

Schinus terebinthifolius Raddi: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
POTENCIAL BIOLÓGICO

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2014

Schinus terebinthifolius Raddi: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
POTENCIAL BIOLÓGICO

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em Produção
Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Daniela Barros de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Michelle Frazão Muzitano

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 02/2014

Bernardes, Natália Ribeiro

Schinus terebinthifolius Raddi: Atividade antioxidante e potencial biológico / Natália Ribeiro Bernardes. – 2014.
196 f. : Il.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 149 – 166.

1. *Schinus terebinthifolius* 2. Atividade antioxidante 3. Atividade anti-inflamatória 4. Atividade antimicrobiana 5. Flavonoides I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 664

Schinus terebinthifolius Raddi: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
POTENCIAL BIOLÓGICO

NATALIA RIBEIRO BERNARDES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em Produção
Vegetal.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2014

Comissão examinadora:

Professora Michelle Frazão Muzitano D.S.c., Química de Produtos Naturais.
LAPRON/UFRJ - Macaé

Professora Marta Simone Mendonça Freitas D.S.c. Produção Vegetal.
CCTA/UENF

Professor Olney Vieira da Motta. D.S.c. Biociências e Biotecnologia.
CCTA/UENF

Professora Daniela Barros de Oliveira, D.S.c. Química de Produtos Naturais.
CCTA/UENF (Orientadora)

Ao meu marido Raphael, aos meus pais José Francisco e Catarina, meus irmãos João Paulo e Francesca e a minha afilhada/sobrinha Júlia (Jujuba).

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida e a oportunidade de desenvolver esse trabalho. Sem Ele, nada em minha vida seria possível. Foi Ele que me deu forças em momentos difíceis, que me apresentou pessoas que me ajudariam, que me deu a oportunidade de ter meus pais, meu marido, meus familiares e amigos. Porque toda honra e glória é só para Ele e Nossa senhora que me cobriu com seu manto protetor;

Agradeço a UENF, pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

Agradeço à Professora Daniela Barros de Oliveira pela grande oportunidade, por todos os ensinamentos, pelos conselhos e pela orientação no desenvolvimento deste trabalho de Tese. Agradeço também pela paciência. Você é especial!

À Professora Michelle Frazão Muzitano por aceitar fazer parte da banca avaliadora deste trabalho e colaborar com este trabalho, contribuindo com ideias e valiosas dicas, muito obrigada!

Ao Professor Olney Vieira da Motta que me deu a oportunidade de trabalhar com as bactérias, que sempre manteve o laboratório de portas abertas, e por aceitar fazer parte dessa banca;

À professora Marta Simone Mendonça Freitas por aceitar fazer parte dessa banca;

Agradeço a Camila de Oliveira Mansur pelas análises realizadas no RMN, nos laboratórios do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por

RMN) e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Dept. de Bioquímica - UFRJ);

Agradeço à Professora Solange Silva Samarão que sempre disponibilizou seu tempo e sua atenção para me ensinar. Com a professora Solange eu aprendi muito mais que trabalhar com bactérias, aprendi, indiretamente, toda noção de microbiologia e iniciação científica, como ter amor e dedicação a um trabalho. Pois é Solange, a vida nos colocou novamente em contato uma com a outra. Muito obrigada!

Aos meus pais José Francisco e Catarina, meus irmãos João Paulo e Francesca, aos “irmãos emprestados” Leonardo e Claudia, às minhas sobrinhas Júlia e Camila, obrigada por acreditarem em mim, pelos ensinamentos e por todo amor. Obrigada mesmo! Obrigada por aceitarem toda distância, momentos que deixaram de ser vividos. Mesmo distante, vocês estarão sempre no meu coração e sem a força de vocês eu não teria conseguido. Agradeço em especial a Francesca e Leonardo por ter me presenteado com a vida da menina mais linda, Jujuba, a dinda te ama muito!!!!

Ao meu esposo Raphael, não sei nem agradecer. Sempre junto de mim, sempre me apoiando, me incentivando, me orientou e me ajudou sempre quando eu mais precisava, e principalmente estava pronto para me escutar e me acalmar nos meus momentos bons e ruins. Nunca me abandonou, você é o melhor presente de Deus na minha vida. Te amo!

Às minhas amigas Lorena, Larissa, Simone, Clara e Lucy agradeço pela ajuda, sempre disponíveis nas horas em que precisei. Estavam sempre ali para me escutar, me apoiar. Não teria conseguido (mesmo) sem a ajuda de vocês;

Agradeço em especial a Silvia que sempre me desejou tanto bem, tão amiga, tão solícita, tão especial. Cuidou de mim, como se eu fosse da sua família, muito obrigada, você vai fazer muita falta!!!!

Aos amigos do LTA e da UENF, João, Sylvania, Tatiana Lopes, Andréia, Carlos, Geraldo, Isabela, Shalline, Thatiana Ventura, Sanderson, Marlon, Amélia, obrigada por tudo, por toda descontração e ajuda;

Aos amigos de sempre, meus tios, primos e em especial Helena, Paula, Rafael, Guilherme e Matheus que sempre estarão presentes na minha vida;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xxi
RESUMO.....	Xxiii
ABSTRACT.....	xxvii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	4
2 - Objetivo Geral.....	4
2 - Objetivos Específicos.....	4
3 - REVISAO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 - Alimentos Funcionais.....	5
3.2 - Flavonoides.....	8
3.2.1 - Propriedades Químicas e Classificação.....	9
3.2.2 - Biossíntese.....	11
3.2.3 - Atividades Biológicas.....	13
3.3 - Radicais Livres X Antioxidantes.....	15
3.4 - Atividade Antimicrobiana.....	20
3.5 - Material vegetal.....	23
3.5.1- Descrição Botânica.....	25

3.5.2 - Propriedades Químicas.....	26
3.5.3 - Propriedades Biológicas.....	32
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 - Coleta de material vegetal.....	35
4.2 - Preparo do extrato metanólico.....	35
4.3 - Fracionamento do extrato, isolamento e identificação da substância..	36
4.4 - Atividade Antioxidante.....	39
4.4.1 - Sequestro do Radical Livre DPPH.....	39
4.4.2 - Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP.....	40
4.4.3 - Inibição da Produção de Óxido Nítrico.....	41
4.4.3.1 - Cultura Celular e preparo dos ensaios de macrófagos RAW 264.7.....	41
4.4.3.2 - Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO).....	42
4.4.3.3 - Testes de citotoxicidade (ensaio de MTT e LDH).....	42
4.4.3.4 - Bioensaio com células L929 e análise da produção de TNF- α por macrófagos.....	43
4.5 - Ensaio biológicos do extrato metanólico, fração orgânica e substâncias isoladas.....	44
4.5.1 - Micro-organismos.....	44
4.5.1.1 - Meio de cultura.....	45
4.5.1.2 - Preparo dos inóculos.....	45
4.5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	45
4.6 - Método para Dosagem de Fenóis Totais.....	46
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 - Análises Cromatográficas.....	49
5.1.1 - Extrato Metanólico.....	49
5.1.2 - Fracionamento do Extrato Metanólico.....	53
5.1.3 - Fracionamento da Fração Orgânica.....	56

5.2 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	67
5.2.1 - RMN da Substância ST-02.....	67
5.2.1.1 - Técnicas monodimensionais.....	67
5.2.2- RMN da Substância ST-04.....	72
5.2.2.1 - Técnicas monodimensionais.....	72
5.2.2.1.1 - RMN ^1H	72
5.2.2.1.2 - RMN APT.....	74
5.2.3 - Técnicas bidimensionais.....	77
5.2.3.1 - COSY ^1H - ^1H	77
5.2.3.2 - HMQC.....	78
5.2.3.3 - HMBC.....	79
5.2.3.4 - Proposta Estrutural.....	80
5.2.4 - Quantificação do ácido gálico no extrato metanólico.....	81
5.2.5 - RMN da Substância ST-5-1.....	82
5.2.5.1 - Técnicas monodimensionais (^1H).....	82
5.2.5.2 - RMN APT.....	85
5.2.6 - Técnicas bidimensionais.....	89
5.2.6.1 - COSY ^1H - ^1H	89
5.2.6.2 - HMQC.....	90
5.2.6.3 - Proposta Estrutural.....	91
5.3 - Teor de Fenóis Totais.....	92
5.4 - Atividade Antioxidante.....	94
5.4.1 - Sequestro do Radical Livre DPPH.....	96
5.4.2 - Método de redução do ferro – FRAP.....	103
5.5 - Atividade Imunofarmacológica.....	105
5.5.1 - Atividade do extrato metanólico na inibição da produção de NO por macrófagos e citotoxicidade	105
5.5.2 - Modulação da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelo extrato metanólico, substâncias isoladas e frações dos	114

frutos de aroeira.....	
5.6 - Atividade Antibacteriana.....	118
5.6.1 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	119
5.6.2 - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA).....	124
5.6.3 - <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.....	129
5.6.4 - <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana.....	134
6 - CONCLUSÕES.....	144
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Núcleo fundamental dos flavonoides, ressaltando sua numeração.....	9
Figura 2 - Algumas subclasses dos flavonoides.....	10
Figura 3 - Biossíntese geral dos flavonoides, ilustrando as etapas da formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonoides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase.....	13
Figura 4 - Reação simulando a ação antioxidante dos flavonoides.....	14
Figura 5 - Estrutura química dos antioxidantes artificiais BHA e BHT.....	17
Figura 6 - Os frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	25
Figura 7 - Estrutura molecular do ácido masticadienoico e do álcool schinol.....	27
Figura 8 - Estrutura química dos constituintes caracterizados a partir dos frutos da aroeira.....	27
Figura 9 - Estrutura química dos biflavonoides isolados a partir dos frutos da aroeira.....	28
Figura 10 - Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	29
Figura 11 - Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	30
Figura 12 - Estrutura química do ácido gálico isolado das folhas de aroeira.....	30

