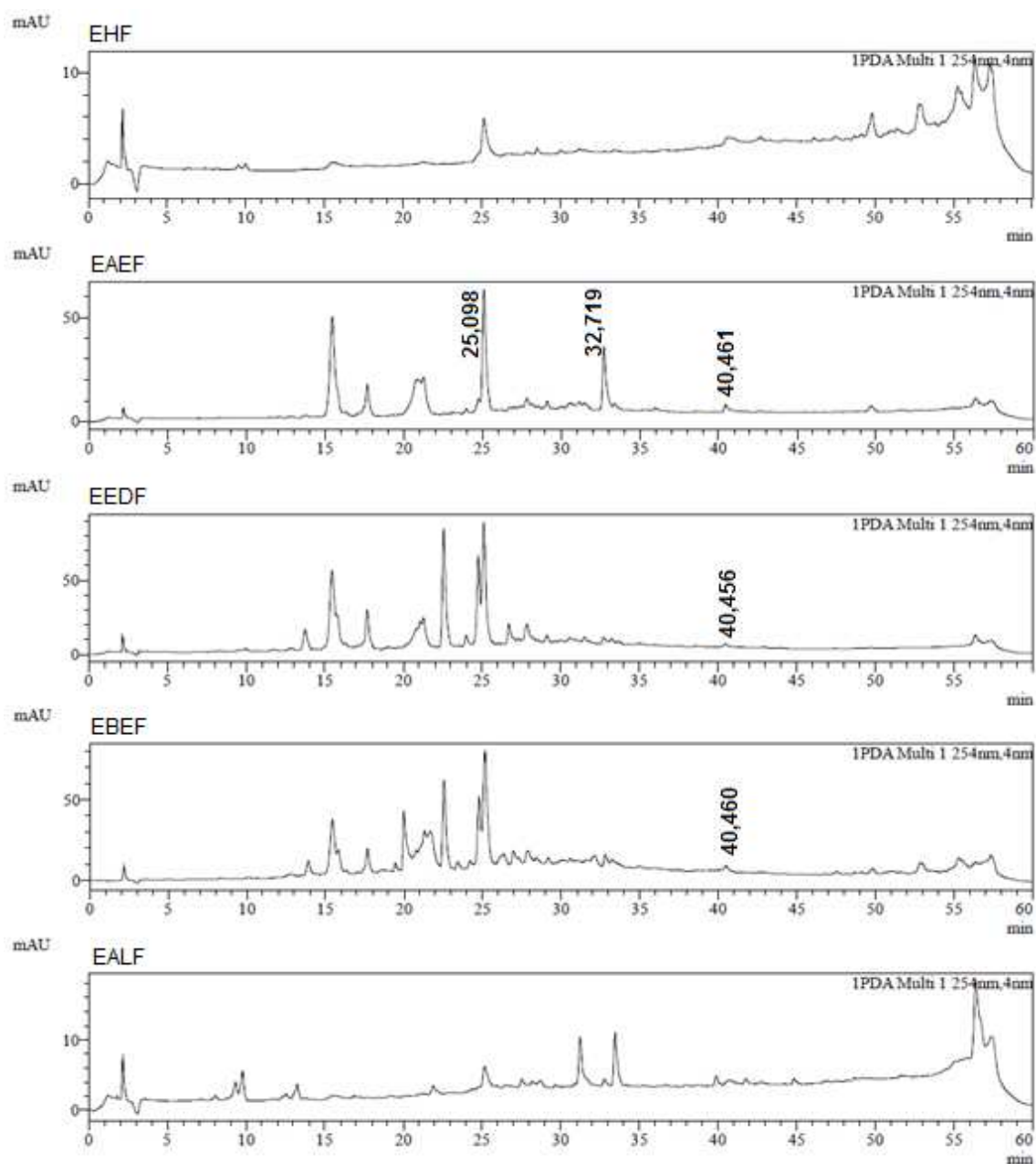


Figura 12: *Fingerprint* dos extratos das folhas de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: Os tempos de retenção foram assinalados acima dos picos cujas varreduras puderam ser obtidas. EHF (extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folha), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBF (extrato etanólico bruto das folhas), EALF (extrato alcaloídico das folhas).

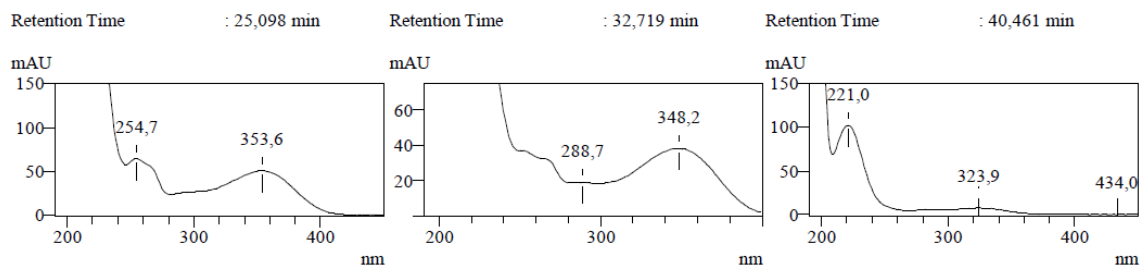


Figura 13: Varreduras dos picos obtidos no *fingerprint* das folhas de *Strychnos pseudoquina*.
 Nota: No tempo de retenção 32,719 min o aparelho detectou interferências que prejudicaram parcialmente a varredura, porém os máximos de absorção encontrados são, de fato, 288,7 e 348,2 nm. As varreduras referem-se aos picos encontrados em EAEF (extrato em acetato de etila das folha).

2.4.4. FLAVONOIDES TOTAIS DE EAEF, EEDC E EEBC

A verificação da presença de flavonoides em EAEF, EEDC e EEBC, tanto na prospecção fitoquímica, quanto na análise do *fingerprint* dos extratos, fez com que a determinação do conteúdo total desta classe de moléculas nestes extratos constituísse uma informação importante para o estudo fitoquímico desta espécie vegetal.

A curva padrão obtida e sua respectiva equação de reta podem ser visualizadas na Figura 14.

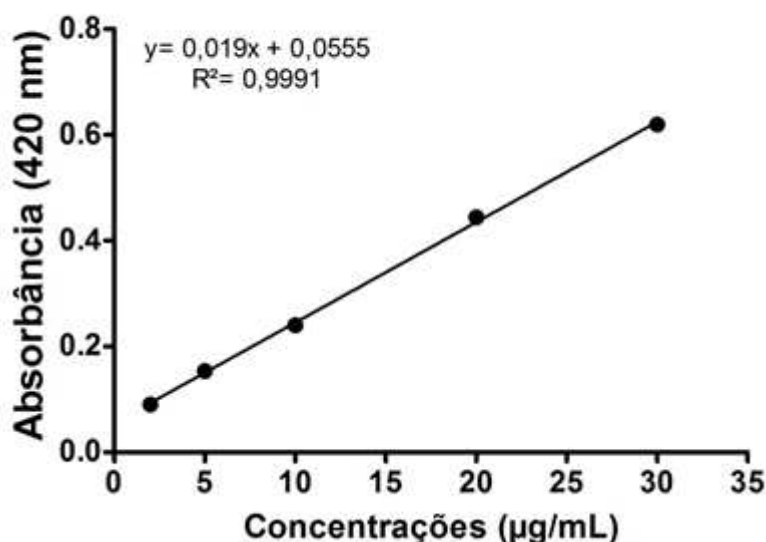


Figura 14: Curva padrão de rutina para o teste espectrofotométrico de flavonoides totais.

Os valores referentes à concentração de flavonoides totais encontram-se na Tabela 8:

Tabela 8: Concentração de flavonoides totais expressa em rutina, para EAEC, EEDC e EEBC.

Amostras	Média das leituras	Concentração mg/g de extrato
EAEC	0,343	181,58
EEDC	0,400	18,13
EEBC	0,367	49,18

Nota: EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas)

A partir dos dados de concentração de flavonoides totais para os extratos EAEC, EEDC e EEBC pode-se perceber que o método de percolação seriada promoveu uma maior concentração dos flavonoides em EAEC, corroborando com os resultados obtidos por HPLC. Este resultado será confrontado com os resultados dos testes biológicos realizados neste trabalho.

2.5. REFERÊNCIAS

BEATTIE, A. J.; HAY, M.; MAGNUSSON, B.; NYS, R.; SMEATHERS, J. VINCENT, J. F. V. Ecology and bioprospecting. **Austral ecology**, v. 36, p. 341-356, 2011.

BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; SILVA, M. A.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H.; BAUAB, T. M.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Loganiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 47-52, 2011.

BRASIL. RDC nº 26 de 13.05.14. Determina a Publicação do “O Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o Registro e a Notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos.”. *Diário Oficial da União*, 09.05.14.

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. 218-28, 2014.

BUCKENMAIER, S.; MILLER, C. A.; VAN DE GOOR, T.; DITTMANN, M. M. Instrument contributions to resolution and sensitivity in ultra high performance liquid chromatography using small bore columns: Comparison of diode array and triple quadrupole mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, p. 64-74, 2015.

CARVALHO, I. M. M. de. **Avaliação da atividade antihepatotóxica de duas espécies vegetais popularmente conhecidas como “quina”: *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil. e *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Shum.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2009. 94p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica Agrícola).

CHEN, Y.; SCHWACK, W. Rapid and selective determination of multi-sulfonamides by high-performance thin layer chromatography coupled to fluorescent densitometry and electrospray ionization mass detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1331, p. 108-16, 2014.

CONSENZA, G.P.; SOMAVILLA, N.S.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M.G.L. Bitter plants used as substitute of Cinchona spp. (quina) in Brazilian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, 790-796, 2013.

CORRADINI, D. Handbook of HPLC. 2. Edição, Boca Raton, CRC Press, 2011. 695 p.

DATAPLAMT. Disponível em <<http://www.dataplamt.org.br/bd2.php?id=123>>. Acesso em: 15 Jan. 2015.

DO, T. K.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 256-60, 2014.

FARIAS, L.M. XAVIER, A.A.; PÁDUA, R.M.; LEITE, J.P.V.; SIMÕES, C.M.O. PRELIMINARY EVALUATION OF ANTIHERPES ACTIVITY OF *Strychnos pseudoquina* St. Hil. In: XXV Congresso Brasileiro de Virologia e IX Encontro de Virologia do Mercosul, 2014. Ribeirão Preto.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 1. Edição, 1926.

FENG, X. L.; HE, Y. B.; LIANG, Y. Z.; WANG, Y. L.; HUANG, L. F.; XIE, J. W. Comparative Analysis of the Volatile Components of Agrimonia eupatoria from Leaves and Roots by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Multivariate Curve Resolution. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FORGACS, P.; JEHANNO, A.; PROVOST, J.; THAL, C.; GUILHEM, J.; PASCARD, C.; MORETTI, C. An indole alkaloid from *Strychnos erichsonii*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 4, p. 969-971, 1986.

GALEFFI, C.; MARINI-BETTOLO, G. B. The alkaloids of *Strychnos rubiginosa* Spruce ex Benth: two new β -carbonilic alkaloids, strychnohirsutine and tetrahydrostrychnohirsutine. **Tetrahedron**, v. 37, n. 18, p. 3167-3170, 1981.

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

HERRERO, M.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; GIUFFRIDA, D.; DUGO, G.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Serial coupled columns reversed-phase separations in high-performance liquid chromatography. Tool for analysis of complex real samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 208-15, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004. Mapa de biomas do Brasil. Escala 1:5.000.000. Disponível em <ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf>. Acesso em: 27 Out. 2014.

KAPOOR, V. K.; SHARMA, S. K.; CHAGTI, K. K.; SINGH, M. Synthesis and hypotensive activity of diaboline. **Indian Journal of Chemistry**, v. 27B, p. 641-644, 1988.

LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R. de; LOPES, A. de S.; FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; FILHO, J. D. de S.; TAVARES, A. A. P.; PÁDUA, R. M. de; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present na Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. Disponível em <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>>. Acesso em: 13 Jan. 2015.

MARONI, B. C.; STASI, L. C.; MACHADO, D. C. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu**. São Paulo, UNESP, 2006, 200 p.

MAVAR-MANGA, H.; QUENTIN-LECLERCQ, J.; LLABRES, G.; BELEM-PINHEIRO, M.-L.; ROCHA, A. F. I. DA; ANGENOT, L. 9-Methoxygeissoschizol, an alkaloid from bark of *Strychnos guianensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1125-1127, 1996.

MATOS, A. T. S. de. **Detecção *in silico* dos constituintes majoritários de *Strychnos brasiliensis* e *S. pseudoquina* (Loganiaceae) usando CLAE-DAD/EMAR**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 2009. 91p. (Dissertação, Mestrado em Química).

MUKHERJEE, R.; SILVA, T. M. S. DA; GUIMARÃES, J. B. L.; OLIVEIRA, E. de J.; KEIFER, P. A.; SHOOLERY, J. N. Tertiary alkaloid fraction of *Strychnos atlântica*: confirmation of the identity and structures of indole alkaloids by high field nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 115-119, 1997.

NICOLETTI, M.; Goulart, M. O.; de Lima, R. A.; Goulart, A. E.; Delle Monache, F.; Marini Bettolo, G. B. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 953-7, 1984.

OLIVEIRA, E. J.; MEDEIROS, I. A.; MUKHERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 45-9, 1996.
PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, n. 4, p. 586-591, 2012.

PENELLE, J.; CHRISTEN, P.; MOLGO, J.; TITS, M.; BRANDT, V.; FREDERICH, M.; ANGENOT, L. 5',6'-dehydroguaiachrysine and 5',6'-dehydroguiaflavine, two curarizing quaternary indole alkaloids from the stem bark of *Strychnos guianensis*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 619-26, 2001.

PENELLE, J.; TITS, M.; CHRISTEN, P.; BRANDT, V.; FREDERICH, M.; ANGENOT, L. Guiaflavine, a new bisindole quaternary alkaloid from the stem bark of *Strychnos guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 898-900, 1999.

SILVA, T. M. DA; SILVA, B. A. DA; MUKHERJEE, R. The monoterpene alkaloid cantleyine from *Strychnos trinervis* root and its spasmolytic properties. **Phytomedicine**, v. 6, n. 3, p. 169-76, 1999.

TEIJARO, C. N.; MUNAGALA, S.; ZHAO, S.; SIRASANI, G.; KOKKONDA, P.; MALOFEEVA, E. V.; HOPPER-BORGE, E.; ANDRADE, R. B.. Synthesis and Biological Evaluation of Pentacyclic *Strychnos* Alkaloids as Selective Modulators of the ABCC10 (MRP7) Efflux Pump. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10383-90, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. 2. Edição, Munich, Springer, 1996. 385 p.

YAN, Y. CHEN, X.; HU, S.; BAI, X. Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 1-17, 2014.

ZAPPI, D.; GUIMARÃES, E.F.; MANOEL, E.A.; SIQUEIRA, C.E. *Loganiaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8680>>. Acesso em: 13 Jan. 2014.

CAPÍTULO II – ESTUDO BIOMONITORADO DAS ATIVIDADES PROLIFERATIVA PARA FIBROBLASTOS E ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *S. pseudoquina* A.St.-Hil.

3.1.INTRODUÇÃO

Os estudos fitoquímicos biomonitorados utilizam técnicas de fracionamento dos constituintes de extratos vegetais para posterior realização de testes biológicos, visando a descoberta do(s) constituinte(s) ativo(s) responsáveis pela atividade biológica investigada. Sabe-se que, para uma mesma droga vegetal, o emprego de diferentes processos extrativos pode fornecer extratos com diferentes composições de metabólitos secundários. A utilização de solventes extratores de diferentes polaridades pode proporcionar uma extração seletiva, como àquela utilizada para alcaloides, descrito no Capítulo I (BRUSOTTI et al., 2014).

Quanto maior a biodiversidade das amostras de espécies vegetais utilizadas para testes biológicos, maior a probabilidade de que os testes realizados resultem na identificação de compostos bioativos (PIETERS, VLIETINCK, 2005).

Efeitos indesejados apresentados por determinadas classes de metabólitos secundários também podem ser evitados por meio do preparo dos extratos vegetais. As técnicas de extração podem, por exemplo, promover a retirada de taninos, que interferem nas análises de inibição de atividades enzimáticas (WALL et al., 1996).

Em Porte et al. (2014), o estudo bio guiado da inibição dos extratos da orquídea *Miltonia flavescens* Lindl. frente ao fungo *Cladosporium herbarum* permitiu a identificação do ácido hidrocínâmico como responsável pela atividade antifúngica desta espécie vegetal.

Quando os ensaios biomonitorados são hifenados a técnicas de identificação de compostos orgânicos desenvolvidas nas últimas décadas, como HPLC, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), espectrofotometria UV-visível (UV) e espectrofotometria de absorção atômica (AAS) (YAN et al., 2014), as atividades

biológicas podem ser atribuídas a compostos ou a classes de compostos bioativos presentes nos extratos.

Em Muhammad et al. (2013) tem-se a investigação bioquímica dos extratos de *Moringa oleifera*, demonstrando que o extrato metanólico bruto aumentou a proliferação celular de fibroblastos *in vitro*. Já o extrato aquoso, por sua vez, aumentou a viabilidade celular dessas células. A técnica de LC-MS, utilizada para identificação dos constituintes dos extratos bioativos de *M. oleifera* possibilitou a identificação dos compostos kaempferol e quercetina no extrato metanólico bruto e da vicenina-2, no extrato aquoso. Todos pertencentes à classe dos flavonoides, indicando que esta classe de compostos pode estar diretamente associada com a atividade cicatrizante.

Estudos demonstram que a estimulação da proliferação celular *in vitro* pode atuar como indicadora de atividade cicatrizante *in vivo* das espécies vegetais. O extrato metanólico de *Siegesbeckia pubescens* apresenta atividade proliferativa para fibroblastos murinos NIH3T3 em concentrações de 0.5-100 µg/mL. O tratamento de feridas cutâneas de ratos com pomadas contendo o extrato metanólico de *S. pubescens*, anteriormente testado para a atividade proliferativa, ao ser incorporado em uma base para pomadas a 4 e 5% (m/m) demonstrou atividade cicatrizante *in vivo* (WANG et al., 2011).

