

DOUGLAS DA COSTA GONTIJO

**ABORDAGEM ETOLÓGICA NA BUSCA DE DROGAS VEGETAIS COM
POTENCIAL AÇÃO ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA,
ANTIMUTAGÊNICA E ANTIGENOTÓXICA**

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
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G641a
2012

Gontijo, Douglas da Costa, 1984-

Abordagem etológica na busca de drogas vegetais com potencial ação antioxidante, antibacteriana, antimutagênica e antigenotóxica / Douglas da Costa Gontijo. – Viçosa, MG, 2012.

xvii, 140f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Antioxidantes. 3. Animais -
Comportamento. I. Universidade Federal de Viçosa.

II. Título.

CDD 22. ed. 547.3

DOUGLAS DA COSTA GONTIJO

**ABORDAGEM ETOLÓGICA NA BUSCA DE DROGAS VEGETAIS COM
POTENCIAL AÇÃO ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA,
ANTIMUTAGÊNICA E ANTIGENOTÓXICA.**

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: 17 de maio de 2012

Rodrigo Maia de Pádua

Luciano Gomes Fietto
(Coorientador)

João Paulo Viana Leite
(Coorientador)

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

"Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara."

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Selma e João, pelo amor incondicional e incentivo.

Ao meu irmão Pablo, pela amizade e preciosa ajuda nas análises estatísticas deste trabalho.

A minha namorada Larissa, pelo companheirismo e amor.

Ao Professor João Paulo Viana Leite, pela amizade, orientação, confiança e incentivo fundamentais para minha formação.

Ao Professor Luciano Fietto, pela parceria e orientação neste e em outros trabalhos.

A Professora Marisa Alves Nogueira Diaz, pela orientação e confiança depositada neste trabalho.

Ao Pesquisador Rodrigo Maia, pela colaboração na melhoria deste trabalho.

Ao Dudu, pela ajuda em todos os aspectos burocráticos do mestrado.

Aos amigos Letícia, Renato e Leandro por compartilharem seus trabalhos sobre muriquis, fundamentais pra a execução deste estudo.

Aos demais Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos e colaborações no decorrer deste trabalho.

A todos os companheiros de trabalho do Laboratório de Biodiversidade, Hugo, Alisson, Amandinha, Victor, Luciana.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Molecular, pelo auxílio nas dúvidas sobre biologia molecular.

Ao Marquinhos, pela amizade e tranquilidade como companheiro de moradia.

Aos queridões da Bioquímica, Patinho, Thiaguinho, Túlio, Brunão, Dani Mendes, Xiboca, Izabelita, Tevez e Baiana, pela amizade.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudos, sem a qual seria inviável a minha dedicação a este trabalho.

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) pela autorização de coleta e apoio logístico no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro.

A todos que estiveram direta e indiretamente inseridos neste trabalho.

A todos, minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
Capítulo 1 - Revisão bibliográfica sobre atividades biológicas de produtos naturais, abordagem etológica e sobre 7 espécies vegetais consumidas na dieta do primata <i>Brachyteles hipoxanthus kuhl</i>	8
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. Produtos naturais de origem vegetal	9
1.2. Atividades antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica e antígenotóxica de produtos naturais	10
1.3. Abordagem Etológica	10
1.3.1. Abordagem Etológica no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG	13
1.3.2. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	14
1.3.3. <i>Brachytelis hipoxanthus</i> Kuhl	15
1.4. Espécies vegetais investigadas no presente trabalho	16
1.4.1. <i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl.	17
1.4.2. <i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	18
1.4.3. <i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	19
1.4.4. <i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg.	21

1.4.5. <i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	21
1.4.6. <i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Müll. Arg.	22
1.4.7. <i>Solanum swartzianum</i> Roem. & Schult.	23
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

Capítulo 2 - Prospecção fitoquímica, quantificação fenólica e ação antioxidante dos extratos aquosos das espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl* 45

1. INTRODUÇÃO	46
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos	48
3. METODOLOGIA	49
3.1. Coleta e Identificação do Material Vegetal	49
3.2. Secagem e obtenção do extrato vegetal	49
3.3. Prospecção fitoquímica e obtenção do perfil cromatográfico	50
3.4. Quantificação de polifenóis totais	52
3.5. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	52
3.5.1. Sistema de sequestro de radicais livres – DPPH	52
3.5.2. Método co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	53
3.5.3. Método de Peroxidação Lipídica	54
3.6. Análise estatística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Prospecção fitoquímica	56
4.2. Quantificação de polifenóis totais	58
4.3. Ação antioxidante	60
4.3.1. Ação antioxidante pelo método do radical DPPH	60
4.3.2. Ação antioxidante pela co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico	63
4.3.3. Ação antioxidante pela peroxidação lipídica	65
4.4. Correlação do conteúdo de polifenóis totais X ação antioxidante	67

5.	CONCLUSÃO	70
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Capítulo 3 - Atividade antibacteriana de extratos de plantas consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl* frente à diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* oriundas de mastite bovina 79

1.	INTRODUÇÃO	80
2.	OBJETIVOS	82
2.1.	Objetivo Geral	82
2.1.	Objetivos Específicos	82
3.	METODOLOGIA	83
3.1.	Micro-organismos e condição de cultivo	83
3.2.	Extratos vegetais e antibiótico	83
3.3.	Avaliação da atividade antibacteriana	83
3.4.	Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos vegetais	84
3.5.	Análise estatística	85
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1.	Avaliação da atividade antibacteriana	86
4.2.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	96
5.	CONCLUSÃO	100
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

Capítulo 4 - Avaliação da citotoxicidade, ação antimutagênica e antigenotóxica de 3 espécies vegetais com potencial atividade antioxidante consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl* 107

1.	INTRODUÇÃO	108
2.	OBJETIVOS	110
2.1.	Objetivo Geral	110
2.2.	Objetivos Específicos	110

3.	METODOLOGIA	111
3.1.	Extratos vegetais	111
3.2.	Testes Citotóxico e Antimutagênico com <i>Salmonella typhimurium</i> /microsoma.	111
3.2.1.	Cepas <i>Salmonella typhimurium</i> /microsoma utilizadas	111
3.2.2.	Meios de cultura	112
3.2.3.	Controles Mutagênicos	112
3.2.4.	Mix S9	113
3.3.	Citotoxicidade dos extratos vegetais a <i>Salmonella typhimurium</i> /microsoma ...	113
3.4.	Ensaio de antimutagenicidade dos extratos	114
3.4.1.	Análise da ação antimutagênica dos extratos	114
3.4.2.	Análise estatística (Teste antimutagênico)	115
3.5.	Testes de antigenotoxicidade	115
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
4.1.	Citotoxicidade dos extratos frente a cepa TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> /microsoma	117
4.2.	Análise antimutagênica dos extratos	119
4.3.	Análise antigenotóxica dos extratos	129
5.	CONCLUSÃO	132
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
	CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO	138
	PERSPECTIVAS DO TRABALHO	140

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Revisão bibliográfica sobre atividades biológicas de produtos naturais, abordagem etológica e sobre 7 espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl*

Figura 1. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. A área de vida do Grupo Matipó corresponde a área estudada para abordagem etológica no PESB. 15

Figura 2. Espécie primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl (muriqui-do-norte) do PESB. ... 16

Figura 3. Espécie vegetal *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae). 18

Figura 4. Espécie vegetal *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae). 19

Figura 5. Espécie vegetal *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae). 20

Figura 6. Espécie vegetal *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). 21

Figura 7. Espécie vegetal *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). 22

Figura 8. Espécie vegetal *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). 23

Figura 9. Espécie vegetal *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae). 24

Capítulo 2 - Prospecção fitoquímica, quantificação fenólica e ação antioxidante dos extratos aquosos das espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl*

Figura 1. Quantidade média de polifenóis totais expressos em micrograma Equivalentes de Ácido Tânico por miligrama de extrato seco (μg EAT/mg extrato). 60

Figura 2. Percentagem de ação antioxidante pelo método do DPPH e comparação de IC₅₀ para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. 62

Figura 3. Perfil do descoramento do β-caroteno incubado com os extratos em função do tempo de reação, além da comparação da percentagem de ação antioxidante pelo método de co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e o controle negativo usado no teste. 64

Figura 4. Percentagem de ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS e o controle negativo usado no teste. 65

Figura 5. Correlação de *Pearson* entre o conteúdo de polifenóis totais e ação antioxidante para os testes de DPPH, co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. 69

Capítulo 3 - Atividade antibacteriana de extratos de plantas consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl* frente à diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* oriundas de mastite bovina

Figura 1. Teste antibacteriano de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*) frente as cepas de *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125. 87

Figura 2. Teste antibacteriano de EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) frente as cepas de *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24. 88

Figura 3. Teste antibacteriano de EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) frente as cepas de *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125. 90

Figura 4. Teste antibacteriano de EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) frente a cepas de *S. aureus* 3993. 91

Figura 5. Percentagem de ação antibacteriana para EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*), EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*), EAPS (Extrato Aquoso *Psychotria suterella*), EAPV (Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*), EARJ (Extrato Aquoso *Rudjia jasminoides*), EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) e os controles positivo (AMPICILINA) e negativo (DMSO). 94

Figura 6. Determinação da concentração inibitória mínima de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*), EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) e EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) para a cepa de *S. aureus* 3993. 96

Figura 7. Determinação da concentração inibitória mínima de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) para a cepa de *S. aureus* 4125 e EAML para a cepa *E. coli* 24. 97

Capítulo 4 - Avaliação da citotoxicidade, ação antimutagênica e antigenotóxica de 3 espécies vegetais com potencial atividade antioxidante consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl*

Figura 1. Curva média de citotoxicidade de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem ativação metabólica S9. 118

Figura 2. Percentagem de inibição mutagênica de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem e com ativação metabólica S9. 122

Figura 3. Percentagem de inibição mutagênica de EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem e com ativação metabólica S9. 125

Figura 4. Percentagem de inibição mutagênica de EAOO (Extrato Aquoso <i>Ocotea odorifera</i>) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> /microsoma sem e com ativação metabólica S9.	128
Figura 5. Ação antígenotóxica de EAAG (Extrato Aquoso <i>Alchornea glandulosa</i>).	130
Figura 6. Ação antígenotóxica de EAML (Extrato Aquoso <i>Miconia laterenata</i>).	130
Figura 7. Ação antígenotóxica de EAOO (Extrato Aquoso <i>Ocotea odorifera</i>).	131

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 - Prospecção fitoquímica, quantificação fenólica e ação antioxidante dos extratos aquosos das espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl*

Tabela 1. Espécies vegetais, identificação e rendimento dos extratos aquosos das folhas.
..... 50

Tabela 2. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos das espécies vegetais estudadas.
..... 51

Tabela 3. Resultados da prospecção fitoquímica, por CCD e valor do fator de retenção (entre parênteses) dos extratos aquosos das espécies estudadas e dos padrões de referência utilizados. 57

Tabela 4. Resultados da quantificação de polifenóis totais dos extratos aquosos das espécies estudadas. 59

Tabela 5. Resultados da quantificação de polifenóis totais, ação antioxidante por DPPH, co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica, dos extratos aquosos das espécies estudadas. 67

Capítulo 3 - Atividade antibacteriana de extratos de plantas consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl* frente à diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* oriundas de mastite bovina

Tabela 1. Atividade antibacteriana expressa pela média em milímetros do halo \pm desvio padrão e percentagem de ação antimicrobiana \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24, expostas a concentração de 1500 μ g de extrato/halo. 93

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de EAAG, EAML, EA00, EAPS, EAPV, EARJ e EASS as cepas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24. 98

Capítulo 4 - Avaliação da citotoxicidade, ação antimutagênica e antigenotóxica de 3 espécies vegetais com potencial atividade antioxidante consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus kuhl*

Tabela 1. Atividade citotóxica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de citotoxicidade \pm desvio padrão (valor entre parênteses) de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*) e EA00 (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) a cepa TA100 de *S. typhimurium* sem ativação metabólica, exposta a diferentes doses de extrato. 117

Tabela 2. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*). 120

Tabela 3. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EAML (Extrato Aquoso *Miconia laterenata*). 123

Tabela 4. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EA00 (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*). 126

RESUMO

GONTIJO, Douglas da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Abordagem etológica na busca de drogas vegetais com potencial ação antioxidante, antibacteriana, antimutagênica e antígenotóxica.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: João Paulo Viana Leite e Luciano Gomes Fietto.

A investigação científica de atividade biológica de extratos vegetais tem sido uma importante estratégia para a descoberta de produtos naturais com grande aplicação em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). Em um país com megabiodiversidade como o Brasil, esta constatação adquire ainda mais valor. O emprego de estratégias de acesso a biodiversidade se faz importante para selecionar plantas para a prospecção de novos fármacos. Nesse sentido, a abordagem etológica monitorando a dieta de primatas na floresta tem se mostrado bastante eficaz, uma vez que esses mamíferos fazem uso de uma vasta gama de espécies, que muitas vezes não fazem parte do uso cotidiano e científico. Aplicando-se esta abordagem etológica, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* e antimicrobiano, além de análise fitoquímica preliminar e conteúdo fenólico de sete extratos aquosos liofilizados de folhas de plantas usadas na dieta do primata *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl (muriqui-do-norte), a saber: *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae), *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae), *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae) e *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae). Dentre estas, três espécies, *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata* e *Ocotea odorifera*, foram avaliadas quanto ao potencial antimutagênico e antígenotóxico, por apresentarem maior atividade antioxidante. A prospecção fitoquímica foi avaliada por CCD e o conteúdo fenólico avaliado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando os testes do radical livre DPPH, co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico e peroxidação lipídica do lipossomo. Para a avaliação antimicrobiana foram utilizadas duas cepas de bactérias gram-positivas de *Staphylococcus aureus* 3993 e *Staphylococcus aureus* 4125, além da cepa bacteriana gram-negativa de *Escherichia coli* 24, todas associadas com mastite bovina. Para os testes antimutagênicos foram utilizadas as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella tiphymurium*/microssoma sem e com ativação

metabólica S9, sendo realizado o método de co-incubação dos extratos com os diferentes padrões mutagênicos para as respectivas cepas. Teste de citotoxicidade com a cepa TA100 sem ativação S9 foi realizado a fim de se determinar as doses de extrato utilizadas nos testes de antimutagenicidade. Por fim, o teste antígenotóxico foi realizado utilizando-se o plasmídeo pUC18 co-incubado com padrão genotóxico e as mesmas doses dos extratos testadas para antimutagenicidade. Dessa forma, pôde-se observar que extratos aquosos de *M. latecrenata*, *A. glandulosa* e *O. odorifera* apresentaram maior conteúdo fenólico. A análise da atividade antioxidante nos três diferentes testes mostrou potencial antioxidante das amostras analisadas, sobretudo para os extratos de *M. latecrenata*, *A. glandulosa*, *O. odorifera* e *S. swartzianum*. Os resultados mostraram grande potencial antimicrobiano para os extratos de *M. latecrenata*, *A. glandulosa* e *O. odorifera*, sendo que o extrato de *M. latecrenata* foi o único extrato ativo contra bactéria gram-negativa *Escherichia coli* 24. Nos testes de citotoxicidade frente a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem metabolização S9, o extrato de *M. latecrenata* apresentou maior ação citotóxica, seguido pelos extratos de *A. glandulosa* e *O. odorifera*. A maior atividade antimutagênica foi observada para o extrato de *M. latecrenata* seguido pelos extratos de *A. glandulosa* e *O. odorifera*, principalmente frente a cepa TA102. Observou-se ainda aumento da atividade antimutagênica para a maioria das cepas testadas após a metabolização dos extratos. Não foi observada ação antígenotóxica para nenhum dos extratos testados. Assim, pelo presente estudo foi possível selecionar três extratos com potenciais atividades antimutagênica e bactericida, frente às cepas testadas.

ABSTRACT

GONTIJO, Douglas da Costa, M.Sc., Federal University of Viçosa, May 2012. **Ethological approach in search of herbal drugs with a potential antioxidant, antibacterial, antimutagenic and antigenotoxic.** Advisor: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisors: João Paulo Viana Leite and Luciano Gomes Fietto.

The scientific research of biological activity of plant extracts has been an important strategy for the discovery of natural products with wide application in Research, Development & Innovation (RD&I). In a country with rich biodiversity such as Brazil, this statement assumes even greater value. The use of strategies for access the biodiversity is important for selecting plants for exploration of new drugs. In this sense, the ethological approach monitoring the diet of primates in the forest has been quite effective, since these mammals make use of a wide range of species that often are not part of everyday and scientific. Applying this ethological approach, the present study aimed to assess the potential antioxidant *in vitro* and antimicrobial, as well as preliminary phytochemical analysis and phenolic content of seven freeze-dried aqueous extracts of leaves of plants used in the diet of primate *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl (*muriqui-do-norte*), as follows: *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae), *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae), *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae) and *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae). Among these three species, *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata* and *Ocotea odorifera* were evaluated for the potential antimutagenic and antigenotoxic, which presented higher antioxidant activity. The phytochemical prospection was assessed by TLC and the phenolic compound was evaluated using the Folin-Ciocalteu reagent. The antioxidant activity was evaluated by testing the free radical DPPH, co-oxidation of β -carotene/linoleic acid and lipid peroxidation of liposome. It was used two strains of Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* 3993 and *Staphylococcus aureus* 4125, as well as Gram-negative bacteria *Escherichia coli* 24 to assess the antimicrobial activity. For antimutagenic tests the strains used were TA97, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium*/microsome with and without S9 metabolic activation, being carried out the co-incubating method of the extracts with different mutagenic patterns for the respective strains. Cytotoxicity test with

the strain TA100 without S9 activation was performed in order to determine the dose of extract used in the antimutagenicity tests. Finally, the antigenotoxic test was carried out using the plasmid pUC18 co-incubated with genotoxic pattern and the same doses of the extracts tested for antimutagenicity. Thus, it was observed aqueous extracts of *M. latecrenata*, *A. glandulosa* and *O. odorifera* showed higher phenolic content. The analysis of antioxidant activity in three different tests showed high antioxidant potential of the samples, especially for the extracts of *M. latecrenata*, *A. glandulosa*, *O. odorifera* and *Solanum swartzianum*. The results showed strong antimicrobial potential to the extracts of *M. latecrenata*, *A. glandulosa* and *O. odorifera*, whereas the extract of *M. latecrenata* extract was the only one active against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* 24. Considering the tests of cytotoxicity against strain TA100 of *Salmonella typhimurium*/microsome without S9 metabolism, the extract of *M. latecrenata* showed higher cytotoxic activity, followed by the extracts of *A. glandulosa* and *O. odorifera*. The highest antimutagenic activity was observed for the extract of *M. latecrenata* followed by the extracts of *A. glandulosa* and *O. odorifera*, especially against the strain TA102. It was also observed increased antimutagenic activity for the most of the strains tested after the metabolization of the extracts. It was not observed antigenotoxic action for any of the extracts tested. Therefore, in the present study was possible to select three extracts with potential antimutagenic and bactericidal activity against the strains tested.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A pesquisa de produtos naturais de origem vegetal na busca de agentes terapêuticos e também como matérias-primas para a síntese de novos compostos biologicamente ativos tem se tornado, nas últimas décadas, uma importante estratégia, para a obtenção de novos fármacos, aproveitamento sustentável da biodiversidade, fomento a atividade econômica e aumento da qualidade de vida em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Patwardhan et al., 2004).

Os produtos naturais têm sido importante fonte de diversidade química, apresentando um arsenal de compostos com elevada importância terapêutica. Importantes atividades biológicas como ação antioxidante, antimicrobiana e antimutagênica dentre outras, são frequentemente atribuídas a produtos naturais de origem vegetal (Michelin et al., 2005, Zahin et al., 2010, Hossain & Shah, 2011), sendo que estas ações terapêuticas estão diretamente relacionadas com várias patologias crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias, infecciosas, neurodegenerativas e tumores (Penna et al., 2001, Huang et al., 2005, Ben Sghaiera et al., 2011).

Nesse contexto, importante ressaltar que o Brasil é o país que possui a maior reserva de diversidade biológica do mundo. Estima-se que o Brasil possua cerca de 20% de todas as espécies vegetais do planeta, apresentando mais de 55.000 espécies de plantas superiores conhecidas (Lewinsohn & Prado, 2002). Esta flora bastante diversificada representa uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, além de ainda constituir valiosos modelos para sínteses de novos fármacos (Varanda, 2006). Contudo, acredita-se que apenas 8% das espécies de plantas superiores brasileiras tenham sido alvo de estudos químicos e que somente 1.100 espécies (cerca de 2%) foram investigadas cientificamente quanto as suas propriedades terapêuticas (Guerra & Nodari, 2001).

Toda esta biodiversidade brasileira encontra-se distribuída em 6 principais biomas, como a Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa, sendo o Cerrado e Mata Atlântica classificados como *hotspots*, pois são biomas de grande riqueza e que estão entre os mais ameaçados de extinção, devido a grande pressão antrópica (Drummond et al., 2005). Dentre estes diferentes biomas, a Mata Atlântica apresenta-se

com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas que objetivam a descoberta de novas drogas, pois agrega enorme quantidade de recursos naturais. Estima-se que a Mata Atlântica possua cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo 8 mil delas endêmicas, além de recordes de quantidade de espécies e endemismo em vários outros grupos de plantas (Myers et al., 2000). Mesmo com extensas áreas ainda pouco conhecidas do ponto de vista biológico, acredita-se que a região abrigue de 1 a 8% da biodiversidade mundial (Fundação SOS Mata Atlântica, 2005).

Porém, a demanda por madeira e a expansão das fronteiras agrícolas, dentre outros fatores, promoveram drástica redução de sua área florestal. Atualmente restam apenas 8% de Mata Atlântica conservada, sendo que a mesma vegetação já se estendeu por 15% do território brasileiro (Tabarelli et al., 2005). Assim, a realização de pesquisas e o desenvolvimento de tecnologias ambientais que visam à utilização dos recursos naturais da Mata Atlântica de forma sustentável são fundamentais para estimular empreendimentos viáveis ambiental e comercialmente.

Como passo determinante no estudo da biodiversidade tem-se a forma de acesso ao patrimônio genético, que se faz importante devido a especificidades do conjunto de informações que podem ser levantadas a respeito das espécies estudadas durante uma pesquisa. Dessa forma, para uma pesquisa científica de bioprospecção de produtos naturais bioativos, diferentes estratégias podem ser empregadas, como o acesso randomizado de espécies vegetais, acesso guiado por fatores quimiotaxonômicos, acesso guiado pela informação etnofarmacológica, acessos biorracionais, guiadas pela ecologia e mais recentemente, as triagens de material vegetal guiadas pela etologia (Carrai et al., 2003, Krief, 2004, Albuquerque & Hanazaki, 2006).

Esta abordagem etológica é relatada em diferentes áreas da ciência como a biologia e psicologia, sendo que sua utilização como estratégia para acesso a biodiversidade visando a bioprospecção farmacêutica ainda é pouco explorada. Contudo, pesquisadores afirmam que se um animal aprende a evitar certos alimentos devido a sua toxicidade, ele também pode aprender a procurar por substâncias da natureza que sirvam como remédios (Krief et al., 2005). Assim, em biomas com grande variedade de espécies vegetais endêmicas como a Mata Atlântica, muitas plantas ainda são desconhecidas quanto ao uso pela medicina popular, sendo necessários métodos alternativos para se ter

acesso a este patrimônio genético de grande interesse e valor para a pesquisa farmacêutica. Nesse sentido, a abordagem etológica surge como uma interessante ferramenta na busca por novas drogas vegetais com potencial ação terapêutica, possivelmente desconhecidas da medicina tradicional.

2. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

Analisar o perfil fitoquímico, quantificar compostos fenólicos totais e avaliar atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos aquosos de 7 espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, além de analisar o potencial antimutagênico e antígenotóxico de 3 extratos com maior ação antioxidante.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, U.P., Hanazaki, N., 2006. Ethnodirected research in the Discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 678-689.

Ben Sghaiera, M., Boubakera, J., Skandrania, I., Bouhlela, I., Limema, I., Ghediraa, K., Chekir-Ghedirab, L., 2011. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 220-232.

Carrai, V., Borgognini-Tarli, S.M., Huffman, M.A., Bardi, M., 2003. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self medication in prosimians? *Primates*, 44, 61-66.

Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., Antonini, Y., 2005. Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação. 2^o ed. Fundação Biodiversitas, 222p.

Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade, Belo Horizonte.

Guerra, P.M., Nodari, O.R., 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões et al., 2001. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3^a ed. Porto Alegre: UFRGS, 15p.

Hossain, M.A., Shah, M.D., 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal Chemistry*, 4, 355-360.

Huang, D., Ou, B., Prior, R., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Krief, S., 2004. Effets prophylactiques et thérapeutiques de plantes ingérées par les chimpanzés: la notion d'automédication` chez les chimpanzés. *Primatologie*, 6, 151-172.

Krief, S., Huffman, M., Sévenet, T., Guillot, J., Bories, C., Hladik, C.M., Wrangham, R.W., 2005. Non-invasive monitoring of the health condition of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26, 467–490.

Lewinsohn, T.M., Prado, P.I., 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 176p.

Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F., Paganelli, M.O., Chaud, M.V., 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 316-320.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-845.

Patwardhan, B., Vaidya, A.B.D., Chorghade, M., 2004. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, 86, 789–799.

Penna, C., Marino, S., Vivot, E., Cruaños, M.C., Muñoz, J.D., Cruaños, J., Ferraro, G., Gutkind, G., Martino, V., 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal Ethnopharmacology*, 77, 37-40.

Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M., Bedê, L.C., 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, 1, 132-138.

Varanda, E.A., 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27, 1-7.

Zahin, M., Ahmad, I., Aqil, F., 2010. Antioxidant and antimutagenic activity of *Carum copticum* fruit extracts. *Toxicology in Vitro*, 24, 1243–1249.

CAPÍTULO 1

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
PRODUTOS NATURAIS, ABORDAGEM ETOLÓGICA E SOBRE 7 ESPÉCIES
VEGETAIS CONSUMIDAS NA DIETA DO PRIMATA *Brachyteles hipoxanthus*
Kuhl**

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Produtos naturais de origem vegetal

Plantas produzem um imenso número de metabólitos secundários, que apresentam diversas e complexas estruturas químicas, produzidos por diferentes vias biossintéticas complexas e altamente reguladas e que funcionam em vários compartimentos celulares e sub-celulares (Lewinsohn & Gijzen, 2009).

Estes metabólitos secundários, também conhecidos como produtos naturais, são biossintetizados a partir dos metabólitos primários como lipídios, carboidratos e aminoácidos, por intermédio de diversas reações enzimáticas, ocorridas no interior das células vegetais (Leite, 2008). Sabe-se ainda que o metabolismo secundário pode sofrer influência da interação de fatores bióticos e abióticos do ambiente com os mecanismos fisiológicos dos vegetais, ocasionando grande variação na produção de metabólitos secundários intra e inter-espécies (Arimura et al., 2005).

Na biosíntese de produtos naturais diferentes precursores como o acetato, mevalonato, 3-fosfoglicerato e aminoácidos são utilizados (Croteau et al., 2000, Schwab et al., 2008) . Dessa forma, várias moléculas são produzidas, dotadas de grande diversidade de esqueletos estruturais, originando várias classes de compostos como terpenos, flavonóides, cumarinas, quinonas, taninos, saponinas, alcalóides e outros com diversas atividades biológicas (Dewick, 2002).

Dessa forma, dadas as várias atividades biológicas e a importância do metabolismo secundário para as próprias plantas, não é de se estranhar que os produtos naturais têm desempenhado papel crucial para a humanidade, fornecendo alimentos com propriedades funcionais e farmacocquímicos para a produção de medicamentos (Ye et al., 2000). Entre 1981 e 2002, quase dois terços de todos os medicamentos aprovados pela organização mundial de saúde foram derivados ou inspirados em produtos naturais (Newman et al., 2003, Newman & Cragg, 2007). Estudos estimam ainda que cerca de dois terços da população mundial dependam de produtos naturais como fontes terapêuticas primárias (McChesney et al., 2007).

1.2. Atividades antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica e antígenotóxica de produtos naturais

Produtos naturais de origem vegetal são frequentemente relatados como eficientes agentes quimiopreventivos (Wozniaka et al., 2010). Assim, compostos fitoquímicos com ações antioxidante, antimutagênico e antimicrobiano são considerados essenciais para a prevenção de doenças infecciosas e degenerativas (Surh & Ferguson, 2003).

Nesse sentido, há um número crescente de estudos destinados à descoberta de metabólitos secundários com propriedades biológicas contra danos celulares causados principalmente por reações oxidativas (Zahin et al., 2010). Dentro deste contexto, diversos trabalhos têm mostrado a relação direta entre produtos naturais de origem polifenólica e atividades antioxidante, antimutagênica e antígenotóxica (Siddhuraju et al., 2003, Ivanova et al., 2005, Montoro et al., 2005, Mussarrat et al., 2006, Bouhlel et al., 2008), além de forte atividade antimicrobiana destes compostos (Majhenic et al., 2007, Wu et al., 2007, Ordóñez et al., 2009), sendo o *screening in vitro* a principal ferramenta seletiva usada em testes laboratoriais (Hayder et al., 2004, Savikin et al., 2009). Estes compostos polifenólicos, fruto do metabolismo secundário vegetal, são derivados de diferentes vias metabólicas, como a das pentoses-fosfato, acetato, chiquimato e fenilpropanóides (Randhir et al., 2004), apresentando-se amplamente distribuídos pelo reino vegetal, sendo enquadrados em diversas classes, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos, lignanas, ligninas e outras (Naczek & Shahidi, 2004).

O conteúdo deste tópico será novamente discutido na introdução dos Capítulos 2, 3 e 4, referentes a ação antioxidante, antimicrobiana e antimutagênica e antígenotóxica de extratos vegetais e compostos fenólicos, respectivamente.

1.3. Abordagem Etológica

O estudo da abordagem etológica ou zoofarmacognosia é um campo relativamente novo na pesquisa sobre o comportamento animal (Huffman, 2001, Engel, 2002). Em 1978 o pesquisador Daniel Janzen deu início ao estudo zoofarmacognóstico de primatas,

quando argumentou que necessidade de energia nutricional encontrada em determinadas espécies vegetais, por si só, não é suficiente para explicar hábitos alimentares incomuns de alguns primatas, levantando a possibilidade de que alguns animais podem usar metabólitos secundários de plantas como estimulantes, laxantes, antiparasitários e antibióticos ou como antídotos de toxicinas anteriormente consumidas (Jansen, 1978). Posteriormente, o estudo zoofarmacognóstico ganhou impulso com a observação de auto-medicação por chimpanzés na Tanzânia (Wrangham & Nishida, 1983, Huffman & Seifu, 1989) e babuínos na Etiópia (Philips-Conroy, 1986).

Assim, este estudo zoofarmacognóstico nasceu com a premissa básica de que animais selvagens podem selecionar e utilizar plantas específicas com propriedades medicinais para o tratamento de doenças e para proteção contra parasitas (Raman & Kandula, 2008). Em uma perspectiva mais ampla, esta abordagem coloca o metabolismo secundário vegetal como fonte medicamentosa para uso farmacológico e terapêutico, uma vez que grande parte do material vegetal que é consumido pelos animais contém uma matriz de compostos secundários extremamente diversificados e ativos biologicamente (Huffman & Seifu, 1989, Ohigashi et al., 1994, Plotkin, 2000).