Figura 13 - Gráfico representando a porcentagem de ácidos e flavonoides nos frutos de aroeira.....	31
Figura 14 - Esquema da atividade antimicrobiana do extrato metanólico, da fração orgânica e das substâncias isoladas dos frutos de aroeira pelo método da diluição em meio líquido.....	46
Figura 15 - Resumo das colunas preparadas e utilizadas neste trabalho de doutorado.....	48
Figura 16 - Cromatograma do extrato metanólico realizado por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	50
Figura 17: Cromatograma 1, perfil químico do extrato metanólico avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL.....	51
Figura 18 - Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	52
Figura 19 - Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 27.43 min, correspondente ao pico 1 (Preto); 29.31 min, correspondente ao pico 2 (Azul), 29.86 min, correspondente ao pico 3 (Rosa) e 30.90 min, correspondente ao pico 4 (laranja).....	52
Figura 20 - Cromatograma da partição com acetato de etila realizada a partir do Extrato Metanólico por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.....	53
Figura 21 - Cromatograma 2, perfil químico da Fração Aquosa avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL.....	54
Figura 22 - Cromatograma 3, perfil químico da Fração Orgânica avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL.....	55
Figura 23 - Esquema simplificado mostrando a origem das substâncias ST-02 e ST-04.....	57

Figura 24 - Cromatograma 4, perfil químico da substância isolada ST-02 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/ml.....	58
Figura 25 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 26.86 min, correspondente ao pico do ST-02.....	59
Figura 26 - Cromatograma 5, perfil químico da substância isolada ST-04 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.....	59
Figura 27 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 10.37 min, correspondente ao pico do ST-04.....	60
Figura 28 - Esquema simplificado mostrando a origem das substâncias ST-05 e ST-06.....	61
Figura 29 - Cromatograma 6, perfil químico do Gr.11 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.....	62
Figura 30 - Cromatograma 7, perfil químico do Gr.14 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.....	63
Figura 31 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 29.31 min, correspondente ao pico do ST-05.....	64
Figura 32 - CCD resultando do fracionamento utilizando Sephadex LH-20 do G-14, resultando em 3 subfrações.....	65
Figura 33 - Cromatograma 8, perfil químico do Gr.21 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 µL. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.....	66

Figura 34 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 29.80 min, correspondente ao pico do Gr. 21.....	66
Figura 35 - CCD resultando do fracionamento utilizando Sephadex LH-20 do G-16 B, resultando em 2 subfrações.....	67
Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H de ST-02 (500 MHz).....	69
Figura 37 - Estrutura proposta de ST-02 Galangina 7-O-ramnopiranosídeo (3, 5, 7 trihidroxi flavonol).....	70
Figura 38 - Espectro de RMN ¹ H de ST-04 (500 MHz).....	73
Figura 39 - Estrutura proposta de ST-04, ácido gálico.....	74
Figura 40 - Espectro de RMN APT de ST-04 (500 MHz).....	76
Figura 41 - Sinais de APT do ácido gálico (ST-04) comparados com os dados da literatura (Moura et al., 2011).....	76
Figura 42 - Espectro de RMN 2D- COSY para ST-04.....	78
Figura 43 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-04.....	79
Figura 44 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-04.....	79
Figura 45 - Estrutura de ST-04 (Ácido gálico).....	80
Figura 46 - Curva padrão do ácido gálico.....	81
Figura 47 - Espectro de RMN ¹ H de ST-05-1 (400 MHz).....	83
Figura 48 - Estrutura proposta de ST-5-1 Galangina (3, 5, 7 trihidroxi flavonol)....	85
Figura 49 - Espectro de RMN ¹³ C de ST-5-1 (400 MHz).....	87
Figura 50 - Espectro de RMN 2D- COSY para ST-5-1.....	90
Figura 51 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-5-1.....	91
Figura 52 - Estrutura proposta de ST-5-1 Galangina (3, 5, 7 trihidroxi flavonol)....	92
Figura 53 - Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado.....	97
Figura 54 - Efeito inibidor do extrato metanólico dos frutos de <i>S. terebinthifolius</i> , bem como das partições aquosa e orgânica em 4, 20, 100 e 500 µg / mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A produção de NO foi quantificada indiretamente no sobrenadante da cultura	107

como NO₂, pelo método de Griess. Controle positivo- macrófagos estimulados com LPS e tratados com L-NMMA a 20 µg / mL (inibindo 43,8 ± 3,8 % da produção de NO) (69,4 ± 0.5 µM de NO). Controle Negativo - macrófagos não tratados e não estimulados com LPS (inibindo 0,0 ± 3,5 % a produção de NO – 0,0 ± 0.6 µM de NO). Média aritmética ± desvio padrão (n = 3).....

Figura 55 - Efeito inibidor das amostras isoladas dos frutos de *S. terebinthifolius*, bem como das frações ST-05 e ST-06 em 0,8; 4; 20 e 100 µg / mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A produção de NO foi quantificada indiretamente no sobrenadante da cultura como NO₂, pelo método de Griess. Controle positivo- macrófagos estimulados com LPS e tratados com L-NMMA a 20 µg / mL (inibindo 43,8 ± 3,8 % da produção de NO) (69,4 ± 0.5 µM de NO). Controle Negativo - macrófagos não tratados e não estimulados com LPS (inibindo 0,0 ± 3,5 % a produção de NO – 0,0 ± 0.6 µM de NO). Média aritmética ± desvio padrão (n = 3)..... 109

Figura 56 - Atividade citotóxica do extrato metanólico e as partições aquosa e orgânica. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS 1 µg/mL e tratados com as amostras nas concentrações de 500, 100, 20 e 4 µg/mL. (A) Os percentuais de citotoxicidade por LDH foram comparados aos controles negativo: 0,1%±0,5/ D.O. 0,4±0,01 e positivo: 99,9±0,5/ D.O. 1,6±0,03. (B) Percentuais de citotoxicidade por MTT aos controles negativo: 5,4%±1,7/ D.O. 0,08±0,02 e positivo: 100,0±0,08/ D.O. 1,26±0,05..... 111

Figura 57: Atividade citotóxica do flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, do ácido gálico e das substâncias ST-05 e ST-06. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS 1 µg/mL e tratados com as amostras nas concentrações de 100, 20, 4 e 0,8 µg/mL. Os percentuais de citotoxicidade por LDH foram comparados aos controles negativo: 0,1%±0,5/ D.O. 0,4±0,01 e positivo: 99,9±0,5/ D.O. 1,6±0,03. (B) Percentuais de citotoxicidade por MTT aos controles negativo: 5,4%±1,7/ D.O. 0,08±0,02 e positivo: 100,0±0,08/ D.O. 1,26±0,05..... 113

Figura 58 - Percentual de citotoxicidade frente ao TNF-α em fibroblastos murinos L929 através do método de MTT. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados e tratados com o extrato metanólico e as partições aquosa e orgânica selecionadas na concentração de 500, 100, 20 e 4 µg/mL por 24h. O sobrenadante da cultura foi adicionado à cultura de células L929 previamente plaqueadas por mais 24h. Avaliação da concentração de TNF-α no sobrenadante da cultura de fibroblastos murinos L929 foi comparada à curva padrão de TNF-α murinho recombinante. Os percentuais de citotoxicidade por MTT foram comparados aos controles negativo: 1,95 ± 1,9 pg/mL e positivo: 100,0±0,6 pg/mL..... 115

Figura 59 - Percentual de citotoxicidade frente ao TNF-α em fibroblastos murinos L929 através do método de MTT. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados e tratados com as substâncias isoladas dos frutos de aroeira Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02), ácido gálico (ST-04) e as frações ST-05 e ST-06 na concentração de 100, 20, 4 e 0,8 µg/mL por 24h. O 115

sobrenadante da cultura foi adicionado à cultura de células L929 previamente plaqueadas por mais 24h. Avaliação da concentração de TNF- α no sobrenadante da cultura de fibroblastos murinos L929 foi comparada à curva padrão de TNF- α murinho recombinante. Os percentuais de citotoxicidade por MTT foram comparados aos controles negativo: $1,9 \pm 1,9$ pg/mL e positivo: $100,0 \pm 0,6$ pg/mL.....	
Figura 60 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), do extrato metanólico frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	120
Figura 61 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), da partição orgânica frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	121
Figura 62 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), fração ST-05 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	122
Figura 63 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), fração ST-06 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	122
Figura 64 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	123
Figura 65 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do ácido gálico (ST-04) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	124
Figura 66 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do extrato metanólico frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	125
Figura 67 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da partição orgânica frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	126
Figura 68 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-06 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	126
Figura 69 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-05 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	127
Figura 70 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do flavonol galangina	128

(ST-02) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	
Figura 71 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do ácido gálico (ST-04) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	128
Figura 72 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do extrato metanólico frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	130
Figura 73 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da partição orgânica frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	131
Figura 74 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-05 frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	132
Figura 75 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-06 frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	132
Figura 76 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	133
Figura 77 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do ácido gálico (ST-04) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermitis</i> ATCC 12228.....	134
Figura 78 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do extrato metanólico frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana.....	135
Figura 79 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da partição orgânica frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana.....	136
Figura 80 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-05 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana.....	136
Figura 81 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da fração ST-06 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana.....	137
Figura 82 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e da Galangina 7-O-	138

Ramnopiranosídeo (ST-02) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.....