O primeiro medicamento fitoterápico resultante da bioprospecção do Bioma Cerrado, o Fitoscar®, é indicado como auxiliar no processo de cicatrização. Ele é produzido a partir do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e seu efeito curativo foi comprovado *in vivo* por Hernandez et al., 2010, que avaliaram a atividade cicatrizante de uma pomada contendo 1% do extrato em acetato de etila de *S. adstringens*. A formulação aumentou o número de mitoses das células das feridas em comparação com o controle, que recebeu apenas o veículo da pomada. Estima-se que os taninos presentes no extrato dessa planta sejam capazes de, devido a sua ação adstringente, aumentar o número de ligações entre as fibras de colágeno. Taninos também podem ser responsáveis por vasoconstrição, atividade antiinflamatória (KAPU et al., 2001; MOTA et al., 1985) e antimicrobiana (LOPES et al., 2005). Estas características também são relatadas como prováveis mecanismos de ação do medicamento Fitoscar®.

Para *S. pseudoquina*, a avaliação da atividade cicatrizante *in vivo* foi realizada por Honório-França et al. (2008) em ratos diabéticos, avaliando a microemulsão do extrato metanólico (2%) da entrecasca desta espécie vegetal. Os resultados não revelaram diferenças significativas entre ratos tratados com a microemulsão do extrato metanólico e ratos tratados com solução salina. Contudo, a presença de relatos de atividade cicatrizante para esta planta na medicina popular faz com que a compreensão de outros fatores relacionados com o processo de cicatrização devam ser investigados.

Neste ponto, deve-se observar que o teste de atividade cicatrizante realizado por Honório-França et al. (2008) foi conduzido sem a investigação da composição química do extrato metanólico da entrecasca. Diante da diversidade de fatores que podem causar alterações no perfil metabólico e, conseqüentemente, na produção de metabólitos secundários de espécies vegetais, novas investigações devem ser conduzidas. O estudo de Lage et al. (2013) demonstra que o fitocomplexo de *S. pseudoquina* pertence à classe dos flavonoides, que apresentaram atividade leishmanicida frente a *Leishmania brasiliensis*. Testes biológicos desta classe de compostos para a atividade cicatrizante com os compostos pertencentes à classe dos flavonoides presentes na casca desta espécie vegetal podem trazer resultados promissores, assim como para a espécie *Moringa oleífera* (MUHAMMAD et al., 2013).

O processo de cicatrização é muito complexo e pode estar relacionado a diversos fatores. Além da atividade proliferativa para fibroblastos, existem outros mecanismos pelos quais os extratos vegetais podem contribuir para o processo de cicatrização. Os extratos vegetais podem atuar, por exemplo, impedindo a proliferação microbiana no local da ferida. Ao apresentar atividade antibacteriana, os extratos auxiliam o sistema imune do hospedeiro a combater as infecções causadas por bactérias nas feridas. Quanto mais rapidamente a fase inflamatória associada à ferida for substituída pela fase de proliferação tecidual, menos radicais livres são gerados como resultado do combate travado entre o sistema imune e os microrganismos infectantes ali presentes. Isto contribui positivamente para o processo de cicatrização (SHAI, 2005).

A atividade antibacteriana, portanto, também pode estar intimamente relacionada à atividade cicatrizante observada *in vivo* pelos usuários de *S.*

pseudoquina. Deve-se destacar ainda que, mesmo que extratos vegetais não apresentem atividade cicatrizante *in vivo*, a inibição de microrganismos presentes nas feridas, por si só, pode contribuir para a adoção desta planta no combate às feridas pela medicina tradicional.

Em estudos que reúnem relatos etnobotânicos de espécies vegetais, a indicação de atividade cicatrizante de plantas medicinais pode ser encontrada facilmente (PIRIZ et al., 2014). Por outro lado, relatos etnobotânicos de atividade antibacteriana não são tão comuns. O conhecimento tradicional muitas vezes não dispõe de ferramentas para compreender os verdadeiros processos associados à cura de doenças. Desta forma, a etnofarmacologia, ramo que se dedica a comprovar farmacologicamente as atividades atribuídas às espécies vegetais pela medicina tradicional, deve realizar investigações mais aprofundadas em propriedades que podem estar diretamente associadas àquelas relatadas nos estudos etnobotânicos.

A investigação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais é de fundamental importância para o setor saúde. Na classe dos antibacterianos há uma necessidade permanente por novos fármacos. As infecções microbianas constituem uma das maiores causas de morte no mundo e, de forma natural, a adaptação destes microrganismos aos medicamentos utilizados atualmente é apenas uma questão de tempo (DEWIC, 2002).

O quadro torna-se ainda mais grave devido ao fato de que, apenas nesta última década, um novo antibiótico foi descoberto, a teixobactina (LING et al., 2015), decorridos nada menos do que 30 anos após a última grande classe de moléculas descobertas no setor, adaptomicina, antibiótico lipopeptídico (KIRKPATRICK et al., 2003).

Os agentes antibacterianos exploram as diferenças estruturais ou funcionais entre hospedeiro e parasita para atuarem positivamente em favor do hospedeiro. Desta forma, dividem-se em categorias relacionadas com seus mecanismos de ação: inibição da síntese da parede celular, danos funcionais à membrana celular, inibição da síntese ou função dos ácidos nucleicos, inibição da síntese proteica (GIGUÈRE et al., 2013) e inibição da síntese de lipídeos (LING et al., 2015).

Entre os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana em espécies vegetais estão incluídos: fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides,

taninos, cumarinas, terpenoides e alcalóides (COWAN, 1999). Porém, não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006). Aligianis et al (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL.

Recentemente, o grupo de pesquisadores da *University Distinguished*, liderado pelo Professor Kim Lewis, que identificou um novo antibiótico que não produziu traços de resistência ao ser utilizado em um experimento *in vivo*. Este composto, denominado teixobactina, é produzido por bactéria *Elephtheria terrae* (LING et al., 2015).

Pode-se dizer que as abordagens utilizadas para o desenvolvimento de novos antibacterianos incluem o desenvolvimento de análogos de moléculas já existentes, desenvolvimento de moléculas peptídicas provenientes de células fagocíticas, a busca por novos produtos naturais bioativos e a identificação de novos alvos. O presente trabalho contribui especificamente para estas duas últimas estratégias de descobrimento.

No que diz respeito aos antibacterianos provenientes de espécies vegetais, os cientistas trazem à reflexão o fato de que a escassez de doenças bacterianas em plantas selvagens indica o sucesso dos seus mecanismos de defesa em combater infecções patogênicas quando comparados aos sistemas imunes de mamíferos (LEWIS e ASUBEL, 2006).

Esta afirmação, à primeira vista, se contradiz com os achados de pesquisadores da área de bioprospecção de antibacterianos de origem vegetal. Comumente, percebem-se ordens de grandeza muito superiores para que extratos brutos alcancem níveis de inibição semelhantes a antibióticos de última geração, como exemplo: 250 µg/mL para inibições inferiores a 50% para 18 extratos de plantas frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis* enquanto a ampicilina inibiu completamente estas bactérias em concentrações de 1 a 50 µg/mL (JANTOVA et al., 2000); concentrações inibitórias mínimas de 128-1024 µg/mL para o extrato metanólico das sementes de *Urtica pilulifera* contra *Bacillus pumilus*, *Shigella* spp. e *Enterococcus gallinarum*, sendo que as

concentrações de MIC da ampicilina não foram superiores a 32 µg/mL para estas bactérias (KORPE et al., 2013).

Pois se há um grande sucesso no combate a infecções microbianas de toda ordem nos vegetais, por que as concentrações de seus extratos brutos se mostram tão acima das concentrações de antibióticos de última geração em estudos *in vitro*? Deve ser realizada uma análise mais aprofundada para que esta situação, muitas vezes considerada desencorajadora, possa dar lugar ao otimismo.

A vasta complexidade de constituintes químicos dos extratos vegetais, bioativos ou não em estudos *in vitro*, pode esconder um fenômeno que também estaria por trás do sucesso das plantas em se defenderem de patógenos bacterianos: o sinergismo. Acredita-se que, no vegetal, a seleção natural permitiu a prevalência de mecanismos de defesa baseados na ação combinada de diferentes compostos, diversificados estruturalmente, presentes em baixas concentrações e de menor atividade inibitória em detrimento de metabólitos de elevada atividade bactericida ou bacteriostática, produzidos em maior quantidade, porém menos diversificados estruturalmente (LEWIS e AUSUBEL, 2006).

Esta afirmação deve ser considerada plausível, visto que o desenvolvimento de resistência bacteriana para os compostos utilizados pelo homem no tratamento de doenças está diretamente relacionado com a frequência de utilização dos mesmos no combate às bactérias. Portanto, quanto maior a exposição das bactérias a compostos inibitórios, maior a possibilidade de surgimento de bactérias resistentes (WILLIAMS, 1999).

O uso combinado de compostos antibacterianos é uma alternativa para driblar os mecanismos de resistência. A atuação sinérgica entre compostos inibitórios pode permitir que as atividades individuais destes compostos sejam otimizadas (HEMAISWARYA et al., 2008). A partir disso, torna-se uma tarefa contraproducente tomar apenas as concentrações inibitórias mínimas *in vitro* (MIC) como estratégia de seleção de extratos ou frações promissoras para desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos.

O presente trabalho expõe, além da avaliação clássica da atividade inibitória dos extratos vegetais de *S. pseudoqina*, a avaliação do sinergismo entre um destes extratos e um β-lactâmico análogo da penicilina, a ampicilina.

Para a condução dos testes propostos por este estudo, optou-se pela abordagem *in vitro* para verificação das atividades biológicas no intuito de obter uma maior frequência de análise e utilizar uma menor quantidade de matéria prima para a produção de extratos vegetais. Os ensaios *in vitro* permitiram que as propriedades proliferativa (para fibroblastos) e antibacteriana dos extratos fossem avaliadas separadamente, diferentemente do que ocorre em experimentos de cicatrização *in vivo*, que permitem o estudo integral dos fatores relacionados com o processo de cicatrização. Contudo, acredita-se que os estudos *in vivo* devam ser limitados apenas para extratos que apresentem atividades biológicas *in vitro*, a fim de contribuir para a utilização ética da vida das cobaias envolvidas nos experimentos.

Desta forma, no presente estudo, foi realizada uma investigação *in vitro* para avaliar a capacidade estimulatória da proliferação de fibroblastos de um extrato de *S. pseudoquina* enriquecido em flavonoides. Também foi avaliada a atividade antibacteriana para os extratos de *S. pseudoquina* frente a bactérias Gram positivas e negativas de interesse médico/veterinário. Além da perspectiva de que estas atividades possam ser as principais responsáveis pela utilização de *S. pseudoquina* pela medicina popular na cura de feridas, a busca por produtos naturais de atividade antimicrobiana constitui um ramo promissor para a atuação dos bioprospectores.

A metodologia adotada neste trabalho, portanto, teve o intuito de selecionar previamente os extratos biologicamente ativos para posteriores ensaios *in vivo*. Estes extratos apresentam, teoricamente, maiores possibilidades de se tornarem fitoterápicos promissores.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GERAL

Biomonitorar a atividade proliferativa de fibroblastos e o potencial antibacteriano de extratos de *S. pseudoquina* A.St.-Hil.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do extrato em acetato de etila das cascas (enriquecido em flavonoides) empregando o teste de proliferação celular *in vitro* em culturas celulares de fibroblastos humanos;
- Avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos: etanólico bruto, extrato hexânico, extrato em acetato de etila, extrato etanólico desengordurado, extrato alcaloídico e extrato aquoso das cascas e folhas de *S. pseudoquina* frente às cepas de bactérias Gram positivas e negativas;
- Realizar o estudo da capacidade antibacteriana quando o extrato em acetato de etila das cascas é utilizado em associação a um antibiótico β -lactâmico de segunda geração (ampicilina).

3.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.3.1. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi anteriormente descrito no item 2.3.1 do Capítulo I.

3.3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos orgânicos e alcaloídico de *S. pseudoquina* foram obtidos segundo os itens 2.2.3.1 e 2.3.2.2 do Capítulo I, respectivamente.

Os extratos aquosos das cascas e folhas foram obtidos por decocção (40 °C) acompanhada de sonicação (Sonicador Unique®), por 30 min, de 10 g de droga vegetal em 10 mL de água destilada.

3.3.3. SOLVENTES, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Todos os solventes utilizados possuíam grau P.A. das marcas Vetec®, ECIBRA®, ISOFAR®, NEON®, e Êxodo®.

A ampicilina utilizada foi adquirida do laboratório INLAB: ampicilina sal sódica, nº CAS 68-52-3.

O meio LB (LB BROTH, MILLER), utilizado tanto na forma sólida (acompanhado de ágar: Dinâmica®) quanto na líquida, foi adquirido do laboratório Acumedia®.

As placas de cultivo de 96 poços e as placas de petri descartáveis utilizadas nos testes foram Costar®.

O leitor ELISA Multiskan Go, Thermo Scientific. A centrífuga de placas Heraeus Multifuge X1R Centrifuge (Thermo Scientific).

3.3.4. BIOMONITORAMENTO DAS FRAÇÕES

Com a finalidade de biomonitorar a atividade dos diferentes extratos das folhas e das cascas de *S. pseudoquina*, estes foram testados frente às atividades antibacteriana e indutora da proliferação de fibroblastos.

3.3.4.1. AVALIAÇÃO *in vitro* DO ESTÍMULO À PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS PELO EXTRATO DE *S. pseudoquina* ENRIQUECIDO EM FLAVONOIDES

O teste de estimulação da proliferação foi adaptado de Ponnusamy et al. (2015). O meio de cultura utilizado para cultivo e manutenção das células foi o RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado (SFB, 10%), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os fibroblastos humanos (NIH3T3) foram mantidos em estufa, a 37° C, num ambiente enriquecido por CO₂ a 5%.

As células estoque, em crescimento subconfluente, foram centrifugadas e ressuspensas em uma garrafa de cultivo contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão de células foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e definição do volume de inóculo.

As células foram inoculadas a uma concentração de 5000 células por poço em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada por apropriadamente 24 h, em estufa, a 37° C, 5% CO₂, permitindo que as células se aderissem e se espalhassem nos poços. O meio de cultura anteriormente adicionado (RPMI, 10% SFB) foi então substituído por meio novo acrescido dos extratos das

cascas e folhas de *S. pseudoquina* e de dois compostos anteriormente isolados de seu extrato em acetato de etila (SPEA1 e SPEA2). As concentrações utilizadas no teste foram de 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 mg/mL para todos os extratos das cascas (EHC – Extrato Hexânico das Cascas, EAEC – Extrato em Acetato de Etila das Cascas, EEDC – Extrato Etanólico Desengordurado das Cascas e EEBC – Extrato Etanólico Bruto das Cascas) e folhas (EHF – Extrato Hexânico das Folhas, EAEF – Extrato em Acetato de Etila das Folhas, EEDF – Extrato Etanólico Desengordurado das Folhas e EEBF – Extrato Etanólico Bruto das Folhas). Esses extratos foram obtidos conforme item 2.3.2.1 do Capítulo I. Os compostos isolados SPEA1 e SPEA2 foram adicionados nas concentrações 10, 5, 2,5, 1,2 e 0,6 mg/mL.

Como controles, foram adicionados meio RPMI com diferentes concentrações de SFB. Os controles positivo fizeram uso de meio RPMI com 20% e 10% de soro fetal bovino, já o controle negativo, utilizou a concentração de 0,5% de soro fetal bovino. Como o SFB é um estimulante do crescimento, as diferentes concentrações presentes nos poços podem indicar as condições iniciais de cultivo (concentração de 0,5%) e a condição de estímulo à proliferação (10 e 20%) para comparação com o extrato.

Após a adição do meio novo acrescido das diferentes concentrações dos extratos e de SFB, a placa foi então incubada nas mesmas condições por mais 48h. Depois de incubada, foram adicionados 10 µL de solução contendo o indicador MTT na concentração de 5 mg/mL. Após a adição do indicador MTT, as placas foram incubadas por mais 4h. As placas tiveram seu conteúdo esgotado em descarte adequado e, aos poços, foram adicionados 200 µL de DMSO. O DMSO permitiu a lise celular e, conseqüentemente, a liberação do indicador colorimétrico derivado do MTT. A quantificação do indicador foi realizada em leitor ELISA em $\lambda = 540$ nm.

Foram construídos gráficos para indicar o efeito produzido pelas diferentes concentrações dos estímulos em relação ao padrão (% de viabilidade celular). A comparação entre os valores de absorbância adquiridos após o MTT foi utilizada para comparação estatística entre os tratamentos (teste-T) com $\alpha = 5\%$.

3.3.4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. pseudoquina* FRENTE AOS MICRORGANISMOS GRAM POSITIVOS E NEGATIVOS

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foram utilizadas bactérias Gram positivas e Gram negativas (Tabela 9). A triagem utilizada foi uma adaptação do teste de difusão em disco, Kirby-Bauer, descrito na Farmacopeia Brasileira, 4ª Ed. (1988). As bactérias foram plaqueadas (*pour plate*, $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL) e foram perfurados poços nos meios de cultura com auxílio de uma bomba de vácuo.

Aos poços foram adicionados 10 µL dos extratos orgânicos, dissolvidos em 1 mL de DMSO 100%. Para o teste da atividade inibitória dos extratos aquosos (decoções das cascas e folhas), foram aplicados 10 µL das decoções diretamente nas placas. Foram utilizados poços para controle de toxicidade do DMSO, com 10 µL de DMSO 100% e controle positivo, utilizando 10 µL de ampicilina 1 mg/mL. A atividade inibitória foi verificada pela presença de halo de inibição.

Tabela 9: Microrganismos utilizados para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos das cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina*.

Gram Positivos	Gram Negativos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 33591
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29004
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23858	<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238
<i>Listeria innocua</i> ATCC 7644	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13325
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525

3.3.4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) EM *B. cereus*, *S. aureus* e *P. fluorescens*

A determinação da concentração inibitória mínima se deu pelo método padrão de microdiluição (CLSI, 2003) utilizando placas de cultivo de 96 poços.

Os extratos foram diluídos em DMSO e posteriormente incorporados em tampão fosfato (PBS) para alcançarem o volume de 100 µL. Após as diluições seriadas dos extratos, foram adicionados aos poços 100 µL de meio novo acrescido de bactérias.

A avaliação da solubilidade dos extratos em tampão fosfato (PBS), para que pudessem ser estabelecidas as concentrações solúveis nos poços das placas de cultivo, revelou que estes apresentavam solubilidade em concentrações de aproximadamente 1 mg/mL. Em concentrações superiores foi observada a formação de precipitado nos poços. Desta forma, foram realizadas diluições seriadas dos extratos à partir da concentração de 1000 µg/mL.