Contudo, esta abordagem etológica sobre o metabolismo vegetal não é uma tarefa simples de se observar, pois deficiências na interpretação quanto a auto-medicação ou simples ingestão alimentar, além de dificuldades na obtenção de informações, podem levar a erros na conclusão de pesquisas, como distinguir entre possíveis benefícios medicinais diretos ou indiretos derivados do metabolismo secundário vegetal e o uso destas mesmas espécies apenas como fonte nutricional (Albuquerque & Hanazaki, 2006). No entanto, apesar de dificuldades quanto a interpretação de resultados, em vários trabalhos são descritas evidências claras de que primatas fazem uso de plantas para fins de medicamento (Hoffman, 2001). Há ainda relatos que alguns primatas fazem uso sazonal de algumas plantas (Hoffman, 2003). Assim, observações zoofarmacognósticas detalhadas de primatas aliada a proximidade filogenética e vias neurais comuns de percepção destes com os seres humanos, além de sintomas similares para doenças, permitem que uma seleção de plantas com propriedades terapêuticas realizadas por primatas seja válida para testes em humanos (Huffman et al., 1996).

Na literatura, há vários relatos usando abordagem etológica como fonte para estudo de novas drogas vegetais. Propriedades terapêuticas como antibióticos, antiinflamatórios, antipiréticos e imunoestimulantes já foram descritas para espécies consumidas por primatas (Huffman et al., 1998, Cousins & Huffman, 2002, Krief, 2003). Em estudos com babuínos, Lozano (1998) e Engel (2002) verificaram o consumo esporádico e em baixas quantidades diárias de folhas de determinadas plantas, que são bem relatadas na literatura por suas propriedades estimulantes, apesar da alta disponibilidade para consumo das espécies vegetais analisadas. Carrai et al. (2003), observaram que fêmeas de lêmures (*Propithecus verreauxi*) que apresentaram ingestão de plantas ricas em taninos durante o período de lactação, tiveram aumento no peso corpóreo e estimulação da secreção do leite, fato que está de acordo com algumas propriedades biológicas desses polifenóis. Krief et al. (2004) observaram o uso de folhas da espécie *Trichilia rubescens* por chimpanzés em uma região endêmica de malária, e verificaram em bioensaios que o extrato metanólico desta espécie possui expressiva ação antimalárica. Além disso, foram isolados dois novos compostos limonóides que também apresentaram atividade antimalárica. Krief et al. (2006) investigaram a atividade biológica de 24 espécies vegetais consumidas por chimpanzés, sendo observadas atividades antibacteriana, antimalárica e antileishimania, além de significativa citotoxicidade para células tumorais humanas. Lacroix et al. (2009) observaram que extratos em acetato de etila da espécie *Markhamia lutea*, consumida por chimpanzés, apresentaram alta atividade anti-leishimania e anti-tripanosossoma, além de baixa citotoxicidade contra células MRC5 e KB. Além disso, o emprego da estratégia zoofarmacognóstica para a seleção de plantas proporcionou a descoberta de novos compostos bioativos como os glicosídeos esteroidais em *Vernonia amygdalina* e limonóides em *Trichilia rubescens* dentre outros que podem atuar como protótipos para novos fármacos (Jisaka et al., 1993, Krief et al., 2004).

Assim, a abordagem etológica se apresenta como mais uma forma de seleção de plantas com vista ao estudo de bioprospecção farmacêutica. Possui ainda a vantagem de informar sobre espécies que nem sempre fazem parte do elenco de plantas da medicina popular.

1.3.1. Abordagem Etológica no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - MG

Durante os meses de maio a outubro de 2006, pesquisadores do grupo BioPESB (Programa de Bioprospecção e Uso Sustentável dos Recursos Naturais do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro) monitoraram 43 indivíduos da espécie *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl (muriquis-do-norte) na Unidade de Conservação Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, região da zona da mata mineira, a fim de se obter dados sobre hábitos alimentares deste primata, sobretudo observando-se aspectos como a estrutura vegetal ingerida (folhas, frutos, flores, entre outros) (Fávaro, 2008). Essas informações serviram para construção de um banco de dados do grupo BioPESB, visando a seleção de diferentes espécies vegetais a serem investigadas quanto a sua constituição fitoquímica e seu potencial farmacológico.

Em levantamento bibliográfico realizado com espécies vegetais consumidas pelos muriquis-do-norte no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro quanto ao número de relato científico referente a estudos químicos e farmacológicos dessas plantas, foram observados que das 29 espécies vegetais consumidas pelos primatas, apenas 27% apresentavam estudos relacionados à constituição química ou ação farmacológica, ou seja, 73% das espécies consumidas pelo *B. hipoxanthus* não possui qualquer estudo relacionado à prospecção farmacêutica (Gontijo et al., 2007, Fávaro, 2008). Em outro trabalho de pesquisadores do grupo BioPESB/UFV, foi analisada ainda a diferença de informações sobre espécies vegetais obtidas através da abordagem etológica e da etnofarmacologia. Assim, foi observado que 100% das espécies consumidas pelos primatas eram nativas da Mata Atlântica, enquanto somente 40% das espécies levantadas etnofarmacologicamente eram nativas. Das espécies diagnosticadas através da abordagem etológica, 60% não apresentaram estudos terapêuticos, sendo que apenas cerca de 25% delas possuem estudos fitoquímicos e farmacológicos. Já as espécies observadas por abordagem etnofarmacológica, somente 20% não apresentaram estudos terapêuticos, enquanto que 70% delas possuem estudos fitoquímicos e farmacológicos (Leite et al., 2012).

Dessa forma, o baixo número de trabalhos científicos referentes às espécies vegetais consumidas pelo primata *B. hipoxanthus* incentivou o estudo fitoquímico e a

avaliação do potencial terapêutico de algumas das espécies observadas no trabalho realizado por Fávares (2008).

1.3.2. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro

Localizado na Zona da Mata mineira, o Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) foi criado em setembro de 1996, através do Decreto Nº 38.319, sendo administrado pelo Instituto Estadual de Florestas – IEF/MG (IEF, 2008). O PESB é uma Unidade de Conservação (UC) que possui uma área de 13.210 hectares, com 126 km de perímetro, caracterizada pela presença dos biomas Mata Atlântica (Floresta Estacional Semidecidual Submontana) e por Campos de Altitude (Rolim & Ribeiro, 2001). Abriga diversos cursos d'água que integram as bacias dos rios Paraíba do Sul e Doce, ocupando terrenos de nove municípios mineiros (Leite et al., 2008) (Figura 1).



Figura 1. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. A área de vida do Grupo Matipó corresponde a área estudada para abordagem etológica no PESB. Adaptado de Fávaro (2008).

Atualmente, o PESB é uma das mais importantes reservas naturais do Estado de Minas Gerais, possuindo espécies raras, algumas em extinção e muitas ainda não catalogadas pela ciência. No PESB está localizado um *continuum* florestal que abriga uma das maiores populações de muriquis-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* kuhl, 1820) do Brasil (Mendes et al., 2005, Moreira et al., 2006).

1.3.3. *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl

A espécie *Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, conhecida popularmente por muriquis-do-norte (Figura 2), é uma espécie endêmica da Mata Atlântica exclusivamente herbívora, sendo o maior primata das Américas (Strier, 1992). Devido principalmente à fragmentação

de seu habitat e à caça ilegal (Mendes et al., 2005), a espécie se encontra criticamente em perigo de acordo com a Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2005). Atualmente, é estimado que menos de 1000 indivíduos da espécie *B. hipoxanthus* sobrevivam em alguns fragmentos isolados de Mata Atlântica nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (Mourthé, 2006).



Figura 2. Espécie primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl (muriqui-do-norte) do PESB. Adaptado de Fávaro (2008).

1.4. Espécies vegetais investigadas no presente trabalho

As 7 espécies vegetais estudadas neste trabalho foram selecionadas dentre as 29 espécies identificadas na dieta do primata *B. hipoxanthus* por terem sido coletadas em volume de material vegetal satisfatório para a realização dos vários testes realizados, além da maioria destas espécies apresentar baixo número de estudos científicos para os extratos utilizados neste trabalho.

1.4.1. *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

A espécie *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl., pertencente a família botânica Euphorbiaceae, é uma árvore de 10-20 metros de altura, conhecida popularmente por canela-raposa, tapiá ou tanheiro, encontrada principalmente no bioma Florestas Atlântica, sendo comumente utilizada para tratamentos gastrointestinais (Lorenzi, 1998, Pellizzon et al., 2010) (Figura 3). Estudos fitoquímicos das folhas espécie *A. glandulosa* mostram composição rica em compostos fenólicos, sendo que o extrato etanólico desta planta apresentou atividade larvicida (Urrea-Bulla et al., 2004). Compostos fenólicos isolados desta espécie apresentaram ação antioxidante e antiulcerogênica, além de ação quimiopreventiva para câncer (Morais et al., 2010, Sumbul et al., 2011). Em outro trabalho, Conegero et al. (2003) identificaram mistura de esteróides, terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos no extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa*. Ainda para o extrato metanólico das folhas foi observada ação antioxidante pelos testes do DPPH e β -caroteno em placa de CCD (Calvo et al., 2007). Fração em acetato de etila do extrato metanólico das folhas desta espécie mostrou ação antiinflamatória em testes *in vivo* (Lopes et al., 2005). Estudos com fração acetato de etila e alcalóides isolados desta espécie exibiram ainda ação antiangiogênica *in vitro* (Lopes et al., 2009, Lopes et al., 2011). Outros estudos *in vivo* sugerem que o extrato metanólico de folhas de *A. glandulosa* atua na redução de úlceras gástricas em roedores, provocando aumento da multiplicação celular relacionada ao crescimento da mucosa gástrica (Calvo et al., 2007). Ação antimicrobiana e antifúngica moderada, além de efeito citostático e citocida para melanoma, foram também encontradas para o extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* (Conegero et al., 2003). Em testes mutagênicos com diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*/microsoma, o extrato metanólico de *A. glandulosa* apresentou mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* (Santos et al., 2010).



Figura 3. Espécie vegetal *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae).

1.4.2. *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin

A espécie *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin, pertencente a família Melastomataceae, é uma espécie endêmica da Mata Atlântica, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até a Bahia (Goldenberg, 2010) (Figura 4). Estudos mostraram efeito citostático em células tumorais humanas provocado por extratos etanólicos e diclorometânico das folhas desta espécie (Pais, 2011). Outros trabalhos encontrados para esta espécie são referentes ao estudo fitossociológico, sistema reprodutivo e levantamento morfológico (Vilela et al., 1999, Goldenberg & Varassin, 2001, Cruz-Barros et al., 2007). Apesar de vários estudos farmacológicos sobre espécies do gênero *Miconia*, foi verificado baixo número de estudos sobre ação terapêutica e ausência de estudos sobre a composição fitoquímica para a espécie *Miconia latecrenata*.

O gênero *Miconia* é o maior gênero da família Melastomataceae, apresentando aproximadamente 1000 espécies que ocorrem principalmente em áreas tropicais das Américas (Renner, 1993). Extratos de espécies deste gênero têm demonstrado ação antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica, tripassomicida e atividade antimalárica (Hasrat et al., 1997, Celotto et al., 2003, Spessoto et al., 2003, Cunha et al., 2008, Rodrigues et al., 2008, Serpeloni et al., 2008, Pieroni et al., 2011, Serpeloni et al., 2011), além de mutagenicidade (Meyagusku & Varanda, 2009,

Meyagusku & Varanda, 2010). Análise fitoquímica de espécies do gênero *Miconia* mostraram composição rica em polifenóis e triterpenos (Cunha et al., 2003, Rodrigues et al., 2007).



Figura 4. Espécie vegetal *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomatacea).

1.4.3. *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer

A espécie *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, pertencente a família Lauraceae, é uma espécie arbórea nativa do Brasil e naturalmente encontrada nos domínios da Mata Atlântica, do Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, sendo comumente conhecida por canela-sassafrás (Santa-Catarina et al., 2001) (Figura 5). É utilizada para a recuperação de matas ciliares degradadas e como árvore madeireira, estando por isso, incluída na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992, Carvalho, 1994). Devido a baixa incidência de outras espécies sob as copas de árvores de *O. odorifera*, a esta espécie é atribuído efeito alelopática (Filho & Nogueira, 2005). Estudos etnofarmacológicos desta espécie apontam para uso como antimalárico (Bolsaris, 2007). Em estudos fitoquímicos foi observada a presença em alta concentração do polifenol safol, além de fenilpropanóides, esteroides, sesquiterpenos e cumarinas (Marques & Massayoshi, 1990, Lordello et al., 2000, Oltramari et al., 2004). Estudos antimicrobianos com o extrato metanólico de folhas da espécie *O. odorifera* mostraram baixa atividade em ensaios de difusão em ágar (Souza

et al., 2004). Outro estudo antimicrobiano realizado com a casca do tronco de *O. odorifera* para 10 cepas bacterianas apontaram também baixa atividade antimicrobiana, sendo somente 1 cepa sensível ao extrato de *O. odorifera* (Rodrigues, 1996). Estudos com óleo essencial e polifenóis isolados desta espécie mostraram ação antifúngica e larvicida (Pinto et al., 2010, Castro & Lima, 2011, Yamaguchi et al., 2011). Em trabalhos com extratos aquosos das folhas, cascas de troncos e cascas de raízes de *O. odorifera* foram observados grande potencial alelopático (Carmo et al., 2007). Outros trabalhos mostram estudos de fenologia e estrutura populacional desta espécie (Ribeiro et al., 2011ab)

Para o gênero *Ocotea* encontra-se aproximadamente 350 espécies, sendo observadas principalmente em regiões neotropicais (Mabberley, 1997). A espécies do gênero *Ocotea* são atribuído uso como aromatizante, ação antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, tripassomicida, antiinflamatória e antiplaquetária, além de efeitos cardiovasculares (Kijoa et al., 1981, Bruni et al., 2004, Setzer et al., 2006, Tognolini et al., 2006, Ballabeni et al., 2007, Noriega & Dacarro, 2008, Ballabeni et al., 2010). Estudos mostram ainda alta toxicidade a células de mamíferos e mutagenicidade de diferentes espécies deste gênero (Marques et al., 2003, Chaverri et al., 2011). Estudos fitoquímicos mostram a presença de neolignanas, flavonoides, terpenóides e alcalóides em diferentes tipos de extratos para espécies de *Ocotea* (Garcez et al., 1995, Lordello & Yoshida, 1997, Silva et al., 2002, Takaku et al., 2007).



Figura 5. Espécie vegetal *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae).

1.4.4. *Psychotria suterella* Müll. Arg.

A espécie *Psychotria suterella* Müll. Arg., pertencente a família Rubiaceae, é um arbusto de até 2 metros de altura, encontrada em florestas tropicais costeiras brasileiras (Dillemburg & Porto, 1985) (Figura 6). Em estudos com extrato etanólico basificado das folhas de *P. suterella* foram identificados 3 alcalóides indólicos monoterpênicos, que apresentaram baixo efeito analgésico, assim, como o extrato bruto (Santos et al., 2001). A maior parte dos estudos sobre a espécie *P. seuterella* está relacionada a trabalhos sobre ecologia e fenologia desta espécie (Lopes & Buzato, 2005, Bertani, 2006, Ines, 2006).

O gênero *Psychotria* reconhecido principalmente pela produção de alcalóides apresenta entre 1000 a 1600 espécies catalogadas (Nepokroeff et al., 1999). Estudos mostram ação antioxidante, antimutagênica e ação analgésica *in vitro* para espécie de *Psychotria* (Elisabetsky et al., 1997, Fragoso et al., 2008) sendo comumente reconhecidas por seus efeitos psicotrópicos, devido principalmente a presença de alcalóides (Lopes et al., 2004).



Figura 6. Espécie vegetal *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae).

1.4.5. *Psychotria vellosiana* Benth.

A espécie *Psychotria vellosiana* Benth., pertencente a família Rubiaceae, é um arbusto de 2-4 metros de altura, comum em locais sombreados de florestas tropicais

úmidas e em cerrado, distribuída no leste do Brasil, de Santa Catarina até Pernambuco (Labouriau et al., 1964) (Figura 7). Estudos com extratos etanólicos e cloreto de metileno das folhas de *P. vellosiana* mostram a presença dos compostos fitoquímicos flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas e esteróides/triterpenos, além de alta atividade antioxidante *in vitro* para o extrato etanólico, baixa toxicidade *in vivo* e alto valor nutricional para as folhas de *P. vellosiana* (Vieira, 2010). Além disso, estudos com extrato etanólico das folhas de *P. vellosiana* mostraram ação antimicobacteriana com ausência de citotoxicidade para células de mamíferos (Ramos et al., 2008). Contudo, a maior parte dos estudos sobre a espécie *P. vellosiana* está relacionada a trabalhos sobre germinação e anatomia foliar desta espécie (Araújo & Cardoso, 2006, Melo et al., 2011).



Figura 7. Espécie vegetal *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae).

1.4.6. *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg.

A espécie *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg., pertencente a família Rubiaceae, é uma árvore pequena, reconhecida pelo cheiro agradável de suas flores durante o período de floração (Lopes et al., 1999) (Figura 8). Estudos realizados por Braga et al. (1991) mostraram a produção de substâncias antifúngicas por esta espécie. Em trabalho com suspensões celulares da espécie *R. jasminoides* foi observado alta atividade fungicida devido principalmente a atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas antifúngicas (Silva & Braga, 2004, Oliveira et al., 2009). Oliveira et al. (2007) descreveram

a ocorrência de antraquinonas e naftoquinona como metabólitos secundários constitutivos induzida em suspensões celulares dessa espécie. Em estudos fitoquímicos foram isolados derivados triterpênicos do extrato acetônico das folhas de *R. jasminoides*, identificados pela primeira vez na família Rubiaceae (Lopes et al., 1999). Em outro estudo foi observada a biotransformação de carboidratos provocada por células de *R. jasminoides* cultivadas em suspensão (Oliveira Júnior, 2004, Oliveira Júnior et al., 2010).

Para o gênero *Rudgea*, observa-se que ele é amplamente distribuído ao longo da costa leste do Brasil, sendo algumas espécies deste gênero usadas como remédio contra sífilis e reumatismo (Pio-Correa, 1931). Estudos fitoquímicos mostram a presença de flavonóides, taninos, saponinas e triterpenos para diferentes extratos de folhas de espécie do gênero *Rudgea* (Young et al., 1998, Alves et al., 2004). Estudos toxicológicos e diuréticos de espécie do gênero *Rudgea* mostraram ausência toxicológica e aumento da atividade diurética em ratos (Pucci et al., 2010).



Figura 8. Espécie vegetal *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae).

1.4.7. *Solanum swartzianum* Roem. & Schult

A espécie *Solanum swartzianum* Roem. & Schult, pertencente a família Solanaceae, é um arbusto nativo com 1-3 metros de altura exclusivo da América do Sul, distribuída por vários estados brasileiros (Mentz & Oliveira, 2004, Agra et al., 2009) (Figura 9). Na literatura há estudos que mostram a dinâmica fitossociológica, a estrutura de

regeneração e anatomia para a espécie *S. swartzianum* (Nappo et al., 2004, Feliciano & Salimena, 2011, Souto & Boeger, 2011). Contudo, não foram encontrados estudos fitoquímicos e farmacológicos para esta espécie.

Para o gênero *Solanum* verifica-se que ele é o maior gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies habitando sistemas ecológicos estabelecidos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Agra, 1999). Além de alcalóides, os flavonóides e saponinas constituem os grupos de substâncias mais freqüentes em espécies do gênero *Solanum* (Mola et al., 1997, Silva & Carvalho, 2003). Várias espécies do gênero *Solanum* já foram estudadas apresentando diversas funções terapêuticas como atividade antioxidante, efeito hepatoprotetor, ação antidiabética, ação antimicrobiana, efeito analgésico dentre outros (Chah et al., 2000, Bento et al., 2004, Ribeiro et al., 2007, Sabir & Rocha, 2008, Gandhi et al., 2011).



Figura 9. Espécie vegetal *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agra, M.F., 1999. New Species of *Solanum* subgenus e *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. *Novon*, 9, 292-295.

Agra, M.A., Nurit-Silva, K., Berger, L.R., 2009. Flora of Paraíba, Brazil: *Solanum* L. (Solanaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23, 826-842.

Alves, R.M.S., Stehmann, J.R., Isaias, R.M.S., Brandão, M.G.L., 2004. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14, 49-56.

Araújo, C.G., Cardoso, V.J.M., 2006. Storage in cerrado soil and germination of *Psychotria vellosiana* (Rubiaceae) seeds. *Brazilian Journal of the Biological*, 66, 709-717.

Arimura, G., Kost, C., Boland, W., 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734, 91-111.

Ballabeni, V., Tognolini, M., Bertoni, S., Bruni, R., Guerrini, A., Moreno-Rueda, G., Barocelli, E., 2007. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research*, 55, 23-30.

Ballabeni, V., Tognolini, M., Giorio, C., Bertoni, S., Bruni, R., Barocelli, E., 2010. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and *in vivo* investigation on its antiinflammatory properties *Fitoterapia*, 81, 289-295.

Bento, A.F., Azevedo, M.S., Luiz, A.P., Moura, J.A., Santos, A.R.S., 2004. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico do fruto de *Solanum acanthodes* Hook.f. em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 14, 9-10.

Bertani, D. F., 2006. Ecologia de populações de *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae) em uma paisagem fragmentada de Mata Atlântica. Campinas, SP.

Bouhlef, I., Valenti, K., Kilani, S., Skandrani, I., Ben Sghaier, M., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Hininger-Favier, I., Laporte, F., Chekir-Ghedira, L., 2008. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. *Toxicology in Vitro*, 22, 1264-1272.

Bolsaris, A.S., 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3.

Braga, M.R., Young, M.C.M., Dietrich, S.M.C., Gottlieb, O.R., 1991. Phytoalexin induction in Rubiaceae. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1079-1090.

Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415-421.

Calvo, T.R., Lima, Z.P., Silva, J.S., Ballesteros, K.V., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Tamashiro, J., Brito, A.R., Takahira, R.K., Vilegas, W., 2007. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 451–459.

Carmo, F.M.S., Borges, E.E.L., Takaki, M., 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta Botânica Brasileira*, 21, 697-705.

Carrai, V., Borgognini-Tarli, S.M., Huffman, M.A., Bardi, M., 2003. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self medication in prosimians? *Primates*, 44, 61-66.

Carvalho, P.E.R., 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais.

Castro, R.D., Lima, E.O., 2011. Antifungal activity of Brazilian sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against genus *Candida*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 13, 203-208.

Celotto, A.C., Nazário, D.Z., Spessoto, M.A., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., 2003. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 339-340.

Chah, K.F., Muko, K.N., Oboegbulema, S.I., 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. Fitoterapia, 71, 187-189.

Chaverri, C., Díazb, C., Cicció, J.F., 2011. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. Journal of the Brazilian Chemical Society, 22, 741-745.

Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science, 163, 1161-1168.

Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., 2003. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). Química Nova, 26, 825—827.

Cousins, D., Huffman, M.A., 2002. Medicinal properties in the diet of gorillas - an ethnopharmacological evaluation. African Study Monographs, 23, 65-89.

Croteau, R., Karp, F., 1991. The origin of natural odorants. In: Muller, P.M., Lamparsky, D. (Eds.), *Perfumes. Art, Science and Technology*. Elsevier Applied Science, London, 1991, 101-126p.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000, 1250-1318p.

Cruz-Barros, M.A.V., Corrêa, A.M.S., Gasparino, E.C., Paes, V.B., 2007. Flora Polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil) Família: 90-Melastomataceae. *Hoehnea*, 34, 531-552.

Cunha, W.R., Martins, C., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medicinal*, 69, 468–470.

Cunha, W.R., Silva, M.L.A., dos Santos, F.M., Montenegro, I.M., Oliveira, A.R.A., Tavares, H.R., Leme dos Santos, H.S., Silva Bizário, J.C., 2008. *In vitro*. Inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. *Pharmaceutical Biology*, 46, 292-294.

Dewick, P.M., 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.

Dillenburg, C.R., Porto, M.L., 1985. Rubiaceae - Tribo Psychotrieae. *Boletim do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 39, 1–76.

Elisabetsky, E., Amador, T.A., Leal, M.B., Nunes, D.S., Carvalho, A.C.T., Verotta, L., 1997. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, 49, 378-385.

Engel, C., 2002. Wild Health: How animals keep themselves well and what we can learn from them. Houghton Mifflin Publishers, New York.

Fávaro, L.B., 2008. Influência da estrutura florestal na área de vida do muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 44p.

Feliciano, E.A., Salimena, F.R.G., 2011. Solanaceae in the Serra Negra, Rio Preto, Minas Gerais. *Rodriguésia*, 62, 55-76.

Filho, R.C., Nogueira, A.C., 2005. Influência da temperatura na germinação de diásporos de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (canela-sassafrás). *Ciência Florestal*, 5, 191-198.

Fragoso, V., Nascimento, N.C., Moura, D.J., Silva, A.C.R., Richter, M.F., Saffi, J., Fett-Neto, A.G., 2008. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicology in Vitro*, 22, 559–566.

Gandhi, G.R., Ignacimuthu, S., Paulraj, M.G., 2011. *Solanum torvum* Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidant effects in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2725-2733.

Garcez, W.S., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1995. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, 39, 815-816.

Goldenberg, R., Varassin, I.G., 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiá, São Paulo, Brasil. *Revista brasileira de Botânica*, 24, 283-288.

Goldenberg, R., 2010. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Gontijo, D.C., Fávoro, L.B., Júnior, W.M.S., Maia, R.T., Moreira, L.S., Viana, J.P.L., 2007. Abordagem Etológica na Busca de Compostos Naturais Bioativos no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. In: V Simpósio de extensão universitária, Viçosa.

Hasrat, J.A., De Backer, J.P., Valquelin, G., Vlietinck, A.J., 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. *Phytomedicine*, 4, 56–65.

Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2004. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research*, 564, 89–95.

Huffman, M.A., Seifu, M., 1989. Observation on the illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 30, 51–63.

Huffman, M.A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 1996. Ethnobotany and zoopharmacognosy of *Vernonia amygdalina*, a medicinal plant used by humans and chimpanzees. in Caligari PDS, Hind DJN, eds. *Compositae: Biology and Utilization*, Vol. 2. Kew (UK): Royal Botanical Gardens, 351–360.

Huffman, M.A., Ohigashi, H., Kawanaka, M., Page, J.E., Kirby, G.C., Gasquet, M., Murakami, A., Koshimizu, K., 1998. African great ape self-medication: A new paradigm for treating parasite disease with natural medicines. In Ebizuka, Y. (ed.), *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 113-123 p.

Huffman, M.A., 2001. Self-Medicative Behavior in the African Great Apes: An Evolutionary Perspective into the Origins of the Human Traditional Medicine. *BioScience*, 51, 651-661.

Huffman, M.A., 2003. Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medical properties of plants. *Proceedings Nutrition Society*, 63, 371-381.

IBAMA, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente, 1992. Portaria IBAMA Nº 6-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista Oficial de espécies da Flora Brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União. Brasília, DF, Imprensa Nacional.

IEF, Instituto Estadual De Florestas, 2008. Plano de Manejo do Parque Estadual Serra do Brigadeiro, Minas Gerais.

Ines, M.C.C., 2006. Fenologia e Sucesso Reprodutivo de *Psychotria suterella* (Rubiaceae): efeitos da disponibilidade de recursos e densidade floral. Instituto de Biociências, SP.

Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T., 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.

Janzen, D.H., 1978. Complications in interpreting the chemical defenses of trees against tropical arboreal ant-eating vertebrates. In: Montgomery GG (ed) *The ecology of arboreal folivores*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 73–84.

Jisaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Hirota, M., Irie, R., Huffman, M.A., Koshimizu, K., 1993. Steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, a possible chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*, 34, 409-413.

Kijjoo, A., Giesbrecht, A.M., Gottlieb, O.R., 1981. *Ocotea quixos*, American cinnamon. *Journal Ethnopharmacology*, 4, 233-236.

Krief, S., 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris. 375p.

Krief, S., 2004. Effets prophylactiques et thérapeutiques de plantes ingérées par les chimpanzés: la notion d'automédication` chez les chimpanzés. *Primatologie*, 6, 151-172.

Krief, S., Martin, M.T., Grellier, P., Kasenene, J., Sévenet, T., 2004. Novel Antimalarial Compounds Isolated in a Survey of Self-Medicative Behavior of Wild Chimpanzees in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3196–3199.

Krief, S., Huffman, M., Sévenet, T., Guillot, J., Bories, C., Hladik, C.M., Wrangham, R.W., 2005. Non-invasive monitoring of the health condition of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26, 467–490.

Krief, S., Huffman, M.A., Sevenet, T., Hladik, C.M., Grellier, P., Loiseau, P., Wrangham, R.W., 2006. Bioactive properties of plants ingested by chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in the Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*, 68, 51-71.

Labouriau, L.G., Valio, I.F.M., Heringer, E.P., 1964. Sobre o sistema reprodutivo de plantas dos Cerrados. *Academia Brasileira de Ciências*, 36, 449-464.

Lacroix, D., Prado, S., Deville, A., Krief, S., Dumontet, V., Kasenene, J., Mouray, E., Bories, C., Bodo, B., 2009. Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees. *Phytochemistry*, 70, 1239–1245.

Leite, J.P.V., 2008. Química de produtos naturais: uma abordagem biossintética. In.: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu. Capítulo 3, 47-99.

Leite, J.P.V., Fernandes, J.M., Fávaro, L.B., Gontijo, D.C., Marotta, C.P.B., Siqueira, L.C., Maia, R.T., Garcia, F.C.P., 2008. Plantas Medicinais no Entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG BIOTA*, Belo Horizonte, 1, 16-34.

Leite, J.P.V., Fávoro, L.B., Maia, R.T., Gontijo, D.C., Moreira, L.S., Fontes, M.A.L., Passamani, M., Melo, F.R. Ethology approach as strategy to search for biologically active principles in plants from a fragmented landscape of the Atlantic Forest, Brazil. *International Journal Primatology*. No prelo, 2012.

Lewinsohn, E., Gijzen, M., 2009. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science*, 176, 161–169.

Lopes, M.N., Mazza, F.C., Young, M.C.M., Bolzani, V.S., 1999. Complete Assignments of ¹H and ¹³C-NMR Spectra of the 3,4-*seco*-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasminoides*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 10, 237-240.

Lopes, S., Poser, G.L.V., Kerber, V.A., Farias, F.M., Konrath, E.L., Moreno, P., Sobral, M.E., Zuanazzi, J.A.S., Henriques, A.T., 2004. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1187-1195.

Lopes, L. E., Buzato, S., 2005. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. *Revista Brasileira de Botânica*, 28, 785-795.

Lopes, F.C.M., Calvo, T.R., Vilegas, W., Carlos, I.Z., 2005. Inhibition of Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and TNF- α Production in Peritoneal Macrophages by Ethyl Acetate Fraction from *Alchornea glandulosa*. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1726—1730.