Figura 83 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (com e sem DMSO), e do ácido gálico (ST-04) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana..... 138

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.....	38
Tabela 2: Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos.....	44
Tabela 3: Sinais listados de ^1H para a substância ST-02.....	68
Tabela 4: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-02 e os sinais da galangina observados na literatura.....	71
Tabela 5: Sinais listados de ^1H para a substância ST-04.....	72
Tabela 6: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-04 e os sinais do ácido gálico observados na literatura.....	73
Tabela 7: Comparação dos sinais de APT de ST-04 e os sinais do ácido gálico observados na literatura.....	75
Tabela 8: Comparação dos sinais de ST-04 e os sinais do ácido gálico da literatura (Moura et al., 2011).....	77
Tabela 9: Quantificação do ácido gálico presente no extrato metanólico dos frutos de aroeira.....	82
Tabela 10: Sinais listados de ^1H para a substância ST-05-1.....	82
Tabela 11: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-5-1 e os sinais da galangina observados na literatura.....	85
Tabela 12: Comparação dos sinais de ^{13}C de ST-5-1 e os sinais da galangina observados na literatura.....	88

Tabela 13: Comparação dos sinais de ST-5-1 e os sinais da galangina da literatura (Kaouadji, 2014; Agrawall, 1989).....	89
Tabela 14: Teor de fenóis totais do extrato metanólico, da partição aquosa e orgânica.....	93
Tabela 15: Vantagens e limitações das técnicas antioxidantes DPPH e FRAP..	95
Tabela 16: Atividade antioxidante pelo método DPPH e EC ₅₀ do extrato metanólico, da partição aquosa, orgânica, das frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT).....	98
Tabela 17: Atividade antioxidante pelo método FRAP do extrato metanólico, da partição aquosa, orgânica, das frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina e apigenina.....	104
Tabela 18: Atividade citotóxica do extrato metanólico, das partições aquosa e orgânica, ST-05 e ST-06, bem como das substâncias isoladas a partir de frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> . A citotoxicidade foi medida pela porcentagem de liberação específica de lactato desidrogenase (LDH). A liberação específica foi calculada como a porcentagem de macrófagos tratados com detergente (1% de Triton X-100) como controle positivo (100% Lise - DO 1,6) e os macrófagos não tratados como controle negativo (Lise 0% - DO 0,4). Média Aritmética ± desvio padrão (n = 3).....	110
Tabela 19: Concentração das amostras de acordo com cada cepa bacteriana..	119

LISTA DE ABREVIACÕES

AA	Atividade Antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butil Hidroxi Anisol
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
CCD	Cromatografia em camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetil Sufxido Deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EC ₅₀	Concentração Efetiva para inibir em 50% da atividade de um composto
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro

IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade de um composto
IDR	Ingestão Diária recomendada
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
McF	McFarland
MH	Muller Highton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NO	Óxido Nítrico
NOs	Óxido Nítrico Sintase
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
RF	Fatores de Referência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-18	Cromatografia em fase inversa com dezoito átomos de carbono
RP-2	Cromatografia em fase inversa com dois átomos de carbono
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
Tr	Tempo de Retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

RESUMO

BERNARDES, N.R. DSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Atividade Antioxidante e Potencial Biológico. Orientadora: Prof. D.S.c Daniela Barros de Oliveira. Coorientadora: Prof. D.S.c Michelle Frazão Muzitano.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, em colaboração com o Laboratório de Sanidade Animal (LSA), ambos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, e com o Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo deste trabalho foi avaliar e ampliar o conhecimento químico e biológico acerca dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), bem como suas atividades biológicas, para a utilização do mesmo como antioxidante e alimento funcional. Para a obtenção do extrato metanólico, os frutos de aroeira foram submetidos à extração exaustiva com metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter as substâncias purificadas e com potencial antioxidante e biológico. O conhecimento do perfil químico do extrato conduziu a uma amostra com um pico bastante intenso no tempo de retenção em 10,891 minutos e mais quatro picos com tempo de 27,435; 29,312; 29,867 e 30,901 minutos com características para flavonoides. Foi realizada uma partição com o solvente acetato de etila que

resultou em duas partições, uma aquosa e outra orgânica que através do seu perfil químico realizado por CLAE, foi possível observar que a partição orgânica concentrou os compostos de interesse. Após a purificação da partição orgânica, obteve-se três substâncias isoladas (ST-02, ST-04 e ST-5-1), que foram enviadas ao RMN para sua elucidação estrutural, que a partir de dados espectroscópicos a galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, o ácido gálico e a galangina foram identificados. Através do teor de fenóis totais foi possível observar que a partição orgânica apresenta a maior concentração de fenóis totais, seguido do extrato metanólico e da partição aquosa. Tal resultado confirma a concentração das moléculas de interesse (substâncias fenólicas) no processo de fracionamento do extrato metanólico. O extrato metanólico, partição aquosa e orgânica, as frações ST-05 e ST-06, bem como as substâncias isoladas e padrões químicos foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante por duas metodologias, uma que se baseia no sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e a metodologia que se baseia na redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , conhecida como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power – Corresponde ao Poder Antioxidante de Redução do Ferro). Em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, pelo método do DPPH, a sequência seria: Ácido gálico (EC_{50} $0,97 \pm 1,58$) > partição orgânica (EC_{50} $0,97 \pm 1,58$) > Extrato metanólico (EC_{50} $14,39 \pm 1,12$) > ST-06 (EC_{50} $27,6 \pm 1,30$) > Partição aquosa (EC_{50} $127,3 \pm 1,14$) > ST-05 (EC_{50} $328,1 \pm 1,12$). Com relação ao resultado do poder redutor do Ferro, o ácido gálico foi a amostra que conseguiu reduzir a maior quantidade de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} ($650,6 \pm 0,8$ μM de Trolox/mg) seguido de partição orgânica ($201,8 \pm 0,6$ μM de Trolox/mg), Extrato metanólico ($172,4 \pm 0,9$ μM de Trolox/mg), Partição aquosa ($160,0 \pm 0,4$ μM de Trolox/mg), ST-06 ($143,8 \pm 0,4$ μM de Trolox/mg) e por fim ST-05 ($72,6 \pm 1,7$ μM de Trolox/mg). Com relação à atividade imunofarmacológica, a partição orgânica apresentou a melhor capacidade em inibir a produção de NO (IC_{50} de $23,23 \pm 1,18$ $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com o extrato metanólico (IC_{50} de $55,04 \pm 1,13$ $\mu\text{g/mL}$) e partição aquosa ($196,5 \pm 1,17$), resultado semelhante ao potencial antioxidante avaliado pelas metodologias do DPPH e FRAP. Com relação às frações ST-05 e ST-06 essas apresentaram as

melhores inibições da produção de NO (IC_{50} de $20,90 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$ e IC_{50} de $14,20 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), até mesmo quando comparadas com a partição orgânica. O flavonoide isolado de *S. terebinthifolius*, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, inibiu significativamente a produção de NO (IC_{50} de $22,47 \pm 1,61 \mu\text{g/mL}$). E com relação ao ácido gálico, este não apresentou boa capacidade em inibir a produção de NO por macrófagos visto que até na maior concentração testada ($100 \mu\text{g/mL}$) a inibição da produção de NO foi de $39,9 \pm 2,3 \%$. No que se refere à citotoxicidade, somente o extrato metanólico e ST-05 mostraram toxicidade nas maiores concentrações ($500 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) acima de 50%, sendo essa toxidez diminuída nas demais concentrações mantendo a inibição da produção de NO. Todas as demais amostras não apresentaram toxidez. Com relação à inibição do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) apenas o extrato metanólico e a fração orgânica na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ inibiram a sua produção em $23,80 \pm 1,61\%$ e $37,19 \pm 0,58\%$, respectivamente, em relação ao controle tratado. Com relação às substâncias isoladas dos frutos de aroeira, a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e o ácido gálico (ST-04), não foi possível observar influência sob o TNF- α . Com relação à avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente às diferentes cepas de *Staphylococcus*, a fração ST-06, para todas as cepas trabalhadas, apresentou o melhor resultado, com concentração de 20 mg/mL . O extrato metanólico, a partição orgânica e o ST-05 também apresentaram elevado potencial antimicrobiano. As amostras menos eficientes foram a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e o ácido gálico (ST-04), onde não foi possível observar a concentração mínima inibitória dessas amostras para todas as cepas trabalhadas, visto que devido a pouca massa resultante do fracionamento, só foi possível avaliar a atividade microbiana em apenas uma única concentração (20 mg/mL). Porém, é possível observar que o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo apresentou inibição do crescimento bacteriano, mas não foi possível observar a concentração mínima inibitória. Esse resultado sugere que outros mecanismos além das propriedades antioxidantes podem estar relacionados com as atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Com base nestas

observações, é de suma importância o descobrimento de substâncias químicas presentes em fontes vegetais que possam apresentar tanto atividades antioxidantes quanto antimicrobiana e anti-inflamatórias. Assim, essas substâncias seriam uma excelente alternativa para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

ABSTRACT

BERNARDES, N.R. DSc.; *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*. February, 2014. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Antioxidant Activity and Biological Potential. Professor Advisor: D.S.c. Daniela Barros de Oliveira. Co-Advisor: Prof. D.S.c. Michelle Frazão Muzitano.