A preparação dos extratos e as diluições alcançadas nos poços se deu da seguinte forma:

- a) Foram pesados 10 mg de cada extrato e dissolvidos em DMSO 100%. 240 µL desta solução mãe foram adicionados a 960 µL de PBS, tornando-se uma solução de volume 1200 µL com concentração 2 mg/mL. Foram tomados 600 µL desta solução para a diluição seriada em outros 5 microtubos contendo 600 µL de PBS cada. Este procedimento resultou na obtenção de 6 microtubos, contendo 600 µL cada, com concentrações de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente.
- b) Aos poços das placas foram adicionados 100 µL de meio novo acrescido de microrganismos e 100 µL de cada uma das diluições dos extratos preparadas anteriormente nos microtubos, o que diminui sua concentração pela metade. Portanto, as concentrações obtidas para os extratos nos poços da placa de cultivo foram de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL e 31,2 µg/mL, respectivamente.

A ativação dos microrganismos das culturas estoque foi realizada pela em meio LB líquido *overnight* em estufa a 37 °C. As bactérias recém ativadas foram utilizadas para o preparo dos inóculos das placas. Aos inóculos foram acrescidas bactérias até que a leitura da absorbância do meio novo acrescido de bactérias em $\lambda = 620$ nm alcançasse o valor 0,08 ($DO_{620} = 0,08$), correspondendo a 0,5 da escala de McFarland (concentração de $1,5 \cdot 10^8$

UFC/mL). A inoculação dessa concentração de bactérias teve o intuito de verificar a potencialização da ampicilina em concentrações subinibitórias, pois com este valor de concentração não houve atividade inibitória da ampicilina em todas as concentrações testadas do antibiótico.

Para avaliar inibição bacteriana devido à presença do DMSO como solvente dos extratos foi realizado o controle de toxicidade do DMSO. Nos poços destinados a este controle de toxicidade foram adicionadas soluções de DMSO que permitissem que a concentração deste solvente alcançasse as mesmas concentrações presentes nos poços contendo os extratos.

A concentração inibitória mínima da ampicilina também foi avaliada neste estudo, servindo de base para a avaliação posterior do sinergismo entre este antibiótico e os extratos bioativos.

A soluções de controle positivo e controle de toxicidade do solvente DMSO foram preparadas como descrito a seguir:

- a) 140 μ L de uma solução de ampicilina 1 mg/mL foram transferidos para um microtubo e a este foram adicionados 1060 μ L de PBS, totalizando um volume de 1200 μ L de concentração 116,6 μ g/mL .
- b) Foram tomados 600 μ L desta solução para a diluição seriada em outros 5 microtubos contendo 600 μ L de PBS cada. Este procedimento resultou na obtenção de 6 microtubos contendo 600 μ L cada com concentrações de 117 μ g/mL 58,3 μ g/mL, 29,1 μ g/mL, 14,4 μ g/mL, 7,2 μ g/mL e 3,6 μ g/mL, respectivamente.
- c) Aos poços das placas foram adicionados 100 μ L meio novo acrescido de microrganismos e 100 μ L de cada uma das diluições preparadas anteriormente, o que diminui sua concentração pela metade. Portanto, as concentrações obtidas para a ampicilina nos poços da placa de cultivo são de 58,3 μ g/mL, 29,1 μ g/mL, 14,4 μ g/mL, 7,2 μ g/mL, 3,6 μ g/mL e 1,8 μ g/mL, respectivamente.
- d) O controle de toxicidade ao DMSO foi preparado adicionando-se 240 μ L de DMSO em 960 μ L de PBS, originando uma solução 20% DMSO de volume total 1200 μ L. Foram tomados 600 μ L desta solução para a diluição seriada em outros 5 microtubos contendo 600 μ L de PBS cada. Este procedimento resultou na obtenção de 6 microtubos contendo 600 μ L cada com

concentrações de 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 % de DMSO, respectivamente.

- e) Aos poços das placas foram adicionados 100 µL de meio novo acrescido de bactérias e 100 µL de cada uma das diluições preparadas anteriormente, o que diminui sua concentração pela metade. Portanto, as concentrações obtidas para o DMSO nos poços da placa de cultivo são de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,31% de DMSO, respectivamente.

As placas contendo os inóculos, os extratos e os controles de toxicidade testados foram incubadas por 18 horas em estufa a 37 °C. Após a incubação, como descrito em Gavrish et al. (2014), 30 µL de resazurina foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas novamente, por mais 2 horas, nas mesmas condições, para a viragem do indicador. A resazurina sofre redução, tornando-se resorufina (Figura 15) na presença de metabólitos produzidos durante a multiplicação microbiana.

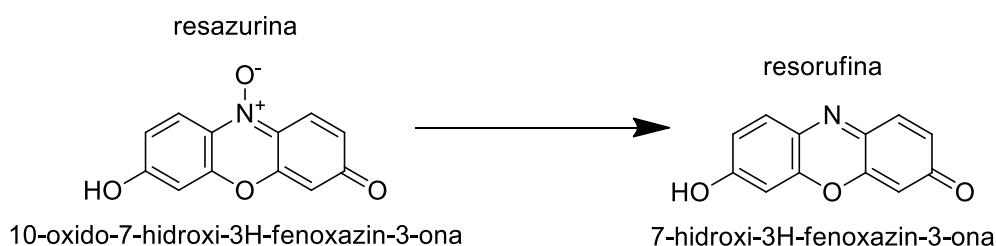


Figura 15: Redução da resazurina (responsável pela coloração azul) a resorufina (responsável pela coloração rosa).

Após a adição da resazurina e a incubação para a viragem do indicador esperava-se que a observação da coloração dos poços devido à presença dos indicadores resazurina/resorufina serviria como critério para avaliação do efeito inibitório das amostras e controles testados, como observado em Sarker et al. (2007). Porém, a presença de coloração amarelada nos poços contendo extratos impediu a observação adequada da coloração azul, típica da inibição do crescimento bacteriano. A verificação da cor rosa nos poços, tipificando sobrevivência das bactérias, também foi prejudicada pela cor dos constituintes dos extratos.

Logo, o método de verificação do crescimento bacteriano teve de ser adaptado. A coloração azulada, que indica a inviabilização do crescimento bacteriano pelo extrato, deve-se à prevalência de resazurina que não é

reduzida pelos metabólitos produzidos durante a multiplicação dos microrganismos. Já a coloração rosa, se dá pela abundância de resorufina, resultado da redução da resazurina por esses metabólitos produzidos durante o crescimento microbiano.

A verificação da absorbância do indicador em leitor ELISA visando a identificação específica da presença destes indicadores poderia, portanto, substituir a verificação visual da coloração azul ou rosa presente nos poços, indicando, de forma mais específica, a quantidade restante de resazurina ou a quantidade formada de resorufina, desde que os constituintes dos extratos não possuam absorção no mesmo comprimento de onda escolhido para a verificação dos indicadores de crescimento. Esta prática permite ainda que atividades parcialmente inibitórias sejam mensuradas. Os valores de absorbância adquiridos podem indicar, por exemplo, as concentrações de compostos inibitórios capazes de inibir 50% ou 90% dos microrganismos adicionados aos poços.

Os comprimentos de onda de maior absorção para as duas formas do reagente indicador utilizados neste estudo foram adotados segundo Bueno et al. (2002): 350-480 nm para a resorufina e 602 nm para a resazurina. A fim de determinar a interferência dos compostos presentes nos extratos para os comprimentos de onda específicos dos indicadores de crescimento, os extratos foram então diluídos nas mesmas concentrações utilizadas no teste e tiveram suas absorbâncias medidas em $\lambda = 350, 590, 480$ e 602 nm em leitor ELISA. Os constituintes dos extratos não apresentaram absorção em 602 nm, sendo este comprimento de onda escolhido para a determinação da prevalência da resazurina nos poços.

Portanto, se a absorbância para $\lambda = 602$ nm encontrada para os poços contendo os extratos for superior aos valores de absorbância encontrados para o controle de toxicidade do DMSO conclui-se que houve inibição do crescimento microbiano. Por outro lado, se a absorbância neste comprimento de onda for semelhante àquela encontrada nos poços onde foi realizado o controle de toxicidade do DMSO, conclui-se que o extrato não foi capaz de inibir a multiplicação bacteriana.

Após a escolha do comprimento de onda ideal, outros fatores relacionados com a absorção da luz nos poços precisaram ser considerados,

como a formação de aglomerados de células após a incubação das placas e, ocasionalmente, a formação de precipitados nos poços. A fim de evitar que houvesse absorção da luz nestas situações, o que poderia ocasionar resultados falso positivos, introduziu-se uma etapa de centrifugação das placas de cultivo, com posterior recolhimento do sobrenadante para outra placa de iguais proporções e, só então, a verificação da absorbância dos poços em leitor ELISA.

Após a etapa de incubação e viragem da resazurina, as placas foram então centrifugadas por 15 min a 4000 RPM. Posteriormente, 100 µL do sobrenadante de cada um dos poços foram transferidos para as mesmas posições de poços de outra placa de cultivo adequadamente higienizada. A absorbância dos poços das placas contendo o sobrenadante foi então adquirida em leitor ELISA em $\lambda=602$ nm, permitindo a verificação do crescimento microbiano.

Gráficos contendo os valores de absorbância obtidos no comprimento de onda específico da resazurina (602 nm) versus as concentrações de extrato testadas foram gerados .

3.3.4.4. AVALIAÇÃO DO SINERGISMO PELO MÉTODO *CHECKBOARD* ASSOCIADO À CONSTRUÇÃO DE ISOBOLOGRAMAS

A metodologia *checkboard* foi adaptada de forma a atender às particularidades das bactérias testadas. Para este teste, devem estabelecer concentrações de interesse que são os MICs das amostras testadas na ampicilina. Como o teste foi realizado para verificar a atuação do extrato em associação a ampicilina, as concentrações de ampicilina testadas para este antibiótico foram subinibitórias. As concentrações de interesse para os testes de sinergismo nos microrganismos testados foram estabelecidas empiricamente a fim de demonstrar os menores valores de antibiótico em que se encontrava atividade sinérgica.

Para este estudo, o extrato em acetato de etila (EAEC) foi selecionado para atuar sinergicamente com a ampicilina, devido aos resultados obtidos anteriormente (itens 3.3.4.1., 3.3.4.2. e 3.3.4.3. deste mesmo Capítulo).

EAEC foi utilizado nas concentrações inibitórias mínimas adequadas ao teste (2x o MIC e 1x o MIC, 2000 e 1000 µg/mL, respectivamente), sendo a concentração de interesse estabelecida em 1000 µg/mL. Para EAEC fez-se necessário demonstrar as concentrações onde havia inibição completa do crescimento. De outra forma, não poderiam ser adquiridos valores de absorbância indicando eliminação dos microrganismos nos poços. A utilização de EAEC nas concentrações de 1xMIC (1000 µg/mL) e 2xMIC (2000 µg/mL) serviram, então, como um padrão para a visualização da inibição completa dos microrganismos.

Para a diluição das soluções de antibiótico, foram adicionados 200 µL em concentração de 8x a concentração de interesse nos 6 poços da linha A, na placa de cultivo de 96 poços (Figura 16). Aos demais poços foram adicionados 100 µL de PBS e em seguida houve a diluição seriada de 100 µL com auxílio de uma pipeta multicanal, da fileira superior para a fileira inferior, com o descarte da solução após o preenchimento da fileira E. As concentrações de interesse para a ampicilina variaram de acordo com as bactérias testadas (*P. fluorescens*, 58,2 µg/mL e *S. aureus*, 115,8 µg/mL). A concentração de interesse para EAEC foi de 1000 µg/mL para ambas as bactérias.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	8X	8X	8X	8X	8X	8X		
B	4X	4X	4X	4X	4X	4X		
C	2X	2X	2X	2X	2X	2X		
D	1X	1X	1X	1X	1X	1X		
E	1/2X	1/2X	1/2X	1/2X	1/2X	1/2X		
F	0X	0X	0X	0X	0X	0X		

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		
B	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		
C	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		
D	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		
E	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		
F	8X	4X	2X	1X	1/2X	0X		

Figura 16: Diluições adotadas para o antibiótico (esquerda) e os extratos (direita) testados na avaliação do sinergismo por meio da metodologia *checkboxboard* (x= concentração de interesse).

Para os extratos, aos 6 poços (A a F) anteriormente preenchidos com 100 µL da diluição seriada da solução de antibiótico, na coluna 1 da placa de cultivo, foram adicionados volumes de 100 µL de solução de extrato a 8x a concentração de interesse (Figura 16). Foi realizada a diluição seriada da esquerda para a direita, com o descarte da solução após o preenchimento da coluna 5.

Após as diluições, foram adicionados 100 µL de meio novo acrescido de bactérias, como descrito no item 3.3.4.2, em todos os poços. Isto fez com que as concentrações de interesse adotadas para o extrato e para a ampicilina tenham se diluído 4x após a adição do meio contendo bactérias nos poços (Figura 17):

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	2X 2X	2X 1X	2X 1/2X	2X 1/4X	2X 1/8X	2X		
B	1X 2X	1X 1X	1X 1/2X	1X 1/4X	1X 1/8X	1X		
C	1/2X 2X	1/2X 1X	1/2X 1/2X	1/2X 1/4X	1/2X 1/8X	1/2X		
D	1/4X 2X	1/4X 1X	1/4X 1/2X	1/4X 1/4X	1/4X 1/8X	1/4X		
E	1/8X 2X	1/8X 1X	1/8X 1/2X	1/8X 1/4X	1/8X 1/8X	1/8X		
F	2X	1X	1/2X	1/4X	1/8X	0 e 0		

Figura 17: Esquema de diluições das amostras nos poços após as diluições seriadas de ampicilina e EAEC para o método *checkboxboard*. Concentrações de ampicilina em azul e do extrato em laranja (x= concentração de interesse).

As placas foram incubadas por 18h a 37 °C. A avaliação do crescimento foi realizada pela adição de 30 µL do indicador resazurina em cada poço, incubação por mais 2h, centrifugação da placa por 15 min a 4000 RPM, posterior retirada de 100 µL do sobrenadante e transferência deste volume para outra placa de cultivo de 96 poços. A determinação da absorbância dos poços foi realizada em leitor ELISA em 602 nm (conforme item 3.3.4.2.).

Para a verificação das interações entre as amostras testadas (EAEC e ampicilina), além da visualização dos poços de cultivo com o indicado de viragem (resazurina), foi utilizada a construção de isobogramas adaptada de BERENBAUM, 1989. Os eixos do gráfico de isobograma representam as doses dos agentes aplicados individualmente. As maiores concentrações aplicadas ao teste de inibição dos microorgsnismos, em separado, foram conectadas por uma linha. As menores concentrações dos ativos capazes de produzir efeito inibitório em associação foram marcadas como pontos no gráfico.

É esperado que, se os agentes não possuírem interação, os pontos marcados no isoblograma com as combinações de compostos produzam linhas retas, interligando os dois eixos. A equação que permite a comprovação da inexistência de interação entre os compostos testados é a seguinte:

$$\frac{da}{Da} + \frac{db}{Db} = 1$$

Nesta equação, *da* refere-se à dose de um dos compostos da associação no sinergismo e *Da*, por sua vez, refere-se à dose necessária do mesmo composto, utilizado em separado, para atingir a atividade biológica esperada. *db* e *Db* são as doses do outro composto utilizado, também encontradas na associação (*db*) e em separado (*Db*). No presente estudo, a atividade biológica avaliada foi a inibição do crescimento bacteriano.

Para avaliar a associação sinérgica entre os compostos testados esta equação deixa de ser uma igualdade. Como neste caso as concentrações dos compostos para atingir o mesmo efeito inibitório esperado são menores, a equação anterior torna-se a seguinte expressão:

$$\frac{da}{Da} + \frac{db}{Db} < 1$$

Portanto, se os valores encontrados com o cálculo das concentrações sinérgicas e unitárias dos compostos estiverem de acordo com a expressão acima, o isoblograma passa a apresentar pontos abaixo da linha que conecta os valores de doses máximas aplicadas nos eixos do gráfico.

Como é de se esperar, para caracterizar o antagonismo, a expressão utilizada é o inverso daquela apresentada anteriormente para o sinergismo:

$$\frac{da}{Da} + \frac{db}{Db} > 1$$

Nesta situação, os pontos do gráfico de isoblograma com as concentrações de compostos que causaram efeito inibitório estão localizados

acima da linha que conecta as concentrações máximas aplicadas no teste para as duas amostras utilizadas (EAEC e ampicilina).

Para a elaboração dos isobologramas foram escolhidos apenas os pontos em que houve as menores concentrações em associação das duas amostras testadas (EAEC e ampicilina).

3.3.5. TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS

Os resultados dos testes biológicos dos extratos foram comparados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e Teste t de Student, quando aplicáveis. A relação entre as atividades biológicas testadas e as concentrações de flavonoides nos extratos foi analisada por correlação de Pearson. O software empregado para realizar as análises estatísticas foi o Graphpad PRISM®, versão 5.0.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos utilizados foram anteriormente descritos no item 2.4.1 do Capítulo I.

3.4.2. ATIVIDADE PROLIFERATIVA DE FIBROBLASTOS

Após a utilização do MTT para verificação da proliferação dos fibroblastos, foi construído o gráfico de absorbância versus concentrações dos estímulos adicionados aos poços que apresentaram atividade maior ou semelhante ao controle positivo (SFB 10%) (Figura 18). O EHC (extrato hexânico das cascas) e os extratos das folhas (EHF – extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folhas), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBF (extrato etanólico bruto das folhas) não apresentaram atividade proliferativa. Pode-se perceber que EAEC, nas

concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL foi eficaz, apresentando atividades proliferativas maiores que o controle positivo (SFB a 10%), assim como o composto isolado SPEA1 (quercetina-3-O-metil-éter) (100 e 50,0 µg/mL) e o SPEA2 (estrichnobiflavona) (100 µg/mL), que foram mais eficientes que o controle positivo. Foram encontradas atividades proliferativas semelhantes ao controle positivo no EEDC (500 µg/mL), EEBC (500 e 250 µg/mL) e SPEA2 (50,0 µg/mL).