Lopes, F.C.M., Rocha, A., Pirraco, A., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Azevedo, I., Carlos, I.Z., Soares, R., 2009. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9.

Lopes, F.C.M., Rocha, A., Pirraco, A., Regasini, L.O., Siqueira, J.R., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Carlos, I.Z., Soares, R., 2011. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits

antiangiogenic activity: Preliminary Findings from *in vitro* assays using human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1244-1253.

Lordello, A.L.L., Yoshida, M., 1997. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*, 46, 741-744.

Lordello, A.L.L., Cavalheiro, A.J., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 2000. Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from Wood of *Ocotea odorífera* (Lauraceae). *Revista Latinoamericana de Química*, 28, 35-39.

Lorenzi, H., 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 3rd ed., Plantarum, São Paulo.

Lozano, G.A., 1998. Parasitic stress and self-medication in wild animals. *Advances in the Study of Behaviour*, 27, 291–317.

Mabberley, D.J., 1997. In: *The Plant Book*, 2^a ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Machado et al., 2005. *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

Majhenic, L., Skerget, M., Knez, Z., 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.

Marques, M.O.M., Yoshida, M., 1990. Structure of propacin. *Química Nova*, 13, 245-246.

Marques, R.C.P., Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Barbosa-Filho, J.M., Agnez-Lima, L.F., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, 536, 117–120.

McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T., 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68, 2015-2022.

Melo, N.C., Pereira, F.J., Pereira, M.P., Polo, M., 2011. Variação da densidade estomática em folhas de *Psychotria vellosiana* em duas condições. XX Congresso de Pós-graduação da UFLA.

Mendes, S.L., Melo, F.R., Boubli, J.P., Dias, L.G., Strier, K.B., Pinto, L.P.S., Fagundes, V., Cosenza, B., De Marco, P.JR., 2005. Directives for the conservation of the northern miquiqui, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates, Atelidae). *Neotropical Primates* 13 (Suppl.).

Mentz, L.A., Oliveira, P.L., 2004. *Solanum* (Solanaceae) na região sul do Brasil. *Pesquisas Botânica*, 54, 9-327.

Meyagusku V.M., Varanda, E.A., 2009. Análise da atividade mutagênica da *Miconia rubiginosa* e *Miconia cabucu* através de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*. In: XXI Congresso de iniciação Científica da UNESP, São José do Rio Preto, 6731-6734.

Meyagusku, V.M., Varanda, E.V., 2010. Analysis of the mutagenic activity of the methanolic extract and of the aqueous and acetat fractions of *Miconia stenostachya* by reverse mutation assay with *Salmonella typhimurium*. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, São José do Rio Preto, 3554-3557.

Mola, J.L., Araujo, E., Magalhães, G., 1997. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do distrito federal. *Química Nova*, 20, 460-462.

Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N., 2005. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92, 349-355.

Morais, M.C.C., Lugman, S., Kondratyuk, T.P., Petronio, M.S., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Soares, C.P., Pezzulo, J.M., 2010. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in câncer chemoprevention. *Natural Product Research*, 24, 1758-1765.

Moreira, L.S., Barbosa, E.F., Alvim, T.H., Dias, L.G., Melo, F.R., Lessa, G., 2006. Muriquis do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro: Tamanhos de grupos e estruturas sexo-etárias. In: Livro de resumos: I Congresso Sul-Americano de Mastozoologia, 105p.

Moreira, L.S., 2008. Socioecologia de Muriquis-do-norte (*Brachitelys hipoxantus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 94p.

Mourthé, I.M.C., 2006. A Ecologia do Forrageamento do Muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820). Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 99p.

Musarrat, J., Aqil, F., Ahmad, I., 2006. Mutagenicity and Antimutagenicity of Medicinal Plants. In: Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M. (Eds.), *Modern Phytomedicine: Turning Plants into Drugs*. Wiley-VCH, Germany, 271–286 p.

Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

Nappo, M.E., Griffith, J.J., Martins, S.V., Júnior, P.M., Souza, A.L., Filho, A.T.O., 2004. Dinâmica da estrutura fitossociológica da regeneração natural em sub- bosque de *Mimosa*

scabrella Bentham em área minerada, em Poços de Caldas, MG. Revista Árvore, 28 , 811-829.

Nepokroeff, M., Bremer, B., Sytsma, K.J., 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and *rbcl* sequence data. Systematic Botany, 24, 5-27.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. Journal Natural Products, 66, 1022-1037.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal Natural Products, 70, 461-477.

Noriega, P., Dacarro, C., 2008. Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. La Granja, 7, 3-8.

Ohigashi, H., Huffman, M.A., Izutsu, D., Koshimizu, K., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Allen, D., Wright, C.W., Phillipson, J.D., Timon-David, P., Delmas, F., Elias, R., Balansard, G., 1994. Toward the chemical ecology of medicinal plant use in chimpanzees: The case of *Vernonia amygdalina* Del., a plant used by wild chimpanzees, possibly for parasite-related diseases. Journal of Chemical Ecology, 20, 541–553.

Oliveira Júnior, C.J.F., 2004. Carboidratos de parede celular e efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento celular de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. cultivada em suspensão. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Oliveira Júnior, C.J.F., Cavalari, A.A., Carpita, N.C., Buckeridge, M.S., Braga, M.R., 2010. Cell wall polysaccharides from cell suspension cultures of the Atlantic Forest tree *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae). Trees, 24, 713-722.

Oliveira, M.C., Negri, G., Salatino, A., Braga, M.R., 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1,4-naphthohydroquinone in cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 30,167-172.

Oliveira, M.C., Simões, K., Braga, M.R., 2009. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 32, 509-519.

Oltramari, A.C., Wood, K.V., Bonham, C., Verpoorte, R., Caro, M.S.B., Viana, A.M., Pedrotti, E.L., Maraschin, R.P., Maraschin, M., 2004. Safrole analysis by GS-MS of Prototrophic (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 231-235.

Ordóñez, A.A.L., Ordóñez, R.M., Zampini, I.C., Isla, M.I., 2009. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 378, 51–58.

Pais, V.A.A., 2011. Evaluation of anticancer activity in vivo and in vitro of medicinal plants from "Serra da Mantiqueira Paulista". Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Pellizzon, C.H., Rozza, A.L., Vasconcelos, P.C.P., Andreo, M.A., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2010. Non-commercial plants of medicinal purposes from the Brazilian biomes for the treatment of gastrointestinal diseases. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 29, 217-236.

Phillips-Conroy, J.E., 1986. Baboons, diet, and disease: food plant selection and schistosomiasis. In: Taub D, King F (eds) *Current perspectives in primate socialdynamics*. Van Nostrand Reinhold, New York, 287–304.

Pieroni, L.G., Rezende, F.M., Ximenes, V.F., Dokkedal, A.L., 2011. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. *Molecules*, 16, 9439-9450.

Pinto, A.R., Cravalho, R.I.N., Netto, S.P., Weber, S.H., Souza, E., Uriatti, R.S., 2010. Bioactivity of essential oils of Brazilian sassafras and eucalyptus against lesser mealworm. *Ciência Rural*, 40, 637-643.

Pio Correa, M., 1931. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas*. 1ª Ed. Ministério da Agricultura, Brasil, 363p.

Plotkin, M.J., 2000. *Medicine Quest: In Search of Nature's Healing Secrets*. New York: Viking.

Pucci, L.L., Cunha, L.C., Tresvenzol, L.M., Paula, J.R., Bozins, M.C.V., Freitas, P.C.M., 2010. Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre). *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 30-37. (2010)

Raman, R., Kandula, S., 2008. Zoopharmacognosy: Self-Medication in Wild Animals. *Resonance*. 245-253.

Ramos, D.F., Leitão, G.G., Costa, F.N., Abreu, L., Villarrela, J.V., Leitão, S.G., Fernández, S.L.S., Silva, P.E.A., 2008. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 669-674.

Randhir, R., Lin, Y.T., Shetty, K., 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13,

295–307.

Renner, S.S., 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nordic Journal Botany*, 13, 519–540.

Ribeiro, S.R., Fortes, C.C., Oliveira, S.C.C., Castro, C.F.S., 2007. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). *Arquivos de Ciências da Saúde*, 11, 179-183.

Ribeiro, R.M., Velloso, S.G.S., Duarte, J.F., Brandão, M.M., Carvalho, D., 2011a. Fragmentação: Efeitos na estrutura populacional de *Ocotea odorifera* Vell. Rohwer. XX Congresso de Pós-graduação da UFLA.

Ribeiro, R.M., Velloso, S.G.S., Duarte, J.F., Brandão, M.M., Carvalho, D., 2011b. Fragmentação: Influência na fenologia de *Ocotea odorifera* Vell. Rohwer. XX Congresso de Pós-graduação da UFLA.

Rodrigues, R.R., 1996. Trilhas do parque da ESALQ. Árvores medicinais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP. Departamento de Botânica, 28p.

Rodrigues, J., Rinaldo, D., Santos, L.C., Vilegas, W., 2007. An unusual C6–C600 linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Phytochemistry*, 68, 1781–1784.

Rodrigues, J., Michelin, D.C., Rinaldo, D., Zocolo, G.J., Santos, L.C., Vilegas, W., Salgado, H.R.N., 2008. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). *Journal of Medicinal Food*, 11, 120-126.

Rolim, F.A., Ribeiro, G.A., 2001. Levantamento do Potencial Turístico do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - PESB com o Suporte em Geoprocessamento. Foz do Iguaçu, INPE, 967-969.

Sabir, S.M., Rocha, J.B.T., 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 226-232.

Santa-Catarina, C., Maciel, S.C., Pedrotti, E.L., 2001. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). *Revista Brasileira de Botânica*, 24, 501-510.

Santos, L.V., Fett-Neto, A.G., Kerber, V.A., Elisabetsky, E., Quirion, J.C., Henriques, A.T., 2001. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1185–1187.

Santos, F.V., Calvo, T.R., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2010. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Brazilian Journal Pharmacognosy*, 20, 382-389.

Savikin, K., Zdunic, G., Jankovic, T., Tasic, S., Menkovic, N., Stevic, T., Dordevic, B., 2009. Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 212-217.

Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E., 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732.

Serpeloni, J.M., Bisarro dos Reis, M., Rodrigues, J., Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A., Dokkedal, A.L., Cólus, I.M.S., 2008. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, 23, 501–507.

Serpeloni, J.M., Barcelos, G.R.M., Mori, M.P., Yanagui, K., Vilegas, W., Varanda, E.A., Cólus, I.M.S., 2011. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of

the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 499–504.

Setzer, W.N., Takaku, S., Stokes, S.L., Penton, A.F., 2006. Inhibition of cruzain by *Ocotea* leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. *Pharmacologyonline*, 3, 785-793.

Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2144–2155.

Silva, I.G., Barbosa-Filho, J.M., da Silva, M.S., de Lacerda, C.D.G., da-Cunha, E.V.L., 2002. Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 881-883.

Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova*, 26, 517-522.

Silva, C.A., Braga, M.R., 2004. Release and activity of phytoalexin-inducing oligosaccharides in tropical Rubiaceae: influence of pectin methylesterification. *Revista Brasileira de Botânica*, 27, 379-393.

Souza, G.C., Haas, A.P.S., von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 135–143.

Souto, M.A.G., Boeger, M.R.T., 2011. Structure and composition of the regeneration stratum and associated vegetation of different succession stages in east of Paraná state. *Ciência Florestal*, 21, 393-406.

Spessoto, M.A., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., 2003. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*, 10, 606–609.

Strier, K.B., 1992. *Atelinae* adaptations: Behavioral strategies and ecological constraints. *American Journal of Physical Anthropology*, 88, 515–524.

Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Akhtar, M. 2011. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an overview. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 3, 361-367.

Surh, Y.J., Ferguson, L.R., 2003. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential-highlights of a symposium. *Mutation Research*, 523, 1-8.

Takaku, S., Haber, W.A., Setzer, W.N., 2007. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 525-532.

Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M., 2006. Comparative screening of natural essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*, 78, 1419-1432.

Tona, K., Kambu, K., Mesia, K., Cimanga, K., De Bruyne, T., Pieters, L., Totté, J., Vlietinck, A.J., 1999. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*, 6, 59-66.

Urrea-Bulla, A., Suárez, M., Moreno-Murillo, B., 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*, 75, 392–394.

Vieira, B.C., 2010. Análises fitoquímica, bromatológica, toxicológica e dos efeitos estimulante físico e antioxidante de extratos de folhas de *Psychotria vellosiana* Benth. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 95p.

Vilela, E.A., Oliveira-Filho, A.T., Carvalho, D.A., 1999. Phytosociology of a Riparian Forest of the lower Rio Grande in Conquista, Minas Gerais, Brazil. *Revista Árvore*, 23, 423-433.

Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I., 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287, 303-305.

Young, M.C.M., Lopes, M.N., Araújo, A.R., Adauto, C., Bolzani, V. S., 1998. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnoides*. *Journal of Natural Products*, 61, 936-939.

Wozniaka, D., Jandab, B., Kapustab, I., Oleszekb, W., Matkowskia, A., 2010. Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Mutation Research*, 696, 148-153.

Wrangham, R.W., Nishida, T., 1983. *Aspilia* spp. leaves: A puzzle in the feeding behavior of wild chimpanzees. *Primates*, 24, 276–282.

Wu, S.C., Yen, G.C., Wang, B.S., Chiu, C.K., Yen, W.J., Chang, L.W., Duh, P.D., 2007. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *Food Science Toxicology (LWT)*, 40, 506-512.

CAPÍTULO 2

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO FENÓLICA E AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS CONSUMIDAS NA DIETA DO PRIMATA *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl

1. INTRODUÇÃO

O reino vegetal é repositário de uma grande biblioteca química. Assim, extratos de plantas representam rica fonte de produtos naturais, sendo vários destes com potencial atividade biológica, tendo importante participação na descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Harvey, 2000).

Dentre os diferentes compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal, os compostos fenólicos estão entre os metabólicos que despertam grande interesse biológico, devido a grande variedade de ações farmacológicas, tais como antialérgicos, antiaterogênicos, antiinflamatórios, antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes e cardioprotetores e vasodilatadores (Benavente-Garcia et al., 1997, Samman et al., 1998, Middleton et al., 2000, Puupponen-Pimiä et al., 2001, Manach et al., 2005). Vários artigos têm relatado diferentes atividades biológicas para os compostos fenólicos, atuando inclusive na prevenção de doenças degenerativas e tratamento de tumores e doenças cardiovasculares (Scalbert et al., 2005).

Nesse contexto, a capacidade de compostos fenólicos de agir como antioxidante tem sido bastante relatado (Hossain & Shah, 2011). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente à sua propriedade redutora, desempenhando papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, podendo agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Souza et al., 2007). A ação antioxidante destes compostos fenólicos é relatada em vários estudos que mostram estes polifenóis como participante na inibição de peroxidação lipídica (Vinson & Dabbagh, 1998), proteção contra a oxidação de lipoproteínas (Fuhrman et al., 1995), redução da agregação plaquetária (Renaud & Delorgeril, 1992) e aumento da vasodilatação (Fitzpatrick et al., 1993). Outros estudos apontam também a ação antioxidante destes compostos naturais como agentes anticarcinogênicos, atuando como fator de proteção fisiológica (De Flora et al., 1992, Yagi et al., 2002, Ben Ammar et al., 2007). No caso de supressão da carcinogênese, os efeitos relatados pelos antioxidantes são consistentes com a visão de que os radicais livres estão envolvidos como agentes fundamentais no processo de desenvolvimento de câncer (Hartman & Shankel, 1990).

Nesse sentido, a busca por novos compostos naturais com potencial ação antioxidante representa uma promissora abordagem terapêutica, principalmente em processos de inibição de danos causados por radicais livres em sistemas biológicos, como o processo respiratório e diversas outras reações redox, que ocorrem nas células aeróbicas. Além disso, o crescente interesse por antioxidantes naturais se justifica ainda pela toxicidade apresentada por conhecidos agentes antioxidantes sintéticos da indústria alimentícia como butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT), uma vez que estudos têm mostrado que estes compostos possuem efeitos patogênicos, tóxicos e carcinogênicos (Amarowicz et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar classes fitoquímicas, quantificar o conteúdo de polifenóis totais e analisar o potencial antioxidante dos extratos aquosos de 7 espécies vegetais consumidas pelo primata *B. hipoxanthus*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter extratos aquosos das folhas das espécies vegetais consumidas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl, presente no fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro;
- ✓ Realizar prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) dos principais grupos de metabólitos secundários que compõem esses extratos;
- ✓ Quantificar por método espectrofotométrico o conteúdo de polifenóis totais dos extratos usando reagente de Folin-Ciocalteu;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos vegetais *in vitro* pelo método do radical ·DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante total dos extratos vegetais *in vitro* pelo método de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos vegetais *in vitro* pelo método da peroxidação lipídica (TBARS).

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta e Identificação do Material Vegetal

As amostras das espécies vegetais foram coletadas no mês de dezembro de 2010, na trilha “Vale do Ouro” localizada dentro da Unidade de Conservação (UC) Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, região da Zona da Mata, Minas Gerais. As árvores nas quais foram coletadas as espécies vegetais utilizadas neste trabalho foram georeferenciadas. A “Licença de autorização de coleta” na UC foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta de Minas Gerais, (Nº UC 073/07, COL 050/07).

A identificação das espécies foi realizada por confronto de exsicatas no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2. Secagem e obtenção do extrato vegetal

As folhas das espécies coletadas foram separadas e secadas em estufa ventilada escura a temperatura de 37 °C por 48 horas, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca.

Os extratos aquosos das espécies vegetais *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Euphorbiaceae), *Miconia latecrenata* (DC.) Naudin (Melastomataceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae), *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae), *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae) e *Solanum swartzianum* Roem. & Schult (Solanaceae) foram preparados por infusão do pulverizado das folhas, na proporção de 1:20 (relação droga vegetal: solvente extrator). Para esse procedimento, ao material vegetal foi adicionada água destilada a 90 °C. O pulverizado das folhas das espécies foi deixado em contato com o solvente durante 15 minutos, sob agitação. Após este procedimento, o material foi filtrado em papel de filtro à vácuo, e o extrato obtido foi levado ao liofilizador por 12 horas, obtendo-se, assim, os extratos secos liofilizados. Por fim, foi calculado o rendimento em percentagem do extrato seco em relação ao peso da droga vegetal usada para obtenção do extrato (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies vegetais, identificação e rendimento dos extratos aquosos das folhas.

Espécies	Sigla	*Exsicata	**Rendimento (%)
<i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl.	EAAG	-	16,6
<i>Miconia latecrenata</i> (DC.) Naudin	EAML	VIC 34.321	28,1
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	EAOO	-	5,8
<i>Psychotria suterella</i> Müll. Arg.	EAPS	-	13,9
<i>Psychotria vellosiana</i> Benth.	EAPV	VIC 32.147	5,3
<i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Müll. Arg.	EARJ	VIC 34.322	15,0
<i>Solanum swartzianum</i> Roem. & Schult	EASS	-	9,2

Nota: -: exsicata não depositada em Herbário. *Número da Exsicata depositada no Herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa. **Rendimento do extrato seco em relação ao peso da droga vegetal usada para obtenção do extrato.

3.3. Prospecção fitoquímica e obtenção do perfil cromatográfico

Para a identificação das classes fitoquímicas que compõem os extratos estudados foram realizados testes de investigação da presença de metabólitos secundários para: alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, taninos e triterpenos/esteróides. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas seguindo as metodologias descritas por Wagner (1984 e 1996) e Harbone (1984), utilizando cromatofolhas com fase estacionária sílica-gel F₂₅₄, diferentes fases móveis e revelação empregando reagentes específicos combinado, em alguns casos, com a visualização do cromatograma sob luz de comprimento de onda na região do ultravioleta, 254 e 365 nm. Os resultados obtidos pela cromatografia foram confrontados com padrões de referência específicos para cada classe fitoquímica analisada (Tabela 2).

Tabela 2. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos das espécies vegetais estudadas.

Metabólitos Secundários	Mistura Eluente	Revelador	Amostra de Referência
Alcalóides	Acetato de etila/Metanol/Água (80/11,2/8)	Reagente de Drangendorff	Quinina
Antraquinonas	Acetato de etila/Metanol/Água (81/11/8)	Solução de Hidróxido de potássio a 5% em etanol	1,8-diidroxiantraquinona
Cumarinas	Éter etílico/Tolueno (1/1)	Solução de Hidróxido de potássio a 5% em etanol	Benzopirona
Flavonóides	Acetato de etila/Ácido fórmico/Ácido acético/Água (75/7,5/7,5/18)	Solução de cloreto de alumínio a 5% em etanol	Quercitina
Heterosídeos cardiotônicos	Acetato de etila/Metanol/Água (81/11/8)	Reagente de Kedde Solução A e B (1/1)	Digitoxina
Saponinas	Clorofórmio/Ácido acético/Metanol (50/25/12)	Anisaldeído	18 β -glicirretínico
Taninos	Acetato de etila/Ácido fórmico/Ácido acético/Água (70/7,7/7,7/19)	Soluções de $K_3Fe(CN)_6$ 1% e $FeCl_3$ 2% (1/1)	Ácido pirogálico
Triterpenos e esteróides	Hexano/Acetato de etila (1/1)	Reagente de Lieberman Burchard	β -sitosterol

3.4. Quantificação de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais foi avaliada pelo método descrito por Simone et al. (2007) usando reagente de Folin-Ciocalteu. Assim, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS foram diluídos em diferentes concentrações e adicionados em tubo de ensaio com volume final de 8,5 mL. Em seguida, foram adicionados aos 8,5 mL dos tubos de ensaio, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e após três minutos à adição deste reagente, foi acrescentado 1 mL de solução de carbonato de sódio a 15% p/v a cada tubo. Esta solução, depois de homogeneizada, foi deixada em repouso por 60 minutos, sendo após este intervalo realizada a leitura de absorvância a 760 nm, em espectrofotômetro na região de UV-Vis contra um padrão branco. Uma curva utilizando o padrão de ácido tânico foi usada para determinação da quantidade de polifenóis totais das amostras, que foram expressas em equivalentes de ácido tânico. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de extratos e/ou produtos naturais com potencial antioxidante. Dentre estes métodos utilizados para avaliar atividade antioxidante destacam-se os de sequestro de radicais livres, como DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o de peroxidação lipídica (Makrigiorgos, 1997, Duarte-Almeida et al., 2006).

3.5.1. Sistema de sequestro de radicais livres - DPPH

A atividade antioxidante determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) avalia a capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos vegetais de sequestrar o radical DPPH (Blois, 1958).

No presente trabalho, a avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres pelo DPPH foi realizada segundo Abdel-Hameed (2009). Assim, diferentes quantidades de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS foram diluídas em metanol, de modo a obter cinco soluções com concentrações distintas. Uma alíquota de 2 mL de cada solução foi adicionada a 2 mL de uma solução de DPPH (0,1 mM), recém-preparada. Após trinta minutos de reação no escuro à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorvância a 517 nm em espectrofotômetro na região de UV-Vis. Como padrões antioxidantes foram utilizados o produto sintético butil-hidroxitolueno (BHT) e o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* EGb 761 (EPGB), que foram testados na mesma concentração das demais amostras vegetais a fim de serem usados como controles positivos para ação antioxidante. O extrato padrão de *Ginkgo biloba* EGb 761 é um extrato seco padronizado oriundo das folhas de *Ginkgo biloba*, constituído por 24% de glicosídeos flavonoides, 6% de lactonas terpênicas, além de terpenóides, protoantocianidinas e outros constituintes (He et al., 2008). Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Pela análise da curva de calibração por regressão logarítmica, foi calculada a quantidade em massa de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (IC₅₀). O percentual de sequestro de DPPH foi calculado pela equação abaixo, sendo que a solução de DPPH sem adição de extrato foi usada como controle.

$$\% \text{ sequestro do radical DPPH} = [1 - (\text{abs. amostra})/(\text{abs. controle})] \times 100.$$

3.5.2. Método co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico

O método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Este método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β-caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (Marco, 1968, Miller, 1971).

Para o presente trabalho, a atividade antioxidante pela co-oxidação do β-caroteno/ácido linoléico foi determinada de acordo com Yu et al. (2006), com algumas modificações. Assim, para o preparo da mistura reativa, 5.000 µg de β-caroteno

dissolvidos em 10 mL de clorofórmio foram adicionados a 300 µL de ácido linoléico e 2 mL de Tween 20. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório a 50 °C. A esta mistura isenta de clorofórmio, foram adicionados 500 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos. Após esta mistura, a solução reativa foi agitada vigorosamente. Assim, a 5 mL desta mistura reativa foi adicionado 1 mL de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS, obtendo-se uma concentração final de 25 µg/mL dos extratos no tubo de ensaio. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo a solução final foram incubados a 50 °C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descolorimento do β-caroteno. As leituras das absorbâncias foram realizadas em intervalos de 20 minutos, sendo lidas do tempo 0 minuto de incubação até 160 minutos a 470 nm. O padrão antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) e o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* EGb 761 (EPGB) foram testados na mesma concentração das amostras vegetais a fim de serem usados como controles positivos para ação antioxidante. As análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da oxidação das amostras (Aam), que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle negativo sem amostras (Ac).

$$Ac = \text{Abs. inicial} - \text{Abs. final} \quad Aam = \text{Abs. inicial} - \text{Abs. final}$$

$$\% \text{ Inibição} = ((Ac - Aam)/Ac) \times 100$$

3.5.3. Método de Peroxidação Lipídica

Análises que utilizam membrana lipídica como alvo de oxidação por espécies reativas têm sido amplamente empregadas como método para avaliação de atividade antioxidante de extratos vegetais (Aldini et al., 2006). Entre as diversas técnicas que utilizam biomembranas, a que emprega lipossoma tem a vantagem de ser facilmente preparada, tendo suas propriedades físico-químicas bem caracterizadas (Morigaki & Walde, 2007).

Dessa forma, para o presente trabalho, a atividade antioxidante por peroxidação lipídica foi realizada conforme Conforti et al. (2002), com algumas modificações. Para o

procedimento, em tubo de ensaio foi adicionado a 2,5 mL de água destilada, 500 µL de solução de lecitina de soja (7700 µg/mL), 1 mL de ácido ascórbico (1750 µg/mL), seguido de 125 µL de cloreto de ferro III (330 µg/mL) e 100 µL de EAAG, EAML, EAPO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. Após a adição destes reagentes, os tubos foram incubados em *shaker* por 60 minutos a 40 °C. Decorrido este período, foi acrescentado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA a 3700 µg/mL) em todos os tubos, sendo os tubos colocados em banho-maria a 80 °C por 15 minutos, obtendo-se uma concentração final dos extratos de 12 µg/mL. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10 000 rpm. Assim, foi realizada a leitura a 532 nm do sobrenadante da centrifugação. O padrão antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) e o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* EGb 761 (EPGB) foram testados na mesma concentração das amostras vegetais a fim de serem usados como controles positivos para ação antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. O cálculo da porcentagem de inibição peroxidativa foi realizado usando-se absorvância do controle negativo (Ac) e absorvância da amostra (Aam).

$$\% \text{ Inibição} = ((Ac - Aam)/Ac) \times 100$$

3.6. Análise estatística

Os dados de quantificação fenólica, atividade antioxidante por DPPH, co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de médias (teste de Tukey) $p < 0,05$. Além disso, foi avaliada a Correlação de Pearson do conteúdo de polifenóis totais com os diferentes testes antioxidantes empregados ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Prospecção fitoquímica

Os resultados da prospecção fitoquímica realizada para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS estão apresentados na Tabela 3.

A alta polaridade dos extratos aquosos analisados é responsável pela ausência de classes fitoquímicas como triterpenos/esteroides, geninas de antraquinonas e alcalóides livres para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. Quanto aos heterosídeos cardiotônicos sabe-se que estes compostos possuem distribuição restrita a algumas famílias botânicas (Cunha, 2005). Contudo, nesta análise fitoquímica preliminar, os resultados negativos não implicam necessariamente na ausência do grupo de metabólitos secundários na espécie estudada, uma vez que o material investigado foi o extrato aquoso, ou seja, foram analisados os constituintes mais polares presentes em cada planta (Boligon et al., 2009).

Aos compostos fenólicos são atribuídas diversas funções terapêuticas, tais como antialérgicos, antiaterogênicos, antiinflamatórios, antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes, antimutagênicos e cardioprotetores e vasodilatadores (Benavente-Garcia et al., 1997, Samman et al., 1998, Middleton et al., 2000, Puupponen-Pimiä et al., 2001, Manach et al., 2005, Scalbert et al., 2005). As saponinas são conferidas propriedades tensoativas, antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobiana, antiasmáticas, cardiovasculares, adstringentes, antiulcerativas e antineoplásticas (Ribeiro et al., 1995, Just et al., 1998, Baba et al., 2000, Albiero et al., 2002, Herlt et al., 2002, Pelegrini et al., 2008).

Tabela 3. Resultados da prospecção fitoquímica, por CCD e valor do fator de retenção (entre parênteses) dos extratos aquosos das espécies estudadas e dos padrões de referência utilizados.

Metabólitos secundários	EAAG	EAML	EAOO	EAPS	EAPV	EARJ	EASS	Padrão Referência
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	+ (5,4)
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	+ (4,4)
Cumarinas	-	-	-	-	+ (2,1)	-	-	+ (5,2)
Flavonóides	+ (3,3/5,5)	-	+ (0,6/2,1)	+ (3,1)	-	+ (1,6/3,9)	+ (4,2)	+ (4,0)
Heterosídeos cardiotônicos	-	-	-	-	-	-	-	+ (3,8)
Saponinas	+ (2,3/2,5/4,7)	+ (2,3/2,5)	+ (0,8/2,4/2,5/4,5)	+ (0,8/2,5)	+ (2,5)	+ (0,8/2,3/4,7)	-	+ (7,0)
Taninos	+ (5,3)	+ (1,6)	+ (4,0/6,4)	+ (4,0/4,5)	+ (4,5)	+ (2,0/5,0)	+ (5,0)	+ (6,7)
Triterpenos e esteróides	-	-	-	-	-	-	-	+ (6,6)

Nota: +: presença, -: ausência. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*. Padrão Referência: Alcalóides – Quinina, Antraquinonas - 1,8-diidroxi-antraquinona, Cumarinas - Benzopirona, Flavonóides - Quercitina, Heterosídeos Cardiotônicos - Digitoxina, Saponinas - 18 β -glicirretínico, Taninos - Ácido pirogálico, Triterpenos e esteróides - β -sitosterol.

Estudos fitoquímicos da espécie *A. glandulosa* mostram composição rica do extrato etanólico das folhas em compostos fenólicos, além da presença de esteróides, terpenóides, polifenóis e alcalóides para o extrato metanólico, (Conegero et al., 2003, Urrea-Bulla et al., 2004). Em estudos com extrato etanólico basificado das folhas de *P. suterella* foram identificados alcalóides indólicos monoterpênicos (Santos et al., 2001). Para a espécie *P. vellosiana*, estudos com extratos etanólico e diclorometânico das folhas mostraram a presença das classes fitoquímicas flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas e esteróides/triterpenos (Vieira, 2010). Em trabalho com suspensões celulares de *R. jasminoides* foi observada a ocorrência de antraquinonas, além de derivados triterpênicos em extrato acetônico (Lopes et al., 1999, Oliveira et al., 2007). Não foram encontrados trabalhos fitoquímicos para as demais espécies estudadas. Contudo, análise fitoquímica de espécies do gênero *Miconia* mostraram composição rica em polifenóis e triterpenos (Cunha et al., 2003, Rodrigues et al., 2007). Estudos fitoquímicos mostram a presença de neolignanas, flavonóides e alcalóides em diferentes tipos de extratos para espécies de *Ocotea* (Garcez et al., 1995, Lordello & Yoshida, 1997, Silva et al., 2002). Para espécies do gênero *Solanum*, além de alcalóides, polifenóis e saponinas constituem os grupos de substâncias mais freqüentes (Mola et al., 1997, Silva & Carvalho, 2003).