This work was performed at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos, in collaboration with the Laboratório de Sanidade Animal (LSA), both belonging to Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, and with Laboratório de Biologia do reconhecer (LBR) of Centro de Biociências e Biotecnologia belonging to Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. The aim of this work is to expand the chemical and biological studies about the fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) knowledge as well as their biological activities, for its use as an antioxidant and functional food. To obtain the methanol extract of the pepper tree, the fruits were submitted to an exhaustive extraction with methanol. The chromatographic fractionations were carried out in order to obtain the purified and antioxidant substances and biological potential. The knowledge of the chemical profile of the extract resulted in a sample with a very intense peak at retention time 10.891 minutes and four peaks with time of 27.435, 29.312, 29.867, and 30,901 minutes with characteristics of flavonoids. A partition with ethyl acetate solvent resulted in two partitions, one aqueous and other organic which through its listing held by HPLC, it was observed that the organic partition concentrated

compounds of interest. After purification, the organic partition obtained three isolated compounds (ST-02, ST-04 and ST-5-1) that were sent to NMR for structure elucidation, which spectroscopic data results in galangin 7-O- rhamnopyranoside, galangin and gallic acid were identified. Through the total phenolic content was observed that the organic partition has the highest concentration of total phenolics, followed by methanol extract and aqueous partition. This result confirms the concentration of the molecules of interest (phenolic compounds) in the process of fractionation of the methanol extract. The methanol extract, aqueous and organic partition, the ST-05 and ST- 06 fractions and the isolated compounds and chemical patterns were evaluated for their antioxidant activity by two methods, one based in the scavengers of free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilidrazil) and the methodology based on the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} , known as FRAP (Ferric reducing Antioxidant Power). On a scale of scavengers capacity of free radicals, by the DPPH method, the sequence would be: gallic acid (EC_{50} 0.97 ± 1.58) > organic partition (EC_{50} 0.97 ± 1.58) > methanol extract (EC_{50} 14.39 ± 1.12) > ST-06 (EC_{50} 27.6 ± 1.30) > aqueous Partition (EC_{50} 127.3 ± 1.14) > ST-05 (EC_{50} 328.1 ± 1.12). With respect to the result of the FRAP, gallic acid sample which was able to reduce the greater amount of reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} ($650.6 \pm 0.8 \mu\text{M}$ of Trolox/mg) then the organic partition ($201.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$ of Trolox/mg) , methanol extract ($172.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ of Trolox/mg), aqueous Partition ($160.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$ of Trolox/mg) , ST-06 ($143.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ of Trolox/mg) and finally ST-05 ($72.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ of Trolox/mg). Regarding the Immunofarmacologic activity, the organic partition showed the best capacity to inhibit NO production (IC_{50} of $23.23 \pm 1.18 \mu\text{g/mL}$) as compared to the methanolic extract (IC_{50} of $55.04 \pm 1.13 \mu\text{g/mL}$) and aqueous partition ($196.5 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$), similar to the antioxidant potential measured by FRAP and DPPH methodologies. Regarding the ST-05 and ST-06 fractions showed the greatest inhibition of NO production (IC_{50} of $20.90 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$ and IC_{50} of $14.20 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$, respectively) to even when compared to the organic partition. The flavonoid isolated from *S. Terebinthifolius*, galangin 7-O- rhamnopyranoside, this significantly inhibited NO production (IC_{50} of $22.47 \pm 1.61 \mu\text{g/mL}$). And with respect to gallic acid, this did not present a good

capacity to inhibit NO production by macrophages since even at the highest concentration tested (100 µg/mL) inhibition of NO production was $39.9 \pm 2.3\%$. With regard to cytotoxicity, only the methanol extract and ST-05 showed toxicity at the highest concentrations (500 µg/mL and 100 µg/mL, respectively) higher than 50%, and in other concentrations that reduced toxicity while maintaining production inhibition NO. All other samples showed no toxicity. With respect to inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α) only methanol extract and the organic fraction in concentration of 500 µg/mL inhibited the production by $23.80 \pm 1.61\%$ and $37.19 \pm 0.58\%$ respectively compared to the control treatment. Regarding substances isolated from the fruits of pepper tree, galangin 7-O-rhamnopyranoside (ST-02) and gallic acid (ST-04), were not observed under the influence of TNF- α . Regarding the assessment of bacterial growth inhibition against various strains of *Staphylococcus*, ST-06 fraction, for all strains worked, showed the best results, with a concentration of 20 mg/mL. The methanol extract, organic partition and ST-05 also showed high antimicrobial potential. The samples less efficient were galangin 7-O-rhamnopyranoside (ST-02) and gallic acid (ST -04) which did not exhibit the minimal inhibitory concentration for these samples all strains worked, since due to the small mass resulting the fractionation was only possible to assess microbial activity in only a single concentration (20 mg/ mL). But is possible to see that the flavonol galangin 7-O-rhamnopyranoside showed inhibition of bacterial growth, but it has not been possible to observe the minimum inhibitory concentration. This result suggests that other mechanisms in addition to the antioxidant properties can be related to the anti-inflammatory and antimicrobial activities. Based on these observations, it is of paramount importance the discovery of chemicals in plant sources that can provide much antioxidants as antimicrobial and anti-inflammatory. Thus, these substances would be an excellent alternative for the development of functional foods.

1. INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares têm sido considerados importantes fatores para a saúde do indivíduo. O consumo de alimentos sem valor nutritivo, os *fast foods*, tem aumentado muito, o que levou a uma série de doenças associadas às deficiências nutricionais e ao risco de infecções bacterianas (Vo e Kim, 2013). Recentemente observa-se um interesse dos consumidores nos benefícios nutricionais e um possível controle ou prevenção de doenças, ou seja, os consumidores estão aderindo à ideia de prevenção e não à cura de doenças (Vo e Kim, 2013, Siró, et al; 2008; Hardy, 2000). Neste sentido, os alimentos funcionais se destacam ocasionando uma melhor qualidade e expectativa de vida (Vo e Kim, 2013; Siró, et al; 2008; Kotilainen, et al.; 2006).

Assim, os alimentos funcionais são conhecidos por desempenharem um importante papel na redução dos riscos a saúde e melhoraria na qualidade de vida. Entretanto, a capacidade de alguns alimentos derivados de plantas em reduzir o risco de doenças crônicas tem sido associada, pelo menos em parte, com a ocorrência de metabólitos secundários, que têm demonstrado exercer uma gama de atividades biológicas (Vo e Kim, 2013; Espín, et al; 2007).

Diversos grupos de pesquisadores têm concentrado esforços significativos na pesquisa de produtos naturais a partir de diversas plantas nativas e introduzidas no país. Mas, mediante todo o potencial da biodiversidade dos compostos naturais, ainda existem poucos grupos trabalhando na área de plantas medicinais pela população e da riqueza da flora brasileira. E visando esta melhoria e aumento da descoberta de novos fitoterápicos, bem como novas pesquisas científicas, o SUS, desde 2009

ampliou o RENISUS, que é Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Ministério da Saúde, 2009).

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira. Seus frutos são utilizados como condimentos na culinária, e popularmente é empregada como anti-inflamatória e antifebrífuga, porém são poucos os trabalhos acerca deste fruto na literatura. A importância do estudo com esta planta tem promovido a sua inclusão na Farmacopeia Brasileira (Brandão et al., 2006), bem como é uma das 71 plantas de interesse do SUS.

Muitas patologias além da aterosclerose, de problemas pulmonares, processos inflamatórios e outras doenças degenerativas como o câncer, podem ser agravadas pela formação de radicais livres e ainda promoverem lesões teciduais, como as cardiopatias, por originarem a oxidação (Mariod, et al. 2010; Halliwell, 2009; Shami e Moreira, 2004). Essas espécies químicas podem ser geradas por fatores intrínsecos e extrínsecos. Como exemplos de fatores intrínsecos podem ser citados a taxa respiratória durante a ativação de glóbulos brancos como neutrófilos, macrófagos, entre outros. E como fatores extrínsecos, a formação a partir do oxigênio e seus derivados, dos radicais alcoxi e peróxido, do ozônio, de metais de transição (Mariod, et al. 2010).

Para tanto é comum o uso de substâncias antioxidantes que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (Bernardes, 2010; Ali, et al. 2008; Vicentino e Menezes, 2007). Os antioxidantes são substâncias químicas que reduzem ou evitam a oxidação e têm a capacidade de neutralizar os efeitos nocivos dos radicais livres nos tecidos e, portanto, são capazes de proteger contra inúmeras doenças (Ali, et al. 2008; Vicentino e Menezes, 2007).

A busca de novos agentes antioxidantes a partir de fontes vegetais utilizadas na alimentação humana e na medicina popular contra inflamações e infecções pode levar a moléculas naturais com alto potencial antimicrobiano e anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* (Bernardes, 2010; Fang e Liu, 2002).

Existem diversos trabalhos para avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de vegetais. No entanto, as pesquisas

realizadas a partir de *Schinus terebinthifolius* Raddi se concentram em nível de análise das folhas e da seiva (tronco) (Web of Science e Science Direct, 1980 a 2013).

Dessa forma, o enfoque principal deste estudo está baseado na avaliação da atividade antioxidante, na inibição do crescimento microbiano e no potencial anti-inflamatório do extrato obtido a partir dos frutos de aroeira, o que em tese pode justificar seu uso popular como alimento funcional.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é ampliar o conhecimento químico e biológico acerca dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, bem como suas atividades biológicas, para a utilização do mesmo como antioxidante e alimento funcional.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar o perfil químico do extrato metanólico dos frutos da aroeira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ❖ Isolar e identificar o pigmento responsável pelo potencial antioxidante e pelas atividades biológicas dos frutos através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- ❖ Avaliar a atividade antioxidante do extrato, das frações e substâncias isoladas a partir dos frutos pelos métodos do DPPH e FRAP;
- ❖ Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro*, através da capacidade do extrato e das frações em inibir a produção de Óxido Nítrico (NO);
- ❖ Avaliar a capacidade de inibição do TNF- α através do bioensaio de L929;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade dos extratos, das frações e substâncias isoladas através do teste de MTT e LDH;
- ❖ Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e das frações obtidas a partir dos frutos de aroeira em diferentes cepas de *Staphylococcus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

Os hábitos alimentares têm sido considerados importantes fatores para a saúde do indivíduo. O consumo de alimentos sem valor nutritivo, os *fast foods*, tem aumentado muito, o que levou a uma série de doenças associadas às deficiências nutricionais e ao risco de infecções bacterianas (Vo e Kim, 2013). Recentemente observa-se um interesse dos consumidores nos benefícios nutricionais e um possível controle ou prevenção de doenças, ou seja, os consumidores estão aderindo à ideia de prevenção e não à cura de doenças (Vo e Kim, 2013, Siró, et al. 2008; Hardy, 2000). Neste sentido, os alimentos funcionais se destacam ocasionando uma melhor qualidade e expectativa de vida (Vo e Kim, 2013; Siró, et al. 2008; Kotilainen, et al. 2006).