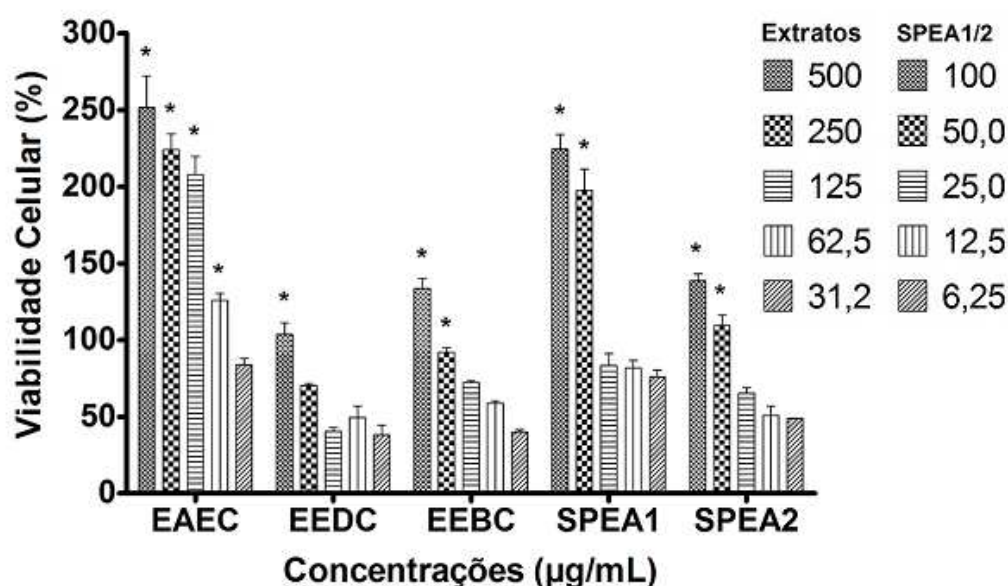


Figura 18: Efeito dos extratos das cascas (EAEC, EEDC, EEBC) e dos compostos quercetina-3-O-metil-éter (SPEA1) e estrichnobiflavona (SPEA2) na proliferação dos fibroblastos NIH3T3. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com base no valor de referência do controle positivo (10% SFB). *indica $p < 0,05$ em comparação ao controle positivo para os valores de absorbância encontrados no teste MTT.

Nota: EAEC - extrato em acetato de etila das cascas, EEDC - extrato etanólico desengordurado das cascas, EEBC - extrato etanólico bruto das cascas, SPEA1/2 - quercetina-3-O-metil-éter e estrichnobiflavona, SFB - soro fetal bovino.

A capacidade de extratos vegetais enriquecidos em flavonoides em contribuir positivamente nos processos de cicatrização (*in vitro* e *in vivo*) pode ser encontrada para outras drogas vegetais que apresentam essa classe de metabólitos: *Moringa oleifera* (MUHAMMAD et al., 2013), *Tephrosia purpurea* (LODHI et al., 2013), *Martynia annua* (LODHI et al., 2013), *Bixa orellana*, *Eupatorium triplinerve*, *Physalis peruviana* e *Equisetum arvense* (GUTIERREZ et al., 2010).

A avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico (Soxhlet) das cascas (80 g de DV moída) de *S. pseudoquina* incorporado a uma

microemulsão (0,6 g de extrato etanólico seco em 30 mL de microemulsão água/óleo) em ratos (feridos, com auxílio de bisturi nº 24, em um corte longitudinal de 1 cm) foi realizada por Honório-França et al. (2008). O tratamento se deu pela administração de 0,2 mL da microemulsão a 2% de extrato etanólico diariamente, por 14 dias (utilizando salina como controle), revelando não haver diferença significativa entre os ratos tratados com o microemulsão e os ratos controle.

A diferença encontrada entre o resultado do presente trabalho e aquele realizado por Honório-França et al. (2008) quanto a atividade biológica envolvida no processo de cicatrização de extratos de *S. pseudoquina* pode ser explicada, em parte, pelo emprego de diferentes solventes extratores no processo de produção dos extratos e, conseqüentemente, um aumento na concentração de compostos ativos. O EAEC apresentou, constitutivamente, uma maior concentração de flavonoides em comparação com os demais extratos (EEDC e EEBC), conforme apresentado nos itens 2.4.3 e 2.4.4 do Capítulo 1.

Os resultados do presente trabalho demonstram a vantagem na realização de estudos farmacológicos baseados no uso popular de plantas medicinais como descrito em Cordell (2011). Uma abordagem bioguiada permitiu a identificação da atividade biológica em comparação aos dados provenientes da literatura. A utilização das cascas de *S. pseudoquina* para o tratamento de feridas relatada em Grandi et al. (1989) durante um levantamento etnofarmacológico com raizeiros que faziam uso dessa espécie vegetal encontra, portanto, respaldo científico. Pode-se demonstrar ainda que a utilização do extrato em acetato de etila (EAEC) é tão interessante quanto o uso de compostos isolados desse extrato para estudos *in vivo* quanto a atividade biológica testada, porém a obtenção do EAEC é muito menos laboriosa, permitindo que futuros testes *in vivo* possam ser realizados diretamente com o extrato.

3.4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos encontram-se na Tabela 10. Apenas as linhagens de *Staphylococcus aureus*,

Bacillus cereus e *Pseudomonas fluorescens* (estas duas últimas ilustradas na Figura 19) mostraram-se sensíveis aos extratos devido a presença de halos de inibição. As frações EAEC, EEBC e EEDC apresentaram halos de inibição com diâmetros diferentes.

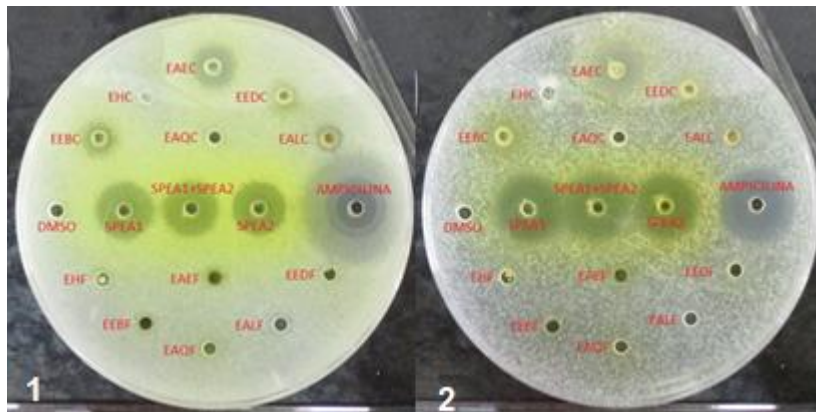


Figura 19: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina* frente às bactérias *Bacillus cereus* ATCC 14579 (1) e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (2). Nota: EHC (extrato hexânico das cascas), EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EAQC (extrato aquoso das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas), EHF (extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folhas), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBCF (extrato etanólico bruto das folhas), EAQF (extrato aquoso das folhas), EALF (extrato alcaloídico das folhas), SPEA 1 (quercetina-3-O-metil éter), SPEA 2 (estrichnobiflavona), DMSO (dimetilsulfóxido), AMP (ampicilina).

Ao serem avaliados os resultados do *fingerprint* (item 2.4.3 do Capítulo I) e da concentração de flavonoides totais (item 2.4.4, do Capítulo I) para os extratos ativos (EAEC, EEDC e EEBC) pode-se perceber que existe uma relação entre a atividade antibacteriana observada e o teor de flavonoides presente nos extratos.

O maior halo de inibição foi encontrado para EAEC, quando comparado com os extratos EEBC e EEDC. Os flavonoides quercetina-3-O-metil-éter (SPEA 1) e estrichnobiflavona (SPEA2), presentes nestes três extratos e anteriormente descritos no item 2.4.3, também foram capazes de inibir as bactérias testadas (Figura 21).

A concentração de flavonoides totais é maior em EAEC (181,58 mg/g de extrato) quando comparada a EEDC e EEBC (18,13 e 97,3 mg/g de extrato, respectivamente). Isso pode explicar a diferença entre os halos de inibição observados para os extratos da casca. O resultado do *fingerprint* (item 2.4.3 do Capítulo I) mostra que estrichnobiflavona e quercetina-3-O-metil-éter estão mais concentrados no EAEC comparados aos demais extratos. Desta forma,

sugere-se que as atividades biológicas verificadas no teste de triagem da atividade antibacteriana estejam diretamente relacionadas com o conteúdo de flavonoides presentes neste extrato. O extrato EAEC tornou-se, então, um candidato ao teste de sinergismo, que será descrito posteriormente.

Tabela 10: Resultados dos testes de presença de halos de inibição (mm) dos diferentes extratos de *Strychnos pseudoquina* frente às cepas bacterianas testadas.

BACTÉRIAS	EHC	EAEC	EEDC	EEBC	EAQC	EALC	EHF	EAEF	EEDF	EEBF	EAQF	EALF	SPEA 1	SPEA 2	AMP
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	8,73	-	6,00	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	12,6	8,75
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23858	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,40
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,56
<i>Listeria innocua</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,80
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 33591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,74
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,34
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	-	9,00	4,30	7,05	-	-	-	-	-	-	-	-	11,3	12,0	5,58
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,45
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,8
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,00
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,79
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	-	8,57	4,28	6,24	-	-	-	-	-	-	-	-	12,1	14,4	11,5

Nota: EHC (extrato hexânico das cascas), EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EAQC (extrato aquoso das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas), EHF (extrato hexânico das folhas), EAEF (extrato em acetato de etila das folhas), EEDF (extrato etanólico desengordurado das folhas), EEBF (extrato etanólico bruto das folhas), EAQF (extrato aquoso das folhas), EALF (extrato alcaloídico das folhas), SPEA 1 (quercetina-3-O-metil éter), SPEA 2 (estrichnobiflavona), AMP (ampicilina). O DMSO, utilizado na solubilização dos extratos, não apresentou halo de inibição nas bactérias testadas.

Para as bactérias sensíveis aos flavonoides de *S. pseudoquina* (*B. cereus*, *S. aureus* e *P. fluorescens*) foram então submetidas ao teste de concentração inibitória mínima no item 3.4.2 deste Capítulo, utilizando os extratos EAEC, EEDC E EEBC.

O extrato alcaloídico da casca (EALC) também foi utilizado no teste de determinação da concentração inibitória mínima por ter apresentado um halo de inibição discreto frente a *B. cereus* durante a avaliação da atividade antimicrobiana (Figura 20).

Em Muhammad et al. (2013), o teste de disco-difusão do extrato em acetato de etila da raiz da espécie *Moringa oleifera*, para determinação da atividade antibacteriana, demonstrou atividade inibitória contra *S. aureus*, *B. megaterium* e *P. fluorescens* (6,25 mg/mL).

Como observado para *S. pseudoquina*, o extrato em acetato de etila apresenta maior teor de flavonoides em relação aos demais extratos avaliados (item 2.4.3 do Capítulo I). No presente trabalho, *P. fluorescens* também foi inibida por EAEC de *S. pseudoquina*, indicando que essa bactéria pode ser sensível aos flavonoides presentes nesse extrato. Observou-se ainda que os extratos EAEC, EEBC e EDC apresentaram halos de diâmetros diferentes na inibição de *P. fluorescens* (Tabela 10).

3.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE EAEC, EEDC, EEBC E EALC EM *B. cereus*, *S. aureus* E *P. fluorescens*

Os valores de absorbância encontrados em 602 nm foram utilizados para elaborar gráficos de inibição da multiplicação bacteriana (Figuras 22 e 23) em *P. fluorescens* e *S. aureus*.

A atividade inibitória em *B. cereus* não pôde ser corretamente avaliada devido à toxicidade do DMSO para esta bactéria quando o solvente foi utilizado na concentração de 5% para diluir os extratos. O controle de toxicidade celular do DMSO para esta bactéria apresentou inibição do crescimento microbiano, inviabilizando a determinação da atividade dos extratos testados na concentração de 1000 µg/mL.

Por outro lado, *P. fluorescens* não apresentou a mesma sensibilidade ao DMSO (resistiu ao solvente orgânico utilizado no preparo das amostras), permitindo que as inibições causadas pelos extratos e pela ampicilina fossem avaliadas adequadamente. EAEC, EEDC e EEBC foram capazes de inibir a multiplicação de *P. fluorescens* na concentração de 1000 µg/mL, porém os níveis de inibição foram diferentes para os três extratos (Figura 20), assim como foram observados diferentes diâmetros dos halos de inibição formados para estes extratos frente à *P. fluorescens* no teste de triagem da atividade antibacteriana (item 3.4.1. deste Capítulo). A inibição provocada nesta bactéria parece depender das concentrações de flavonoides presentes em cada um dos extratos testados.

S. aureus, da mesma forma que *P. fluorescens*, pôde ser avaliado de forma adequada devido à inocuidade da concentração de DMSO utilizada para diluir os extratos, porém esta bactéria apresentou níveis similares de inibição para os extratos EAEC, EEDC e EBEC e um valor discreto de inibição para EALC (Todos na concentração de 1000 µg/mL) (Figura 21), indicando que os alcalóides presentes em *S. pseudoquina* não apresentam atividade antibacteriana frente às cepas avaliadas.

A concentração inibitória mínima da ampicilina para *P. fluorescens* foi encontrada na concentração de 1000 µg/mL de ampicilina. Já *S. aureus* não foi inibido por concentrações inferiores a 4000 µg/mL, indicando que estas cepas não puderam ser inibidas quando inoculadas nos poços na concentração de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Isso se dá pela expressão de fatores de resistência que são adquiridos em contato com antibiótico e transmitidos para as gerações posteriores de bactérias.

Sabe-se que os antibióticos β-lactâmicos, introduzidos nos anos 40, são inibidores da transpeptidase bacteriana que atua na construção da parede celular microbiana. Ao serem ligados à transpeptidase acabam por inativar a enzima, interrompendo, por consequência, o processo de multiplicação celular. Este mecanismo de ação lhes confere um amplo espectro de atuação no combate a infecções microbianas. Porém, o longo tempo de uso permitiu que as bactérias desenvolvessem mecanismos de resistência, que incluem a destruição do anel β-lactâmico por β-lactamases, a alteração das proteínas de

ligação do fármaco na célula bacteriana e a restrição do acesso aos alvos celulares (WILLIAMS, 1999).

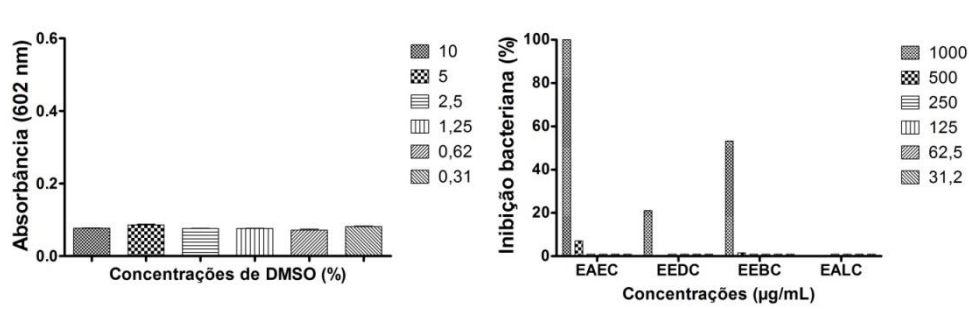


Figura 20: Controle de toxicidade do DMSO e concentração inibitória mínima para os extratos de *Strychnos pseudoquina* frente à *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

Nota: EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas). A concentração de DMSO 0,31% foi utilizada como controle para % de inibição pelo DMSO.

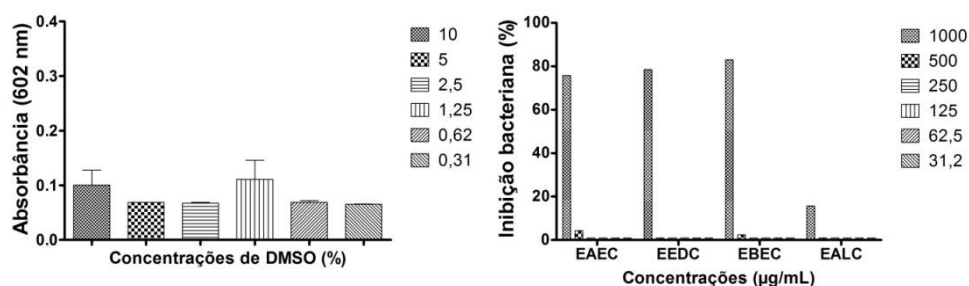


Figura 21: Controle de toxicidade do DMSO e concentração inibitória mínima para os extratos de *Strychnos pseudoquina* frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Nota: EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas), EALC (extrato alcaloídico das cascas).

Confrontando os dados dos teores de flavonoides totais dos extratos EAEC, EEDC e EEBC com os valores de absorbância gerados pelas atividades inibitórias destes extratos em *P. fluorescens* (Figura 22), temos:

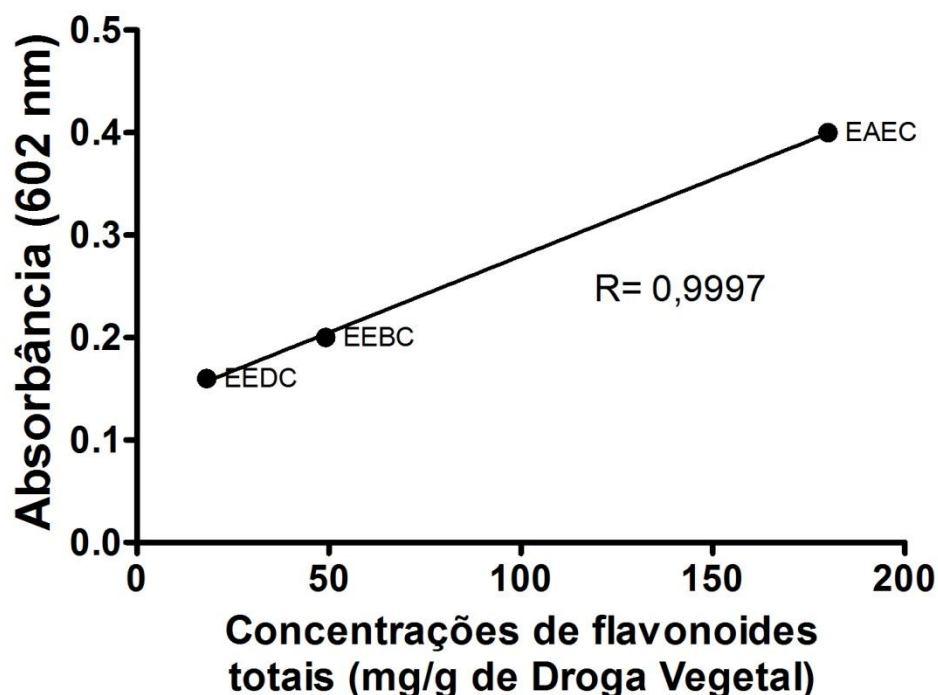


Figura 22: Gráfico de correlação de Pearson entre os teores de flavonoides presentes nos extratos das cascas de *Strychnos pseudoquina* e as atividades antibacterianas observadas frente a *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

Nota: EAEC (extrato em acetato de etila das cascas), EEDC (extrato etanólico desengordurado das cascas), EEBC (extrato etanólico bruto das cascas).