4.2. Quantificação de polifenóis totais

A Tabela 4 apresenta o conteúdo fenólico total das amostras de EAAG, EAML, EA00, EAPS, EAPV, EARJ e EASS, analisadas pelo método de Folin- Ciocalteu.

Tabela 4. Resultados da quantificação de polifenóis totais dos extratos aquosos das espécies estudadas.

Amostras	Quantificação Polifenóis ($\mu\text{g EAT/mg extrato}$)
EAAG	$80,9 \pm 0,2^a$
EAML	$81,5 \pm 0,3^a$
EAOO	$40,1 \pm 0,1^b$
EAPS	$16,8 \pm 0,4^f$
EAPV	$22,4 \pm 0,1^d$
EARJ	$18,0 \pm 0,1^e$
EASS	$23,8 \pm 0,1^c$

Nota: Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

Das espécies analisadas somente para planta *A. glandulosa* foram verificados estudos descritos na literatura com quantificação fenólica, sendo que neste caso o conteúdo fenólico do extrato metanólico seco de suas folhas representou 10% do conteúdo do extrato (Calvo et al., 2007).

Na análise comparativa do conteúdo polifenólico de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS, observam-se maiores valores para EAML E EAAG, seguidos por EAOO, EASS, EAPV, EARJ e EAPS (Figura 1).

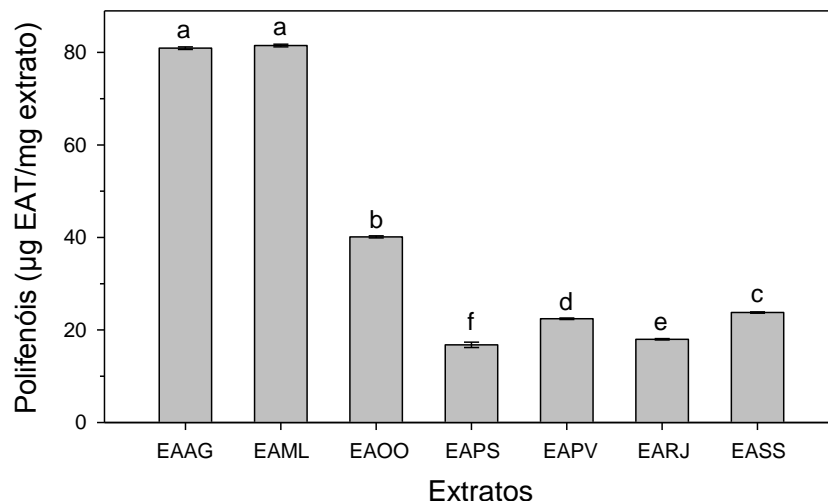


Figura 1. Quantidade média de polifenóis totais expressos em micrograma Equivalentes de Ácido Tânico por miligrama de extrato seco ($\mu\text{g EAT/mg extrato}$). Os histogramas seguidos pela mesma letra possuem médias que não diferem, entre si, pelo teste Tukey a $p < 0,05$. Os seguimentos de retas verticais nos histogramas correspondem aos desvios padrões. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

4.3. Ação antioxidante

Entre as espécies analisadas, apenas para as espécies *A. glandulosa* e *P. vellosiana* foram encontrados estudos sobre a atividade antioxidante. Calvo et al. (2008) observaram ação antioxidante pelos testes do DPPH e β -caroteno em placa de CCD para extrato metanólico de folhas de *A. glandulosa*. Vieira (2010) encontrou alta atividade antioxidante para o extrato etanólico das folhas de *P. vellosiana*.

4.3.1. Ação antioxidante pelo método do radical DPPH

A Figura 2 apresenta os gráficos e as respectivas equações logarítmicas obtidas da análise da atividade antioxidante pelo método do DPPH, além de análise comparativa dos

IC₅₀ obtidos através das equações logarítmicas. Todas as equações utilizadas apresentam significância estatística ($p < 0,05$), além de valor para regressão maior do que 0,9. Na Tabela 5 (página 67) encontram-se o valor de IC₅₀ para todos os extratos analisados.

Através da análise dos resultados é possível observar a maior atividade antioxidante para EAML, EAAG e EAEO em relação aos demais extratos. Importante ressaltar o potencial antioxidante desses três extratos, que apresentam valor de IC₅₀ estatisticamente iguais ao IC₅₀ dos padrões antioxidantes BHT e EPGB. Para os demais extratos, os valores de IC₅₀ foram consideravelmente maiores do que o IC₅₀ dos padrões antioxidantes. Contudo, este fato não exclui o potencial antioxidante de EASS, EAPV, EARJ e EAPS, uma vez que o valor máximo de IC₅₀ encontrado (74,2 µg/mL para EAPS) ainda pode ser considerado como ação antioxidante relevante. Extratos de plantas com IC₅₀ maior do que 80 µg/mL foram consideradas com potencial atividade antioxidante (Roesler et al., 2007).

A alta atividade antioxidante encontrada principalmente para EAAG, EAML e EAEO pode estar relacionada ao alto teor de polifenóis totais observados para estes extratos. Sabe-se que polifenóis estão diretamente relacionados a ação antioxidante e que extratos aquosos favorecem a extração destes compostos fenólicos (Kubola & Siriamornpun, 2008, Sarikurkcu et al., 2009).

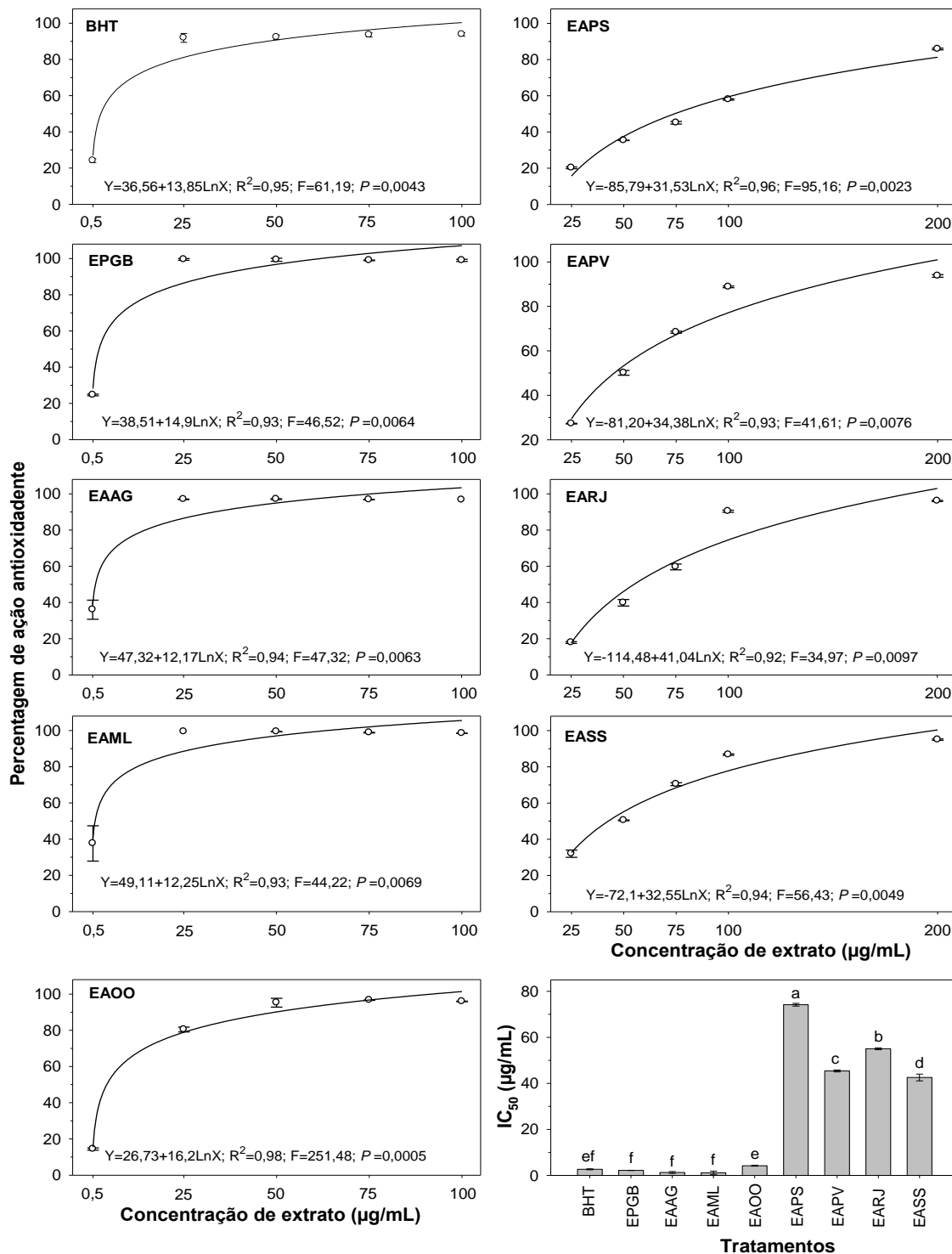


Figura 2. Percentagem de ação antioxidante pelo método do DPPH e comparação de IC₅₀ para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. BHT - padrão sintético butil-

hidroxitolueno, EPGB - Extrato Padronizado *Ginkgo biloba*, EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

4.3.2. Ação antioxidante pela co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico

A Figura 3 apresenta o perfil do descoramento do β -caroteno e a percentagem de atividade antioxidante de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e os padrões BHT e EPGB. Na Tabela 5 (página 67) encontram-se os valores da percentagem de ação antioxidante pela co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico para todos os extratos analisados.

A análise dos resultados mostra similaridade entre os perfis de percentagens antioxidantes para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EASS e EAPV. O padrão sintético BHT apresentou a maior percentagem de ação antioxidante (79,3%), sendo significativamente maior do que a percentagem obtida para os extratos analisados. Já o extrato padronizado EPGB não apresentou diferença estatística do controle negativo (sem tratamento). Os demais extratos analisados EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS apresentaram diferença estatística em relação ao controle negativo, resultado da proteção da molécula de β -caroteno por parte dos extratos.

A menor atividade antioxidante dos extratos analisados comparado ao padrão BHT e a ausência de ação antioxidante para EPGB pode estar relacionada a possível degradação de compostos fenólicos ocorrida pelo tratamento térmico por curto período inerente a metodologia do teste de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico ocasionando, assim, diminuição da ação antioxidante (Anese et al., 2002).

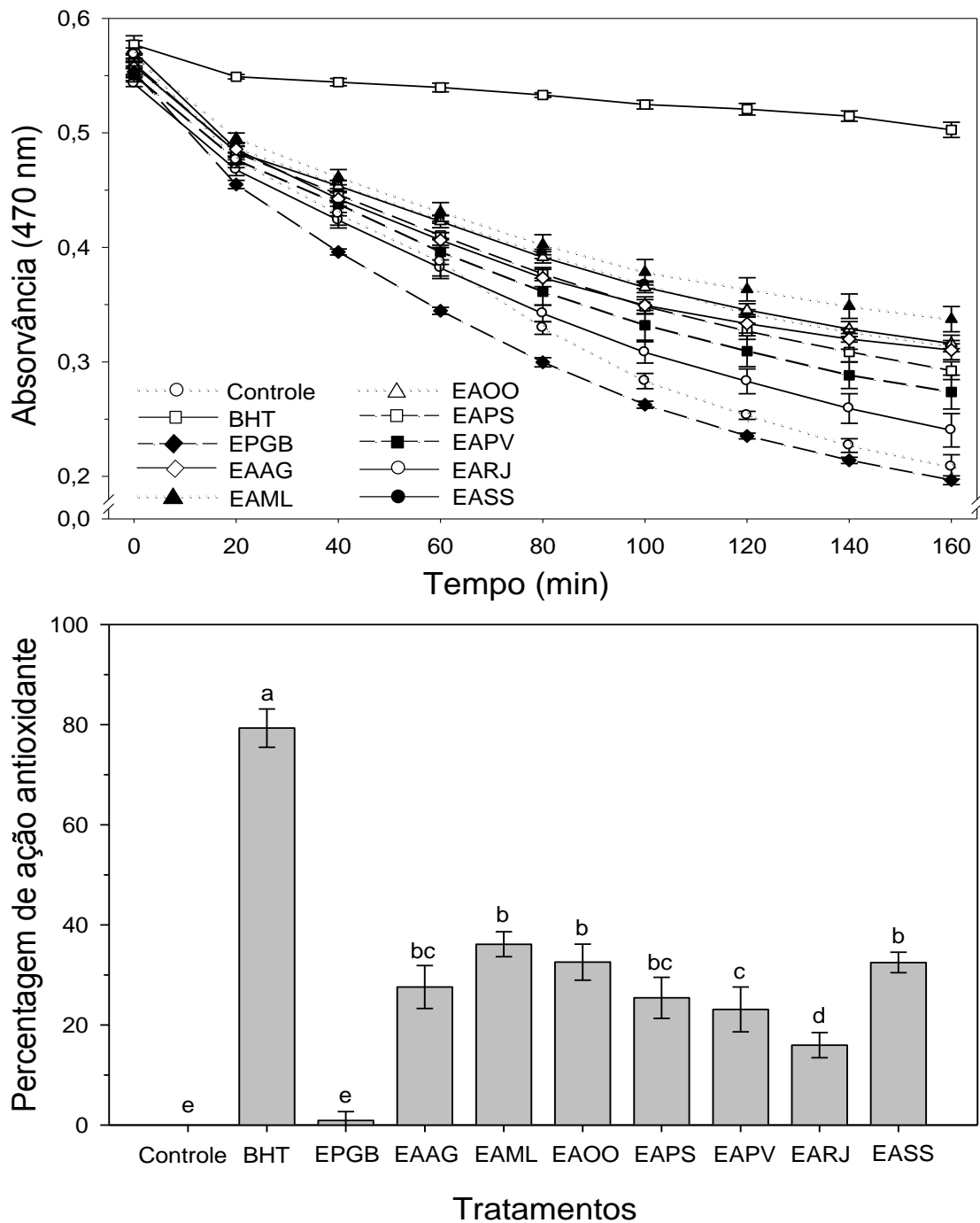


Figura 3. Perfil do descoramento do β -caroteno incubado com os extratos em função do tempo de reação, além da comparação da percentagem de ação antioxidante pelo método de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e o controle negativo usado no teste. A concentração final das amostras é 25 $\mu\text{g/mL}$. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a

$p < 0,05$. BHT - padrão sintético butil-hidroxitolueno, EPGB - Extrato Padronizado *Ginkgo biloba*, EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

4.3.3. Ação antioxidante pela peroxidação lipídica

A Figura 4 apresenta a porcentagem de ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e os padrões BHT e EPGB. Na Tabela 5 (página 67) encontram-se os valores da porcentagem de ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para todos os extratos analisados.

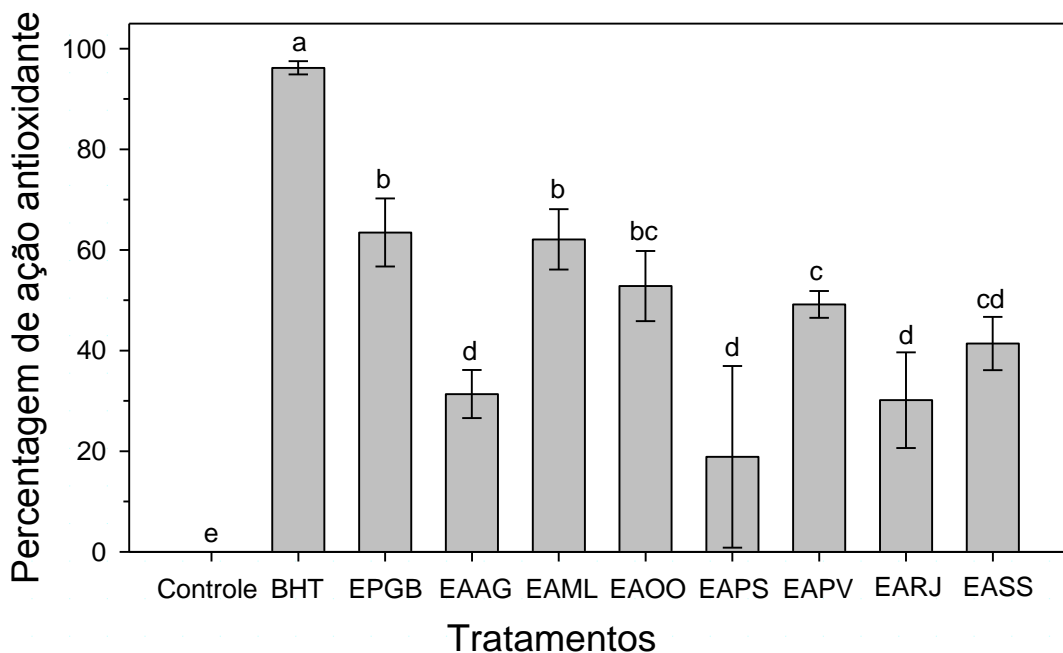


Figura 4. Porcentagem de ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para BHT, EPGB, EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS e o controle negativo usado no teste. A concentração final das amostras é 12 $\mu\text{g/mL}$. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. BHT - padrão sintético butil-hidroxitolueno, EPGB - Extrato Padronizado *Ginkgo biloba*, EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*,

EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EA00 - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

Análise dos resultados mostrou, como esperado, a maior atividade antioxidante para o padrão BHT, dentre as amostras analisadas. EAML e EA00 apresentaram alta ação antioxidante por este método, semelhante estatisticamente ao extrato padronizado EPGB. Os demais extratos mostraram um perfil semelhante estatisticamente. Contudo, a ação antioxidante de todos os extratos diferiu estatisticamente do controle negativo (sem extrato).

Como para a peroxidação lipídica também há tratamento térmico inerente a metodologia do teste, menor ação antioxidante de extratos como EAAG também pode estar relacionada a possível degradação de compostos fenólicos, ocasionando diminuição da ação antioxidante (Anese et al., 2002). Além disso, por apresentar íons metálicos promotores da oxidação da membrana lipossômica, para a avaliação da ação antioxidante pela peroxidação lipídica, além do mecanismo de sequestro de radicais livres, é provável que ocorra ação quelante de metais como Fe^{3+} por parte dos compostos fenólicos (Srinivasan et al., 2005).

Devido a complexidade dos processos de ação antioxidante, é importante o emprego de diferentes metodologias para se avaliar esta atividade. Assim, diferenças metodológicas e na análise dos resultados devem ser levadas em conta, não sendo raro a obtenção de resultados distintos na avaliação de antioxidantes utilizando diferentes sistemas *in vitro* (Carpes et al., 2008).

Diferentemente do sequestro de radicais livres pelo DPPH•, que se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, a co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e a peroxidação lipídica determinam a atividade de um composto de proteger um substrato lipídico da oxidação pela neutralização de radicais livres formados no sistema (Gursoy et al., 2009). Estudos afirmam que a atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades

redutoras e estrutura química, que desempenham importante papel na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição (Kristinova et al., 2009).

4.4. Correlação do conteúdo de polifenóis totais X ação antioxidante

A Tabela 5 apresenta os resultados da quantificação de polifenóis totais, ação antioxidante por DPPH, co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica, dos extratos aquosos das espécies estudadas.

Tabela 5. Resultados da quantificação de polifenóis totais, ação antioxidante por DPPH, co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica, dos extratos aquosos das espécies estudadas.

Amostras	Quantificação Polifenóis ($\mu\text{g EAT/mg extrato}$)	DPPH (IC_{50})	β -caroteno/ácido linoléico (% Ação Antioxidante)	Peroxidação Lipídica (% Ação Antioxidante)
BHT	-	$2,6 \pm 0,2^{\text{ef}}$	$79,3 \pm 3,8^{\text{a}}$	$96,2 \pm 1,3^{\text{a}}$
EPGB	-	$2,2 \pm 0,1^{\text{f}}$	$0,9 \pm 1,8^{\text{e}}$	$63,5 \pm 6,7^{\text{b}}$
EAAG	$80,9 \pm 0,2^{\text{a}}$	$1,3 \pm 0,4^{\text{f}}$	$27,6 \pm 4,3^{\text{bc}}$	$31,3 \pm 4,8^{\text{d}}$
EAML	$81,5 \pm 0,3^{\text{a}}$	$1,1 \pm 0,7^{\text{f}}$	$36,1 \pm 2,5^{\text{b}}$	$62,1 \pm 6,0^{\text{b}}$
EAOO	$40,1 \pm 0,1^{\text{b}}$	$4,2 \pm 0,2^{\text{e}}$	$32,5 \pm 3,6^{\text{b}}$	$52,8 \pm 7,0^{\text{bc}}$
EAPS	$16,8 \pm 0,4^{\text{f}}$	$74,2 \pm 0,6^{\text{a}}$	$25,4 \pm 4,1^{\text{bc}}$	$18,9 \pm 18,1^{\text{d}}$
EAPV	$22,4 \pm 0,1^{\text{d}}$	$45,4 \pm 0,4^{\text{c}}$	$23,1 \pm 4,5^{\text{c}}$	$49,2 \pm 2,7^{\text{c}}$
EARJ	$18,0 \pm 0,1^{\text{e}}$	$55,0 \pm 0,4^{\text{b}}$	$15,9 \pm 2,5^{\text{d}}$	$30,1 \pm 9,5^{\text{d}}$
EASS	$23,8 \pm 0,1^{\text{c}}$	$42,5 \pm 1,4^{\text{d}}$	$32,5 \pm 2,1^{\text{b}}$	$41,4 \pm 5,3^{\text{cd}}$

Nota: -: teste não realizado. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. BHT - padrão sintético butil-hidroxitolueno, EPGB - Extrato Padronizado *Ginkgo biloba*, EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

A Figura 5 apresenta a correlação de *Pearson* entre o conteúdo polifenólico total e a atividade antioxidante para os 3 testes realizados.

Os resultados indicam significância estatística ($p < 0,05$) e alto valor de correlação ($r = 0,86$) entre o conteúdo fenólico e o IC_{50} obtido pelo método do DPPH. O valor de

correlação foi negativo ($r = - 0,86$), uma vez que se observa que os compostos com maior conteúdo de polifenóis apresentaram menor valor de IC_{50} , relacionando fortemente aos polifenóis a ação antioxidante ocasionada por EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS (Tabela 5).

Para a ação antioxidante avaliadas nos testes de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico ($r = 0,51$) e peroxidação lipídica ($r = 0,37$), os resultados não mostraram correlação entre o conteúdo fenólico total e a ação antioxidante, apesar de em ambos os casos os resultados apresentarem significância estatística ($p < 0,05$).

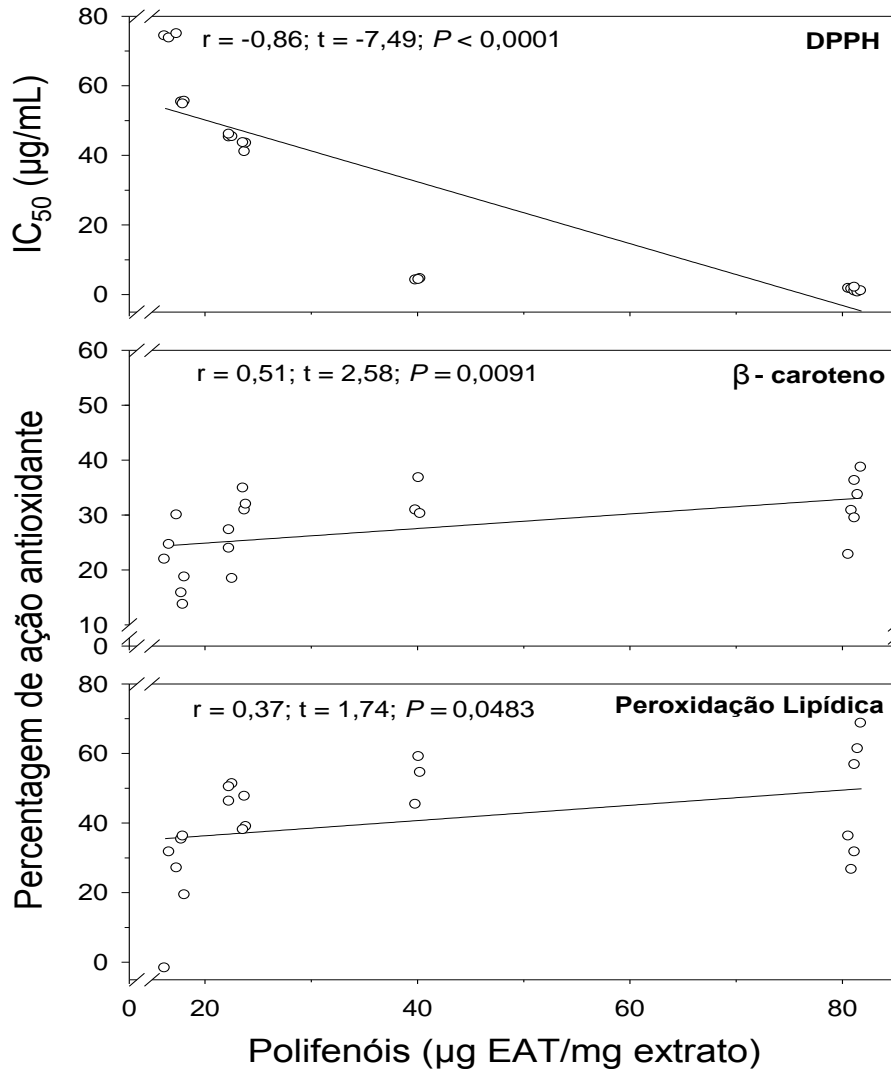


Figura 5. Correlação de *Pearson* entre o conteúdo de polifenóis totais e ação antioxidante para os testes de DPPH, co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico e peroxidação lipídica de EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. Significância estatística a $p < 0,05$. BHT - padrão sintético butil-hidroxitolueno, EPGB - Extrato Padronizado *Ginkgo biloba*, EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

5. CONCLUSÃO

Análise da atividade antioxidante dos extratos mostrou potencial antioxidante das amostras analisadas, sobretudo para EAML, EAAG, EAOO e EASS. Esses mesmos extratos foram apontados com maior conteúdo polifenólico em teste de quantificação, evidenciando possível correlação de compostos fenólicos com a ação antioxidante. Assim, estes extratos se mostram promissores para estudos de isolamento dos compostos responsáveis pela ação antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hameed, E.S.S., 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry* 114, 1271–1277.

Albiero, A.L.M., Sertié, J.A.A., Bacchi, E.M., 2002. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. *Journal Ethnopharmacology*, 82, 41-44.

Aldini, G., Piccoli, A., Beretta, G., Morazzoni, P., Riva, A., Marinello, C., Maffei Facino, R., 2006. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, 77, 121-128.

Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F., 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2755-2759.

Anese, M., Falcone, P., Fogliano, V., Nicoli, M.C., Massini, R., 2002. Effect of equivalent thermal treatment on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *Journal Food Science*, 67, 3442-3446.

Baba, M., Ohmura, M., Kishi, N., Okada, Y., Shibata, S., Peng, J., Yao, S.S., Nishino, H., Okuyama, T., 2000. Saponins isolated from *Allium chinense* G.Don and antitumor-promoting activities of isoliquiritigenin and laxogenin from the same drug. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 660-662.

Ben Ammar, R., Bouhlel, I., Valenti, K., Ben Sghaier, M., Kilani, S., Mariotte, A.M., Dijoux Franca, M.G., Laporte, F., Ghedira, G., Chekir-Ghedira, L., 2007. Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H₂O₂ and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: combination with polyphenolic compounds and classic in vitro assays. *Chemico-Biological Interactions*, 168, 171–183.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505-4515.

Boligon, A.A., Feltrin, A.C., Janovik, V., Frohlich, J.K., Athayde, M.L., 2009. Estudo fitoquímico das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. *Saúde*, 35, 46.

Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.

Calvo, T.R., Lima, Z.P., Silva, J.S., Ballesteros, K.V., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Tamashiro, J., Brito, A.R., Takahira, R.K., Vilegas, W., 2007. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 451–459.

Carpes, S.T., Prado, A., Moreno, I.A.M., Mourão, G.B., Alencar, S.M., Masson, M.L., 2008. *Screening* of the antioxidant potential of bee pollen produced in the southern region of Brazil. *Química Nova*, 31, 1660-1664.

Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., 2003. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, 26, 825-827.

Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F., Houghton, P.J., 2002. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part *Fitoterapia*, 73, 479-483.

Cunha, W.R., Martins, C., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medicinal*, 69, 468–470.

Cunha, A.P., 2005. *Farmacognosia e fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gubenkian.

De Flora, S., Bronzetti, G., Sobels, F.H., 1992. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutation Research*, 267, 153–155.

Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 26, 446-452.

Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., Coffey, R.G., 1993. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology*, 265, 774–778.

Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M., 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-densitylipoprotein to lipid-peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 549–554.

Garcez, W.S., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1995. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, 39, 815-816.

Gursoy, N., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Solak, M.H., 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2381-2388.

Harborne, J.B., 1984. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall, 278p.

Hartman, P.E., Shankel, D.M., 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ Mol Mutagen*, 15, 145–182.

Harvey, A., 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.

He, J. Lin, J., Li, J., Zhang, J.H., Sun, X.M., Zeng, C.M., 2008. Dual effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on human red blood cells. *Nordic Pharmacological Society*, 104, 138-144.

Herlt, A.J., Mander, L.N., Pongoh, E., Rumampuk, R.J., Tarigan, P., 2002. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae. *Journal of Natural Products*, 65, 115-120.

Hossain, M.A., Shah, M.D., 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal Chemistry*, 4, 355-360.

Just, M.J., Recio, M.C., Giner, R.M., Cuéllar, M.J., Manez, S., Bilia, A.R., Ríos, J.L., 1998. Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta Medica*, 64, 404-407.

Kristinova, V., Mozuraityte, R., Storro, I., Rustad, T., 2009. Antioxidant activity of phenolic acids in lipid oxidation catalyzed by different prooxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10377-10385.

Kubola, J., Siriamornpun, S., 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chemistry*, 110, 881-890.

Lopes, M.N., Mazza, F.C., Young, M.C.M., Bolzani, V.S., 1999. Complete Assignments of ¹H and ¹³C-NMR Spectra of the 3,4-*seco*-Triterpene Canaric Acid isolated from *Rudgea jasmínoides*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 10, 237-240.

Lordello, A.L.L., Yoshida, M., 1997. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*, 46, 741-744.

Makrigiorgos, G.M., 1997. Detection of lipid peroxidation on erythrocytes using the excimer-forming property of a lipophilic BODIPY fluorescent dye. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 35, 23-35.

Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A., 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinions in Lipidology*, 16, 77-84.

Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal American Oil Chemistry Society*, 45, 594-598.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.

Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal American Oil Chemistry Society*, 48, 91.

Mola, J.L., Araujo, E., Magalhães, G., 1997. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do distrito federal. *Química Nova*, 20, 460-462.

Morigaki, K., Walde, P., 2007. Fatty acid vesicles. *Current opinion e colloid & Interface Science*, 12, 75-80.

Oliveira, M.C., Negri, G., Salatino, A., Braga, M.R., 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1,4-naphthoquinone in cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botanica*, 30, 167-172.

Pelegri, D.D., Tsuzuki, J.K., Amado, C.A.B., Cortez, D.A.G.; Ferreira, I.C.P., 2008. Biological Activity and Isolated Compounds in *Sapindus saponaria* L. and other Plants of the Genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27, 922-927.

Puupponen-Pimiä , R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494–507.

Renaud, S., Delorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease. *The Lancet*, 339, 1523–1526.

Rodrigues, J., Rinaldo, D., Santos, L.C., Vilegas, W., 2007. An unusual C6–C600 linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). *Phytochemistry*, 68, 1781–1784.

Ribeiro, A., Zani, C.L., Alves, T.M.A., Mendes, N.M., Hambuerger, M., Hostettman, K., 1995. Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. *International Journal Pharmacognosy*, 33, 177-180.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M., 2007. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 27, 53-60.

Samman, S., Lyons Wall, P.M., Cook, N.C., 1998. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In Rice-Evans, C.A., Packer, L. (Eds.), *Flavonoids in health and disease* (469–482p). New York: Marcel Dekker.

Santos, L.V., Fett-Neto, A.G., Kerber, V.A., Elisabetsky, E., Quirion, J.C., Henriques, A.T., 2001. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1185–1187.

Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., Mete, E., 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2479-2483.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

Silva, I.G., Barbosa-Filho, J.M., da Silva, M.S., de Lacerda, C.D.G., da-Cunha, E.V.L., 2002. Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 881-883.

Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., 2003. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova*, 26, 517-522.

Simone, G.V., Maria, T.K., Valquíria, R., Amélia, T.H., George, G.O., 2007. Evaluation of analytical variables of the Folin-Ciocalteu method for the quantitation of the total tannins content using a *Psidium guajava* L. leaves aqueous extract as a model. *Química Nova*, 30, 815-820.

Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira-Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355

Srinivasan, M., Rukkumani, R., Ram Sudheer, A., Menon, V.P., 2005. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19, 491-496.

Urrea-Bulla, A., Suárez, M., Moreno-Murillo, B., 2004. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*, 75, 392–394.

Vieira, B.C., 2010. Análises fitoquímica, bromatológica, toxicológica e dos efeitos estimulante físico e antioxidante de extratos de folhas de *Psychotria vellosiana* Benth. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 95p.

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., 1998. Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Letters*, 433, 44–46.

Yagi, A., Kabash, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Moustafa, S.M., Khalifa, T.I., 2002. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Medica*, 68, 957–960.

Yu, H.H., Liu, X.G., Xing, R.E., Liu, S., Guo, Z.Y., Wang, P.B., 2006. *In vitro* determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*, 95, 123-130.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2^a ed., 384p.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer Verlag, ed. 1^a, 320p.

White, B.L., Howard, L.R., Prior, R.L., 2010. Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Extruded Cranberry Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4037–4042.

CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PLANTAS
CONSUMIDAS NA DIETA DO PRIMATA *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl
FRENTE À DIFERENTES CEPAS DE *Staphylococcus aureus* e
Escherichia coli ORIUNDAS DE MASTITE BOVINA**

1. INTRODUÇÃO

O aumento do número de pesquisa realizando triagem de produtos naturais na busca de novos agentes antimicrobianos data do fim da primeira metade do século XX. Desde então, vários antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (Walsh, 2003), além de antibióticos semi-sintéticos análogos aos antibióticos naturais como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina), análogos de tetraciclina e derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicacina) foram descobertos (Guimarães et al., 2010). Porém, o uso indiscriminado de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos fármacos (Falcão et al., 2002).

Nesse sentido, a pesquisa em bioprospecção farmacêutica torna-se estratégia importante para a busca de novos agente antimicrobianos, principalmente em países de megabiodiversidade como o Brasil (Ostrosky et al., 2008). Outro ponto, de abrangência mundial, é a busca por novos agentes antimicrobianos que sejam eficientes principalmente a microrganismos resistentes aos antibióticos conhecidos, associados a infecções oportunistas em casos de doenças como AIDS, quimioterapia antineoplásica ou transplantes (Penna et al., 2001). Estudos com produtos naturais têm demonstrado que estes apresentam diferentes mecanismos de ação sobre o microrganismo, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas dos microorganismos (Kim et al., 1995, Sikkema et al., 1995, Burt, 2004, Gonçalves et al., 2005).

Dessa forma, a investigação química e biológica de extratos vegetais ou de produtos naturais purificados pode contribuir significativamente para a obtenção de novos antimicrobianos. Nos últimos anos, diferentes estudos foram realizados em diversos países a fim de se avaliar a eficiência de extratos vegetais como antimicrobianos (Meng et al., 2000, Ho et al., 2001, Michelin et al., 2005, Leitão et al., 2006). Atualmente estima-se que mais de 100 produtos derivados de extratos naturais se encontram em fase de estudo clínico e pelo menos, mais de 100 projetos estão em desenvolvimento pré-clínico (Harvey, 2008).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também tem crescido de forma significativa (Duarte, 2006). Nesse contexto, um campo de pesquisa envolvendo a busca de produtos naturais com ação antimicrobiana está relacionado a ação contra cepas bacterianas de mastite bovina em rebanho leiteiro. A mastite bovina é o fator limitante mais relevante na produção leiteira, sendo caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária, responsável pelas maiores perdas econômicas do setor (Balaban & Razooly, 2000). Além disso, estudos mostram que os riscos de transmissão de bactérias resistentes a mastite bovina para o homem é extremamente efetivo através de processos alimentares (Mota et al., 2005).

Devido principalmente ao aparecimento de cepas multi-resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o tratamento da mastite bovina tem sido difícil (Santos et al., 2006, Fontana et al., 2010). Segundo Zanette et al. (2010), aproximadamente 25% de cepas com isolados de mastite apresentaram-se multirresistentes a drogas antimicrobianas tradicionais. Esta dificuldade no controle e tratamento da mastite, aliada a existência de estudos que relatam o potencial antimicrobiano de diferentes produtos naturais, torna extremamente promissora a pesquisa com extratos e compostos de origem vegetal (Rios & Reccio, 2005, Sher, 2009).

Dessa forma, uma vez que as plantas produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que estudos de triagem possam promover a descoberta de novos extratos vegetais ou novos compostos isolados candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos para uso humano e/ou veterinário (Ahmad & Beg, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o potencial antibacteriano do extrato aquoso das espécies vegetais consumidas pela espécie primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana de extratos aquosos de espécies vegetais consumidas pelo primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl sobre isolados das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* 3993 e *Staphylococcus aureus* 4125 e Gram negativa *Escherichia coli* 24;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para ação dos extratos frente as diferentes cepas utilizadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Micro-organismos e condição de cultivo

As cepas *Staphylococcus aureus* 3993, *Staphylococcus aureus* 4125 e *Escherichia coli* 24 utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora – MG (ATCC 33591), sendo isolados de mastite bovina.

As culturas bacterianas foram estriadas em placas contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHA) mantidas por 16 horas a 37 °C. Para preparo dos estoques, cada isolado foi inoculado em 5 mL de caldo BHI, e mantido em estufa a 37 °C por 16-18 horas. Esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 850 µL de BHI com adição posterior de 150 µL de glicerol estéril. Os microtubos foram mantidos a - 80 °C.

3.2. Extratos vegetais e antibiótico

Foram preparados estoques de todos os extratos vegetais (Item 3.2. – Capítulo 2) ressuscitados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/mL. Estoques de soluções do antibiótico ampicilina foram preparados a uma concentração de 5 mg/mL, esterilizados por filtração, quando necessário, e armazenados a -20°C.

3.3. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate* (NCCLS, 2003). Para isso, 100 µL de uma suspensão bacteriana contendo 10⁶ UFC/mL das cepas de *Staphylococcus aureus* 3993, *Staphylococcus aureus* 4125 e *Escherichia coli* 24 foram espalhadas com alça de Drigalsky em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar e 30 µL de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*), EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorífera*),

EAPS (Extrato Aquoso *Psychotria suterella*), EAPV (Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*), EARJ (Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides*) e EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) na concentração de 50 mg/mL foram adicionados aos furos. Além disso, 30 µL de ampicilina (5 mg/mL) e 30 µL de DMSO foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 horas, sendo os halos de inibição medidos em milímetros após este período. Os testes foram realizados por duas vezes em triplicata. Percentagem da ação antibacteriana dos extratos foi realizada usando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano das doses de extratos avaliadas e o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano do controle positivo com ampicilina (Controle +).

$$\% \text{ Ação Antibacteriana} = \frac{\text{Halo Inibição Dose Testada}}{\text{Halo Inibição Controle +}} \times 100$$

3.4. Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos vegetais

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de extrato que inibe o crescimento bacteriano (Martini & Eloff, 1998). Assim, a atividade dos extratos sobre o crescimento bacteriano foi determinada através do método da microdiluição (NCCLS, 2003). As diferentes cepas de bactérias foram, inicialmente, cultivadas em placas contendo ágar BHI, as quais foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, colônias isoladas foram repicadas para caldo Müeller-Hinton o qual foi incubado a 37 °C até obtenção de crescimento em fase exponencial, correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (DO_{620nm} 0,10). Assim, suspensões bacterianas das cepas de *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24 foram incubadas com diferentes doses de EAAG, EAAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ e EASS. Soluções diluídas da solução a 50 mg/mL dos extratos (40; 36; 32; 28; 24; 20; 16; 12; 8; 4; 3,6; 3,2; 2,8; 2,4; 2; 1,6; 1,2; 0,8 e 0,4 µL de extrato) foram adicionadas a 100 µL de suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL) das diferentes cepas e o volume final de 200 µL por *well* completado com caldo Müeller-Hinton. Dessa forma, a CIM foi determinada pela observação visual após incubação da placa por 24 horas, a 37 °C. Após a incubação por 24 horas, a cada *well*

foram adicionados 4 μL do sal INT (iodonitrotetrazolium) (2 mg/mL), de forma a facilitar a visualização das células bacterianas viáveis, uma vez que o INT em contato com cultura bacteriana viável apresenta uma coloração roséa. Como controle negativo, 100 μL da mesma suspensão bacteriana para as diferentes cepas testadas foram adicionados a 40 μL de DMSO, acrescido de 60 μL de caldo Müller-Hinton. Para controle positivo, 40 μL de ampicilina (5 mg/mL) foram adicionados a 60 μL de caldo Müller-Hinton e 100 μL da mesma suspensão bacteriana para as diferentes cepas testadas. Além disso, 40 μL dos diferentes extratos (50 mg/mL) foram adicionados a 60 μL de caldo Müller-Hinton e 100 μL da mesma suspensão bacteriana para as diferentes cepas testadas, foi usado como controle da coloração do próprio extrato.

3.5. Análise estatística

Os dados de percentagem de ação antibacteriana para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e os controles positivo (ampicilina) e negativo (DMSO) foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de médias (teste de Tukey) $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da atividade antibacteriana

As Figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam imagens do teste antibacteriano por difusão em ágar para EAAG, EAML, EAOO e EASS, respectivamente. Somente EAML mostrou atividade frente a todas as três cepas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24. EAAG e EAOO apresentaram atividade antibacteriana apenas para as cepas *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125. Para EASS, ação antibacteriana foi observada somente para a cepa *S. aureus* 4125. Os resultados para EAPS, EAPV e EARJ foram negativos frente a todas as cepas bacterianas testadas. Não foram apresentadas figuras para os extratos com resultado negativo.

Na literatura foram encontrados estudos que mostram ação antibacteriana para o extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* frente a cepa de *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima de 250 µg/mL (Conegero et al., 2003).

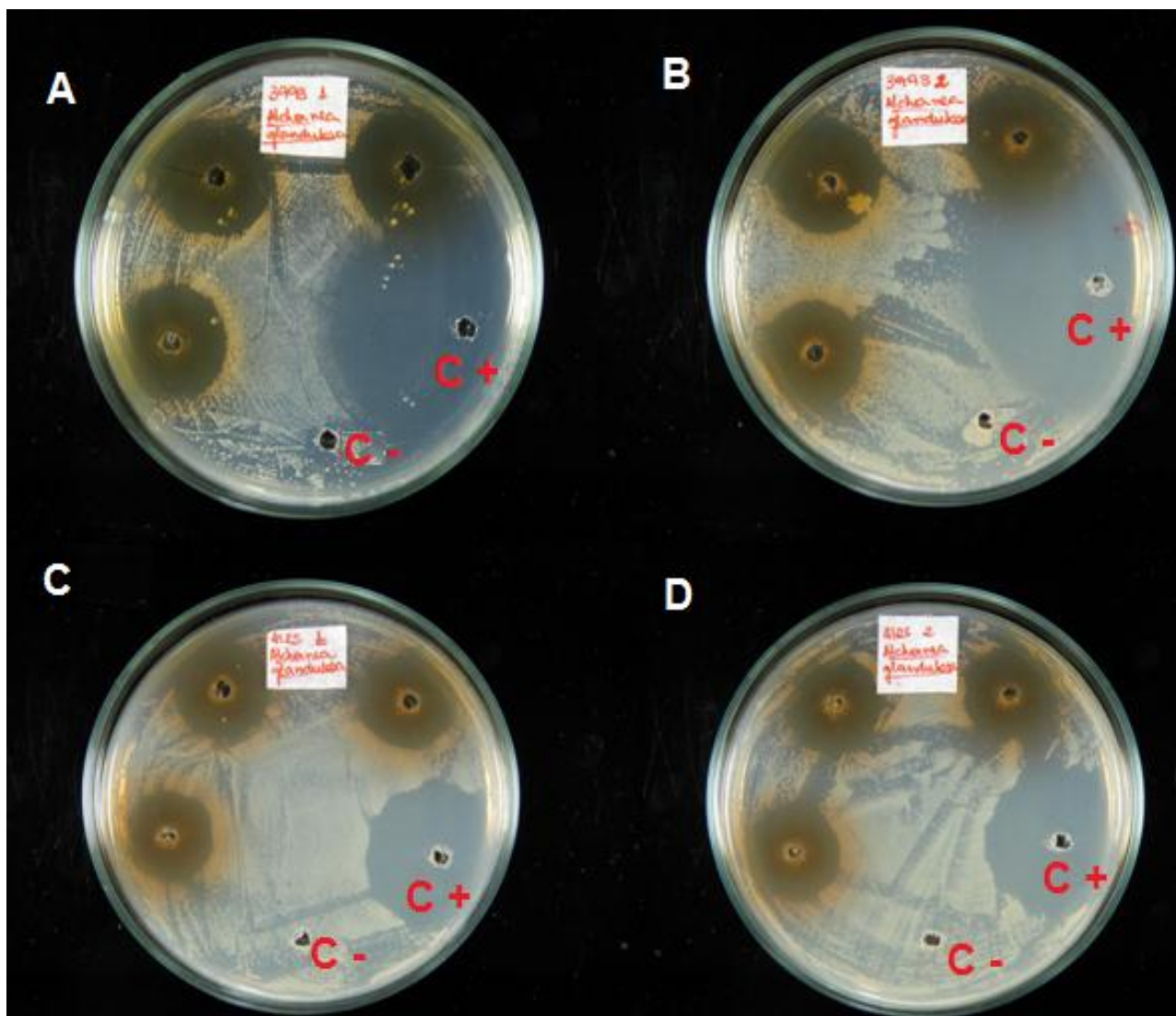


Figura 1. Teste antibacteriano de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*) frente as cepas de *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125. O teste foi realizado em triplicata e 2 repetições. A: teste de EAAG frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 1). B: teste de EAAG frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 2). C: teste de EAAG frente a cepa de *S. aureus* 4125 (repetição 1). D: teste de EAAG frente a cepa de *S. aureus* 4125 (repetição 2). Nota: C +: controle positivo (Ampicilina). C -: controle negativo (DMSO).

Não foram encontrados estudos sobre a ação antimicrobiana para a espécie *Miconia latecrenata*. Contudo, estudos de espécies do gênero *Miconia* têm demonstrado potencial ação antibacteriana de extrato etanólico de folhas de *M. albicans*, *M. rubiginosa*

e *M. stenostachiaya* sobre cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em testes de difusão em ágar (Celotto et al., 2003, Rodrigues et al., 2008).

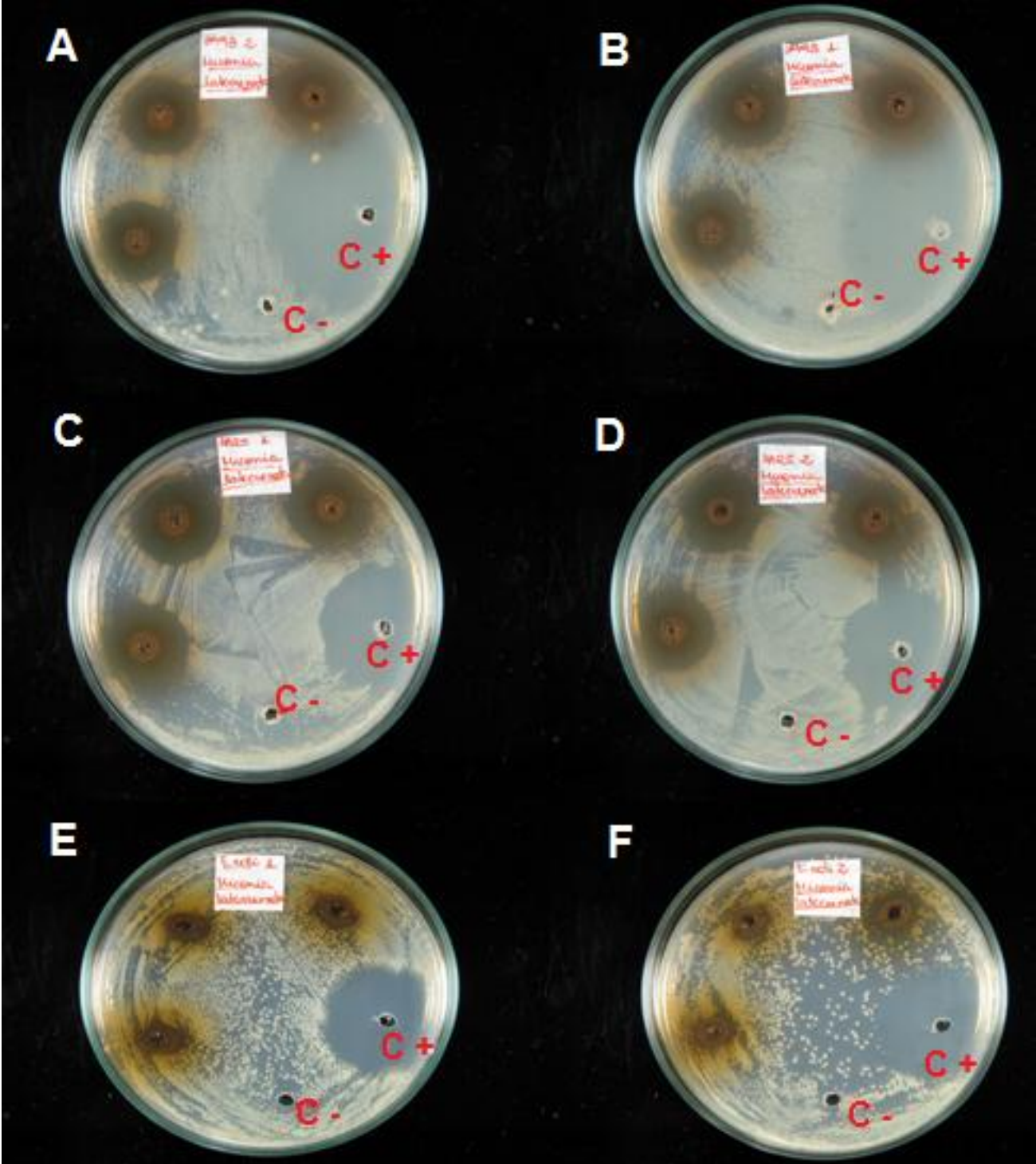


Figura 2. Teste antibacteriano de EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) frente as cepas de *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24. O teste foi realizado em triplicata e 2 repetições. A: teste de EAML frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 1). B: teste de EAML frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 2). C: teste de EAML frente a cepa de *S. aureus* 4125 (repetição 1). D: teste de EAML frente a cepa de *S. aureus* 4125 (repetição 2). E: teste de EAML frente a cepa de *E. coli* 24 (repetição 1). F: teste de EAML frente a cepa de *E. coli* 24 (repetição 2). Nota: C +: controle positivo (Ampicilina). C -: controle negativo (DMSO).

Para a espécie *Ocotea odorifera* foi observada baixa ação antibacteriana frente cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em testes de difusão em ágar para o extrato metanólico das folhas da espécie em ensaios de difusão em ágar (Souza et al., 2004). Contudo, estudos com o óleo essencial das folhas de várias espécies de *Ocotea* mostraram potencial ação antibacteriana frente a cepas de diferentes espécies de *Streptococcus* e cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em testes de difusão em meio líquido (Bruni et al., 2004, Noriega & Dacarro, 2008).

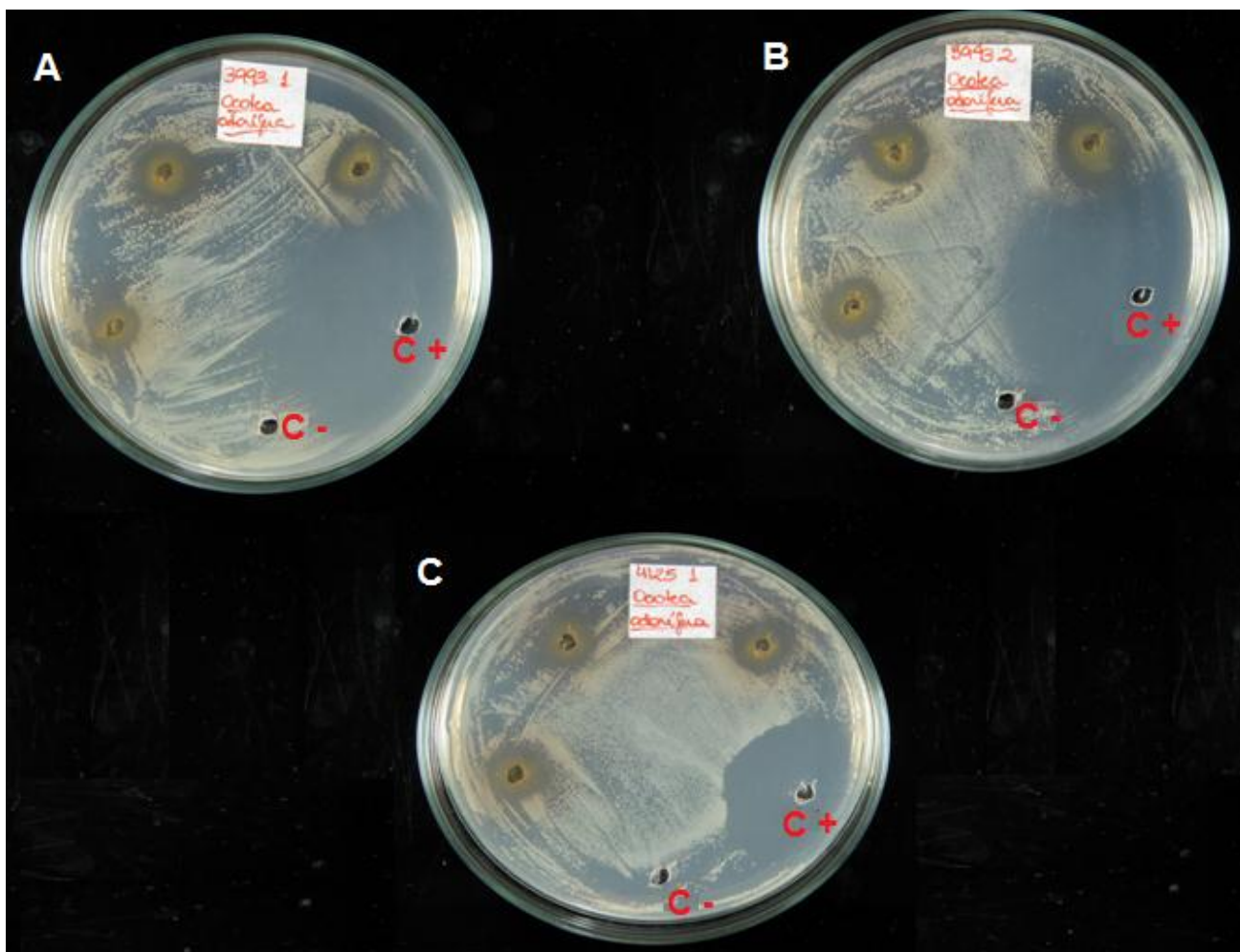


Figura 3. Teste antibacteriano de EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) frente as cepas de *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125. O teste foi realizado em triplicata e 2 repetições. A: teste de EAOO frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 1). B: teste de EAOO frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 2). C: teste de EAOO frente a cepa de *S. aureus* 4125 (este teste só possui uma repetição). Nota: C +: controle positivo (Ampicilina). C -: controle negativo (DMSO).

Para a espécie *Solanum swartzianum* não foram encontrados estudos sobre sua ação antimicrobiana. Entretanto, relatos na literatura apontam espécie do gênero *Solanum*, como extrato metanólico de *S. turvum* com potencial ação antibacteriana contra cepas de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em testes de difusão em ágar (Chah et al., 2000).

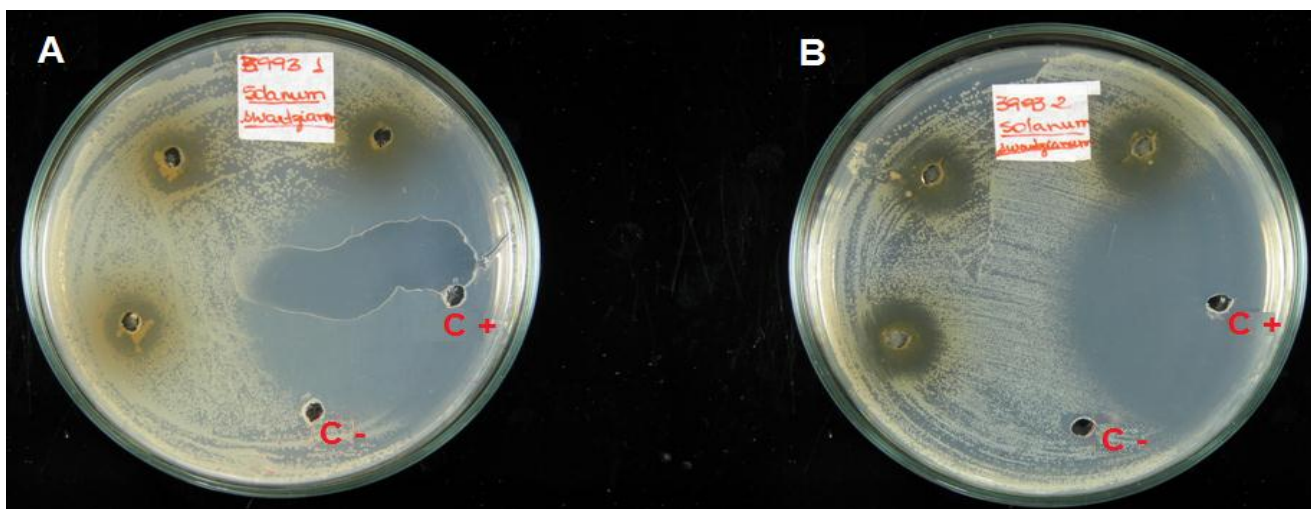


Figura 4. Teste antibacteriano de EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) frente a cepa de *S. aureus* 3993. O teste foi realizado em triplicata e 2 repetições. A: teste de EASS frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 1). B: teste de EASS frente a cepa de *S. aureus* 3993 (repetição 2). Nota: C +: controle positivo (Ampicilina). C -: controle negativo (DMSO).

Das espécies estudadas que não apresentaram ação antibacteriana frente às cepas testadas neste trabalho, foi encontrado na literatura estudo relatando ação antimicrobiana somente para o extrato etanólico das folhas de *Psychotria vellosiana* frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (CIM \leq 0,20 $\mu\text{g/mL}$) e *Mycobacterium kansasii* (CIM $>$ 100 $\mu\text{g/mL}$) em testes de concentração mínima inibitória (Ramos et al., 2008).

Para testes antibacterianos de difusão em ágar não há um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões. Dessa forma, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições inferiores (Fennel et al., 2004). Segundo Springfield et al. (2003) extratos apresentam alta atividade antimicrobiana quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menor do que o halo do controle positivo. Segundo estes mesmos autores, extratos que possuem moderada ação antimicrobiana, apresentam halos maiores que 2 mm, mas menores que o controle positivo de mais de 3 mm e não são considerados antimicrobianos quando diâmetro do halo de inibição é igual ou menor que 2 mm

(Springfield et al., 2003). Outro estudo aponta resultado positivo para halos de inibição maiores que 7 mm (Nascimento et al., 2000). Assim, para o presente trabalho, extratos que apresentaram halos de inibição maiores do que 7 mm foram considerados com potencial ação antibacteriana, sendo avaliados posteriormente para a concentração mínima inibitória frente as mesmas cepas analisadas no teste de diluição em ágar.

Na Tabela 1 são apresentados o tamanho do halo de inibição bacteriana dos extratos e controles e a percentagem de ação antibacteriana dos extratos comparada a ação antibacteriana do controle positivo de ampicilina ao qual foi atribuído 100% de atividade. A Figura 5 apresenta análise comparativa da percentagem de ação antibacteriana das amostras estudadas.

Tabela 1. Atividade antibacteriana expressa pela média em milímetros do halo \pm desvio (mm) padrão e porcentagem de ação antibacteriana \pm desvio padrão em relação ao controle positivo ampicilina (valor entre parênteses) nas cepas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24, expostas a concentração de 1500 μ g de extrato/teste.