A definição dos alimentos funcionais foi proposta pela primeira vez em 1984 por cientistas japoneses que estudavam a relação entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação de sistemas fisiológicos. Porém, na maioria dos países não existe uma definição exata do termo, e um consenso sobre a definição de alimentos funcionais é um desafio mesmo para especialistas em nutrição e alimentação (Siró, et al. 2008; Niva, 2007).

De acordo com a Comissão Europeia sobre a Ciência dos Alimentos Funcionais na Europa (FuFoSE), coordenado pelo International Life Science Institute (ILSI), estes alimentos são definidos: "um alimento só pode ser considerado funcional se juntamente com o impacto nutricional básico, possuir

efeitos benéficos em uma ou mais funções do organismo humano, assim, melhorando as condições gerais e físicas e/ou diminuindo o risco da evolução de doenças. Seu consumo e a forma de ingestão deve ser diariamente e na forma natural. Por isso, não poderia ser em forma de pílula ou cápsula (Siró, et al. 2008). Uma definição simples e prática de alimentos funcionais seria “alimento ou ingredientes alimentares que podem fornecer um benefício à saúde além dos tradicionais nutrientes já contidos” (Ikeda, et al. 2010; Goldberg, et al. 2000).

A Food and Drug Administration (FDA) regula os alimentos funcionais baseada no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em quatro categorias: alimentos, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais ou alimento-medicamento (Noonan e Noonan, 2004). Portanto, é difícil dimensionar o mercado destes produtos (Kotilainen et al. 2006). No Brasil, a indústria deve seguir a legislação do Ministério da Saúde. As normas e os procedimentos para registro de alimentos e/ou ingredientes funcionais é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e estabelece que para se obter o registro de um alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, deve ser formulado um relatório técnico-científico, comprovando os benefícios e a segurança no uso do alimento (Câmara, et al. 2008).

Estima-se que a taxa de crescimento anual na indústria de alimentos esperada para os alimentos funcionais varie, mas o consumo destes alimentos mostra-se impressionante em comparação com as taxas de crescimento de outros mercados. A procura pelos alimentos funcionais cresce de 2-3% por ano para a indústria de alimentos como um todo (Verbeke, 2010). No Brasil, já são vários os alimentos funcionais presentes no mercado. Podendo citar além dos iogurtes com probióticos que melhoram a saúde intestinal, os leites enriquecidos com ferro, com vitaminas e com o ácido graxo ômega-3. O setor da água mineral também ingressou no mercado das bebidas funcionais, oferecendo águas que contêm alta concentração de vitaminas C e do complexo B, ou com fibras como frutooligossacarídeos (FOS) com a promessa de contribuir para a prevenção dos cânceres de mama e de cólon e para a

redução dos riscos de doenças cardiovasculares, além de regular o intestino (Raud, 2008).

Os exemplos de alimentos funcionais citados pelo International Food Information Council Foundation (IFIC), órgão que trabalha com questões de comunicação envolvendo consumidores e nutrição nos Estados Unidos, são: frutas, hortaliças, grãos, e alimentos fortificados. Alguns suplementos alimentares (IFIC, 2006) têm sido desenvolvidos para trazer benefícios com relação à regulação de funções corporais, exercendo proteção contra algumas doenças (Bernardes, et al. 2010).

Assim, os alimentos funcionais são conhecidos por desempenharem um importante papel na redução dos riscos a saúde e melhoraria na qualidade de vida. Entretanto, a capacidade de alguns alimentos derivados de plantas em reduzir o risco de doenças crônicas tem sido associada, pelo menos em parte, com a ocorrência de metabólitos secundários, que têm demonstrado exercer uma gama de atividades biológicas. Em geral, esses metabólitos possuem baixo teor de compostos bioativos, quando comparados com medicamentos, mas desde que sejam ingeridos regularmente e em concentrações significativas, como parte da dieta, eles podem ter um efeito fisiológico perceptível em longo prazo (Vo e Kim, 2013; Espín, et al. 2007). Notavelmente, estes resultados são esperados, devido aos efeitos sinérgicos, à segurança, ao estatus econômico, e menos efeitos colaterais do que muitos medicamentos rotineiramente prescritos para o tratamento de certos sintomas (Vo e Kim, 2013; Raskin et al. 2002).

Sendo assim, as frutas e as hortaliças vêm sendo estimuladas desde a década de 80 para consumo na população mundial (Bernardes, et al. 2010; Singh et al. 2003) por apresentarem substâncias que estão relacionadas aos efeitos metabólitos ou fisiológicos no organismo humano, além de estarem vinculadas à atividade antioxidante (ação redutora), como as substâncias fenólicas (Wach et al. 2007).

Nos últimos anos, os pesquisadores têm concentrado esforços significativos na pesquisa de produtos naturais a partir de plantas frutíferas. Embora exista um grande potencial na biodiversidade brasileira, são poucos os trabalhos na área de caracterização de pigmentos a partir de frutos no país. Os

pigmentos naturais, para a química de alimentos, são substâncias com estruturas e propriedades químicas e físicas diferenciadas, agrupados de acordo com suas estruturas químicas em: substâncias heterocíclicas tetrapirrólica; substâncias com estrutura isoprênica; betalaínas; substâncias quinoidais; moléculas ou substâncias aromáticas, como os ácidos fenólicos, os taninos e os flavonoides, que neste trabalho terão maior enfoque (O'Prey et al., 2003; Bobbio e Bobbio, 2001).

3.2- Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários provenientes da rota biossintética dos vegetais e são encontrados principalmente em frutas, verduras e alguns grãos. A concentração de um flavonoide específico pode variar consideravelmente, dependendo de inúmeros fatores, tais como doenças, ataque de insetos e/ou pragas, estresse climático, radiação ultravioleta, entre outros (Haytowitz, et al. 2013; Winkel-Shirley, 2002). Outras fontes da variabilidade podem incluir o cultivar, o local de crescimento, as práticas agrícolas, a colheita, os métodos de armazenamento e as condições de processamento e preparação (Haytowitz, et al. 2013).

Os flavonoides constituem um grande grupo de compostos fenólicos vegetais. Atualmente, mais de 10.000 flavonoides foram identificados (Agati, et al; 2012; Harbone, 1994), embora um número muito menor possui importância do ponto de vista alimentar (Agati, et al. 2012).

A absorção dos flavonoides glicosilados ingeridos na dieta tem sido um tema controverso e evasivo ao longo dos anos. Apesar de muitas respostas já terem sido apresentadas, esta questão está longe de ser resolvida. Mas, acredita-se que estas moléculas altamente polares não poderiam ser absorvidas após ingestão oral, mas hidrolisadas em suas agliconas (as formas sem açúcar) por enzimas bacterianas no lúmen do intestino (Walle, 2004; Griffiths e Barrow, 1972). As agliconas então, podem ser parcialmente absorvidas ou podem ainda sofrer outra biotransformação por bactérias. Outras

evidências sugerem que alguns flavonoides glicosilados podem ser hidrolisados no intestino delgado (Walle, 2004).

Sabe-se que os flavonoides possuem potencial bioativo e devido a isso, têm sido reconhecidos há muito tempo. Na década de 90, o interesse por estes compostos realmente começou e vem crescendo desde então (Erlund, 2004). Várias propriedades exibidas pelos flavonoides incluem a inibição da peroxidação lipídica, atividade anticancerígena e sua capacidade antioxidante (Agati et al. 2012). O potencial em reduzir os riscos de doenças crônicas devido a estas propriedades biológicas tem motivado a comunidade científica para realizar estudos epidemiológicos para observar a ingestão de flavonoides e possíveis associações com a redução do risco para diversas doenças (Haytowitz, et al. 2013).

3.2.1 Propriedades Químicas e Classificação

Os flavonoides são compostos por dois anéis benzênicos (A e B), que são conectados por um anel pireno contendo o oxigênio (C) (Figura 1). Mais de 10.000 substâncias de estrutura compatível aos flavonoides foram identificadas. O grande número de moléculas surge devido à possibilidade das diversas combinações de vários grupos de hidroxila e metoxila, além das reações de redução e oxidação no esqueleto básico dessas moléculas (Agati, et al. 2012; Hodek, et al. 2002).

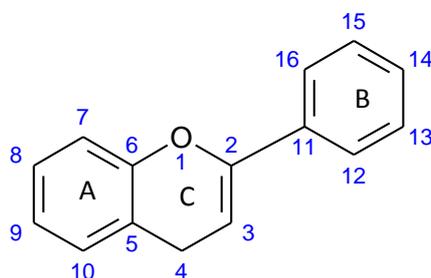
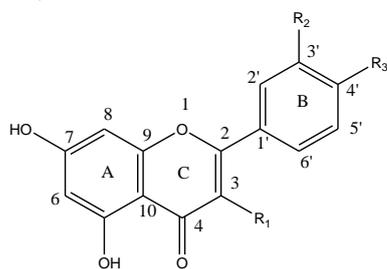


Figura 1- Núcleo fundamental dos flavonoides, ressaltando sua numeração.