Pode-se observar uma forte correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e a inibição bacteriana, indicando que este grupo de metabólitos secundários é o responsável pela atividade inibitória.

3.4.5. SINERGISMO ENTRE O EAEC E AMPICILINA

Como descrito anteriormente, foram adotadas apenas concentrações subinibitórias de antibiótico para elaboração deste estudo. Logo, as concentrações testadas de ampicilina (58,2, 29,0, 14,6, 7,3 e 3,6 µg/mL) não foram capazes de inibir a multiplicação de *P. fluorescens* quando testadas separadamente. Contudo, na presença de EAEC na concentração 500 µg/mL, todas as concentrações de ampicilina utilizadas promoveram a inibição do crescimento bacteriano. O EAEC, por sua vez, quando testado isoladamente, nesta mesma concentração, não foi capaz de inibir o crescimento microbiano (Figura 23, poços F3).

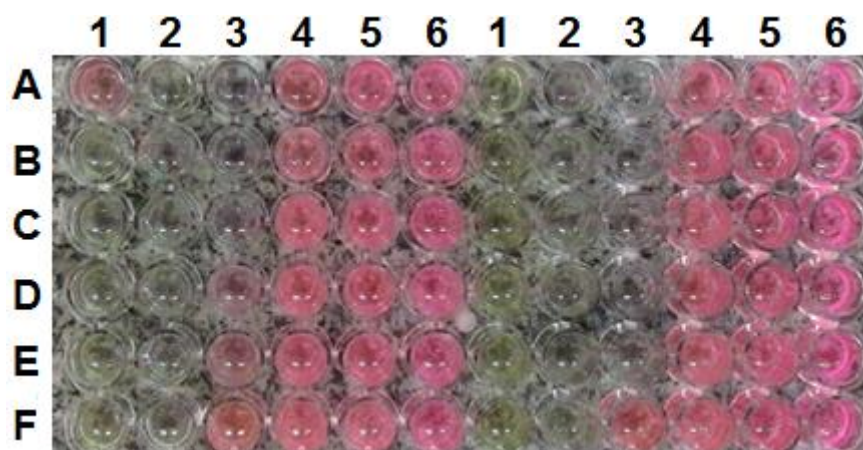


Figura 23: Avaliação da interação entre o extrato em acetato de etila das cascas de *Strychnos pseudoquina* (EAEC) e ampicilina para *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

Os valores de absorbância dos poços contendo as associações entre EAEC e ampicilina e as duas amostras em separado também podem ser visualizados no gráfico representado na Figura 24. Neste gráfico, o valor da absorbância a 602 nm está relacionado com a prevalência da resazurina adicionada aos poços. A resazurina é reduzida por compostos produzidos pelos microrganismos durante a multiplicação celular, desta forma, quanto menor a multiplicação microbiana nos poços, menos resazurina será convertida a sua forma reduzida (resorufina) e, conseqüentemente, maior o valor de absorbância encontrado no poço. O comprimento de onda específico para a detecção da resazurina foi estabelecido em 602 nm.

O Teste t empregado para comparar os grupos referentes às concentrações de extrato testadas em associação com a ampicilina não detectou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de ampicilina utilizadas com EAEC a 2000, 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$, dando suporte à verificação do sinergismo.

Neste gráfico pode-se perceber que EAEC na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, em associação a todas as concentrações de ampicilina testadas, causou inibição microbiana, contudo, ao ser utilizado em separado (500 $\mu\text{g/mL}$ de EAEC e 0 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina), não foi capaz de inibir o crescimento microbiano. Este resultado dá suporte para a ocorrência de sinergismo entre EAEC e a ampicilina.

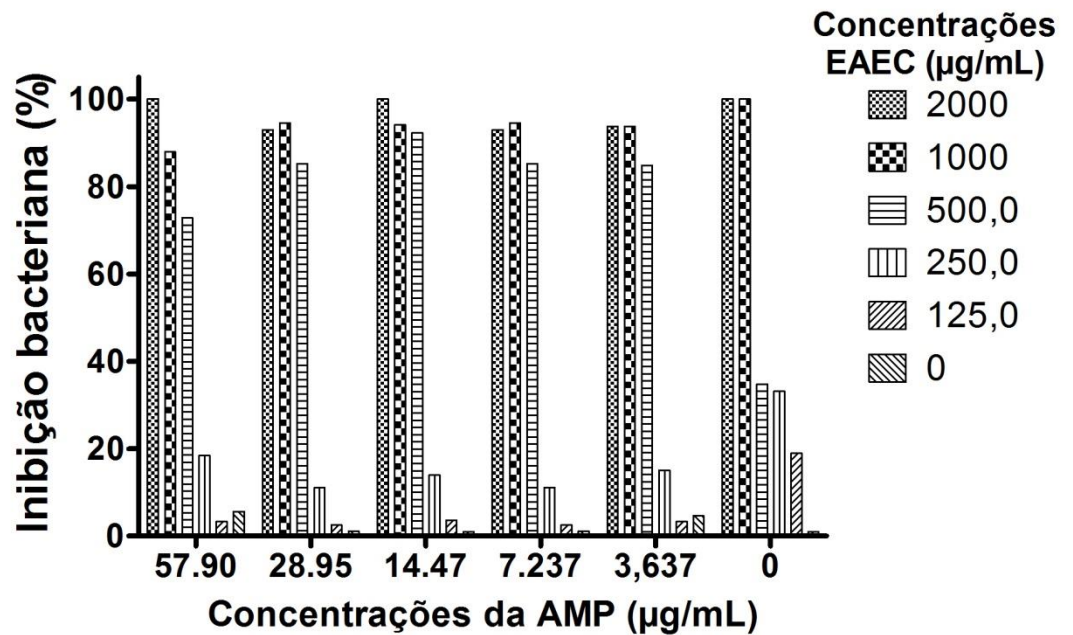


Figura 24: Gráfico de prevalência da resazurina nos poços em que houve inibição da multiplicação de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 para diferentes concentrações de EAEC.

Nota: Resultados expressos como média $\pm$ Desvio Padrão (n=2) ^ap<0,05.

O cálculo do índice de interação entre EAEC e ampicilina (empregando a adaptação da metodologia de construção do isoblograma) para *P. fluorescens* indicou sinergismo, pois:

$$\frac{500,0}{1000} + \frac{3,638}{> 1000} < 1 \therefore 0,5 + 0,003638 < 1 \therefore 0,500 < 1$$

Devido ao valor encontrado, o isoblograma obtido para *P. fluorescens* (Figura 25) foi:

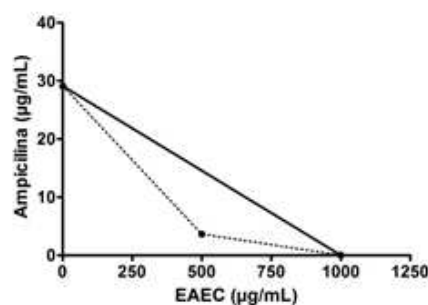


Figura 25: Isoblograma demonstrando o ponto de sinergismo entre EAEC e ampicilina (500 µg/mL e 3,673 µg/mL, respectivamente).

S. aureus, por sua vez, apresentou valores diferentes daqueles encontrados para *P. fluorescens*. A placa contendo o resultado de viragem para a interação sinérgica entre as amostras pode ser visualizada na Figura 26.

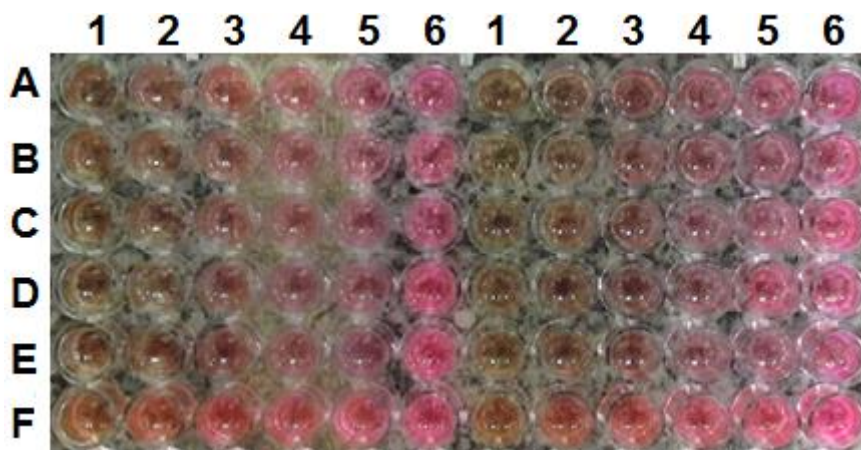


Figura 26: Avaliação da interação entre o extrato em acetato de etila das cascas de *Strychnos pseudoquina* (EAEC) e ampicilina para *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

O Teste t entre os grupos, conforme realizado para *P. fluorescens*, revelou que não há diferença significativa para os valores de absorbância encontrados para todas as concentrações de ampicilina associadas a todas as concentrações de EAEC (Figura 27).

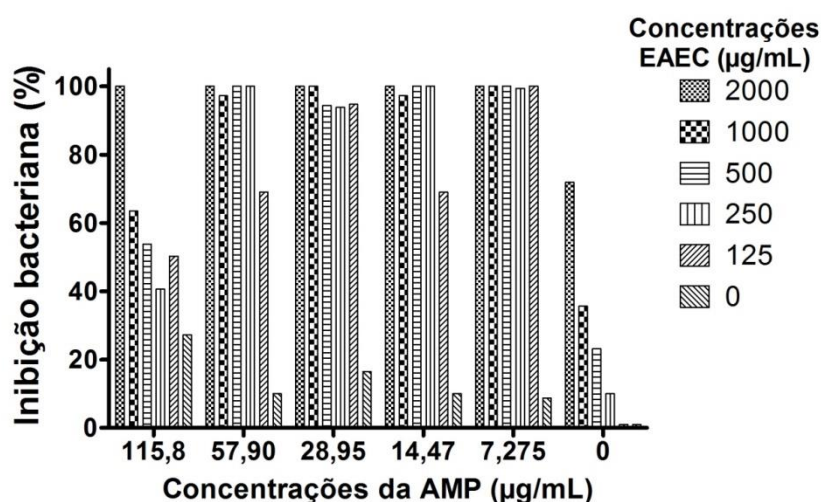


Figura 27: Gráfico de prevalência da resazurina nos poços em que houve inibição da multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 para diferentes concentrações de EAEC. Nota: Resultados expressos como média $\pm$ Desvio Padrão (n=2) ^ap<0,05.

Dessa forma, pode-se concluir que a comparação entre os valores de absorbância obtidos para todas as concentrações de EAEC associados a

ampicilina foram maiores do que os valores encontrados para a ampicilina utilizada separadamente (0 µg/mL de EAEC e 115,8, 57,90, 28,95, 14,47, 7,275 µg/mL de ampicilina). Estes resultados também colaboram para que seja observado sinergismo entre a associação testada.

O cálculo do índice de interação entre EAEC e ampicilina para *S. aureus*, assim como anteriormente utilizado para inibição de *P. fluorescens*, indicou sinergismo, pois:

$$\frac{125,0}{1000} + \frac{7,275}{> 1000} < 1 \therefore 0,5 + 0,007275 < 1 \therefore 0,500 < 1$$

Devido ao valor encontrado para as concentrações das amostras no sinergismo, o isoblograma obtido para *S. aureus* foi (Figura 28):

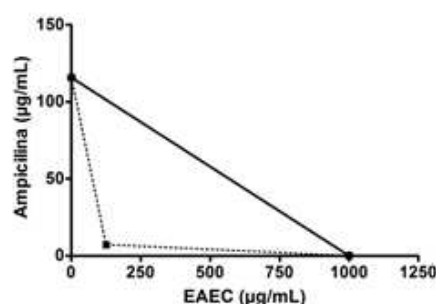


Figura 28: Isoblograma da interação entre EAEC e ampicilina frente a *S. aureus* demonstrando sinergismo.

A interação sinérgica pode ser encontrada, para testes biológicos, quando o efeito de combinação de diferentes agentes difere do efeito encontrado para os mesmos agentes, em separado, avaliando os resultados de dose-resposta individuais (BERENBAUM, 1989).

A resistência bacteriana a compostos inibitórios pode ser atribuída, entre outros fatores, à inibição de bombas de efluxo, que expulsam moléculas nocivas do meio intracelular para o meio extracelular antes que estes possam atingir os alvos celulares, causando danos à maquinaria biológica bacteriana (AMARAL, 2013).

Tanto a prospecção fitoquímica quanto a análise do *fingerprint* e a determinação da concentração de flavonoides totais presente nos itens 2.4.2,

2.4.3 e 2.4.4 do Capítulo I revelaram a presença de flavonoides em EAEC. Pode-se afirmar ainda que os flavonoides estrichnobiflavona e a quercetina-3-O-metil éter, anteriormente isolados de *S. pseudoquina*, estão presentes em maior concentração nesse extrato. O resultado do sinergismo, portanto, pode ser atribuído aos flavonoides presentes neste extrato, visto que estes compostos podem atuar tanto em mecanismos diferentes daquele descrito para o antibiótico ampicilina na inibição microbiana, quanto na inibição de fatores de resistência.

Segundo Stermitz et al. (2000), a inibição das bombas de efluxo microbiana, também denominadas *Multidrug Resistance Pumps* (MDRs) pelo flavonoide 5'-metoxihidnocarpina fez com que o alcaloide de baixa atividade antibacteriana, berberina, agisse de forma mais potente (estruturas demonstradas na Figura 29).

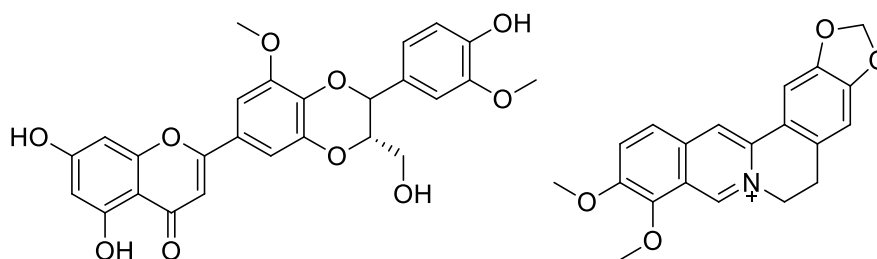


Figura 29: 5'-metoxihidnocarpina e berberina.

Quando a berberina, em quantidades subinibitórias, foi combinada com a 5'-metoxihidnocarpina (1 µg/mL), provocou a inibição completa de crescimento bacteriano. A berberina, utilizada separadamente, apresenta baixa atividade antibacteriana e a 5'-metoxihidnocarpina, por sua vez, não apresentava atividade antibacteriana em concentrações menores que 500 µg/mL como inibidora de *S. aureus*.

Portanto, compostos que afetam a atividade de uma determinada bactéria causadora de infecção podem ser úteis como adjuvantes na medida em que o organismo infectante torna-se susceptível aos antibióticos para os quais era resistente inicialmente (AMARAL, 2013).

Foi constatado para *S. aureus*, diferentemente do observado para *P. fluorescens*, que nas maiores concentrações de ampicilina testadas (115,0 µg/mL e 57,90 µg/mL) a capacidade inibitória da associação de EAEC e

ampicilina não foi tão expressiva quanto a associação de ambos nas menores concentrações de ampicilina (28,95, 14,47 e 7,275 µg/mL).

Isto pode indicar que, como sugere Lewis; Ausubel (2006), em concentrações de antibiótico capazes de provocar inibição bacteriana, fatores de resistência, como as MDRs, podem ser ativados. Quando a bactéria é exposta a concentrações potencialmente tóxicas de antibióticos, ocorre a superexpressão dos genes relacionados à resistência e, conseqüentemente, a transferência destes genes de resistência permite que os os microrganismos consigam sobreviver.

Stermitz et al. (2000) relataram a ação de um flavonoide na inibição de MDRs de *S. aureus*, permitindo que a berberina, alcaloide de atividade antimicrobiana, atuasse adequadamente. Sabe-se que EAEC constitui a fração enriquecida em compostos desta classe, o que pode sugerir que os flavonóides de *S. pseudoquina* possa também agir por este mecanismo.

Existe uma apresentação farmacêutica baseada na associação sinérgica entre uma penicilina de segunda geração, a amoxicilina, e um inibidor enzimático específico para bactérias, o ácido clavulânico (inibidor de β -lactamase). Esta associação permitiu que os β -lactâmicos continuassem a ser utilizados clinicamente a despeito da resistência encontrada para esta classe de moléculas.

No presente estudo, os resultados podem colaborar para a descoberta de outras associações sinérgicas, assim como aquelas encontradas para a berberina e a 5'-metoxihidnocarpina. Atividades relacionadas com a inibição de bombas de efluxo microbianas e a inibição de enzimas bacterianas relacionadas com a síntese de DNA também devem ser investigadas nos extratos desta espécie vegetal.

3.5. REFERÊNCIAS

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

AMARAL, L. Regulation and Control of Efflux Pumps that Mediate Multi-drug Resistance of Pathogenic Bacteria. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 21, 2013.

BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v. 1989, n. 41, p.1-49, 1989.

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. 218-28, Jan 2014.

BUENO, C.; VILLEGAS, M. L.; BERTOLOTTI, S. G.; PREVITALI, C. M.; NEUMANN, M. G.; EMCINAS, M. V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reactions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 4, p. 385-90, 2002.

CORDELL, G. A. Phytochemistry and traditional medicine - A revolution in process. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 391-398, 2011.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. Edição, Nova York, John Wiley & Sons Ltd., 2002. 539 p.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, n. 7, 2006.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. Edição, São Paulo, Atheneu, 1988.

GAVRISH, E.; SHRESTHA, B.; CHEN, C.; LISTER, I.; NORTH, E. J.; YANG, L.; LEE, R. E.; HAN, A.; WILLIAMS, B.; CHARNUSKA, D.; COLEMAN, K.; LEWIS, K.; LAFLEUR, M. D. In vitro and in vivo activities of HPI1, a selective antimicrobial against *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3255-60, 2014.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. Antimicrobial therapy in veterinary medicine, 5ª ED. John Wiley & Sons, Inc, 2013, 679 p.