Tratamento (1500 μ g/teste)	<i>S. aureus</i> 3993	<i>S. aureus</i> 4125	<i>E. coli</i> 24
EAAG	23,7 \pm 1,5 (55,0 \pm 3,5) ^b	21,5 \pm 0,8 (62,0 \pm 2,4) ^c	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
EAML	23,5 \pm 1,0 (54,6 \pm 2,4) ^b	23,5 \pm 1,5 (68,7 \pm 4,2) ^b	11,5 \pm 1,4 (38,8 \pm 4,6) ^b
EAOO	13,5 \pm 1,4 (31,4 \pm 3,2) ^c	11,5 \pm 1,2 (33,2 \pm 3,5) ^d	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
EAPS	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^d	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^e	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
EAPV	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^d	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^e	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
EARJ	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^d	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^e	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
EASS	12,2 \pm 1,7 (55,0 \pm 3,5) ^b	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^e	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c
^A AMP	43,0 \pm 1,0 (100,0 \pm 0,0) ^a	34,7 \pm 0,6 (100,0 \pm 0,0) ^a	29,7 \pm 0,6 (100,0 \pm 0,0) ^a
^B DMSO	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^d	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^e	0,0 \pm 0,0 (0,0 \pm 0,0) ^c

Nota: Letras maiúsculas (esquerda): A: Ampicilina - controle positivo (150 μ g/halo). B: Dimetilsufóxido - controle negativo (30 μ L/halo). Letras minúsculas (direita): Médias de porcentagem de ação antibacteriana com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

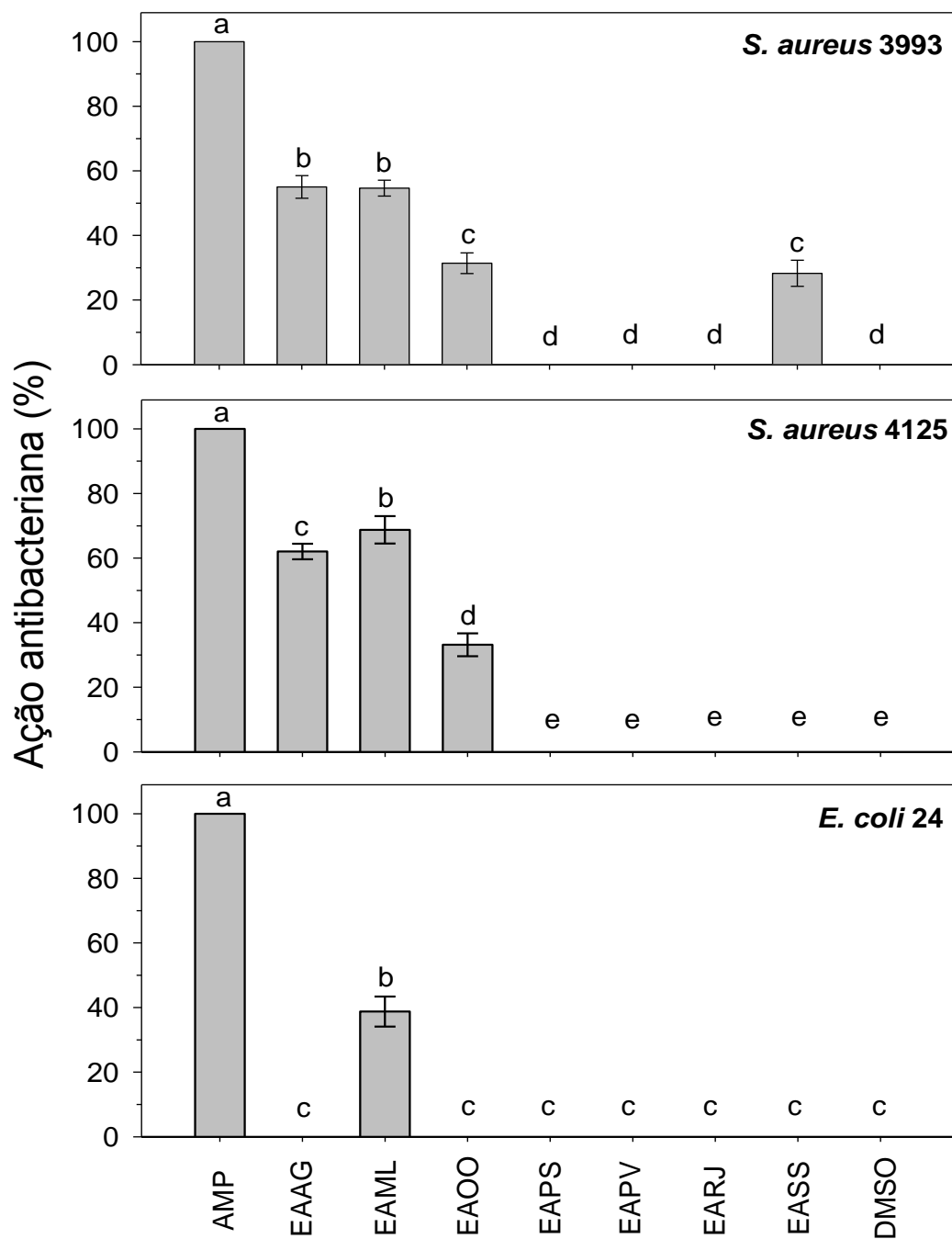


Figura 5. Percentagem de ação antibacteriana para EAAG, EAML, EAOO, EAPS, EAPV, EARJ, EASS e o controles positivo (AMP) e negativo (DMSO). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea*

odorifera, EAPS - Extrato Aquoso *Psychotria suterella*, EAPV - Extrato Aquoso *Psychotria vellosiana*, EARJ - Extrato Aquoso *Rudgea jasminoides* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

Os resultados mostram maior atividade antibacteriana para extratos com maior conteúdo fenólico e maior potencial antioxidante (EAML, EAAG, EAOO e EASS), conforme visto no Capítulo 2 deste trabalho. Vários estudos apontam os compostos fenólicos como importantes metabólitos promotores de atividade antibacteriana (Scalbert, 1991, Didry et al., 1993, Helander et al., 1998). Pode-se observar ainda a maior atividade de EAAG, EAML, EAOO e EASS sobre as cepas gram-positivas de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina, uma vez que estas não apresentam a membrana lipopolissacarídea (LPS) sobre sua parede celular peptídeoglicana. Em bactérias gram-negativas, a membrana lipopolissacarídea constitui o exterior da membrana controlando fortemente a penetração de agentes antibacterianos (Nikaido, 2003). Recentemente, tem sido descrito o envolvimento das LPS intactas na resistência a novas moléculas antibacterianas (Mamelli et al., 2009). Dessa forma, a menor atividade dos extratos testados contra a cepa gram-negativa de *E. coli* 24 de mastite bovina pode ser atribuída a presença da membrana lipopolissacarídea externa a sua parede celular.

Contudo, é importante lembrar que métodos de difusão em ágar, como o utilizado nestes ensaios, apresentam algumas limitações como dificuldade de homogeneidade da concentração do ágar, além da própria dificuldade de difusão dos compostos presentes nos extratos (Pinto et al., 2003). Além disso, no presente trabalho foi empregado como solvente extrator água, extraíndo seletivamente compostos hidrossolúveis das plantas. Estudos comparativos que buscaram investigar a influência da forma de extração sobre a ação antimicrobiana de extratos demonstraram que a escolha do solvente de extração influencia diretamente a atividade do extrato. Eloff (1998), ao avaliar extratos obtidos com solventes como diclorometano, acetona, etanol, metanol e água para uma mesma planta, observou maior atividade para o extrato obtido com o extrato acetônico. Resultados com diferenças de atividade antimicrobiana obtidas devido ao uso de diferentes solventes extratores também foram verificados por Lin et al. (1999) e Karaman et al. (2003). Assim, limitações impostas pela escolha do solvente extrativo, além de dificuldades de difusão

dos extratos podem influenciar nos resultados dos ensaios, não podendo, dessa forma, ser descartado maior potencial antibacteriano para as espécies vegetais estudadas frente a diferentes metodologias de trabalho.

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados somente para os extratos que apresentaram potencial ação antibacteriana pelo teste de difusão em ágar.

Assim, a Figura 6 apresenta foto do teste de CIM para EAAG, EAML, EAEO e EASS frente a cepa de *S. aureus* 3993.

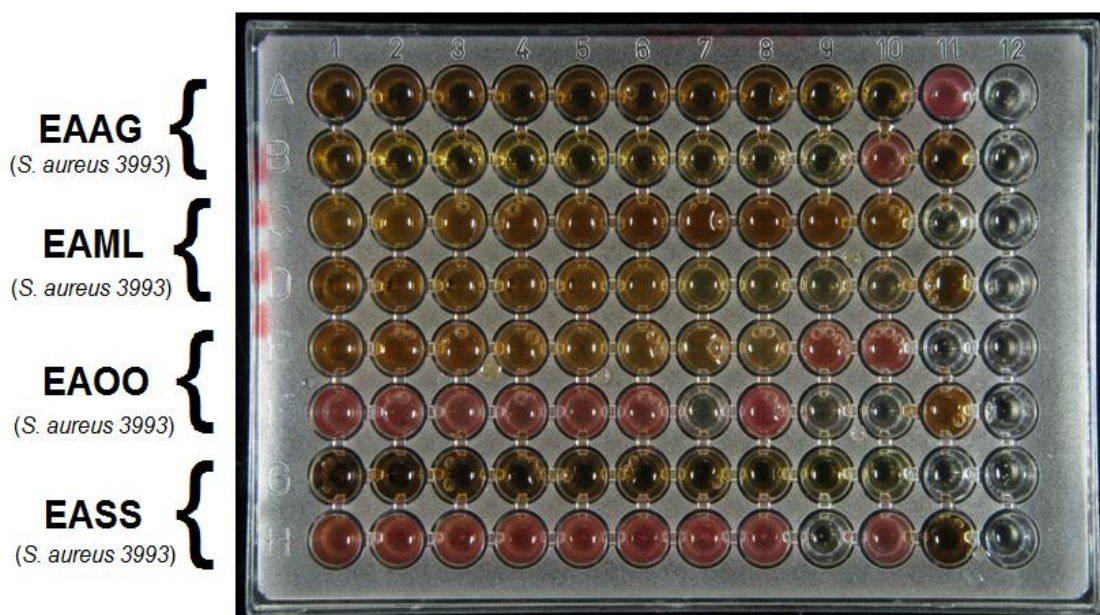


Figura 6. Determinação da concentração inibitória mínima de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*), EAEO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) e EASS (Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*) para a cepa de *S. aureus* 3993. Nota: Na 1ª linha referente a cada extrato, as doses nas wells de 1 a 10 são: 2000 µg, 1800 µg, 1600 µg, 1400 µg, 1200 µg, 1000 µg, 800 µg, 600 µg, 400 µg e 200 µg/well, respectivamente. As wells 11 e 12 na 1ª linha referente a cada extrato representam controle com 100 µL bactéria (10^6 UFC/mL) + 100 µL de meio Müller-Hinton e o controle negativo com 100 µL bactéria (10^6 UFC/mL) + 60 µL de meio Müller-Hinton +

40 μL de DMSO, respectivamente. Para a 2ª linha referente a cada extrato, as doses nas wells de 1 a 10 são: 200 μg , 180 μg , 160 μg , 140 μg , 120 μg , 100 μg , 80 μg , 60 μg , 40 μg e 20 $\mu\text{g}/\text{well}$, respectivamente. As wells 11 e 12 na 2ª linha referente a cada extrato representam o controle da coloração com 40 μL de extrato (50 mg/mL) + 160 μL de meio Müller-Hinton e o controle positivo com 100 μL bactéria (10^6 UFC/mL) + 60 μL de meio Müller-Hinton + 40 μL de ampicilina (5 mg/mL), respectivamente.

A Figura 7 apresenta foto do teste de CIM para EAAG, EAML e EAOO frente a cepa de *S. aureus* 4125, além de teste de CIM para EAML frente a cepa de *E. coli* 24.

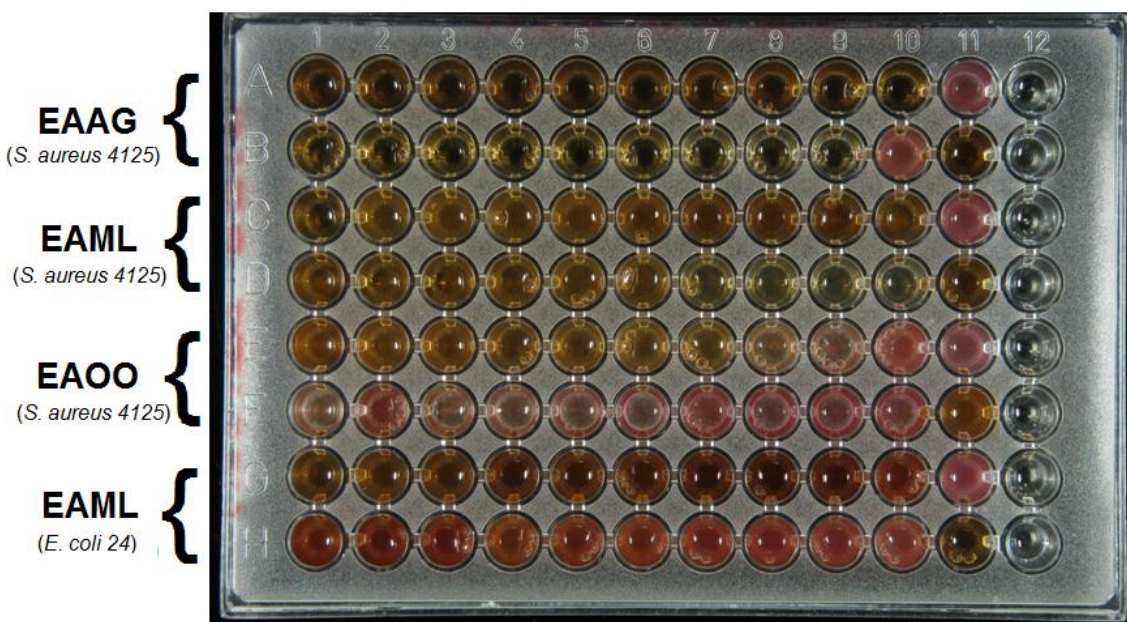


Figura 7. Determinação da concentração inibitória mínima de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) para a cepa de *S. aureus* 4125 e EAML para a cepa *E. coli* 24. Nota: Na 1ª linha referente a cada extrato, as doses nas wells de 1 a 10 são: 2000 μg , 1800 μg , 1600 μg , 1400 μg , 1200 μg , 1000 μg , 800 μg , 600 μg , 400 μg e 200 $\mu\text{g}/\text{well}$, respectivamente. As wells 11 e 12 na 1ª linha referente a cada extrato representam controle com 100 μL bactéria (10^6 UFC/mL) + 100 μL de meio Müller-Hinton e o controle negativo com 100 μL bactéria (10^6 UFC/mL) + 60 μL de meio Müller-Hinton + 40 μL de DMSO, respectivamente. Para a 2ª linha referente a cada extrato, as doses nas wells de 1

a 10 são: 200 µg, 180 µg, 160 µg, 140 µg, 120 µg, 100 µg, 80 µg, 60 µg, 40 µg e 20 µg/well, respectivamente. As wells 11 e 12 na 2ª linha referente a cada extrato representam o controle da coloração com 40 µL de extrato (50 mg/mL) + 160 µL de meio Müller-Hinton e o controle positivo com 100 µL bactéria (10⁶ UFC/mL) + 60 µL de meio Müller-Hinton + 40 µL de ampicilina (5 mg/mL), respectivamente.

Assim como para testes antibacterianos de difusão em ágar, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), também há dificuldade em se estabelecer como os valores de CIM são classificados. Dessa forma, no presente trabalho, foi utilizada a classificação para a atividade antibacteriana dos extratos vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição bacteriana - CIM até 500 µg/mL; inibição bacteriana moderada - CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição bacteriana - CIM acima de 1600 µg/mL (Aligianis et al., 2001) (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de EAAG, EAML, EAOO e EASS as cepas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 e *E. coli* 24.

Amostras	<i>S. aureus</i> 3993	<i>S. aureus</i> 4125	<i>E. coli</i> 24
EAAG	20 < CIM < 40 µg	20 < CIM < 40 µg	-
EAML*	CIM < 20 µg	CIM < 20 µg	1400 < CIM < 1600 µg
EAOO	40 < CIM < 60 µg	40 < CIM < 60 µg	-
EASS	200 < CIM < 400 µg	-	-

Nota: -: teste não realizado.*CIM de EAML para as cepas *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125 não foi determinada, uma vez que a menor dose usada no teste (20 µg/well) foi letal as colônias bacterianas testadas, sendo atribuída, assim, a EAML uma CIM < 20 µg. EAAG - Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*, EAML - Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*, EAOO - Extrato Aquoso *Ocotea odorifera* e EASS - Extrato Aquoso *Solanum swartzianum*.

Os resultados mostram que EAAG, EAML e EAOO apresentam a mesma faixa de CIM entre as cepas de *S. aureus* 3993 e *S. aureus* 4125, sendo que EAML apresentou uma faixa de CIM consideravelmente menor do que EAAG e EAOO. Contudo, todos os resultados podem ser classificados como forte atividade antibacteriana, segundo Aligianis

et al. (2001). Já EASS apresentou forte atividade antibacteriana para a cepa *S. aureus* 3993, apresentando, entretanto, CIM consideravelmente maior do que os outros extratos analisados. Somente EAML apresentou inibição bacteriana entre moderada e fraca para a cepa gram-negativa de *E. coli* 24. As diferenças de CIM entre os extratos para as diferentes cepas testadas estão relacionadas a quantidade do conteúdo fenólico destes extratos, podendo também sofrer influência do tipo de polifenóis presentes nestes extratos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados mostram o potencial antibacteriano para EAAG, EAML e EA00 sobre as cepas gram-positivas *S. aureus* 3993, *S. aureus* 4125 de mastite bovina, sendo que também foi observada ação antibacteriana para EASS sobre a cepa *S. aureus* 3993. Além disso, EAML apresentou ação inibitória no crescimento bacteriano sobre a cepa gram-negativa *E. coli* 24, também oriunda de mastite bovina. EAML apresentou a menor concentração inibitória mínima para ação antibacteriana frente as cepas de bactérias gram-positivas, sendo o único extrato ativo contra bactéria gram-negativa. Nesse sentido, foram demonstrados que os extratos EAML, EAAG, EA00 e EASS apresentam potencial para serem testados para o tratamento de mastite bovina, sendo que dentre estes o extrato aquoso de *Miconia latecrenata* mostrou melhor atividade, sendo ativo sobre as três cepas bacterianas causadoras da doença. Estudos *in vivo* devem ser realizados para a comprovação da eficácia desse extrato, como também a ausência de toxicidade. Estudos químicos também precisam ser realizados para descobrir qual(is) metabólito(s) da planta está(ão) relacionado(s) com a atividade biológica. A confirmação da atividade desse extrato por estes estudos complementares poderá resultar no desenvolvimento de um medicamento para o tratamento da mastite, doença esta causadora de prejuízo considerável para a pecuária leiteira brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aligianis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4168-4170.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. *Staphylococcal enterotoxins* (review). *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1-10.

Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415-421.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

Celotto, A.C., Nazário, D.Z., Spessoto, M.A., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., 2003. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 339-340.

Chah, K.F., Muko, K.N., Oboegbulema, S.I., 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia*, 71, 187-189.

Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., 2003. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, 26, 825-827.

Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M., 1993. Activé antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés (Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde singly or in combinations). *Pharmazie*, 48, 301-304.

Duarte, M.C.T., 2006. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP*. Universidade Estadual de Campinas.

Eloff, J.N., 1998. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 1-8.

Falcão, E.P.S., Silva, N.H., Gusmão, N.B., Ribeiro, S.M., Honda, N.K., Pereira, E.C., 2002. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 21, 43-49.

Fennel, C.W., Lindsey, K.L., Mc Gaw, L.J., Sparg, S.G., Stafford, G.I., Elgorashi, E.E., Grace, O.M., Van Staden, J., 2004. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal Ethnopharmacology*, 94, 205-217.

Fontana, V.L.D.S., Gianinni, M.J.S.M., Leite, C.Q.F., Miranda, E.T., Almeida, A.M.F., Fontana, C.A.P., Souza, C.M., Stella, A.E., 2010. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes as drogas antimicrobianas e detecção do gene da β -lactamase em *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia*, 17, 552-559.

Gonçalves, A.L., Filho, A.A., Menezes, H., 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 353-358.

Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T., 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33, 667-679.

Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-901.

Helander, I.M., Alakom, I.H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

Ho, K.Y., Tsai, C.C., Huang, H.S., Chen, C.P., Lin, T.C., Lin, C.C., 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 187-191.

Karaman, İ., Şahin, F., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., Adigüzel, A., 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal Ethnopharmacology*, 85, 231-235.

Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F., Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of carvacol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 60, 1364-1374.

Leitão, S.G., Castro, O., Fonseca, E.M., Julião, L.S., Tavares, E.S., Leo, R.R.T., Vieira, R.C., Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Martino, V., Sulsen, V., Barbosa, Y.A.G., Pinheiro, D.P.G., Silva, P.E.A., Teixeira, D.F., Lourenço, M.C.S., 2006. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 6-11.

Lin, J., Opoku, A.R., Geheeb-Keller, M., Hutchings, A.D., Terblanche, S.E., Jager, A.K., van Staden, J., 1999. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 267–274.

Mamelli, L., Petit, S., Chevalier, J., Giglione, C., Lieutaud, A., Meinel, T., Artaud, I., Pagés, J.M., 2009. New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of Gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors. *PLoS One*, 4, e6443, 1-8.

Martini, N., Eloff, J.N., 1998. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal Ethnopharmacology*, 62, 255-263.

Meng, J.C., Zhu, Q.X., Than, R.X., 2000. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroiseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. *Planta Med*, 66, 541-544.

Michelin, D.C., Moreschi, P.E., Lima, A.C., Nascimento, G.G.F., Paganelli, M.O., Chaud, M.V., 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15, 316-320.

Mota, R.A., Silva, K.P.C., Freitas, M.F.L., Porto, W. J. N., Silva, L.B.G., 2005. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42, 465-470.

Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247-256.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. Atlanta, USA.

Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 593-656.

Noriega, P., Dacarro, C., 2008. Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 7, 3-8.

Ostrosky, E.A. Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., Freitas, B.R., 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 301-307.

Penna, C., Marino, S., Vivot, E., Cruaães, M.C., Muñoz, J.D., Cruaães, J., Ferraro, G., Gutkind, G., Martino, V., 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal Ethnopharmacology*, 77, 37-40.

Pinto, T.J.A., Kaneko, T.M., Ohara, M.T., 2003. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325p.

Ramos, D.F., Leitão, G.G., Costa, F.N., Abreu, L., Villarrela, J.V., Leitão, S.G., Fernández, S.L.S., Silva, P.E.A., 2008. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 669-674.

Rios, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84, 2005.

Rodrigues, J., Michelin, D.C., Rinaldo, D., Zocolo, G.J., Santos, L.C., Vilegas, W., Salgado, H.R.N., 2008. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). *Journal of Medicinal Food*, 11, 120-126.

Santos, C.D.M., Leal, G.S., Rossi, D.A., 2006. Frequência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leites de vacas com mastites recorrentes em rebanhos da região de Uberlândia-MG. *Revista Veterinária Notícias*, 12, 83-88.

Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.

Sher, A., 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 7, 72-79.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59, 201-222.

Souza, G.C., Haas, A.P.S., von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 135–143.

Springfield, E.P., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W., Johnson, Q., 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, 10, 434-439.

Zanette, E., Scapin, D., Rossi, E.M., 2010. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc & Ciência – ACBS*, 1, 65-70.

Walsh, C., 2003. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. ASM Press: Washington, 345p.

CAPÍTULO 4

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, AÇÃO ANTIMUTAGÊNICA E
ANTIGENOTÓXICA DE 3 ESPÉCIES VEGETAIS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CONSUMIDAS NA DIETA DO PRIMATA
Brachyteles hipoxanthus Kuhl**

1. INTRODUÇÃO

Atualmente considerável atenção tem sido dada a produtos naturais com efetiva ação antimutagênica/antigenotóxica. Estes produtos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos capazes de atuar inibindo ou reduzindo a ação de agentes químicos e físicos, endógenos ou ambientais, que induzem a formação de tumores e/ou outros tipos de mutação genética (Ipek et al., 2005).

Mutações do DNA despertam grande interesse por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas tais como câncer e arteriosclerose, além de doenças inflamatórias e cardiovasculares (De Flora, 1998, Seo et al., 2000, Huang et al., 2005). Estas mutações genéticas estão diretamente relacionadas ao estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Guyton & Kensler, 1993, Dröger, 2002). Estas ROS são continuamente produzidas nos sistemas biológicos como produtos ou subprodutos de reações enzimáticas e também através de fontes exógenas, como radiação, tabagismo, e agrotóxicos (Singh et al., 2009). As ROS são atribuídas a capacidade de oxidar várias biomoléculas celulares como os ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios (Ardestani & Yazdanparast, 2007). Segundo Lehninger et al. (2005), o dano oxidativo causado pelas ROS é a causa mais importante de alterações mutagênicas no DNA.

Nesse sentido, na tentativa de contrabalancear a ação destas espécies reativas, diversos extratos vegetais com potencial antioxidante estão sendo investigados visando redução de efeitos mutagênicos/genotóxicos e carcinogênicos (Ikken et al., 1999). Assim, diferentes estudos têm demonstrado a atividade antimutagênica/antigenotóxica de extratos vegetais (Sangwan et al., 1998, Van der Merwea et al., 2006, Silva et al., 2008, Marín-Martinez et al., 2009, Zahin et al., 2010). Outros trabalhos relacionam ainda compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário vegetal com propriedades antioxidantes, antimutagênicas/antigenotóxicas, anticarcinogênicas e antiinflamatórias, as quais têm potencial ação na prevenção de doenças degenerativas e na proteção da estabilidade do genoma (Cardador-Martinez et al., 2002, Kris-Etherton et al., 2002, Surh, 2002, Theriault et al., 2006).

Dessa forma, o uso de extratos vegetais que funcionem como agentes antimutagênicos/antigenotóxicos é uma alternativa promissora no campo químico-farmacológico, dado a diversidade de estruturas fitoquímicas com ações terapêuticas produzidas pelo metabolismo secundário vegetal. Atualmente, estima-se que aproximadamente 70% das drogas antitumorais que estão no mercado, ou em fase de testes clínicos, são derivadas de produtos naturais, gerando uma receita anual de 160 milhões de dólares (Roucchi & Washington, 2003, Varanda, 2006). Assim, em um país de megabiodiversidade como o Brasil, é de se esperar que haja um enorme arsenal de drogas vegetais ainda a serem estudadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o potencial antimutagênico e antigenotóxico de 3 espécies vegetais utilizadas pelo primata *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, identificadas com maior potencial antioxidante.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos aquosos das espécies vegetais *Alchornea glandulosa* (EAAG), *Miconia latecrenata* (EAML) e *Ocotea odorifera* (EAOO) a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem ativação metabólica S9;
- ✓ Analisar o potencial antimutagênico pelo teste com *Salmonella typhimurium*/microsoma para as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 sem e com ativação metabólica S9, para os extratos aquosos das espécies vegetais *Alchornea glandulosa* (EAAG), *Miconia latecrenata* (EAML) e *Ocotea odorifera* (EAOO);
- ✓ Analisar o potencial antigenotóxico pelo teste de Clivagem Plasmidial para os extratos aquosos das espécies vegetais *Alchornea glandulosa* (EAAG), *Miconia latecrenata* (EAML) e *Ocotea odorifera* (EAOO).

3. METODOLOGIA

3.1. Extratos vegetais

Os extratos EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) utilizados neste capítulo foram preparados conforme o item 3.2. - Capítulo 2, sendo ressuspensos em água destilada.

3.2. Testes Citotóxico e Antimutagênico com *Salmonella typhimurium/microsoma*

Para avaliação da citotoxicidade e atividade antimutagênica dos extratos vegetais, foram empregados testes utilizando cepas de *Salmonella typhimurium/microsoma*.

3.2.1. Cepas *Salmonella typhimurium/microsoma* utilizadas

A cepa TA97 apresenta mutação no gene *hisD6610*, possuindo um resíduo de citosina a mais, detectando compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. Já a cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a enzima histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e também detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 tem mutação no gene *hisG428*, para as bases TAA, que detecta mudanças de pares de bases, por transições e transversões de bases (Mortelmans & Zieger, 2000). Com exceção a cepa TA102, todas as outras linhagens citadas apresentam ainda deleção do gene $\Delta uvrB$, que codifica para uma proteína do sistema de reparo por excisão de DNA. Todas as 4 linhagens apresentadas, possuem mutação *rfa*, que causa perda parcial da camada lipossacarídica

da bacteriana, aumentando, assim, a permeabilidade das cepas a maiores moléculas orgânicas, além do plasmídeo PKM101 (*amp*⁺) (Maron & Ames, 1983). Todas as cepas de *Salmonella typhimurium*/microsoma utilizadas neste trabalho são linhagens não patogênicas de *Salmonella*.

3.2.2. Meios de cultura

Para o preparo dos inóculos das cepas, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente oxoid nº 2, incubada a 37 °C, por 12-16 horas, com agitação em *shaker* (160 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁸ bactérias/mL.

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983). Assim, foram usados ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose e meio Vogel Bonner “E” 50X concentrado (10 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada) na proporção de 980 mL para 20 mL, respectivamente. O tampão fosfato para o teste sem ativação S9 foi formado por fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico (0,2 M pH 7,4). Já para o teste com ativação S9, foi utilizado um mix S9 com volume total de 50 mL, preparado no momento do uso. Este mix foi composto por 19,75 mL de água destilada, 25 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, 2 mL de NADP 0,1 M, 0,25 mL de D-glicose-6-fosfato 1 M, 1 mL de solução salina 1,65 m KCl + 0,4 M MgCl₂.6H₂O e 2 mL de liofilizado de fração S9 ressuscitado em água destilada. O liofilizado de fígado de rato fração S9 induzido por Aroclor 1254 foi adquirido junto a empresa Moltax (Molecular Toxicology, Annapolis, USA).

O ágar de superfície (“top ágar”) foi composto por 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL e D-biotina 0,123 mg/mL. Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos.

3.2.3. Controles Mutagênicos

Como controle negativo foi utilizado água destilada, o solvente empregado para ressuspensão dos extratos vegetais. Para o ensaio sem ativação metabólica, foram usados como agentes mutagênicos (controles positivos) 50 µL de o 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (4-NPD) (100 µg/mL) para as linhagens TA97 e TA98, 10 µL de azida sódica (50 µg/mL) para a linhagem TA100 e 2 µL de mitomicina C (500 µg/mL) para a cepa TA102. Já para o teste de antimutagenicidade com ativação metabólica S9, 25 µL de 2-aminoantraceno (200 µg/mL) foi utilizado como agente mutagênico para todas as linhagens testadas.

3.2.4. Mix S9

O mix S9 é uma mistura de sais, carboidratos, transportador de elétrons e fração S9 de homogeneizado de fígado de roedores (fração pós-mitocondrial, suplementada com co-fatores, preparada a partir de fígado tratado com agentes indutores de enzimas). O uso do mix S9 permite inferir se extratos ou substâncias isoladas são mutagênicos em sua forma original ou se necessitam serem metabolizados ou ativados para se tornarem mutagênicos, mimetizando parcialmente as condições de metabolização em mamíferos.