Baseado em seu esqueleto, os flavonoides são classificados em seis subclasses (figura 2): flavonóis (1-a) (p.ex., quercetina, kaempferol), contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C; flavonas (1-b)

(p.ex., luteolina, apigenina), contendo apenas carbonila na posição 4; flavanóis (2) (p.ex. catequina) contendo apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; flavanonas (4) contendo apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3; antocianidinas (3) (p.ex., cianidina, malvidina) apenas contendo a hidroxila no C-3; isoflavonas (5) (p.ex., genisteína, gliciteína) em que o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (Otaki, et al. 2009; Ribani, 2006; Ross e Kasum, 2002; Harborne, 1994).

1a e b)

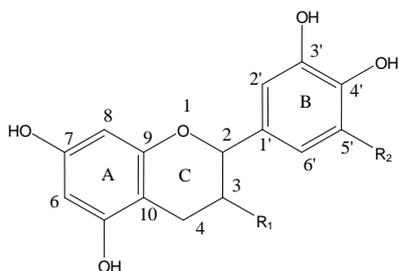
**1-a Flavonóis**

	R ₁	R ₂	R ₃
Quercetina	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	H	OH

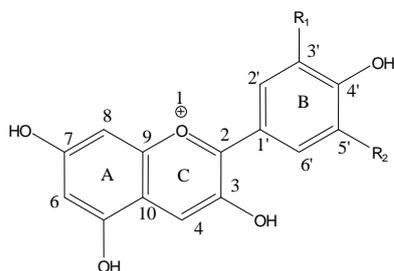
1-b Flavonas

	R ₁	R ₂	R ₃
Luteolina	H	OH	OH
Apigenina	H	H	OH

2)

**2) Flavanóis**

	R ₁	R ₂
Catequina	OH	H

**3) Antocianidina**

	R ₁	R ₂
Cianidina	OH	H
Malvidina	OCH ₃	HCH ₃

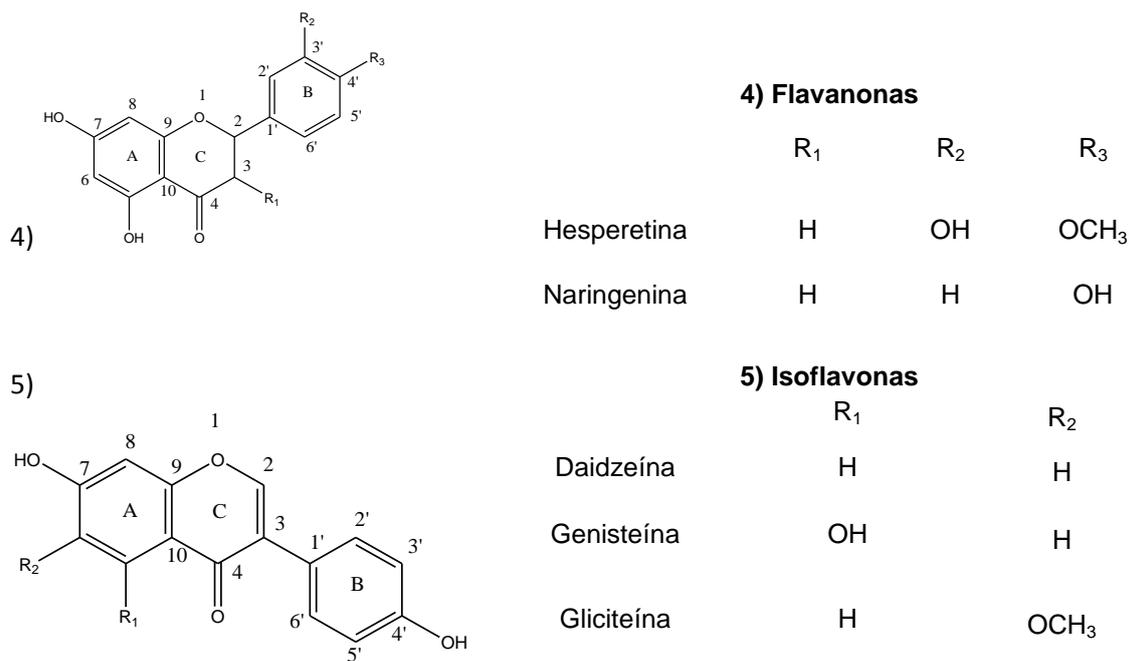


Figura 2 - Algumas subclasses dos flavonoides

Os flavonoides estão presentes em plantas principalmente como glicosídeos. Pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações destes (di-ou trissacarídeos) podem se ligar com os diferentes grupos hidroxilas da aglicona dos flavonoides. A abundância dos flavonoides é o resultado de muitas combinações diferentes destas agliconas com açúcares. As porções de açúcar mais comuns incluem D-glicose e L-ramnose. Os glicosídeos são geralmente O-glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila em C-3 ou na posição C-7 (Erlund, 2004; Hodek, et al. 2002; Willians e Harbone, 1996).

Com relação aos flavonoides isolados a partir do gênero *Schinus*, em que se encontra a espécie *Schinus terebinthifolius*, alvo deste estudo, onze flavonoides foram identificados, entre eles quercetina, isoquercitrina 6"-O-p-hidroxibenzoato, hisperina 2"-O- α -L-ramnopiranosil-6"-O-galato, agastisflavona, robustaflavona, tetraidrorobustaflavona, apigenina, naringina, miricetrina, quercitrina e miricetina (Figuras 8, 9, 10 e 11).

3.2.2- Biossíntese

Os flavonoides, junto com os isoprenoides e alcaloides, compreendem as três maiores classes de metabólitos secundários, são únicos nos vegetais e são parte essencial na adaptação à vida em um ambiente adverso e inconstante (Schijlen et al. 2004; Winkel-Shirley, 2001). Na maioria das espécies de plantas, o excesso de luz e alta radiação UV desencadeiam um aumento na síntese e acúmulo de compostos não fotossintéticos relacionados a via dos fenil propanoides contendo o esqueleto C6-C3 (fenil propano), derivados do ácido cinâmico, sintetizado a partir do ácido chiquímico (Ávila, 2012; Ribani, 2006).

O esqueleto carbônico dos flavonoides resulta de rotas biossintéticas mistas (Figura 3): a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico (Harborne, 1994). A chalcona sintase é a enzima que cataliza a formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonoides são formados, pela condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, (C6-C3). O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canaliza o esqueleto C6-C3 da fenilalanina via ácido *trans*-cinâmico pelo metabolismo de fenilpropanoides. A introdução da função hidróxi na posição 4 do ácido *trans*-cinâmico é catalizada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações, pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil-CoA), substrato preferido pela chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado a partir da acetil-CoA e CO₂. Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, os vegetais sintetizam as diferentes classes dos flavonoides (Ávila, 2012; Ribani, 2006; Forkmann e Martens, 2001).

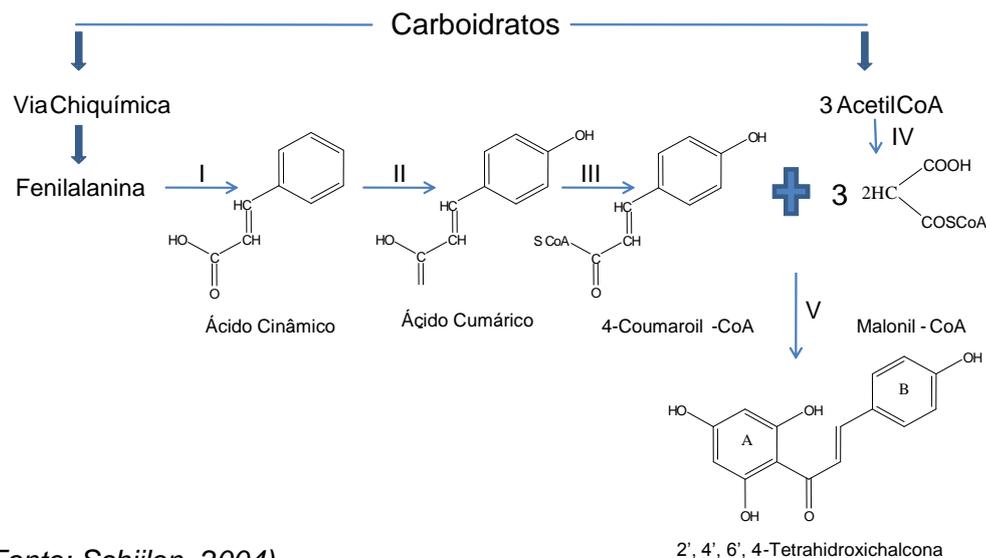


Figura 3 - Biossíntese geral dos flavonoides, ilustrando as etapas da formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonoides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase.

3.2.3- Atividades Biológicas

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre as quais pode citar a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta (UV) e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, e inibidores de enzimas (Povh, et al. 2012; Taiz e Zeiger, 2009).

Em termos alimentares, os compostos fenólicos promovem a inativação ou remoção dos radicais livres formados durante a iniciação ou a propagação da oxidação lipídica, mecanismo responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos. Sendo assim, os flavonoides têm a capacidade de interromper a oxidação lipídica estabilizando por

ressonância os radicais, dessa forma, não tendo a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (Figura 4) (Oliveira, et al. 2009; Ramalho e Jorge, 2006).



(Fonte: Oliveira, et al. 2009)

Figura 4 - Reação simulando a ação antioxidante dos flavonoides.

Com relação aos efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonoides nos humanos, destacam-se as ações como sequestro de radicais livres (antioxidantes), anti-inflamatórias, anti-hepatóxica, antialérgica, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, fungistática, antiviróticos, entre outros (Huang, et al. 2007, Muzitano, et al. 2006). A maioria dos efeitos benéficos para a saúde, atribuídos aos flavonoides, são as suas propriedades antioxidantes e habilidades quelantes. Devido à sua capacidade em inibir a oxidação do LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade), os flavonoides demonstram efeitos cardioprotetores (Heim, et al. 2002). Entre essas ações antioxidantes se destacam a menor taxa de mortalidade por doença arterial coronariana, a menor incidência de infarto do miocárdio em homens mais velhos (Heim, et al. 2002; Hertog, et al. 1993) e a redução do risco de doença cardíaca coronária em 38% em mulheres pós-menopausa (Heim, et al. 2002) em virtude da alta ingestão de flavonoides.