GUTIERREZ, J. E.; PEREZ, J. A.; POMA, E. G.; YOSHIZAWA, A. F.; AREVALO, O. R.; PENA, D. A.; BENAVIDES, N. E.; VALDIVIA, E.; BAYONA, R. R.; LANDA, K. N. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of medicinal plants and stimulation of fibroblast proliferation. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 76, p. 73-79, 2010.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A. da; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Mina Gerais. **Acta Botânica Brasileira**, v. 3 n. 2, p. 185-224, 1989.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L. M. S.; PALAZZO, F.; MELLO, J. C. P. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, 2010.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 504-10, 2008.

JANTOVA, S.; NAGY, M.; RUZEKOVA, L.; GRANCAI, D. Antibacterial activity of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. **Phytother Res**, v. 14, n. 8, p. 601-3, 2000.

- KAPU, S. D.; NGWAI, Y. B.; KAYODE, O.; AKAH, P. A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 7-13, 2001.
- KORPE, D. A.; ISERI, O. D.; SAHIN, F. I.; CABI, E.; HABERAL, M. High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. **Int J Food Sci Nutr**, v. 64, n. 3, p. 355-62, 2013.
- KIRKPATRICK, P. RAJA, A.; LABONTE, J.; LEBBOS, J. Daptomycin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 943-4, 2003.
- LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R. de; LOPES, A. de S.; FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; FILHO, J. D. de S.; TAVARES, A. A. P.; PÁDUA, R. M. de; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective *in vitro* antileishmanial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- LEWIS, K.; AUSUBEL, F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. **Natural Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1504-7, 2006.
- LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHABERLE, T. F.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 000, p. 1-18, 2015.
- LODHI, S.; JAIN, A. P.; SHARMA, V. K.; SINGHAI, A. K. Wound-healing effect of flavonoid-rich fraction from *Tephrosia purpurea* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 19, p. 191-195, 2013.
- LODHI, S.; SINGHAI, A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 253-259, 2013.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.
- MOTA, M. L.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 289-300, 1985.
- MUHAMMAD, A. A.; PAUZI, N. A. S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards**. Wayne: NCCLS, Document M31-T, 1997. 64p.
- PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 57-60, 2005.
- PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 628-636, 2014.

PONNUSAMY, Y.; CHEAR, N. J.; RAMANATHAN, S.; LAI, C. S. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 305-14, 2015.

PORTE, L. F.; SANTIN, S. M.; CHIAVELLI, L. U.; SILVA, C. C.; FARIA, T. J.; FARIA, R. T.; RUIZ, A. L.; CARVALHO, J. E.; POMINI, A. M. Bioguided identification of antifungal and antiproliferative compounds from the Brazilian orchid *Miltonia flavescens* Lindl. **Zeitschrift Naturforschung C**, v. 69, n. 1-2, p. 46-52, Jan-Feb 2014.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-4, Aug 2007.

SHAI, A.; MAIBACH, H. I. Wound Healing and Ulcers of the skin. Diagnosis and Therapy - The Practical Approach. Berlin, Springer, 2005. 270 p.

STERMITZ, F. R.; LORENZ, P.; TAWARA, J. N.; ZENEWICZ, L. A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 4, p. 1433-7, 2000.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; BROWN, D. M.; FULLAS, F.; OLWALD, J. B.; JOSEPHSON, F. F.; THORNTON, N. M.; PEZZUTO, J. M.; BEECHER, C. W.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; KINGHORN, A. D. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. **Phytomedicine**, v. 3, n. 3, p. 281-5, Nov 1996.

WANG, J.; RUAN, J.; CAI, Y.; LUO, Q.; XU, H.; WU, Y. In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 1033-1038, 2011.

WILLIAMS, J. D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, Suppl. 1, p. S3-S7, 1999.

YAN, Y. CHEN, X.; HU, S.; BAI, X. Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 1-17, 2014.

CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA O CONTROLES DE QUALIDADES QUÍMICO E BIOANALÍTICO EM AMOSTRAS DE *S. pseudoquina* A.St.-Hil.

4.1.INTRODUÇÃO

Apesar da megabiodiversidade brasileira, o potencial para desenvolvimento de fitoterápicos no país é subexplorado (ALVES, 2013). O mesmo país que, desde a chegada da família real portuguesa, atraiu diversos naturalistas, entre eles August Saint-Hilaire (1779-1853) (que percorreu a região de Minas Gerais, catalogando centenas de novas espécies entre os anos de 1816 e 1822), teve seu primeiro formulário de fitoterápicos elaborado apenas em 2011 (BRASIL, 2011).

Embora a produção brasileira de fitoterápicos ainda não tenha atingido todo o seu potencial, as pesquisas realizadas nesse campo certamente avançaram significativamente ao longo das últimas décadas. Para o período entre 1994 e 2004, Calixto (2005) investigou o número de publicações relacionadas a espécies vegetais produzido pelos países latino-americanos (*Web of Science*), demonstrando que a produção científica brasileira mostrou-se mais expressiva para esse período, alcançando 41,6% do total de publicações analisadas, em comparação com seus irmãos latinos: México (19,9%), Argentina (19,5%), Chile (6,4%), Venezuela (4,4%), Colômbia (2,9%), Peru (2,4%), Cuba (2,0%) e Uruguai (0,8%).

O atraso brasileiro no lançamento de fitoterápicos pode ser explicado pela vulnerabilidade empresarial na proteção intelectual de inovações tecnológicas até a década de 90. No ano de 2015, a legislação que assegura a propriedade intelectual completará 19 anos: a Lei nº 9,279, que regula os direitos e obrigações relativos à propriedade intelectual foi sancionada em 1996, pelo então presidente da República. Esta reforma pôde ser considerada crucial para o incentivo à busca por inovações tecnológicas de toda ordem, incluindo aquelas provenientes de espécies vegetais.

Ryan (2010) relata o processo de pesquisa e desenvolvimento do fitoterápico Acheflan®. Trata-se de um anti-inflamatório produzido a partir da planta medicinal *Cordia verbenaceae*. Segundo este autor, Ache Laboratórios

Farmacêuticos, estabelecida 1966, veio a tomar conhecimento desta planta medicinal ao final dos anos 80. Apesar do interesse em desenvolver uma formulação medicinal à base de *C. verbenaceae*, a legislação brasileira não permitia o patenteamento de produtos farmacêuticos, permitindo-o apenas para processos de fabricação. Assim, se o produto se tornasse popular, os competidores da Ache poderiam se utilizar da engenharia reversa e se beneficiar dos mesmos lucros sem ter investido os mesmos montantes em pesquisa e desenvolvimento que a detentora da marca Acheflan®. Devido a isso, o projeto foi interrompido. Porém em 1996, com a aprovação da Lei de patentes (Lei nº 9,279), o projeto inicial foi retomado, culminando no lançamento do produto em 2005 (RYAN, 2010).

Segundo a RDC 26/14, o registro de fitoterápicos pode ser realizado baseado em seu uso tradicional. O uso tradicional pode ser definido como: aquele alicerçado no longo histórico de utilização no ser humano demonstrado em documentação tecnicocientífica, sem evidências conhecidas ou informadas de risco à saúde do usuário (RDC 26/14). Portanto, a verificação sistemática de informações acerca do uso popular de espécies vegetais certamente trará novos produtos que aquecerão o setor de fitoterápicos pelos próximos anos.

Outro avanço trazido por esta legislação está relacionado com o controle de qualidade dos fitoterápicos. A RDC 26/14 permite que sejam utilizadas técnicas de controle biológico para determinar e/ou monitorar a qualidade de derivados vegetais.

O termo controle biológico pode ser definido como um método alternativo à análise quantitativa dos marcadores da matéria-prima vegetal e do produto acabado, baseado na avaliação da atividade biológica proposta para o fitocomplexo.

Os produtos derivados de plantas medicinais podem conter metabólitos secundários cuja investigação não pode ser realizada com apenas um único teste analítico. Soma-se a isso o fato de que os marcadores analíticos, geralmente mais abundantes nos extratos vegetais, utilizados para o controle de qualidade, não possuem, como seu próprio nome especifica, atividade farmacológica/biológica (YE et al., 2004).

A técnica de controle biológico, portanto, permite que a presença do grupo farmacofórico em concentrações bioativas seja analisada de forma

direta, aproximando o controle de qualidade com a qualidade medicinal do fitoterápico. Métodos químicos analíticos baseados na quantificação de marcadores podem se distanciar da qualidade medicinal dos derivados vegetais pois, para extratos vegetais, os marcadores analíticos, geralmente em maiores concentrações, podem não estar relacionados com a atividade farmacológica. No presente trabalho, foi proposto um método de controle biológico para a espécie *Strychnos pseudoquina*.

A fim de gerar subsídios para a elaboração de monografias destinadas ao controle de qualidade desta espécie, o Capítulo III abordará técnicas químicas comumente utilizadas para o controle de qualidade (Cromatografia de camada Delgada e Espectrofotometria) em comparação a uma técnica de controle biológico (inibição bacteriana).

A adoção de metodologias de controle biológico pode trazer mais confiabilidade na determinação da qualidade da droga vegetal derivada de *S. pseudoquina*. Os dados gerados neste trabalho poderão ser incluídos em compêndios farmacopeicos.

No presente trabalho, por meio da técnica de cromatografia de camada delgada, foram investigadas, qualitativamente, as principais classes de constituintes das amostras comerciais de *S. pseudoquina* em comparação aos acessos dessa espécie vegetal.

4.1.1. CONTROLES QUÍMICOS DA QUALIDADE

A manutenção da qualidade dos materiais vegetais empregados no tratamento de doenças ou suplementação alimentar é de fundamental interesse para a segurança e eficácia na utilização de espécies vegetais. A adulteração de drogas vegetais constitui um risco sanitário. Essa prática deplorável tem sido aplicada em preparações da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), por exemplo. No caso da MTC, compostos sintéticos podem ser incorporados nas preparações herbais para mimetizar as mesmas propriedades dos preparados genuínos, como por exemplo, os corantes (HUANG et al., 2014).

O crescente interesse em utilizar fitoterápicos como terapias medicinais faz com que falsificações de drogas vegetais tornem-se mais frequentes. O trabalho dos bioprospectores em comprovar as atividades farmacológicas de

espécies utilizadas pela medicina popular fatalmente será acompanhado pela má fé de falsificadores.

Avaliando a qualidade de 12 amostras comerciais de *Bacharis trimera*, comumente utilizada em casos de problemas digestivos, Bertrame et al. (2009) constataram que todas as amostras analisadas apresentavam não conformidades com a legislação vigente.

Frequentemente, os compostos adulterantes podem estar associados a sérios efeitos adversos. A adoção de marcos regulatórios para teores de compostos que não estão relacionados com as propriedades medicinais de espécies vegetais em fitoterápicos é necessária para assegurar a saúde dos usuários desses produtos por todo o mundo (ERNST, 2002).

Neste sentido, a fim de contornar os problemas relacionados com adulterações, técnicas de última geração empregadas nos processos de separação e detecção de compostos em extratos vegetais têm sido aplicadas para verificar a qualidade de fitoterápicos, com destaque para a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS).

Os perfis de fragmentação gerados após a medida das massas dos fragmentos são comparados com bibliotecas informatizadas de compostos, identificando as moléculas fragmentadas. A concentração dos compostos fragmentados também pode ser inferida nas técnicas de cromatografia líquida acoplada a esses aparelhos. Desta forma, a LC/MS reúne as características necessárias para a identificação de adulterantes em fitoterápicos: além de separar e quantificar compostos presentes nos fitoterápicos, a identificação das estruturas pode ser realizada pelo espectrômetro de massas (LU et al., 2010, DOWLING et al., 2011, REN et al., 2012 e VACLAVIK et al., 2014).

Outra técnica que pode ser empregada para avaliar a qualidade de derivados vegetais é a cromatografia de camada delgada (CCD). Trata-se de uma técnica ágil para demonstrar qualitativamente a constituição química de uma droga vegetal e, neste sentido, além da detecção qualitativa, pode produzir informações quantitativas dos compostos presentes (WAGNER; BLADT, 1996).

Já para a quantificação de metabólitos secundários, outra técnica comumente aplicada é a espectrofotometria. A aplicação da espectrofotometria para o controle de qualidade permite que os teores de marcadores analíticos

ou biológicos específicos de espécies vegetais sejam avaliados. Como exemplo, pode-se citar a quantificação de flavonoides totais (YU, 1987, HUI et al., 2005, HU et al., 2008 e CHEN et al., 2010).

A espectrofotometria também foi empregada na quantificação do fitocomplexo de *S. pseudoquina* identificado. As investigações farmacológicas empregadas para os extratos de *S. pseudoquina*, tanto em Lage et al (2013) quanto no Capítulo II, revelaram que os constituintes ativos de seu fitocomplexo pertencem à classe dos flavonoides. Desta forma, buscou-se avaliar o teor de flavonoides totais nos extratos provenientes de diferentes acessos e de amostras comerciais adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte.

4.1.2. CONTROLE BIOLÓGICO DA QUALIDADE

A evolução das técnicas analíticas proporcionou uma maior acurácia na detecção de metabólitos secundários, trazendo consigo a ideia de que há uma embaraçosa complexidade metabólica nos extratos vegetais. Isto se refletiu nos aspectos regulatórios do setor.

A inserção de testes biológicos para controle de qualidade de produtos derivados de espécies vegetais parece ter surgido, de fato, pela percepção de que ensaios biológicos simples já conduziam, há décadas, a triagem e seleção de candidatos para investigações específicas de propriedades medicinais. A consolidação dessas técnicas de triagem trouxe aos pesquisadores a segurança e a confiabilidade necessárias para torná-las parâmetros de qualidade (MCLAUGHLIN et al., 1998).

São três as técnicas descritas para o ensaio microbiano para os antibióticos produzidos no Japão: placas cilíndricas, placas de cultivo em poços e os métodos turbidimétricos. O primeiro baseia-se na zona de inibição de crescimento microbiano em meio ágar-nutriente, o segundo, na indicação de multiplicação bacteriana por reagentes colorimétricos e o terceiro, como o próprio nome já diz, fundamenta-se na inibição da turbidez provocada pela multiplicação microbiana em meio líquido (JAPANESE PHARMACOPEIA, 5ª Ed., 2006).

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de avaliação da atividade antibacteriana contra *P. fluorescens* ATCC 13525 em placa de cultivo de 96 poços. Buscou-se avaliar o efeito provocado pelo fitocomplexo de *S. pseudoquina* relacionado com esta inibição (flavonoides). A sensibilidade dessa bactéria aos flavonoides presentes nos extratos de *S. pseudoquina* foi comprovada durante os resultados obtidos para os experimentos nos itens 3.4.2., e 3.4.3. A técnica de controle biológico proposta tem o intuito de simplificar e aperfeiçoar o processo de controle da qualidade da espécie *S. pseudoquina*.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de controle biológico para *S. pseudoquina*, comparando diferentes acessos desta espécie com amostras comerciais.

4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a concentração de flavonoides totais das amostras;
- Avaliação da atividade inibitória dos extratos brutos etanólicos das amostras comerciais e dos acessos de *S. pseudoquina* contra a bactéria *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

4.3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.3.1. MATERIAL VEGETAL

A espécie acessada fora anteriormente descrita no item 2.3.1. do Capítulo I. Amostras de *S. pseudoquina* acessadas nas regiões de Rio Verde (GO) e Montes Claros (MG) também foram utilizadas para esta avaliação. As amostras comerciais foram obtidas de ervanários no Mercado Central de Belo Horizonte.

4.3.2. EXTRAÇÃO DOS ACESSOS DE *S. pseudoquina* PARA CONTROLE POSITIVO

Os acessos de *S. pseudoquina*, provenientes de Jaboticatubas e Rio Verde, utilizadas como controles positivos, foram obtidos por percolação tradicional e percolação fracionada conforme o item 2.3.2.1. do Capítulo I, porém foram testados apenas os extratos em acetato de etila e os extratos etanólicos brutos por conterem diferentes concentrações de flavonoides, que estão diretamente relacionados com o fitocomplexo de *S. pseudoquina*, como pôde ser avaliado nos itens 3.3.4.1., 3.3.4.2, 3.3.4.3. e 3.3.4.4. do Capítulo II.

Estes acessos (Jaboticatubas e Rio Verde) foram utilizados para demonstrar como *S. pseudoquina* de diferentes regiões podem se comportar no teste de controle biológico.

4.3.3. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Foram pesados 10,0 g de cada uma das drogas vegetais. Estas foram submetidas à maceração com etanol em aparelho de ultrassom por 30 min, por três vezes. Os extratos etanólicos brutos foram obtidos por meio da concentração dos macerados em evaporador rotatório. Os extratos em acetato de etila foram obtidos conforme o item 2.3.2.1. do Capítulo I.

4.3.4. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DOS ACESSOS DE *S. pseudoquina*

A prospecção fitoquímica ocorreu conforme o item 2.3.3. do Capítulo I. As imagens das cromatofolhas juntamente com as condições de FM foram registradas.

4.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

A quantificação de flavonoides totais foi realizada conforme item 2.3.5 do Capítulo I, com algumas modificações.

Foram pesados de 2,0 g do material vegetal e transferidos quantitativamente para Erlenmeyer de 250 mL. Ao Erlenmeyer foram adicionados 50 mL de acetato de etila, seguindo-se a extração por sonicação (30 min). Este procedimento foi realizado por 3 vezes. O líquido extrator obtido após cada uma das extrações foi filtrado com o auxílio de algodão e transferido para um balão de fundo redondo com o intuito de remover o solvente em evaporador rotatório (40 °C).

Após a concentração dos extratos, estes foram ressuspensos utilizando 10 mL de etanol 70% e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com etanol 70%.

Uma alíquota de 2,0 mL do extrato recentemente preparado foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e a este foram adicionados 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol e 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. O volume foi completado com água purificada. A solução permaneceu em repouso por 20 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A solução de compensação utilizada para anular a interferência da coloração natural do extrato que possa absorver na região de detecção desse método (420 nm), foi preparada misturando-se uma alíquota de 2,0 mL da solução hidroetanólica preparada anteriormente com 0,6 mL de ácido acético glacial e 8,0 mL de metanol em balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água purificada.

A curva de calibração foi construída utilizando-se a rutina como padrão (2,0 a 50,0 µg/mL). Primeiramente foi preparada uma solução estoque de (0,5 mg/mL) de rutina, previamente dessecada. O padrão foi então dissolvido em metanol e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com este mesmo solvente.

Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL e 1,5 mL desta solução estoque para balões volumétricos de 25 mL, correspondendo às

massas: 0,05 mg, 0,125 mg, 0,250 mg, 0,500 mg e 0,750 mg de rutina, respectivamente. Em seguida, foram adicionados, a cada um dos balões, volumes de 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol e 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em metanol. O volume dos balões foi completado pela adição de água purificada, obtendo-se soluções de concentração 2,5, 10, 20 e 30 µg/mL de rutina, respectivamente. As soluções foram homogeneizadas, deixadas em repouso por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

O preparo do branco para a construção da curva se deu pela adição de 0,6 mL de ácido acético glacial, 8,0 mL de metanol, 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% em um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água purificada.

As leituras da absorbância tanto do padrão para curva de calibração quanto das amostras e da solução de compensação foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-100 a 420 nm, utilizando cubetas de quartzo.

4.3.6. TESTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DOS ACESSOS DE *S. pseudoquina* DE JABOTICATUBAS E RIO VERDE

Para este teste foram pesados 4,00 mg dos extratos em acetato de etila e etanólicos brutos de *S. pseudoquina* e diluídos em 1 mL de DMSO 100%. 240 µL destas soluções mãe foram adicionados a 960 µL de PBS, tornando-se soluções de volume 1200 µL com concentrações de 4 mg/mL. Foram tomados 600 µL desta solução para as diluições seriadas em outros 5 microtubos contendo 600 µL de PBS cada. Este procedimento resultou na obtenção de 6 microtubos contendo 600 µL cada, com concentrações de 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL 125 µg/mL, respectivamente.

Aos poços das placas foram adicionados 100 µL de cada uma das diluições preparadas anteriormente e 100 µL de meio novo acrescido de *Pseudomonas fluorescens*. A ativação da bactéria e preparação do inóculo se deu conforme item 3.3.4.2. do Capítulo II. Portanto, as concentrações obtidas para os extratos nos poços da placa de cultivo foram de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente.

4.3.7. TESTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DE ACESSOS DE *S. pseudoquina*

Para este teste, 20 mg dos extratos obtidos foram diluídos em 1 mL de DMSO 100%. 240 µL destas soluções mãe foram transferidos para microtubos estéreis e a eles foram adicionados a 960 µL de PBS, tornando-se soluções de volume 1200 µL com concentrações de 4 mg/mL. Foram tomados 600 µL desta solução para as diluições seriadas em outros 5 microtubos contendo 600 µL de PBS cada. Este procedimento resultou na obtenção de 6 microtubos contendo 600 µL cada, com concentrações de 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL 125 µg/mL, respectivamente.

Aos poços das placas foram adicionados 100 µL de cada uma das diluições preparadas anteriormente e 100 µL de meio novo acrescido de *Pseudomonas fluorescens*. A ativação da bactéria e preparação do inóculo se deu conforme item 3.3.4.2. do Capítulo II. Portanto, as concentrações obtidas para os extratos nos poços da placa de cultivo foram de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, respectivamente.

As condições de incubação e a determinação dos valores de absorbância da resazurina ocorreram conforme item 3.4.2. do Capítulo II. Também serão gerados gráficos de valores de absorbância da resazurina versus as concentrações testadas.

4.3.8. TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS

Os resultados dos efeitos inibitórios dos extratos e controles foram comparados estatisticamente utilizando Teste t de Student e análise de variância (ANOVA), quando aplicáveis. O software empregado para realizar as análises estatísticas foi o Graphpad PRISM®, versão 5.0.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES

Os rendimentos do acesso de *S. pseudoquina* proveniente da região de Jaboticatubas encontram-se no item 2.4.1. do Capítulo I. Os rendimentos do acesso de Rio Verde encontram-se na Tabela 11:

Tabela 11: Rendimentos dos extratos do acesso de *Strychnos pseudoquina* da região de Rio Verde.

Droga Vegetal	Percolação Seriada			Percolação Etanólica*
	Ext. Hexânico	Ext. em Acetato de Etila	Ext. Etanólico Desengordurado	
Cascas (1000 g)	5,0 g (0,5%)	13,0 g (1,3%)	132 g (13,2%)	103 g (17,2%)

Nota*: para percolação etanólica foram utilizados 600 g de casca.

As amostras apresentaram os seguintes rendimentos (Tabela 12):

Tabela 12: Rendimentos dos extratos do acesso de *Strychnos pseudoquina* da região de Rio Verde.

Droga Vegetal (10 g)	Maceração Etanólica
Amostra 1	30 mg (0,3%)
Amostra 2	25 mg (0,25%)
Amostra 3	33 mg (0,33%)
SPMC (<i>S. pseudoquina</i> Montes Claros)	27 mg (0,27%)
SPJ (<i>S. pseudoquina</i> Jaboticatubas)	60 mg (0,6%)

4.4.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

As amostras comerciais 1, 2 e 3 (A1, A2 e A3) e os acessos SPM (*S. pseudoquina* da região de Montes Claros) e SPJ (*S. pseudoquina* da região de Jaboticatubas) testadas apresentaram perfis cromatográficos para CCD que podem ser visualizados nas Figuras 30, 31, 32 e 33.

A avaliação qualitativa das classes de compostos investigadas aponta diferenças na constituição química encontrada nas amostras em relação aos

acessos. Estas diferenças indicam que o controle de qualidade de *S. pseudoquina* mostra-se muito importante para o uso seguro e eficaz desta espécie vegetal. As falsificações e adulterações, além de não produzirem os efeitos farmacológicos esperados nas doses previamente estabelecidas, podem trazer risco à saúde dos usuários (ERNST, 2002).

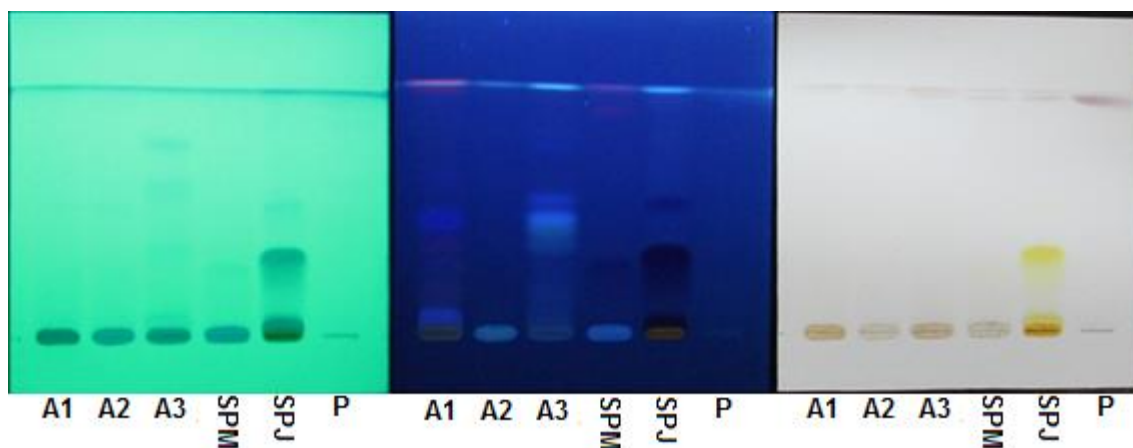


Figura 30: Prospecção de triterpenos das amostras comerciais e acessos de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: A1 (Amostra comercial 1), A2 (Amostra comercial 2), A3 (Amostra comercial 3), SPM (*S. pseudoquina* Montes Claros), SPJ (*S. pseudoquina* Jaboticatubas) e P o padrão β -sistosterol. FM: AcOEt/Hex (1:1). À esquerda a visualização da placa sob UV 254 nm, ao centro a visualização da placa em UV 365 nm e à direita, após a revelação com reagente de Lieberman-Burchard/aquecimento.

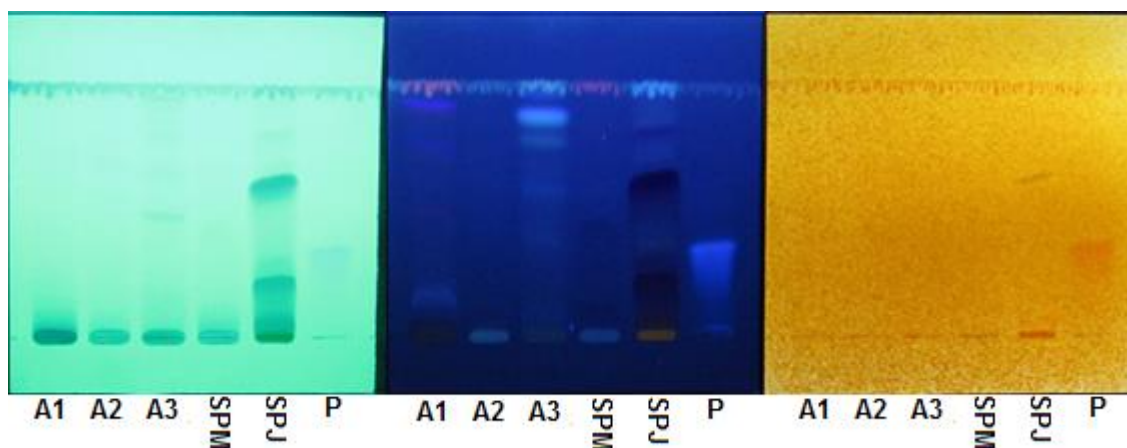


Figura 31: Prospecção de alcaloides das amostras comerciais e acessos de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: A1 (Amostra comercial 1), A2 (Amostra comercial 2), A3 (Amostra comercial 3), SPM (*S. pseudoquina* Montes Claros), SPJ (*S. pseudoquina* Jaboticatubas) e P o padrão quinina. FM: $\text{CCl}_3/\text{EtOEt}/\text{MeOH}$ (81:9:4,5). À esquerda a visualização da placa sob UV 254 nm, ao centro a visualização da placa em UV 365 nm e à direita, após a revelação com reagente de Dragendorff.

A utilização da CCD para avaliação da qualidade das amostras dos acessos e amostras comerciais de *S. pseudoquina* indicou diferenças significativas.

No que diz respeito ao fitocomplexo de *S. pseudoquina* (flavonoides), a complexidade encontrada para o acesso de *S. pseudoquina* da região de Jaboticatubas (SPJ, Figura 34) mostra-se muito superior àquela observada para as demais amostras. Isso também se estende ao teste de presença de fenólicos (Figura 35), que também apresentaram perfis diferentes na CCD.

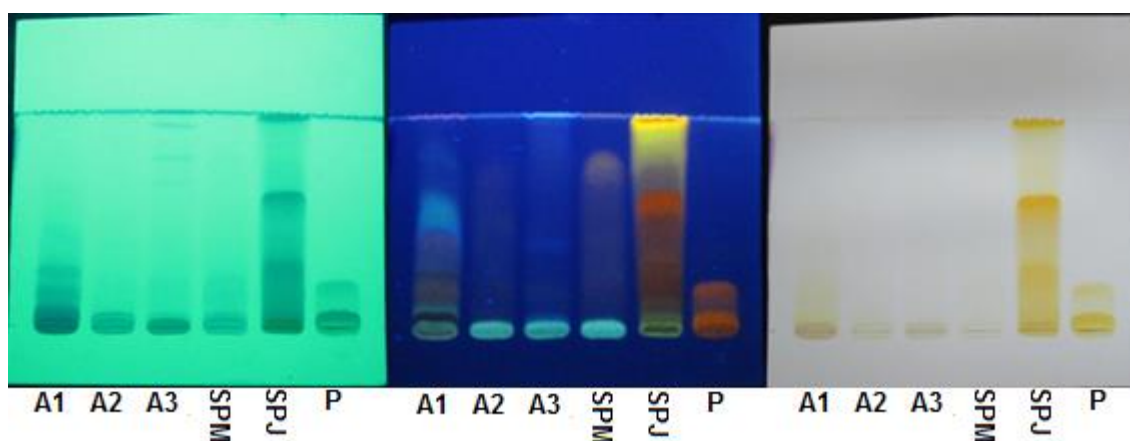


Figura 32: Prospecção de flavonoides das amostras comerciais e acessos de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: A1 (Amostra comercial 1), A2 (Amostra comercial 2), A3 (Amostra comercial 3), SPM (*S. pseudoquina* Montes Claros), SPJ (*S. pseudoquina* Jaboticatubas) e P o padrão rutina. FM: $\text{CCl}_3/\text{EtOEt}/\text{MeOH}$ (81:9:9,5). À esquerda, após a aplicação do indicador NP-PEG, a visualização da placa sob UV 254 nm, ao centro, visualização da placa em UV 365 nm e à direita, visualização em luz ambiente.

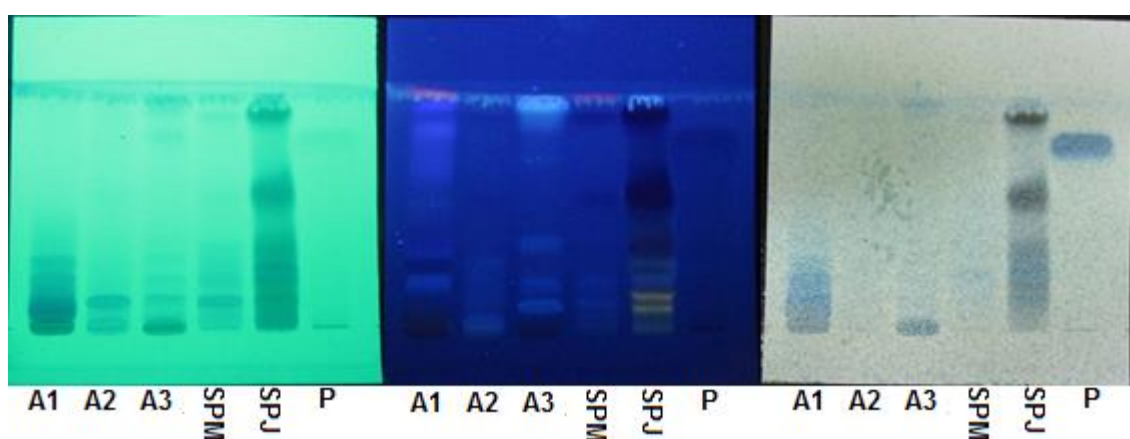


Figura 33: Prospecção de fenólicos das amostras comerciais e acessos de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: A1 (Amostra comercial 1), A2 (Amostra comercial 2), A3 (Amostra comercial 3), SPM (*S. pseudoquina* Montes Claros), SPJ (*S. pseudoquina* Jaboticatubas) e P o padrão ácido pirogálico. FM: $\text{CCl}_3/\text{EtOEt}/\text{MeOH}$ (81:9:4,5). À esquerda a visualização da placa sob UV 254 nm, ao centro a visualização da placa em UV 365 nm e à direita, após a revelação com Reagente de Barton.

No teste de alcaloides pode-se verificar uma mancha mais evidente para *S. pseudoquina* da região de Jaboticatubas (SPJ) em comparação com as demais amostras, em que não foram encontrados traços desta classe de moléculas.

O teste de triterpenos indicou a presença desta classe de moléculas na amostra comercial A3 e nas amostras dos acessos SPM e SPJ.

As classes de compostos identificadas foram resumidas na Tabela 13. Os resultados obtidos para a análise de constituintes presentes em SPJ são semelhantes àqueles obtidos na prospecção fitoquímica por CCD do EEBC, presente no item 2.4.2, do Capítulo I, Tabela 7, que também identificou fenólicos, flavonoides, triterpenos/esteroides e alcaloides. Esta observação está dentro do que se espera, pois o EEBC analisado também foi obtido por meio da extração da droga vegetal da região de Jaboticatubas.

Tabela 13: Resultados da prospecção fitoquímica.

Classes	A1	A2	A3	SPM	SPJ
Fenólicos	+	-	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+
Triterpenos/esteroides	-	-	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	+

4.4.3. FLAVONOIDES TOTAIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS E DOS ACESSOS DE *S. pseudoquina*

A curva para quantificação (obtida utilizando o padrão rutina) e sua respectiva equação de reta podem ser visualizadas na Figura 34:

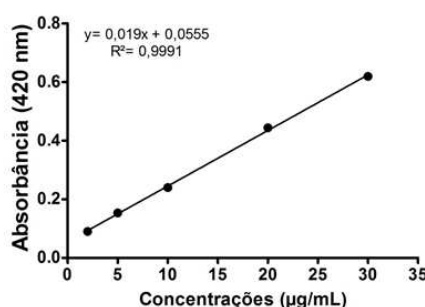


Figura 34: Curva padrão expressa em rutina, para o teste de flavonoides totais.

Os resultados da quantificação de flavonoides totais para as amostras comerciais e para os acessos de *S. pseudoquina* foram reunidos na Tabela 14.

O acesso proveniente da região de Jaboticatubas (MG) mostrou-se mais concentrado dentre todas as amostras analisadas. Os acessos de Rio Verde e Montes Claros apresentaram teores semelhantes aos obtidos para as amostras comerciais.

Tabela 14: Concentrações de flavonoides totais para as amostras comerciais e acessos de *Strychnos pseudoquina*.

Amostras	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média	Concentração µg/mL	Concentração mg/g de Droga Vegetal
SPJ (Jaboticatubas)	0,328	0,327	0,327	0,327	20,15	12,593
SPRV (Rio Verde)	0,538	0,534	0,533	0,535	31,08	4,856
SPM (Montes Claros)	0,255	0,259	0,254	0,256	16,39	2,562
A1 (Amostra Comercial 1)	0,147	0,161	0,159	0,156	11,11	1,737
A2 (Amostra Comercial 2)	0,256	0,257	0,254	0,256	16,38	2,559
A3 (Amostra Comercial 3)	0,371	0,372	0,373	0,372	22,50	3,516

4.4.4. CONTROLE BIOLÓGICO PARA OS ACESSOS DE *S. pseudoquina*

O controle biológico, utilizando diferentes acessos de *S. pseudoquina*, submetendo-os ao teste de inibição de *P. fluorescens*, revelou que os valores de absorbância obtidos estão diretamente relacionados com o teor de flavonoides dos extratos. No gráfico gerado para a inibição da bactéria pelo valor de absorbância da resazurina (Figura 35) estão ilustradas as diferentes inibições.