3.3. Citotoxicidade dos extratos vegetais a *Salmonella typhimurium*/microsoma

A citotoxicidade dos extratos vegetais EAAG, EAML e EAOO a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma auxotrófica para histidina foi determinada sem uso do fator S9 de metabolização segundo Stankevics et al. (2008), com algumas modificações. Assim, cultura de bactéria a uma densidade de $0,4 \times 10^8$ bactérias/mL foi diluída até a densidade $0,4 \times 10^2$ bactérias/mL. Posteriormente, 100 µL de extrato a diferentes concentrações foram adicionados a 500 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e 100 µL de cultura de bactéria ($0,4 \times 10^2$ bactérias/mL) em tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio foi adicionado 2 µL do antibiótico ampicilina (50 mg/mL) a fim de se evitar contaminação por outras bactérias. Após 30 minutos incubados a 37 °C, ao conteúdo do tubo de ensaio foi adicionado 2 mL de ágar de superfície, composto por ágar e cloreto de sódio, e misturado

em vortex. Posteriormente, o conteúdo de cada tubo foi vertido em placa contendo meio ágar mínimo glicosado (AMG) e meio Vogel Bonner “E” 50X concentrado enriquecido com histidina e biotina. Dessa forma, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o número de colônias crescidas foi contado. O experimento foi realizado em triplicata. A citotoxicidade dos extratos foi determinada como:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = (100 - (\text{N}^\circ \text{ colônias Dose} \times 100 / \text{N}^\circ \text{ Colônias Controle} -))$$

Com dados das doses utilizadas e as respectivas percentagens de citotoxicidade, foi construído um gráfico, seguido de uma regressão logarítmica. Doses de extratos que inibiram o crescimento de colônias em mais de 30% quando comparadas com o controle negativo (sem tratamento) foram consideradas citotóxicas (Stankevics et al., 2008).

3.4. Ensaios de antimutagenicidade dos extratos

O teste antimutagênico, foi realizado sem e com ativação metabólica S9, utilizando o método de pré-incubação de 30 minutos (Maron & Ames, 1983), para as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsoma.

A dose dos extratos utilizada nos testes antimutagênicos foi baseada na citotoxicidade de EAAG, EAML e EAOO apresentada à cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem ativação S9. Assim, a cada dose do extrato testada foi adicionado 500 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 para o ensaio sem ativação metabólica S9 ou 500 µL mix S9 para o ensaio com ativação metabólica S9, acrescido de 100 µL de cultura de bactéria a $0,4 \times 10^8$ bactérias/mL, 2 µL de ampicilina (50 mg/mL) e os agentes mutagênicos referentes a cada cepa testada em tubo de ensaio, sendo posteriormente incubados a 37 °C por 30 minutos (Maron & Ames, 1983). Decorrido este tempo foi adicionado 2 mL de top ágar e misturado, sendo posteriormente plaqueado em placa contendo meio mínimo glicosado. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e as colônias revertentes *his+* contadas. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4.1. Análise da ação antimutagênica dos extratos

Segundo Oh et al. (2008), a percentagem de inibição mutagênica é determinada como:

$$\% \text{ Inibição mutagênica: } \frac{(\text{n}^\circ \text{ colônias controle (+)} - \text{n}^\circ \text{ colônias dose testada})}{(\text{n}^\circ \text{ colônias controle (+)} - \text{n}^\circ \text{ colônias controle (-)})} \times 100$$

De acordo com Laughton et al. (1991) e Caillet et al. (2011) ação antimutagênica maior do que 70% é considerada forte, entre 40% e 70% é considerada antimutagenicidade moderada, e abaixo de 40% a antimutagenicidade é considerada neutra. Ao controle positivo foi atribuída a percentagem 0% de inibição mutagênica, uma vez que para o controle positivo não há incubação com extratos.

3.4.2. Análise estatística (Teste antimutagênico)

Os dados de antimutagenicidade de EAAG, EAML, EA00 e dos controles positivos (NPD, azida sódica, mitomicina C e 2-aminoantraceno) foram analisados utilizando o cálculo da análise de variância (ANOVA) entre a percentagem de inibição mutagênica das diferentes doses testadas e a percentagem de inibição mutagênica do controle positivo, seguido de teste de médias (teste de Tukey e teste Scott-Knott) $p < 0,05$.

3.5. Testes de antigenotoxicidade

A avaliação antigenotóxica por clivagem plasmidial utiliza-se da permanência das conformações topológicas helicoidal (forma II) e da forma tensionada superhelicoidal (forma I) do DNA em contato com agentes oxi-redutores, como o cloreto de estanho (SnCl_2) (Dantas et al., 1999). Um aumento da densidade da conformação linear (forma III) do DNA plasmidial em amostras tratadas com agentes genotóxicos é também um forte indício do resultado negativo para antigenotoxicidade.

Assim, para a avaliação do potencial antigenotóxico dos extratos vegetais, foi empregado o teste de clivagem plasmidial, de acordo com o método descrito em De

Mattos et al. (2000). As doses de extratos utilizadas neste teste foram baseadas nas doses utilizadas nos testes de antimutagenicidade com *Salmonella typhimurium*/microsoma. Assim, 12,5, 50 e 100 μL de EAAG (570 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 12,5, 50 e 100 μL de EAML (3400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 12,5, 50 e 100 μL de EA00 (4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubados com 20 μL de DNA plasmidial pUC18 (75,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 100 μL de cloreto de estanho (SnCl_2) a 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 1 hora a 37 °C. Posteriormente os volumes de cada amostra foram completados para 220 μL com água destilada e tratados com 440 μL de etanol 100% e 22 μL de acetato de sódio 3 M pH 5.3 por 12 horas a - 18 °C para precipitação do DNA plasmidial. Após este período, foi retirada uma alíquota de 50 μL da amostra de DNA para centrifugação a 10000 rpm, por 10 minutos. Posteriormente, o DNA plasmidial centrifugado e precipitado foi ressuspenso em 20 μL de água destilada. Esta alíquota de DNA foi aplicada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualização. Após 45 minutos de corrida a 80 volts, o gel foi retirado da cuba de eletroforese e fotografado para posterior análise. O DNA tratado com água destilada foi utilizado como controle positivo para antigenotoxicidade enquanto DNA tratado com SnCl_2 foi usado como controle negativo para antigenotoxicidade. A comparação entre as bandas de DNA teste com as bandas do DNA dos controles positivo e negativo foi usada para diagnosticar possível ação antigenotóxica dos extratos. O experimento foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Citotoxicidade dos extratos frente a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium/microsoma*

A Tabela 1 apresenta o número de colônias crescidas e a percentagem citotóxica, além da DL₃₀ para EAAG, EAML e EAOO.

Tabela 1. Atividade citotóxica expressa pela média do número de colônias ± desvio padrão e percentagem de citotoxicidade ± desvio padrão (valor entre parênteses) de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) a cepa TA100 de *S. typhimurium* sem ativação metabólica, exposta a diferentes doses de extrato.

Dose (µg/placa)	EAAG	EAML	Dose (µg/placa)	EAOO
^A 0,0	383,3 ± 7,0 (0,0 ± 0,0)	383,3 ± 7,0 (0,0 ± 0,0)	^A 0,0	383,3 ± 7,0 (0,0 ± 0,0)
300	317,7 ± 5,8 (17,1 ± 2,1)	279,0 ± 8,7 (27,2 ± 1,2)	875	372,7 ± 27,0 (2,8 ± 6,3)
780	247,3 ± 9,9 (35,4 ± 3,6)	189,7 ± 14,5 (50,5 ± 4,2)	1750	359,3 ± 42,2 (6,1 ± 12,7)
1560	188,3 ± 3,2 (50,9 ± 1,1)	123,7 ± 16,8 (67,8 ± 3,9)	3500	291,3 ± 15,3 (24,0 ± 2,9)
3120	153,0 ± 7,0 (60,1 ± 1,1)	17,0 ± 1,0 (95,7 ± 0,3)	5250	253,3 ± 8,1 (33,9 ± 3,2)
4690	105,0 ± 5,0 (72,6 ± 1,2)	0,0 ± 0,0 (100,0 ± 0,0)	7000	229,0 ± 1,7 (40,2 ± 1,1)
6250	77,7 ± 21,1 (79,7 ± 5,6)	0,0 ± 0,0 (100,0 ± 0,0)	-	-
^B DL ₃₀	585,8 ± 49,2	334,5 ± 0,5	^B DL ₃₀	4535,3 ± 96,3

Nota: A: controle sem tratamento com extrato. B: DL₃₀ = Dose Letal para 30% do número de colônias do controle sem tratamento com extrato.

Os resultados mostraram uma maior toxicidade de EAML, seguido por EAAG e EAOO. Esse resultado está de acordo com os testes antibacterianos discutidos no capítulo 2 deste trabalho, no qual EAML também apresentou maior atividade antibacteriana, sendo o único extrato a apresentar ação sobre bactéria gram-negativa. A maior toxicidade de EAML, EAAG e EAOO a bactéria gram-negativa *S. typhimurium* em relação a *E. coli* 24 pode estar relacionada a mutação *rfa*, de *S. typhimurium*/microsoma que causa perda parcial da camada lipossacarídica da bactéria, aumentando, assim, a permeabilidade da membrana a maiores moléculas orgânicas (Mortelmans & Zieger, 2000). A DL₃₀ dos extratos foi calculada usando diferentes equações logarítmicas referentes ao comportamento citotóxico de cada extrato (Figura 1).

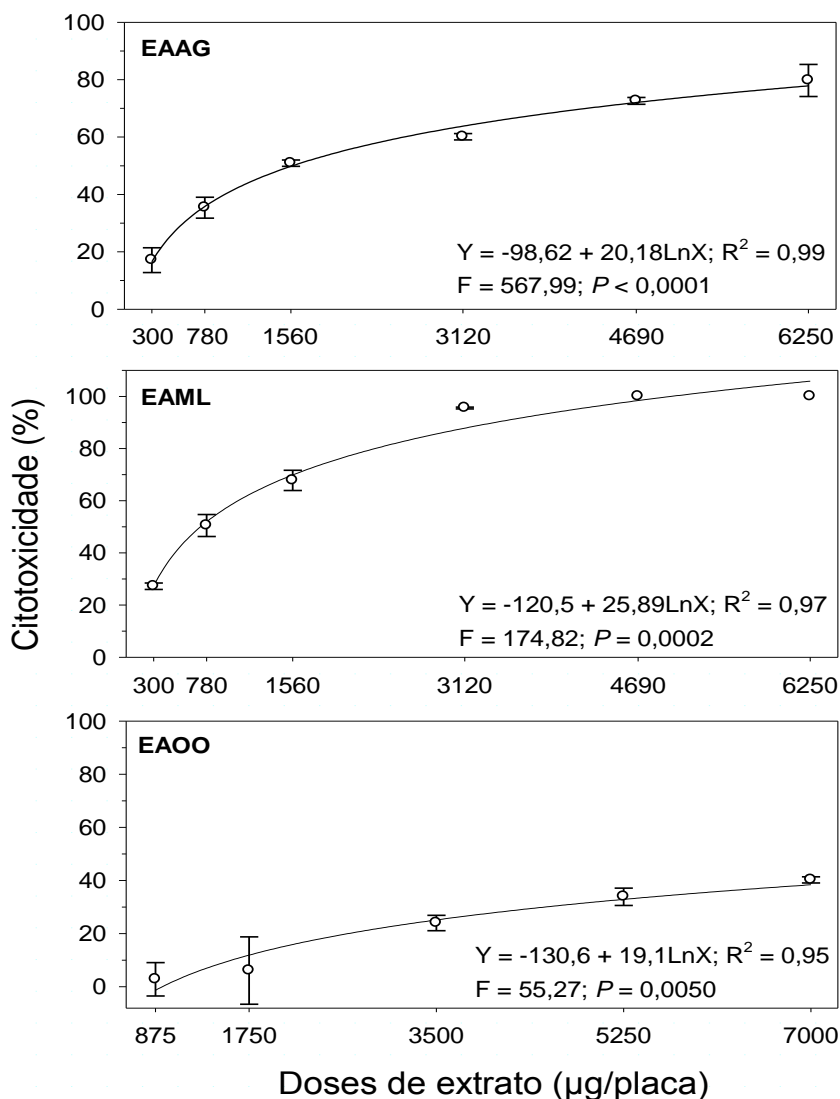


Figura 1. Curva média de citotoxicidade de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*), EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) e EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem ativação metabólica S9.

4.2. Análise antimutagênica dos extratos

Não foram encontrados estudos antimutagênicos na literatura para nenhuma das espécies estudadas.

Contudo, estudos com extratos metanólicos de folhas de diferentes espécies de *Miconia* mostraram ação antimutagênica contra o mutágeno CPA (ciclofosfamida) em testes de micronúcleos de células de ratos e ensaio do cometa e contra o fármaco DXR (doxorubicina) em ensaio clonogênico (Serpeloni et al., 2008, Serpeloni et al., 2011). Entretanto, extratos metanólicos de folhas de espécies de *Miconia* também apresentaram mutagenicidade *in vitro* frente a cepas de *S. typhimurium* (Meyagusku & Varanda, 2009, Meyagusku & Varanda, 2010).

Para a espécie *Alchornea glandulosa* foi encontrado estudos mutagênicos, sendo que o extrato metanólico de suas folhas apresentou mutagenicidade *in vitro* frente a cepas de *S. typhimurium* e *in vivo* (Santos et al., 2010). Extrato hidroalcoólico de folhas de uma espécie de *Ocotea* apresentou mutagenicidade *in vitro* sem e com metabolização frente a cepas de *S. typhimurium* (Marques et al., 2003).

Em trabalho realizado por Stankevics et al. (2008) com cepas de *S. typhimurium*/microsoma, doses de extratos vegetais que apresentaram até 70% do número total de colônias bacterianas em relação ao controle sem adição de extrato, não foram considerados citotóxicos para cepas de *S. typhimurium*/microsoma. Assim, os testes antimutagênicos do presente trabalho, foram realizados com os valores DL₃₀ obtidos no ensaio citotóxico realizado com a cepa TA100 de *S. typhimurium*/microsoma.

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados antimutagênicos para EAAG, EAML e EAOO, respectivamente, frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem e com metabolização S9.

Tabela 2. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*).

Tratamento ($\mu\text{g/placa}$)	EAAG							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
^A 0,0	317,3 \pm 6,1	474,0 \pm 10,0	60,7 \pm 10,1	40,3 \pm 0,6	448,0 \pm 10,6	204,0 \pm 48,0	196,0 \pm 8,0	210,0 \pm 14,0
71,2	464,0 \pm 26,2 (65,2 \pm 6,2) ^c	884,0 \pm 53,8 (36,7 \pm 8,3) ^b	126,0 \pm 15,1 (36,1 \pm 14,7) ^{ab}	1051,3 \pm 48,7 (29,0 \pm 3,4) ^c	850,7 \pm 6,1 (13,1 \pm 1,3) ^{de}	712,3 \pm 34,2 (59,1 \pm 2,7) ^c	828,7 \pm 30,1 (26,8 \pm 3,5) ^{ab}	218,0 \pm 34,0 (96,5 \pm 14,8) ^a
142,5	542,7 \pm 24,1 (46,5 \pm 5,7) ^d	868,0 \pm 62,7 (39,1 \pm 9,7) ^{ab}	144,0 \pm 11,8 (18,6 \pm 11,5) ^b	932,3 \pm 12,0 (37,3 \pm 0,8) ^b	634,0 \pm 6,0 (59,8 \pm 1,3) ^b	683,7 \pm 3,5 (61,4 \pm 0,3) ^c	861,0 \pm 18,5 (23,0 \pm 2,1) ^b	272,0 \pm 34,0 (72,9 \pm 16,6) ^a
285,0	507,3 \pm 9,9 (54,9 \pm 2,3) ^{cd}	824,0 \pm 14,2 (45,9 \pm 2,2) ^{ab}	132,3 \pm 9,3 (30,0 \pm 9,1) ^b	932,0 \pm 41,8 (37,4 \pm 2,9) ^b	567,3 \pm 27,6 (74,2 \pm 5,9) ^a	435,3 \pm 49,8 (81,4 \pm 4,0) ^b	778,3 \pm 25,9 (32,6 \pm 3,0) ^a	205,3 \pm 26,6 (102,0 \pm 11,6) ^a
427,5	375,7 \pm 7,2 (86,1 \pm 1,7) ^b	785,3 \pm 36,3 (51,9 \pm 5,6) ^{ab}	96,7 \pm 13,3 (64,8 \pm 13,0) ^a	925,3 \pm 18,9 (37,8 \pm 1,3) ^b	766,3 \pm 15,2 (31,3 \pm 3,3) ^c	466,3 \pm 54,4 (78,9 \pm 4,4) ^b	884,3 \pm 3,5 (20,3 \pm 0,4) ^b	221,3 \pm 12,8 (95,0 \pm 5,6) ^a
570,0	205,3 \pm 11,5 (126,6 \pm 2,7) ^a	754,7 \pm 36,3 (56,6 \pm 5,6) ^a	141,7 \pm 4,5 (20,8 \pm 4,4) ^b	669,3 \pm 20,5 (55,8 \pm 1,4) ^a	813,7 \pm 13,0 (21,1 \pm 2,8) ^d	191,7 \pm 14,6 (101,0 \pm 1,2) ^a	872,7 \pm 18,6 (21,7 \pm 2,1) ^b	194,7 \pm 26,6 (106,7 \pm 11,6) ^a
Controle +	^B 738,3 \pm 15,2 *(0,0 \pm 0,0) ^e	^C 1121,3 \pm 61,5 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^B 163,0 \pm 8,0 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^C 1464,0 \pm 55,0 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^D 911,3 \pm 7,6 *(0,0 \pm 0,0) ^e	^C 1447,7 \pm 116,4 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^E 1060,0 \pm 4,0 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^C 439,0 \pm 3,6 *(0,0 \pm 0,0) ^b

Nota: Letras maiúsculas (esquerda): A: água destilada (100 $\mu\text{L/placa}$) (controle negativo). Controle + (controle positivo): B: NPD (4-nitro-O-fenilenodiamino) (5,0 $\mu\text{g/placa}$), C: 2-aminoantraceno (5,0 $\mu\text{g/placa}$), D: Azida sódica (0,5 $\mu\text{g/placa}$), E: Mitomicina C (1,0 $\mu\text{g/placa}$). Letras minúsculas (direita): Médias de percentagem de inibição mutagênica com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. *Aos controles positivos foi atribuído 0% de inibição mutagênica.

Pela análise dos resultados da Tabela 2 foi possível observar para a cepa TA97 que EAAG apresentou maior ação antimutagênica para o extrato sem metabolização, sendo encontrado um pico máximo de 126% para a dose de 570 µg/placa. Esse valor superior a 100% pode estar relacionado a atividade antimutagênica inibitória também de reversões espontâneas referentes ao controle negativo. Para a cepa TA98, EAAG apresentou inibição mutagênica máxima de 65% para a dose de 427,5 µg/placa do extrato sem metabolização S9. Contudo, a inibição de 56% promovida pela dose de 570 µg/placa para o extrato metabolizado é estatisticamente igual a inibição máxima de 65% (de 427,5 µg/placa –S9). Já para a cepa TA100, houve maior inibição mutagênica, aproximadamente 100% para o extrato metabolizado na dose de 570 µg/placa. Para a cepa TA102, a ação antimutagênica máxima de aproximadamente 100% foi estatisticamente igual para 4 das 5 doses testadas. Além disso, foi observado aumento significativo da percentagem de ação antimutagênica para o extrato EAAG metabolizado, quando comparado ao extrato sem metabolização. Para todas as cepas, todas as doses testadas de EAAG, sem e com metabolização S9, apresentaram diferença estatística para o controle positivo (sem adição de extrato) (Figura 2).

De acordo com Laughton et al. (1991) e Caillet et al. (2011) ação antimutagênica maior do que 70% é considerada forte, entre 40% e 70% é considerada antimutagenicidade moderada, e abaixo de 40% a antimutagenicidade é considerada neutra. Dessa forma, análise do perfil antimutagênico de EAAG para as cepas TA97 e TA98 mostra ação antimutagênica de neutra a moderada, sem e com metabolização para estas cepas. Já para as cepas TA100 e TA102, observa-se um perfil antimutagênico variando de moderado a forte após metabolização S9. Importante lembrar aqui, a diferença de mecanismos para as cepas analisadas, sendo que os resultados obtidos para EAAG sugerem maior atividade antimutagênica em mecanismos de substituição de bases (TA100 e TA102) em relação aos mecanismos de mudança de quadro de leitura (TA97 e TA98).

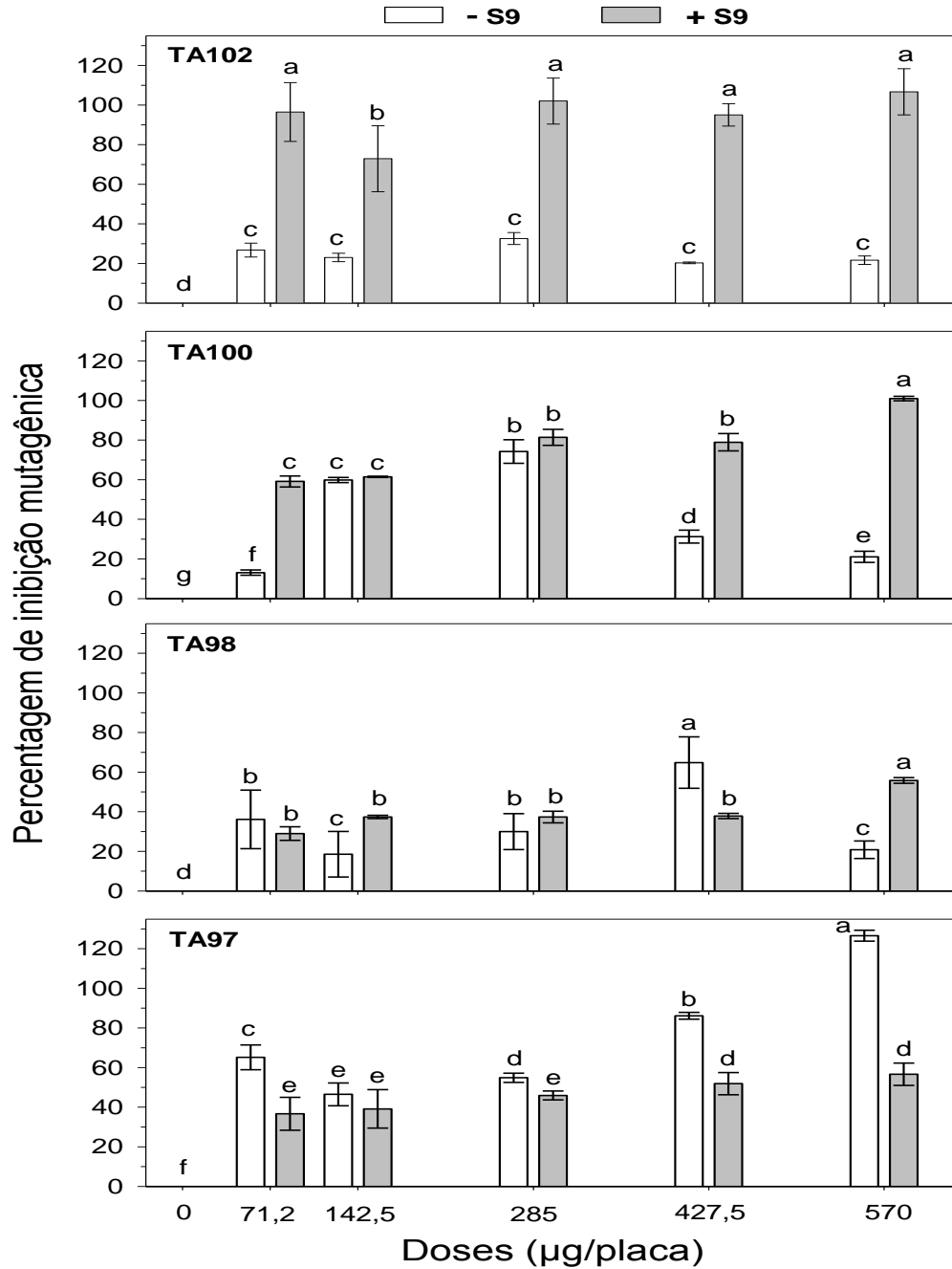


Figura 2. Percentagem de inibição mutagênica de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem e com ativação metabólica S9. Os histogramas seguidos pela mesma letra possuem médias que não diferem, entre si, pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Os seguimentos de retas verticais nos histogramas correspondem aos desvios padrões.

Tabela 3. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*).

Tratamento ($\mu\text{g/placa}$)	EAML							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
^A 0,0	317,3 \pm 6,1	474,0 \pm 10,0	60,7 \pm 10,1	40,3 \pm 0,6	448,0 \pm 10,6	204,0 \pm 48,0	196,0 \pm 8,0	210,0 \pm 14,0
42,5	373,7 \pm 21,5 (86,6 \pm 5,1) ^a	862,3 \pm 5,7 (40,0 \pm 0,9) ^{ab}	158,7 \pm 2,1 (-4,6 \pm 10,3) ^b	954,3 \pm 176,3 (35,8 \pm 12,4) ^c	830,0 \pm 30,0 (17,5 \pm 6,5) ^b	498,0 \pm 12,5 (76,4 \pm 1,0) ^{ab}	971,3 \pm 17,0 (10,3 \pm 2,0) ^d	318,7 \pm 26,0 (52,5 \pm 11,4) ^b
85,0	443,0 \pm 36,4 (70,1 \pm 8,6) ^{ab}	916,7 \pm 37,1 (31,6 \pm 5,7) ^b	148,3 \pm 9,7 (14,3 \pm 9,5) ^{ab}	676,3 \pm 30,4 (55,3 \pm 2,1) ^{ab}	836,7 \pm 18,1 (16,1 \pm 3,9) ^b	464,0 \pm 31,7 (79,1 \pm 2,5) ^{ab}	797,0 \pm 44,0 (30,4 \pm 5,1) ^{bc}	253,3 \pm 44,6 (81,1 \pm 19,5) ^{ab}
170,0	407,7 \pm 3,5 (78,5 \pm 0,8) ^{ab}	864,0 \pm 12,0 (39,7 \pm 1,8) ^{ab}	134,0 \pm 16,7 (28,3 \pm 16,3) ^a	734,7 \pm 9,2 (51,2 \pm 0,6) ^{bc}	790,0 \pm 10,0 (26,2 \pm 2,1) ^{ab}	579,7 \pm 18,2 (69,8 \pm 1,5) ^{bc}	622,7 \pm 30,5 (50,6 \pm 3,5) ^a	216,0 \pm 24,3 (97,4 \pm 10,6) ^a
255,0	557,0 \pm 14,1 (43,1 \pm 3,3) ^c	818,7 \pm 16,1 (46,7 \pm 2,5) ^a	135,0 \pm 5,3 (27,4 \pm 5,2) ^a	633,7 \pm 10,0 (58,3 \pm 0,7) ^{ab}	753,0 \pm 14,1 (34,2 \pm 3,0) ^a	670,3 \pm 87,0 (62,5 \pm 7,0) ^c	872,0 \pm 21,1 (21,7 \pm 2,4) ^c	249,3 \pm 34,0 (82,8 \pm 14,8) ^{ab}
340,0	451,3 \pm 34,3 (68,2 \pm 8,1) ^b	800,0 \pm 52,3 (49,6 \pm 8,1) ^a	148,0 \pm 5,0 (14,6 \pm 4,9) ^{ab}	477,3 \pm 6,1 (69,3 \pm 0,4) ^a	791,3 \pm 4,2 (25,9 \pm 0,9) ^{ab}	416,3 \pm 54,1 (82,9 \pm 4,3) ^a	749,0 \pm 20,7 (36,0 \pm 2,4) ^b	229,3 \pm 32,1 (91,5 \pm 14,0) ^{ab}
Controle +	^B 738,3 \pm 15,2 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^C 1121,3 \pm 61,5 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^B 163,0 \pm 8,0 *(0,0 \pm 0,0) ^{ab}	^C 1464,0 \pm 55,0 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^D 911,3 \pm 7,6 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^C 1447,7 \pm 116,4 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^E 1060,0 \pm 4,0 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^C 439,0 \pm 3,6 *(0,0 \pm 0,0) ^c

Nota: Letras maiúsculas (esquerda): A: água destilada (100 $\mu\text{L/placa}$) (controle negativo). Controle + (controle positivo): B: NPD (4-nitro-*O*-fenilenodiamino) (5,0 $\mu\text{g/placa}$), C: 2-aminoantraceno (5,0 $\mu\text{g/placa}$), D: Azida sódica (0,5 $\mu\text{g/placa}$), E: Mitomicina C (1,0 $\mu\text{g/placa}$). Letras minúsculas (direita): Médias de percentagem de inibição mutagênica com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. *Aos controles positivos foi atribuído 0% de inibição mutagênica.

A análise dos resultados antimutagênicos de EAML vistos na Tabela 3 frente a cepa TA97 mostrou inibição mutagênica máxima de aproximadamente 87% sem metabolização para a dose de 42,5 µg/placa. Observou-se ainda para cepa TA97, maior ação antimutagênica do extrato não metabolizado para todas as doses quando comparadas com o extrato de EAML metabolizado. Para a cepa TA98 a inibição mutagênica máxima foi de aproximadamente 70% com metabolização S9, sendo estatisticamente igual a inibição mutagênica de 4 das 5 doses testadas de EAML metabolizado e diferente de todas as doses não metabolizadas. Ainda para a cepa TA98, foi observada que na dose de 42,5 µg/placa de EAML, sem metabolização S9, houve inibição mutagênica negativa de aproximadamente 5%. Este fato pode está relacionado ao maior número de colônias crescidas no teste para essa dose em relação ao controle positivo utilizado. Contudo, este resultado não difere estatisticamente do controle positivo, sendo atribuída a este tratamento de EAML ausência de atividade antimutagênica. Já para as cepas TA100 e TA102 houve inibição mutagênica máxima de 83 e 97%, respectivamente, para EAML metabolizado. Para a cepa TA100, 3 das 4 doses testadas foram estatisticamente iguais ao valor máximo de antimutagenicidade (83% para a 340 µg/placa), sendo que para a cepa TA102, 4 das 5 doses testadas apresentaram igualdade estatística a maior inibição mutagênica (97% para a dose 170 µg/placa). Com exceção a dose 42,5 µg/placa de EAML sem metabolização, todas as demais doses testadas de EAML para todas as 4 cepas analisadas, sem e com metabolização S9, apresentaram diferença estatística para o controle positivo (sem adição de extrato) (Figura 3).

Ainda de acordo com Laughton et al. (1991) e Caillet et al. (2011), análise do perfil antimutagênico de EAML para a cepa TA97 mostra ação antimutagênica forte para o extrato metabolizado e neutra para EAML sem metabolização. Para TA98, nota-se atividade neutra para EAML sem metabolização, e ação moderada para o extrato metabolizado. Já para as cepas TA100 e TA102, observou-se um perfil antimutagênico forte após metabolização S9. Assim como verificado para EAAG, EAML também revela ter maior atividade antimutagênica para cepas com mecanismos de substituição de bases (TA100 e TA102).