3.3 - Radicais Livres X Antioxidantes

Os radicais livres (RL) são moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (Bernardes, et al. 2010; Schneider e Oliveira, 2004; Fang et al. 2002; Young e Woodside, 2001). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas.

Na atmosfera terrestre as moléculas de oxigênio são as maiores promotoras de reações nas células vivas. Exceto os organismos que são adaptados para viverem na ausência de oxigênio, todos os animais e vegetais necessitam de oxigênio para obtenção de energia (Rodrigues, 2008; Halliwell e Gutteridge, 1985).

Os organismos aeróbicos reduzem parte do O_2 absorvido (95%), formando-se água na cadeia respiratória, nas membranas das mitocôndrias, através do transporte de elétrons, também no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O_2 , pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo 4 elétrons e $4H^+$ para o oxigênio, que se reduz formando água. Como uma pequena parte do oxigênio é reduzida univalentemente, ou seja, a molécula recebe somente 1 elétron, que ocupará um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua desemparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) formando a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, conhecida como superóxido (O_2^-) (Rodrigues, 2008; Halliwell e Gutteridge, 1989).

As ERO's são formadas a partir do oxigênio, e ao mesmo tempo que geram e sustentam a vida, podem por outro lado causar danos irreversíveis. Quando produzidas em excesso são extremamente tóxicas e quando o organismo encontra dificuldades em neutralizá-las, estas se tornam potencialmente perigosas, podendo causar diversas doenças, evidenciando o dano oxidativo causado por essas moléculas (Rodrigues, 2008; Halliwell e Gutteridge, 1989).

Essas moléculas são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios. A peroxidação lipídica é ocasionada pela propagação dos radicais livres através da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e sua terminação ocorre pelo sequestro dos radicais livres por antioxidantes (Korkina e Afans'ev, 1997). As ERO's contribuem para o envelhecimento celular (Sastre, et al. 2000), mutagênese (Takabe, et al. 2001), carcinogênese (Kawanishi, et al. 2001), e doença coronariana (Khan e Baseer, 2000), possivelmente através da desestabilização das membranas (Mariod, et al. 2009; Heim, et al. 2004; Shami e Moreira, 2004).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Elas podem ser geradas por fontes endógenas, que se originam de processos biológicos que ocorrem no organismo como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases ou fontes exógenas como tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Soares, 2002).

As espécies reativas de oxigênio formadas *in vivo*, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, são altamente reativas e potencialmente prejudiciais. Estes são continuamente produzidos no corpo humano, pois são essenciais para o custo energético, desintoxicação, sinalização química, e função imunológica (Ali, et al. 2008; Scheneider e Oliveira, 2004). Devido ao excesso de produção de espécies reativas, induzida pela exposição a substâncias oxidantes externas ou uma falha nos mecanismos de defesa, o dano para as estruturas de células, DNA, lipídios e proteínas pode aumentar os riscos em mais de trinta diferentes doenças, como a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral, câncer e infarto do miocárdio (Halliwell, 2009; Ali, et al. 2008; Degáspari, 2004; Scheneider e Oliveira, 2004). Para tanto é comum o uso de substâncias antioxidantes que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (Ali, et al. 2008; Vicentino e Menezes, 2007).

Os antioxidantes são substâncias químicas que reduzem ou evitam a oxidação e têm a capacidade de neutralizar os efeitos nocivos dos radicais

livres nos tecidos e, portanto, são capazes de proteger contra inúmeras doenças (Ali, et al. 2008; Vicentino e Menezes, 2007).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) (Figura 5). Mas, as possíveis toxicidades dos antioxidantes sintéticos têm sido objeto de estudo há muitos anos (Mariod, et al. 2009). Isso leva ao interesse de antioxidantes oriundos dos produtos naturais.

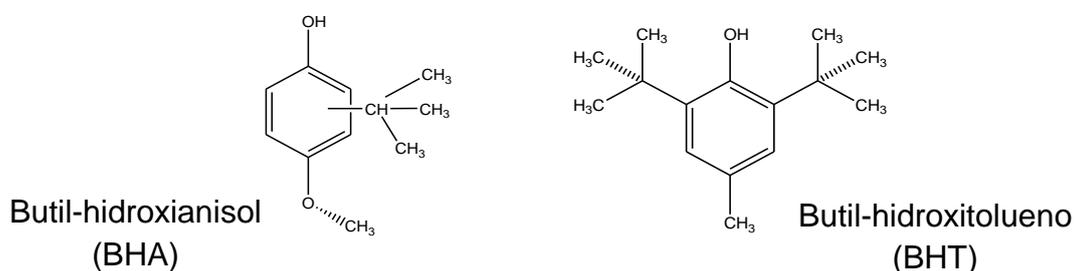


Figura 5 - Estrutura química dos antioxidantes artificiais BHA e BHT.

Durante os anos 90, a American Dietetic Association observou que o consumo regular de frutas, legumes, cereais integrais e outros alimentos que contenham antioxidantes pode fornecer proteção contra determinadas doenças (Mariod, et al. 2009; Bandyopadhyay, et al. 2007). Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo elevado de frutas e legumes reduz o risco de algumas doenças como a arteriosclerose e o câncer (Mariod, et al. 2009; Bandyopadhyay, et al. 2007; Kanner et al. 2001). Além disso, desde a antiguidade, ervas e especiarias eram utilizadas não apenas como aromatizantes em alimentos, mas também pelas suas propriedades medicinais e antissépticas, bem como por sua ação conservante que é resultado de seus componentes com atividade antimicrobiana e antioxidante (Mariod, et al.; 2009; Bandyopadhyay, et al. 2007).

A oxidação lipídica, provocada pelas ERO's, está entre as mais frequentes em alimentos, e desta forma, as reações de oxidação e de atividade microbiana são consideradas como as principais causas da deterioração dos alimentos. Além disso, os alimentos com a presença de bactérias patogênicas

levaram os pesquisadores a estudar novas alternativas para reduzir a incidência de doenças de origem alimentar, através do controle da qualidade microbiológica dos produtos alimentares (Glória, 2013; Ojeda-Sanaa et al. 2013; Rahman e Kang, 2009).

Além das bactérias causarem deterioração nos alimentos que são altamente prejudiciais, sabe-se que os macrófagos, que são fagócitos mononucleares onipresentes em tecidos de mamíferos, são capazes de ingerir e digerir os antígenos exógenos como os micro-organismos e as partículas insolúveis; e os endógenos como restos de células hospedeiras mortas e restos celulares por meio de fagocitose. Durante a fagocitose, um processo metabólico conhecido como “explosão respiratória” ocorre em macrófagos ativadas. Este processo resulta na ativação de uma oxidase ligada à membrana, que catalisa a redução do oxigênio para o anion superóxido, um intermediário reativo de oxigênio que é extremamente tóxico para os micro-organismos. Este anion superóxido também gera outro agente oxidante poderoso que inclui os radicais hidroxila (OH) e os peróxidos de hidrogênios (H₂O₂) (Abbas e Lichtman, 2008). Quando os macrófagos são ativados, eles começam a expressar elevados níveis de óxido nítrico sintase (NOS) que produzem óxido nítrico (NO), o qual tem potente atividade antimicrobiana. Os macrófagos ativados produzem uma série de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI), que têm potente atividade antimicrobiana (Das, et al. 2008).

O radical livre óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização altamente reativa, o que dificulta sua medição direta. O NO tem vários papéis no sistema imune, sendo um agente tóxico para organismos infecciosos, indutor ou supressor de apoptose, imunoregulador principalmente pró-inflamatório, vasoregulador, na agregação plaquetária e também na neurotransmissão (Azadmehr et al. 2009; Bogdan et al. 2001). É um potente vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas, regula o recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos. A expressão aumentada de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) tem sido observada em pacientes com infecção do trato urinário, tuberculose, malária, sepse e no processo de tumorigênese, onde as

altas concentrações de NO são responsáveis pela angiogênese, hiperpermeabilidade vascular e conseqüentemente desenvolvimento do tumor (Guzik et al. 2003). Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobiana (Guzik et al. 2003). Além disso, o NO é produzido em vários locais no corpo e envolve diferentes isoformas da enzima e vias não-enzimáticas. É uma molécula utilizada no reino animal como um sinalizador nos sistemas cardiovascular e nervoso, desempenha um papel de defesa do hospedeiro, ou um agente tóxico entre os micro-organismos e as células (Coleman, 2001; Rang, et al. 2001).

Existem três isoformas de NOS caracterizadas, mas duas são relevantes para efeitos inflamatórios, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Luiking et al. 2010; Sprague e Khalil, 2009; Bogdan et al. 2001).

A eNOS é Ca^{2+} dependente e produz pequenas quantidades de NO. Já a iNOS é normalmente indetectável no tecido vascular saudável, mas é expressa por leucócitos em resposta a estímulos inflamatórios e citocinas. A iNOS produz grande quantidade de NO, sem a exigência de elevados níveis de Ca^{2+} citosólico (Luiking et al. 2010).

A expressão de iNOS catalisa a formação de grandes quantidades de NO, o qual desempenha um papel fundamental na patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias. Portanto, o nível de NO induzido pela iNOS pode refletir o grau de inflamação e fornece um indicativo para avaliar processos inflamatórios (Maalouf, et al. 2010).

A exposição a produtos microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS), dsRNA ou citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF- α e IFN- γ induz a expressão do gene da iNOS em várias células inflamatórias (Korhonen et al. 2005).