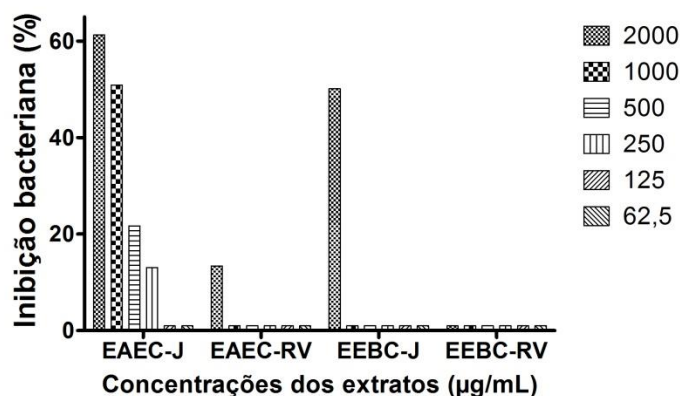


Figura 35: Inibição de *Pseudomonas fluorescens* pelos extratos em acetato de etila e etanólicos brutos de *Strychnos pseudoquina*.

Nota: EAEC-J (extrato em acetato de etila das cascas de *S. pseudoquina* de Jaboticatubas), EAEC-RV (extrato em acetato de etila das cascas de *S. pseudoquina* de Rio Verde), EEBC-J (extrato etanólico bruto das cascas de *S. pseudoquina* de Jaboticatubas), EEBC-RV (extrato etanólico bruto das cascas de *S. pseudoquina* de Rio Verde).

Assim como no item 3.4.2, do Capítulo II, pode-se perceber que a multiplicação de *P. fluorescens* não foi afetada pelas concentrações de DMSO utilizada nos testes.

A análise de variância (ANOVA) demonstrou não haver variância significativa ($p < 0,05$) para as concentrações de 2000 µg/mL e 125 µg/mL de todos os extratos testados. O EAEC-J apresentou os maiores valores de inibição para todas as concentrações utilizadas no teste quando comparado aos demais extratos testados.

Analisando os dois extratos, em acetato de etila e etanólico bruto, da DV (Droga Vegetal) de Rio Verde (EAECRV e EEBCRV, respectivamente), o Teste t, comparando os valores de absorbância obtidos em todas as concentrações testadas (2000, 1000, 500,0, 250,0, 125,0, 65,50 µg/mL) demonstrou não haver diferença significativa ($p < 0,05$) para os efeitos inibitórios encontrados.

Por outro lado, para os extratos da DV de Jaboticatubas foi observada diferença significativa entre os extratos obtidos utilizando os dois solventes orgânicos para os efeitos inibitórios em *P. fluorescens* nas concentrações de 1000, 500,0, 250,0, 125,0, 65,50 µg/mL para $p < 0,05$, demonstrando que EAEC-J e EEBC-J possuem constituintes diferentes e, conseqüentemente, diferentes efeitos inibitórios.

Os efeitos inibitórios provocados pelas concentrações utilizadas dos extratos indicam que a concentração de 125 µg/mL para o EAECJ apresentou

o mesmo efeito inibitório comparável estatisticamente ($p < 0,05$) às concentrações de 1000 µg/mL de EAECRV e EEBCRV.

Avaliando-se exclusivamente a concentração de 1000 µg/mL de todos os extratos testados pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) e esta diferença permite que algumas considerações sejam melhor exploradas.

O efeito inibitório encontrado para EAECJ pode ser explicado devido ao fato de que *P. fluorescens*, como descrito no item 3.4.3. e 3.4.4. do Capítulo II, apresenta uma sensibilidade peculiar ao fitocomplexo de *S. pseudoquina* (flavonoides).

Portanto, a concentração de flavonoides totais presente no acesso proveniente de Jaboticatubas (12,5 mg/g de Droga Vegetal) em comparação ao acesso de Rio Verde (4,85 mg/g de Droga Vegetal) provocou diferentes respostas na inibição desta bactéria.

Na tentativa de buscar uma equivalência entre os teores de flavonoides encontrados nas drogas vegetais utilizadas no teste e os efeitos inibitórios observados contra *P. fluorescens* (efeito este que é diretamente proporcional aos valores de absorbância da resazurina, como descrito no item 3.3.4.3. do Capítulo II), foram obtidas as médias de absorbância encontradas para a concentração de 1000 µg/mL para os EAEC de Rio Verde e o EAEC de Jaboticatubas. As médias dos valores de absorbância encontrados foram 0,720 e 0,406, respectivamente, para EAECJ e EAECRV.

Prosseguindo com a hipótese de que os efeitos inibitórios podem ser diretamente proporcionais às concentrações de flavonoides totais dos extratos em acetato de etila, é necessário determinar a concentração do fitocomplexo nos extratos utilizados (EAECJ e EAECRV). Esta determinação ocorreu levando em consideração o teor de flavonoides totais presentes nas DV de Rio Verde e Jaboticatubas.

Para estabelecer a massa teórica do fitocomplexo presente nos EAEC a partir dos teores de flavonoides totais das drogas vegetais das duas regiões analisadas foi utilizada a seguinte equação:

$$m_f = \frac{Ft_{DV} \cdot m_{DV} \cdot R_{EAEC}}{100}$$

Sendo m_f o valor da massa do fitocomplexo extraída pelo solvente acetato de etila, Ft_{DV} a concentração de flavonóides totais para as DV, expresso em mg/g de DV (obtido por espectrofotometria), m_{DV} a massa de DV utilizada no processo de extração (g) e R_{EAE} o rendimento do extrato em acetato de etila obtido após o processo de extração (%).

Para *S. pseudoquina* de Jaboticatubas, as incógnitas da equação proposta são: $Ft_{DV} = 12,593$ mg/g, $m_{DV} = 200$ g e $R_{EAE} = 4,49\%$. Para o acesso de Rio Verde temos: $Ft_{DV} = 4,85$ mg/g, $m_{DV} = 1000$ g e $R_{EAE} = 1,3\%$.

Os valores de m_f obtidos para os extratos em acetato de etila das DV provenientes de Jaboticatubas e Rio Verde, segundo a equação anterior, foram 113,1 mg e 63,12 mg de fitocomplexo, respectivamente.

Confrontando os dados relativos aos valores médios de absorbância adquiridos para a concentração de 1000 µg/mL dos dois extratos em acetato de etila com os valores obtidos para a concentração teórica dos fitocomplexos em ambos os extratos, tem-se as seguintes equações:

$$\frac{Abs_{EAE}RV}{Abs_{EAE}J} \quad e \quad \frac{mf_{EAE}RV}{mf_{EAE}J}$$

Sendo $Abs_{EAE}RV$ e $Abs_{EAE}J$ os valores das médias das absorbâncias da resazurina para a concentração de 1000 µg/mL dos extratos em acetato de etila de Rio Verde e Jaboticatubas ($Abs_{EAE}RV = 0,406$ e $Abs_{EAE}J = 0,720$) e $mf_{EAE}RV$ e $mf_{EAE}J$ as respectivas massas de fitocomplexo calculadas anteriormente para a extração das duas drogas vegetais ($mf_{EAE}RV = 63,12$ e $mf_{EAE}J = 113,1$), a obtenção das médias relativas destas medidas poderia ocasionar na observação da proporcionalidade entre o efeito inibitório e a massa de fitocomplexo presente nos EAE.

Aplicando as equações, os valores obtidos para a relação entre inibição de *P. fluorescens* e as massas relativas de fitocomplexo extraídas das duas DV foram 56,34% e 55,82%, respectivamente, indicando que há uma proporcionalidade entre a presença do fitocomplexo e a inibição da bactéria para os extratos em acetato de etila. Este resultado pode indicar que o controle biológico do fitocomplexo pode alcançar proporções mensuráveis e precisas

em comparação ao controle químico empregado (espectrofotometria) para os extratos em acetato de etila da espécie *S. pseudoquina*.

A correlação de Pearson, aplicada a estes extratos, também indica que a inibição provocada em *P. fluorescens* foi dependente da concentração de flavonoides totais. Este fenômeno foi observado tanto para as diferentes concentrações de flavonoides observadas por região de acesso, quanto para as concentrações do fitocomplexo presentes nos extratos produzidos com os diferentes solventes orgânicos utilizados no processo de extração. Em ambos os casos os extratos preparados utilizando acetato de etila como solvente extrator apresentou maior inibição de *P. fluorescens* quando comparado aos extratos etanólicos brutos (Figura 36).

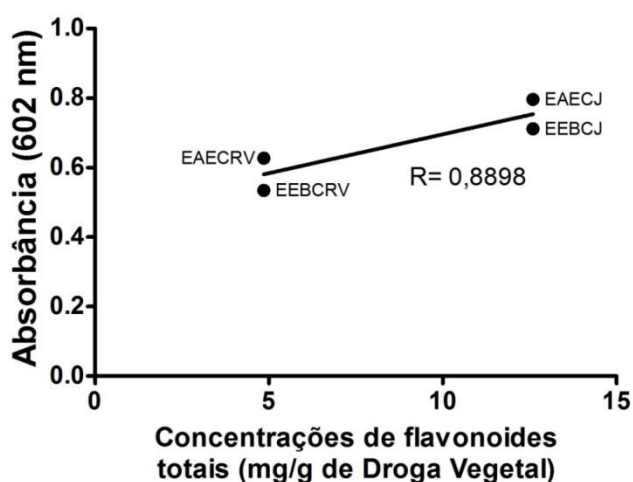


Figura 36: Correlação de Pearson para os extratos de acessos de *Strychnos pseudoquina* das regiões de Rio verde (MG) e Jaboticatubas (MG).

4.4.5. CONTROLE BIOLÓGICO PARA AS AMOSTRAS COMERCIAIS

Os efeitos inibitórios dos extratos das amostras comerciais (A1, A2 e A3) e acessos (SPM e SPJ) de *S. pseudoquina* testados para a inibição de *P. fluorescens* e quantificados por espectrofotometria (602 nm, valor de absorbância da resazurina, determinado conforme item 3.3.4.2, do Capítulo II) foram reunidos na Figura 37.

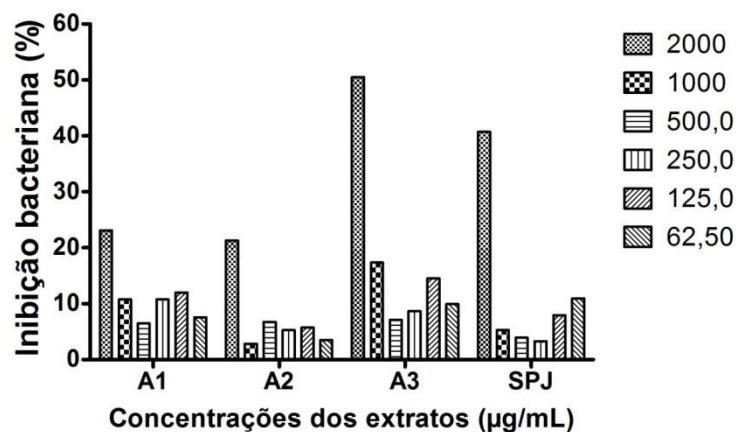


Figura 37: Inibição de *P. fluorescens* frente às amostras comerciais (A1, A2 e A3) e acessos de *Strychnos pseudoquina* (SPM e SPJ).

O controle biológico das amostras comerciais em comparação aos acessos de *S. pseudoquina* (inibição de *P. fluorescens*) revelou que houve correlação entre as atividades bacterianas encontradas (avaliadas conforme item 3.4.3, do Capítulo II) e a concentração de flavonoides totais presente nos extratos, exceto para a amostra comercial 3 (A3) (Figura 38).

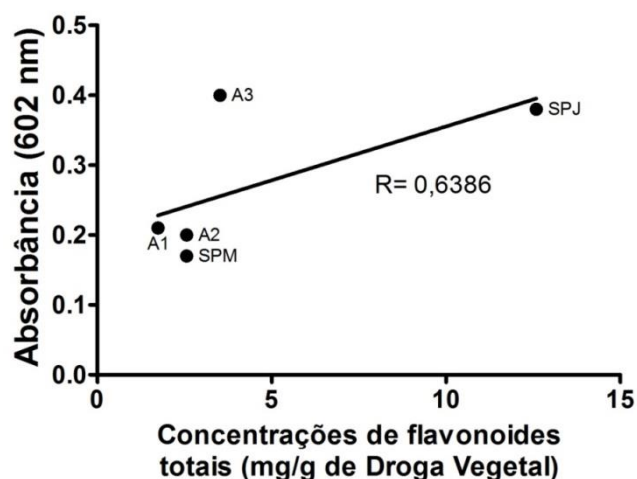


Figura 38: Correlação de Pearson entre as concentrações de flavonoides totais e o efeito inibitório causado pelos extratos de amostras comerciais (A1, A2 e A3) e acessos (SPM e SPJ) de *Strychnos pseudoquina* contra *P. fluorescens*.

Verificou-se que apenas a A3 apresentou inibição semelhante a SPJ neste teste, inibindo o crescimento de *P. fluorescens* na concentração de 2000 µg/mL.

A proposta de controle biológico se adequa às necessidades de acompanhamento da qualidade dos produtos derivados de plantas, porém, como este tipo de técnica foi recentemente permitida pela legislação, ainda não se encontra consolidada na Farmacopeia Brasileira. Desta forma, conclui-se que o pioneirismo deste trabalho encontra-se tanto na tentativa de colaborar para a inserção de um produto tradicional fitoterápico no mercado, quanto no controle de qualidade biológico do mesmo.

4.5. REFERÊNCIAS

ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e prespectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.

BERTRAME, F. L.; FERRONI, D. C.; ALVES, B. R. V.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO L. A. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Health Sciences (UEM)*, v. 31, n. 1, p.37-46, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. RDC nº 26 de 13.05.14. Determina a Publicação do “**O Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o Registro e a Notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos.**”. *Diário Oficial da União*, 09.05.14.

CALIXTO, L. F. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CHEN, Y.; WANG, J.; WAN, D. Determination of total flavonoids in three *Sedum* crude drugs by UV-Vis spectrophotometry. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 24, p. 259-63, 2010.

DOWLING, G.; REGAN, L. A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 54, n. 5, p. 1136-45, 2011.

ERNST, E. Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. **Journal of International Medicine**, v. 252, n. 2, p. 107-13, Aug 2002.

HU, X.; YOU, J.; BAO, C.; ZHANG, H.; MENG, X.; XIAO, T.; ZHANG, K.; WANG, Y.; WANG, H.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of total flavonoids in *Scutellaria barbata* D. Don by dynamic ultrasonic extraction coupled with on-line spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, n. 2, p. 217-23, 2008.

HUANG, B.; XU, M.; YANG, Q.; TIAN, X.; YANG, Y.; BAI, D. Review of approved supplementary testing methods and items on identifying adulterated chemical substances in

traditional Chinese medicine preparations and herbal medicines. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v. 34, p. 1701-1708, 2014.

HUI, R. H.; HOU, D. Y.; GUAN, C. X.; LIU, X. Y. Quantitative determination of total flavonoids in sea-buckthorn fruit juice by three wavelength spectrophotometry. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v. 25, n. 2, p. 266-9, 2005.

LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R. de; LOPES, A. de S.; FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; FILHO, J. D. de S.; TAVARES, A. A. P.; PÁDUA, R. M. de; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present na Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

LU, Y.; ZHOU, N. L.; LIAO, S. Y.; SU, N.; HE, D. X.; TIAN, Q. Q.; CHEN, B.; YAO, S. Z. Detection of adulteration of anti-hypertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS. **Food Additives & Contaminants**, v. 27, n. 7, p. 893-902, 2010.

JAPANESE PHARMACOPEIA 5ª Ed., 2006.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, CGEN. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/patrimonio-genetico>>. Acesso em 14 Fev. 2015.

REN, Y.; WU, C.; ZHANG, J. Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 21, p. 2847-57, 2012.

RYAN, M. P. Patent Incentives, technology markets, and public-private bio-medical innovation networks in Brazil. **World Development**, v. 38, n. 8, p. 1082-1093, 2010.

VACLAVIK, L.; KRYNITSKY, A. J.; RADER, J. I. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 27, p. 6767-90, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2. Edição, Munich, Springer, 1996. 385 p.

YE, F.; WANG, H.; JIANG, S.; WU, J.; SHAO, J.; CHENG, X.; TU, Y.; ZHANG, D. Y. Quality evaluation of commercial extracts of *Scutellaria baicalensis*. **Nutrition and Cancer**, v. 49, n. 2, p. 217-22, 2004.

YU, B. Y. UV-spectrophotometry of total flavonoids in maidong. **Zhong Yao Tong Bao**, v. 12, n. 4, p. 8-10, 1987.

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram que, entre todos os solventes extratores testados durante as percolações das cascas e folhas dos espécimes de *S. pseudoquina*, o acetato de etila foi capaz de produzir um efeito concentrador para a classe dos flavonoides, principalmente para as cascas. Este efeito foi comprovado pelos *fingerprints* dos extratos obtidos em HPLC-

DAD. O extrato em acetato de etila das cascas (EAEC) foi mais eficaz do que os demais extratos das cascas e folhas para as atividades biológicas testadas (atividade antibacteriana, estímulo à proliferação de fibroblastos *in vitro* e sinergismo antibacteriano). Ao confrontarmos os resultados dos testes biológicos com a composição química dos extratos pode-se relacionar a maior eficácia de EAEC a sua maior concentração de flavonoides.

A utilização das cascas de *S. pseudoquina* pela medicina popular como farmacógeno desta espécie vegetal encontra, portanto, embasamento químico e biológico, sustentando a tradicionalidade de uso e a importância da proteção do bioma Cerrado.

O *fingerprint* dos extratos demonstrou ainda que EAEC é constituído, majoritariamente, pelos flavonoides estrichnobilflavona e quercetina-3-O-metil éter. Novas prospecções serão realizadas a fim de isolar e purificar estes compostos para posteriores testes das atividades observadas no presente trabalho. Estudos *in vivo* poderão ser conduzidos para comprovar a atividade cicatrizante do extrato enriquecido em flavonoides.

As cepas Gram positivas e negativas que não apresentaram sensibilidade aos extratos durante a triagem serão submetidas ao teste de sinergismo com a ampicilina a fim de compreender melhor o efeito inibitório provocado pelo EAEC.

As técnicas utilizadas para controle da qualidade (controles químicos e controle biológico da qualidade) demonstraram que há desvios da qualidade em drogas vegetais de *S. pseudoquina* comercializadas, indicando que há risco sanitário no consumo desta espécie vegetal. O presente trabalho contribuiu para o estabelecimento de metodologias que podem ser utilizadas na padronização de técnicas bioanalíticas destinadas ao controle da qualidade desta espécie.

Em busca da exploração sustentável de *S. pseudoquina*, serão conduzidos testes para avaliar a produção de flavonoides *in vitro* por meio de cultura de tecidos vegetais e as melhores condições de micropropagação *in vitro* para esta planta medicinal.