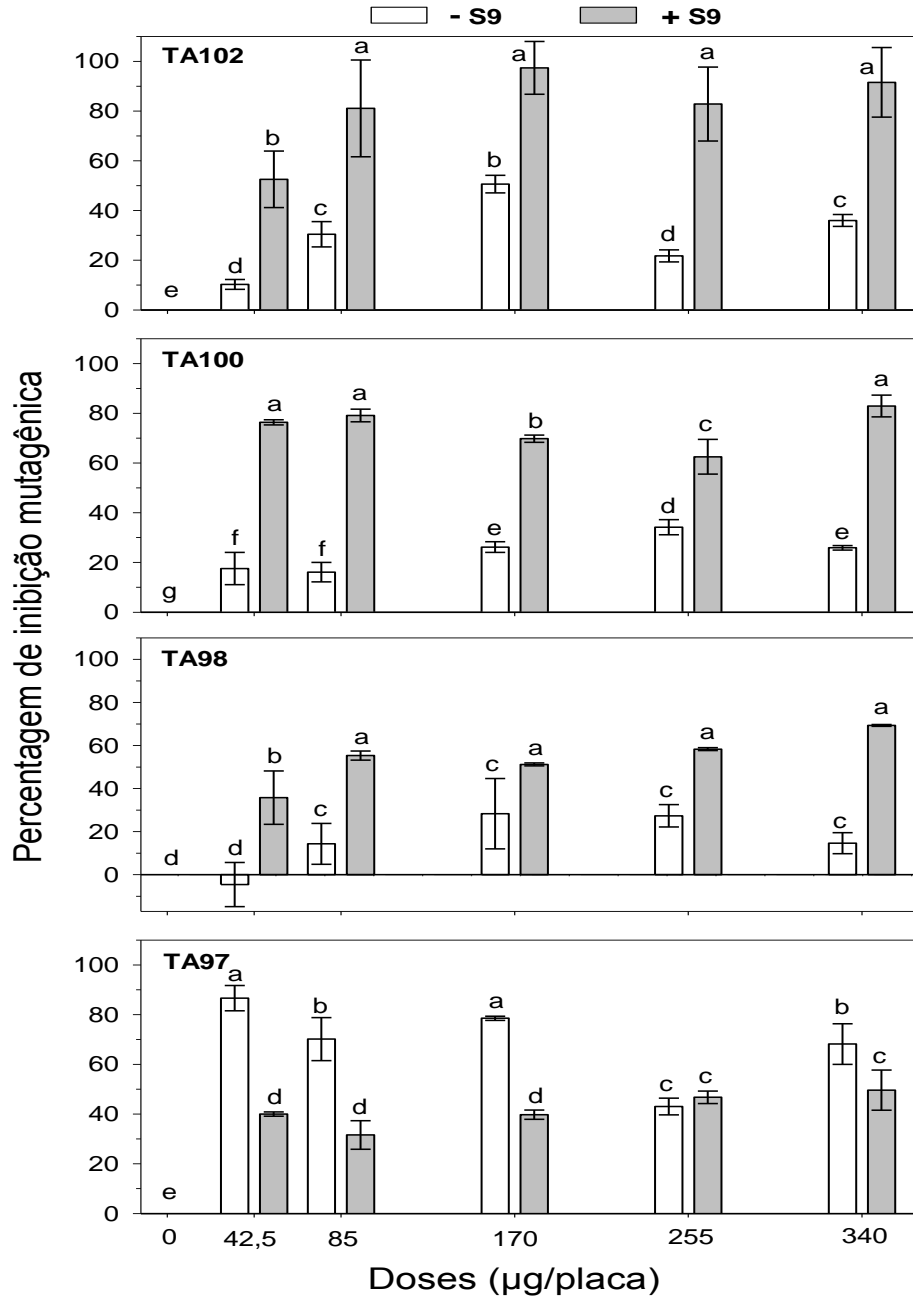


Figura 3. Percentagem de inibição mutagênica de EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem e com ativação metabólica S9. Os histogramas seguidos pela mesma letra possuem médias que não diferem, entre si, pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Os seguimentos de retas verticais nos histogramas correspondem aos desvios padrões.

Tabela 4. Atividade antimutagênica expressa pela média do número de colônias \pm desvio padrão e percentagem de inibição mutagênica \pm desvio padrão (valor entre parênteses) nas cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, expostas a diferentes doses de EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*).

Tratamento ($\mu\text{g/placa}$)	EAOO							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
^A 0,0	317,3 \pm 6,1	474,0 \pm 10,0	60,7 \pm 10,1	40,3 \pm 0,6	448,0 \pm 10,6	204,0 \pm 48,0	196,0 \pm 8,0	210,0 \pm 14,0
562,5	438,7 \pm 8,3 (71,2 \pm 2,0) ^b	842,7 \pm 30,0 (43,0 \pm 4,6) ^a	126,3 \pm 1,5 (35,8 \pm 1,5) ^{ab}	1094,7 \pm 61,2 (25,9 \pm 4,3) ^c	852,3 \pm 4,5 (12,7 \pm 1,0) ^b	1098,0 \pm 20,3 (28,1 \pm 1,6) ^c	921,7 \pm 24,2 (16,0 \pm 2,8) ^b	376,0 \pm 14,4 (27,5 \pm 6,3) ^b
1125,0	333,0 \pm 26,3 (96,3 \pm 6,2) ^a	796,0 \pm 20,0 (50,2 \pm 3,1) ^a	114,7 \pm 12,2 (47,2 \pm 11,9) ^{ab}	1009,3 \pm 115,5 (31,9 \pm 8,1) ^{bc}	879,0 \pm 11,0 (7,0 \pm 2,4) ^b	958,7 \pm 37,3 (39,3 \pm 3,0) ^b	925,0 \pm 24,0 (15,6 \pm 2,8) ^b	318,7 \pm 39,2 (52,5 \pm 17,1) ^a
2250,0	275,0 \pm 18,1 (110,0 \pm 4,3) ^a	804,0 \pm 6,9 (49,0 \pm 1,1) ^a	115,7 \pm 10,1 (46,2 \pm 9,8) ^{ab}	830,7 \pm 30,3 (44,5 \pm 2,1) ^b	854,7 \pm 10,1 (12,2 \pm 2,2) ^b	890,0 \pm 38,0 (44,8 \pm 3,0) ^{ab}	829,3 \pm 40,1 (26,7 \pm 4,6) ^a	326,7 \pm 18,5 (49,0 \pm 8,1) ^a
3375,0	320,0 \pm 20,0 (99,4 \pm 4,7) ^a	825,3 \pm 24,1 (45,7 \pm 23,7) ^a	143,0 \pm 14,7 (19,5 \pm 14,4) ^b	385,3 \pm 36,1 (75,8 \pm 2,5) ^a	725,3 \pm 16,2 (40,1 \pm 3,5) ^a	994,0 \pm 34,0 (36,5 \pm 2,7) ^{bc}	858,3 \pm 32,0 (23,3 \pm 3,7) ^a	278,7 \pm 28,9 (70,0 \pm 12,7) ^a
4500,0	539,0 \pm 26,2 (39,8 \pm 9,5) ^c	774,7 \pm 14,0 (49,6 \pm 8,1) ^a	86,3 \pm 20,1 (65,9 \pm 26,4) ^a	392,0 \pm 32,7 (74,6 \pm 3,4) ^a	712,7 \pm 10,3 (36,2 \pm 13,6) ^a	790,0 \pm 36,2 (50,5 \pm 6,8) ^a	856,3 \pm 26,1 (22,3 \pm 5,1) ^a	240,0 \pm 42,3 (76,4 \pm 36,5) ^a
Controle +	^B 738,3 \pm 15,2 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^C 1121,3 \pm 61,5 *(0,0 \pm 0,0) ^b	^B 163,0 \pm 8,0 *(0,0 \pm 0,0) ^b	^C 1464,0 \pm 55,0 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^D 911,3 \pm 7,6 *(0,0 \pm 0,0) ^b	^C 1447,7 \pm 116,4 *(0,0 \pm 0,0) ^d	^E 1060,0 \pm 4,0 *(0,0 \pm 0,0) ^c	^C 439,0 \pm 3,6 *(0,0 \pm 0,0) ^c

Nota: Letras maiúsculas (esquerda): A: água destilada (100 $\mu\text{L/placa}$) (controle negativo). Controle + (controle positivo): B: NPD (4-nitro-*O*-fenilenodiamino) (5,0 $\mu\text{g/placa}$), C: 2-aminoantraceno (5,0 $\mu\text{g/placa}$), D: Azida sódica (0,5 $\mu\text{g/placa}$), E: Mitomicina C (1,0 $\mu\text{g/placa}$). Letras minúsculas (direita): Médias de percentagem de inibição mutagênica com letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a $p < 0,05$. *Aos controles positivos foi atribuído 0% de inibição mutagênica.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 4, para a cepa TA97 de EAOO, observa-se maior ação antimutagênica para o extrato sem metabolização, sendo encontrado um pico máximo de 110% para a dose de 2250 µg/placa. Esse valor superior a 100% pode estar relacionado a atividade antimutagênica inibitória também de reversões espontâneas referentes ao controle negativo. Para EAOO metabolizado ainda frente a cepa TA97, nota-se igualdade estatística entre todas as doses analisadas, apresentando menor atividade antimutagênica do que todas as doses não metabolizadas. Para a cepa TA98 de EAOO, observa-se perfil estatístico semelhante para a ação antimutagênica tanto do extrato sem metabolização quanto do extrato metabolizado, sendo a inibição mutagênica máxima de 66 e 76% para o EAOO sem e com metabolização, respectivamente. Já para as cepas TA100 e TA102, houve maior inibição mutagênica para o extrato metabolizado em todas as doses testadas frente as 2 cepas, sendo observado pico máximo atividade antimutagênica de aproximadamente 50% para a cepa TA100 e 76% para a cepa TA102, ambas para a dose de 4500 µg/placa. Para todas as cepas, todas as doses testadas de EAOO, sem e com metabolização S9, apresentaram diferença estatística para o controle positivo (sem adição de extrato) (Figura 4).

Segundo a classificação de atividade antimutagênica sugerida Laughton et al. (1991) e Caillet et al. (2011), para análise do perfil antimutagênico de EAOO, observa-se que a cepa TA97 mostra forte ação antimutagênica para o extrato sem metabolização e moderada atividade para EAOO metabolizado. Para TA98, nota-se atividade neutra para EAOO sem metabolização, e ação moderada para o extrato metabolizado. Já para a cepa TA100, observa-se um perfil antimutagênico neutro para EAOO sem e com metabolização S9. Para a cepa TA102, a atividade antimutagênica é neutra para EAOO sem metabolização, e moderada para o extrato metabolizado. Somente para a cepa TA97 EAOO apresentou forte atividade antimutagênica, demonstrando maior ação a cepas com mecanismos de mudança de quadro de leitura (TA97 e TA98).

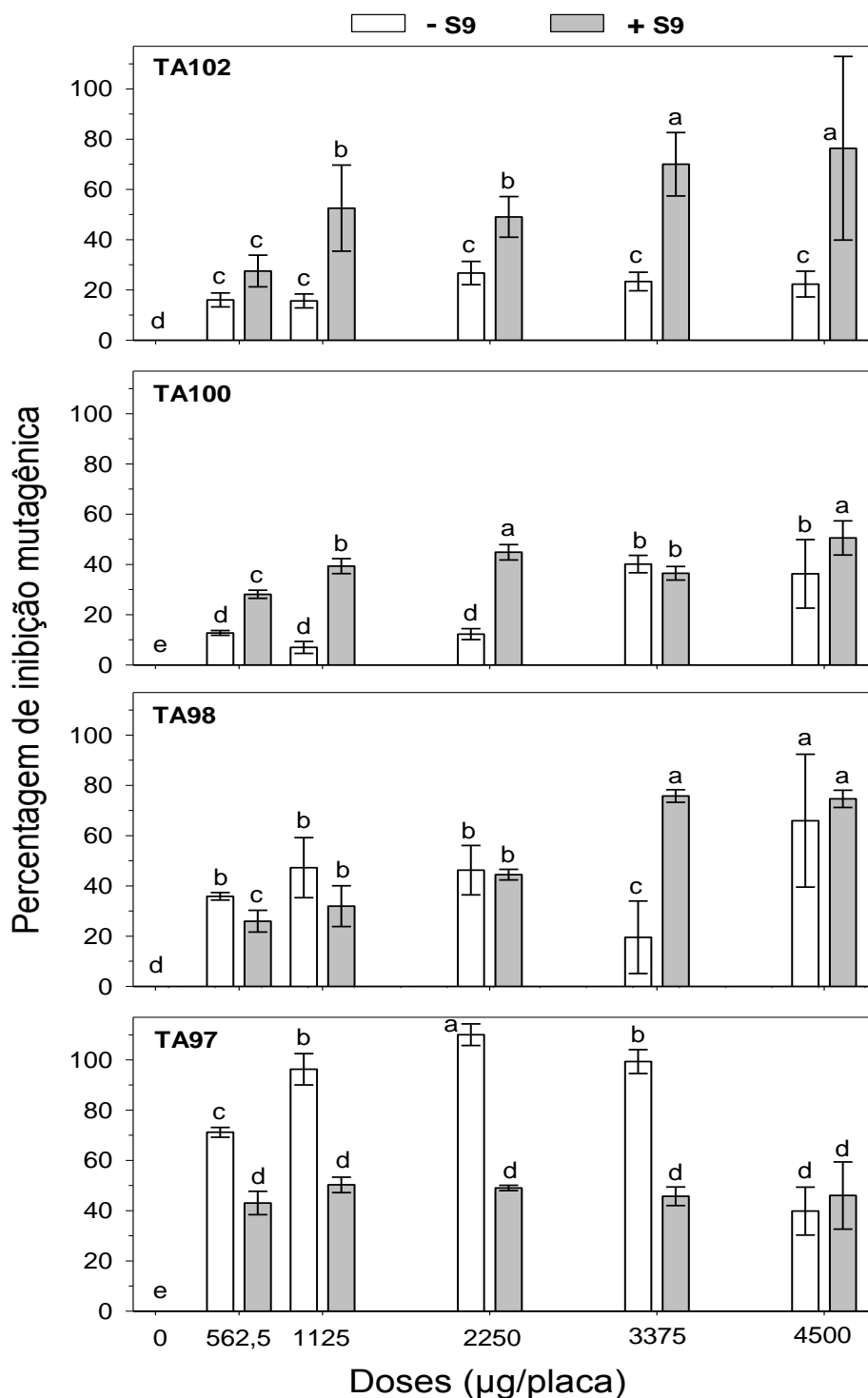


Figura 4. Percentagem de inibição mutagênica de EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*) frente as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*/microsossoma sem e com ativação metabólica S9. Os histogramas seguidos pela mesma letra possuem médias que não diferem, entre si, pelo teste Scott-Knott a $p < 0,05$. Os seguimentos de retas verticais nos histogramas correspondem aos desvios padrões.

Assim, pela análise dos resultados foi observado que EAAG e EAML apresentaram maiores percentagens de ação antimutagênica do que EAOO, mesmo sendo testadas em doses significativamente menores do que EAOO. Esse fato pode estar relacionado ao maior conteúdo de compostos fenólicos e maior potencial antioxidante apresentados por EAML, seguido por EAAG em relação a EAOO, como foi apresentado no capítulo 1 deste trabalho. Estudos apontam os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, com potencial ação antimutagênica (Cardador-Martinez et al., 2002, Kris-Etherton et al., 2002, Surh, 2002, Theriault et al., 2006).

Além disso, tanto EAAG quanto EAML tiveram maior atividade preferencialmente sobre cepas que detectam substâncias que provocam substituição de bases nitrogenadas (TA100 e TA102), enquanto EAOO foi mais ativo sobre cepas com mecanismos de mudança de quadro de leitura (TA97 e TA98). Importante lembrar ainda que a cepa TA102 apresentou as maiores percentagens de ação antimutagênica. Este fato pode estar relacionado com o potencial antioxidante dos extratos testados (Capítulo 2), uma vez que é descrito para a cepa TA102 sua atividade de detecção principalmente sobre substâncias oxidantes (Levin et al., 1982).

4.3. Análise antigenotóxica dos extratos

Através dos resultados antigenotóxicos pode-se observar que tanto EAAG (Figura 5) quanto EAML (Figura 6) não apresentaram ação antigenotóxica em nenhuma das doses nas quais foram testadas, uma vez que é possível para ambos os extratos a observação da mudança topológica plasmidial das *lanes* tratadas com as diferentes doses de extratos (*lanes* 3, 4 e 5) e o agente genotóxico SnCl₂ (*lanes* 2) em relação ao controle negativo de genotoxicidade sem adição de SnCl₂ (*lanes* 1). Nesse sentido, nota-se o surgimento da conformação linear do plasmídeo (forma III) para as *lanes* 2, 3, 4 e 5, com ausência das conformações helicoidal (forma II) e tensionada superhelicoidal (forma I), ao contrário do que ocorre nas *lanes* 1 do controle sem o agente genotóxico, onde é possível observar a ausência da

conformação linear do plasmídeo e presença das conformações helicoidal e tensionada superhelicoidal.

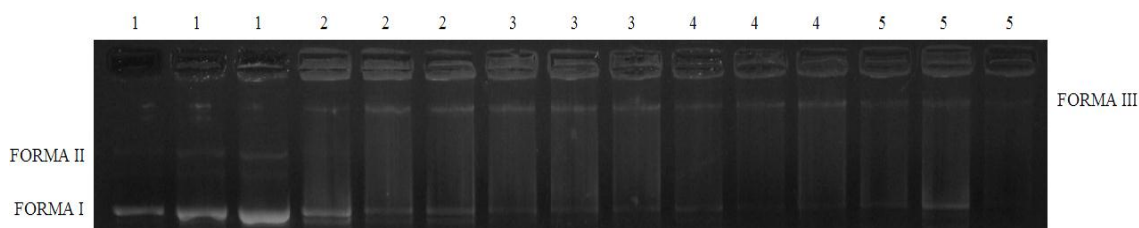


Figura 5. Ação antigenotóxica de EAAG (Extrato Aquoso *Alchornea glandulosa*). Nota: **1:** controle negativo (75,5 µg DNA + 100 µL H₂O), **2:** controle positivo (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂), **3:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 71,2 µg EAAG), **4:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 285 µg EAAG), **5:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 570 µg EAAG). Experimento realizado em triplicata.

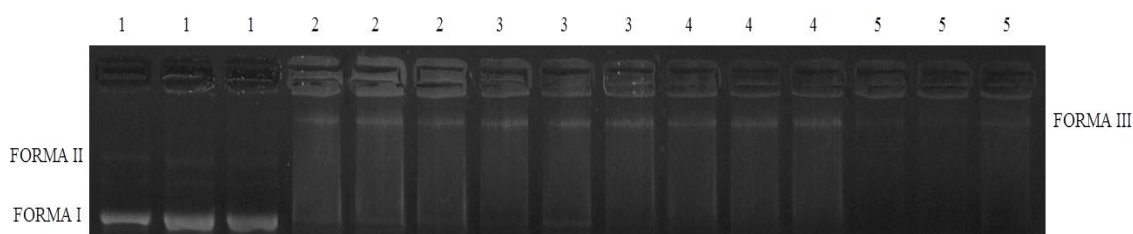


Figura 6. Ação antigenotóxica de EAML (Extrato Aquoso *Miconia latecrenata*). Nota: **1:** controle negativo (75,5 µg DNA + 100 µL H₂O), **2:** controle positivo (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂), **3:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 42,5 µg EAML), **4:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 170 µg EAML), **5:** (75,5 µg DNA + 750 µg SnCl₂ + 340 µg EAML). Experimento realizado em triplicata.

Para EAOO (Figura 7) não foi possível a observação da ação antigenotóxica deste extrato para as duas maiores doses testadas. Este fato pode estar relacionado a altas doses na qual este teste foi realizado. Contudo, um dos objetivos deste ensaio foi realizá-lo com as mesmas doses do teste antimutagênico com cepas de *S. typhimurium*/microsoma, a fim de possíveis comparações de resultados. Apesar de não ser possível análise das maiores doses testadas, nota-se que a menor dose utilizada neste teste também não

apresentou ação antígenotóxica frente ao agente SnCl_2 , uma vez que observase o aparecimento da conformação linear do plasmídeo para as *lanes* 2 e 3, com ausência das conformações helicoidal e tensionada superhelicoidal, ao contrário do que ocorre nas *lanes* 1 do controle, onde é possível observar a ausência da conformação III e a presença das forma II e I.

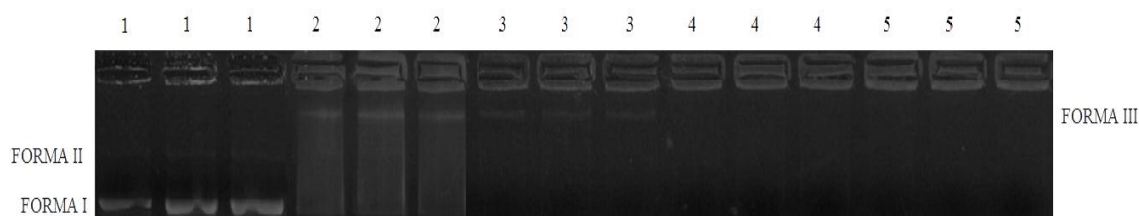


Figura 7. Ação antígenotóxica de EAOO (Extrato Aquoso *Ocotea odorifera*). Nota: **1:** controle negativo (75,5 μg DNA + 100 μL H_2O), **2:** controle positivo (75,5 μg DNA + 750 μg SnCl_2), **3:** (75,5 μg DNA + 750 μg SnCl_2 + 562,5 μg EAOO), **4:** (75,5 μg DNA + 750 μg SnCl_2 + 2250 μg EAOO), **5:** (75,5 μg DNA + 750 μg SnCl_2 + 4500 μg EAOO). Experimento realizado em triplicata.

Embora EAAG, EAML e EAOO terem apresentado alto conteúdo fenólico e grande ação antioxidante, estes extratos não foram capazes de inibir reações de oxirredução que ocorrem nos mecanismos de genotoxicidade de SnCl_2 , nos quais o agente redutor Sn^{2+} se oxida, reduzindo moléculas de DNA, podendo ocasionar danos estruturais as estes polímeros (Caldeira-de-Araújo et al., 1996, Dantas et al., 1996, Cabral et al., 1998).

Nesse sentido, importante ressaltar a diferença de resultados entre os testes antimutagênicos e antígenotóxicos, uma vez que nos ensaios biológicos com *S. typhimurium*/microssoma foi observado potencial ação antimutagênica de EAAG, EAML e EAOO, fato não encontrado para os testes antígenotóxicos. Essa diferença de resultados possivelmente pode estar relacionada a diferença de mecanismos inerentes aos ensaios de antimutagenicidade e antígenotóxicidade.

5. CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados observa-se maior citotoxicidade de EAML, seguido por EAAG e EAOO. Além disso, maior atividade antimutagênica foi encontrada para EAML, seguido por EAAG e EAOO metabolizados, principalmente para a cepa TA102, correlacionando possivelmente a ação dos compostos fenólicos e o potencial antioxidante dos extratos à atividade antimutagênica. Contudo, não foram observadas ações antigenotóxicas para nenhum dos extratos testados. Os resultados de antimutagenicidade indicam potencialidade do extrato EAML para a busca de novos agentes anticancerígenos. Estudos complementares precisam ser realizados para aprofundar o conhecimento químico e biológico desse extrato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardestani, A., Yazdanparast, R., 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chemistry, 104, 21-29.

Cabral, R.E.C., Leitão, A., Lage, C., Caldeira-de-Araújo, A., Bernardo-Filho, M., Dantas, F.J.S., Cabral-Neto, J., 1998. Mutational potentiality of stannous chloride: an important reducing agent in the ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals. Mutation Research, 408, 129-135.

Caillet, S., Lessard, S., Lamoureux, G., Lacroix, M., 2011. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. Food Chemistry, 124, 1699-1707.

Caldeira-de-Araújo, A., Dantas, F.J.S., Moraes, M.O., Felzenszwalb, I., Bernardo-Filho, M., 1996. Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. Journal Brazilian Association Advance Science, 48, 109-113.

Cardador-Martinez, A., Castano-Tostado, E., Loarca-Pina, G., 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. Food Additives & Contaminants, 19, 62–69.

Dantas, F.J.S., Moraes, M.O., Carvalho, E.F., Valsa, J.O., Bernardo-Filho, M., Caldeira-de-Araújo, A., 1996. Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB 1157: Participation of reactive oxygen species. Food Chemistry and Toxicology, 34, 959-962.

Dantas, F.J.S., Moraes, M.O., Mattos, J.C.P., Bezerra, R.J.A.C., Carvalho, M.B.F., Caldeira-de-Araújo, A., 1999. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. Toxicology Letters, 110, 129-136.

De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402, 151-158.

De Mattos, J.C.P., Dantas, F.J.S., Bezerra, R.J.A.C., Bernardo-Filho, M., Cabral-Neto, J.B., Lage, C., Leitão, A.C., Caldeira-de-Araújo, A., 2000. Damage induced by chloride in plasmid DNA. *Toxicology Letters*, 116, 159-163.

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

Guyton, K.Z., Kensler, T.W., 1993. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 49, 523-544.

Huang, D., Ou, B., Prior, R., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Ikken, Y., Morales, P., Martinez, A., Marin, M.L., Haza, A.I., Cambero, M.I., 1999. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3257-3264.

Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuyulu, B.A., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chemistry*, 93, 551-556.

Kris-Etherton, P., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71–78.

Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Houtt, J.R.S., Halliwell, B., 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical Pharmacology*, 42, 1673–1681.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry. 4^a edition. New York, NY, W.H. Freeman and Company, 1119p.

Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A., Ames, B.N., 1982. A new Salmonella tester strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 79, 7445-7449.

Marín-Martínez, R., Veloz-García, R., Guzmán-Maldonado, S.H., Loarca-Pina, G., Cardador-Martínez, A., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., Torres-Pacheco, I., Pérez, C.P., Herrera-Hernández, G., Villaseñor-Ortega, F., González-Chavira, M., Guevara-Gonzalez, R.G., 2009. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. Bioresource Technology, 100, 434-439.

Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-215.

Marques, R.C.P., Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Barbosa-Filho, J.M., Agnez-Lima, L.F., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. Mutation Research, 536, 117–120.

Meyagusku V.M., Varanda, E.A., 2009. Análise da atividade mutagênica da *Miconia rubiginosa* e *Miconia cabucu* através de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*. In: XXI Congresso de iniciação Científica da UNESP, São José do Rio Preto, 6731-6734.

Meyagusku, V.M., Varanda, E.V., 2010. Analysis of the mutagenic activity of the methanolic extract and of the aqueous and acetat fractions of *Miconia stenostachya* by reverse mutation assay with *Salmonella typhimurium*. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, São José do Rio Preto, 3554-3557.

Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60.

Oh, H.T., Kim, S.H., Choi, H.J., Chung, M.J., Ham, S.S., 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*). *Toxicology In Vitro*, 22, 1484-1488.

Rouchi, A.M., Washington, C., 2003. Rediscovering natural products. *Chemical & Engineering News*, 81, 77-91.

Sangwan, S., Shanker, S., Sangwan, R.S., Kumar, S., 1998. Plant-derived products as antimutagens. *Phytotherapy Research*, 12, 389–399.

Santos, F.V., Calvo, T.R., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2010. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Brazilian Journal Pharmacognosy*, 20, 382-389.

Seo, K.Y., Jelinsky, S.A., Loechler, E.L., 2000. Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. *Mutation Research*, 463, 215–246.

Serpeloni, J.M., Bisarro dos Reis, M., Rodrigues, J., Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A., Dokkedal, A.L., Cólus, I.M.S., 2008. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, 23, 501–507.

Serpeloni, J.M., Barcelos, G.R.M., Mori, M.P., Yanagui, K., Vilegas, W., Varanda, E.A., Cólus, I.M.S., 2011. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 499–504.

Silva, C.R., Monteiro, M.R., Rocha, H.M., Ribeiro, A.F., Caldeira-de-Araujo, A., Leitão, A.C., Bezerra, R.J.A.C., Pádula, M., 2008. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 22, 212–218.

Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Singh, D.P., Sarma, B.K., Upadhyay, G., Singh, H.B., 2009. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1161-1167.

Stankevics, L., Aiub, C., De Santa Maria, L.C., Lobo-Hajdu, G., Felzenszwalb, I., 2008. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. *Toxicology in Vitro*, 22, 1869-1877.

Surh, Y.J., 2002. Anti-tumour promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: short review. *Food Chemistry and Toxicology*, 40, 1091-1097.

Therriault, M., Caillet, S., Kermasha, S., Lacroix, M., 2006. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*, 98, 490–501.

Van der Merwea, J.D., Joubert, E., Richards, E.S., Manley, M., Snijman, P.W., Marnewick, J.L., Gelderblom, W.C.A.A., 2006. Comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. *Mutation Research*, 611, 42-53.

Varanda, E.A., 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27, 1-7.

Zahin, M., Ahmad, I., Aqil, F., 2010. Antioxidant and antimutagenic activity of *Carum copticum* fruit extracts. *Toxicology in Vitro*, 24, 1243–1249.

CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO

- ✓ O estudo de prospecção fitoquímica possibilitou a identificação de algumas classes de metabólitos secundários até então não relatados na literatura para os extratos EAAG, EAML, EA00, EAPS, EAPV, EARJ e EASS, sendo que os teores de compostos fenólicos para estes extratos também são pela primeira vez relatados;
- ✓ EAML e EAAG apresentaram alto conteúdo fenólico, seguidos por EA00;
- ✓ Análise da atividade antioxidante em 3 diferentes testes mostrou grande potencial antioxidante das amostras analisadas, sobretudo para EAML, EAAG, EA00 e EASS;
- ✓ Os resultados mostraram potencial antibacteriano para os extratos EAML, EAAG e EA00 frente a cepas causadoras da mastite. Desses extratos EAML mostrou ser a mais ativa, apresentando resultado que o elege como promissora para o desenvolvimento de fármacos pra tratamento de mastite bovina;
- ✓ EAML apresentou a menor concentração inibitória mínima para ação antimicrobiana frente as cepas de bactérias gram-positivas, sendo o único extrato ativo contra bactéria gram-negativa;
- ✓ EAML apresentou maior citotoxicidade frente a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*/microsoma sem metabolização S9, seguido por EAAG e EA00;
- ✓ EAML apresentou maior atividade antimutagênica, seguido por EAAG e EA00, principalmente para a cepa TA102;
- ✓ Após a metabolização dos extratos houve aumento da atividade antimutagênica para a maioria das cepas testadas;

- ✓ Não foram observadas ações antigenotóxicas para nenhum dos extratos testados;

- ✓ O emprego da abordagem etológica para a seleção de espécies visando a bioprospecção de extratos bioativos possibilitou a descoberta de plantas com potenciais atividades antioxidante, antibacteriana e antimutagênica.

PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Os resultados deste trabalho surgem como uma alternativa para a conservação de espécies vegetais, visto que com a avaliação do potencial não-madereiro de espécies nativas do bioma Mata Atlântica, a exploração desse recurso vegetal poderá ser realizada de forma sustentável. O emprego da estratégia etológica empregando plantas consumidas pela dieta do primata utilizado no presente trabalho trata da primeira experiência do nosso grupo de pesquisa visando a seleção de espécies para o estudo de bioprospecção farmacêutica. Esse método, no entanto, precisa ser aperfeiçoado, principalmente no que tange a observação e associação de possíveis sintomas patológicos manifestados pelo primata e a planta consumida durante este período.

Assim, o grupo de pesquisa BioPESB está sendo pioneiro no Brasil em utilizar o critério etológico na busca de produtos naturais bioativos em bioma de Mata Atlântica. Nesse caso, o envolvimento do primata *B. hipoxanthus* nas pesquisas, também implica em uma ação conservacionista para esta espécie, que atualmente encontra-se em número bastante reduzido.