A produção de NO aumenta durante a inflamação e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios. Muitas patologias procedem ou são acompanhadas de um processo inflamatório agudo e/ou crônico, com elevada produção de mediadores químicos de forma a ocasionar lesão tecidual, disfunção de múltiplos órgãos e em último caso, o óbito (Skippen et al. 2008).

Anormalidades associadas com inflamação são observadas em arteriosclerose, doença de Alzheimer, câncer, tuberculose e sepse (Gaestel et al. 2009).

Durante a sepse ou choque hemorrágico em seres humanos um estado inflamatório desenvolve. Isto também está associado com um aumento da expressão de moléculas de adesão nos fagócitos sanguíneos (monócitos e neutrófilos) e células endoteliais (Ward, 2010), que conduz a um aumento de neutrófilos, e monócitos nos órgãos com o objetivo de eliminar os micro-organismos. Juntamente com os produtos de ativação, e com os produtos dos neutrófilos, monócitos e células dendríticas que provavelmente contribuem para lesões de órgãos e letalidade na sépsis (Bosmann e Ward, 2013; Ward, 2010). Sendo assim, resultados experimentais mostram que compostos capazes de inibir a produção de NO, por inibir a expressão ou a atividade da iNOS, possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios e antioxidantes (Hamalainen et al. 2007), bem como bactericidas (Bosmann e Ward, 2013).

3.4 – Atividade Antimicrobiana

De acordo com González-Lamothe e colaboradores (2009), os produtos do metabolismo secundário das fontes vegetais podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multiresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção. Sendo assim, a busca por substâncias com atividades antimicrobianas e antioxidantes é uma prioridade em vista do surgimento de cepas patogênicas resistentes e do aumento das doenças degenerativas. De acordo com Batista (2011), as infecções podem ser classificadas em três tipos: I-emergentes e reemergentes, que correspondem a doenças novas ou modificadas que estão aumentando ou possuem potencial para aumentar no futuro próximo. II – oportunistas, quando acometem pessoas com sistema imunológico deprimido. III - hospitalares ou nosocomiais, quando ocorrem em ambiente hospitalar. Entre essas últimas, o surgimento de infecções na

comunidade deu origem a micro-organismos que, de alguma forma, ganham acesso a ambientes hospitalares causando novos casos dessas doenças.

Entre os micro-organismos que provocam as infecções oportunistas estão as bactérias e os fungos, sendo que a OMS (Organização Mundial da Saúde) preocupa-se com o fato de que estas infecções são provocadas por cepas resistentes. Estas são mais virulentas e não se enquadram no espectro de medicamentos atuais. De acordo com a OMS estas infecções causam 25% de mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos (Wannmacher, 2004).

É preciso abordar a resistência bacteriana sob vários aspectos. Desde o estudo dos processos relacionados à ação dos antibióticos até a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes e sua posterior aplicação terapêutica, que deve ser de forma racional. Além disso, se faz necessário a adequação de normas para controle de infecções hospitalares, destacando que estes diferentes níveis de ações devem ser contínuos e interligados (Silveira et al. 2006).

Dessa forma, há a necessidade de se buscar substâncias com potencial antibacteriano e antioxidante (Ravishankar et al. 2012; Park et al. 2009). Assim, encontra-se nas plantas uma fonte de compostos com tais propriedades. As atividades antimicrobianas e medicinais comprovadas a partir das plantas foram suscitando o interesse de pesquisadores como uma alternativa ao uso de produtos sintéticos (Millezi et al. 2012).

Dentre as diversas bactérias que têm o seu crescimento avaliado a partir de extratos de plantas encontram-se as do gênero *Staphylococcus*. Essas bactérias estão entre as mais frequentemente isoladas em clínica microbiológica e estão se tornando cada vez mais importantes, especialmente por serem consideradas uma das principais causas de infecções hospitalares e toxinfecções em alimentos (Vuong et al. 2000).

Existem aproximadamente 250 tipos de doenças alimentares e, dentre elas, muitas são causadas por micro-organismos patogênicos, os quais são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e expressivas perdas econômicas. As síndromes, resultantes da ingestão de alimentos contaminados por esses micro-organismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por

Alimentos (DTA) (Oliveira et al. 2010; Buzby e Roberts, 2009), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) ou simplesmente toxinfecções (Buzby e Roberts, 2009). Uma ampla diversidade de bactérias patogênicas tem sido relacionada às doenças de origem alimentar, sendo as principais: espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Cruz-Galvez et al. 2013; Castillo et al. 2009).

Infecções causadas por *Staphylococcus* são de grande importância não só para medicina humana, mas também, para a medicina veterinária. Os *Staphylococcus* são um grupo de bactérias esféricas, com forma de cocos gram-positivos. Possuem aproximadamente de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro de comprimento, sendo ainda imóveis, não formadoras de esporos e geralmente não encapsuladas. É considerado um dos micro-organismos mais comuns nas infecções que produzem pus em todo o mundo (Polakowska et al. 2012; Santos et al. 2007).

O gênero *Staphylococcus* é formado por 33 espécies, sendo que, 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente as bactérias pertencentes a esse gênero fazem parte da microbiota normal da pele humana e de outros sítios anatômicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) relacionou as espécies mais importantes na clínica para *Staphylococcus*, sendo que as espécies de maior interesse são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, as quais são frequentemente relacionadas a diversas infecções em seres humanos (Glória, 2013; Santos et al. 2007; Cassettari et al. 2005).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. Este micro-organismo pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculo e celulite) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e outras) (Bauer et al, 1960).

Os agentes antimicrobianos têm sido utilizados desde a década de 20 no tratamento de doenças infecciosas. Estes agentes têm grande potencial para reduzir doenças e tratar pacientes infectados. Desde a sua primeira introdução, o uso de antibióticos tem se tornado comum em todo o mundo por causa de sua eficácia contra agentes microbianos (Zinner, 2007, Bauer et al, 1960). No

entanto, devido ao seu uso indiscriminado, as bactérias desenvolveram resistência contra vários antibióticos. Esta situação levou a uma redução na eficácia da terapia convencional (antibióticos) (Allahverdiyev, et al. 2013).

Confirmam-se tais informações a partir de estudos realizados em pacientes com infecção na corrente sanguínea onde, foi demonstrado que *S. aureus* foi a bactéria predominante em 118 episódios e destes, 66 eram resistentes à meticilina (Guilarde et al. 2007).

Já foi estudada a transmissão de *S. aureus* resistente à meticilina durante tratamento dentário. Em experimento realizado no período de um ano, com placas de Petri com meio de cultura adequado foram expostas ao ambiente, tendo como resultados uma significativa contaminação por *Staphylococcus* spp no ambiente clínico, sendo que dos 32,2% exemplares, 0,45% foi de *S. aureus*, alguns resistentes a ampicilina, eritromicina e tetraciclina, sugerindo a existência de isolados multiresistentes (Bernardo et al. 2005).

Dessa maneira, as plantas e seus metabólitos secundários estão entre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, algumas são utilizadas pela medicina popular no tratamento de doenças infecciosas, como antioxidantes e estudos com base nesse conhecimento confirmam o uso de algumas espécies (Bernardo et al. 2005).

Alguns estudos indicam uma relação entre a capacidade de sequestro de radicais livres e atividade antibacteriana dos extratos a partir de fontes vegetais (Glória, 2013; Radovanovic et al. 2009; Ahmad et al. 2005; Copland et al. 2003). No trabalho de Radovanovic e colaboradores (2009), amostras ricas em polifenóis e antocianinas tiveram uma boa atividade antioxidante associada a uma significativa inibição no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo assim, a busca por substâncias antioxidantes é de extrema importância.

3.5- Material vegetal

O Brasil, até a primeira metade do século XX, era essencialmente rural e utilizava a flora medicinal, não importando se as plantas eram nativas ou introduzidas de outros países. Hoje, a medicina popular do país é o reflexo da união étnica entre os diferentes imigrantes que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração em geração (Lorenzi e Matos, 2002).

Apesar da ampla utilização de plantas medicinais pela população e da riqueza da flora brasileira, existe o consenso sobre os poucos estudos científicos acerca do assunto. Portanto, torna-se necessário estimular a realização desses estudos, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais como sociais. E visando esta melhoria e aumento da descoberta de novos fitoterápicos, bem como novas pesquisas científicas, o SUS, desde 2009 ampliou o RENISUS, que é Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Ministério da Saúde, 2009).

De acordo com Koehn e Carter (2005), o grande empecilho que continua a afetar o estudo e a descoberta de um fármaco oriundo de um produto natural é o isolamento e a purificação dos princípios ativos. Muitas vezes, os princípios bioativos representam muito menos de 1% em peso do extrato bruto e embora avanços na tecnologia de separação, tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), originar grandes avanços na resolução, muitas vezes a etapa de purificação no processo é limitante. O desafio é duplo: primeiro, deve-se correlacionar os sinais biológicos de interesse, e em segundo lugar, deve-se planejar métodos de separação para produzir quantidades suficientes do material puro. E sendo assim, grandes quantidades de material são requeridas.

Tendo em vista esta questão e o crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo é necessário pensar no uso sustentável das plantas, e como alternativa, um estudo com a propagação *in vivo* e *in vitro* destas espécies vegetais seria de grande interesse, visto que esta é uma técnica que pode fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para

plantios no campo, tanto na área florestal quanto na agrônômica e na hortigranjeira (Abreu et al. 2003).

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira e faz parte da diversidade da região de Campos dos Goytacazes (Carvalho, et al. 2006). Seus frutos são utilizados como condimentos na culinária, e popularmente é empregada como anti-inflamatória e febrífuga. A importância do estudo com esta planta tem promovido a sua inclusão na Farmacopeia Brasileira (Brandão et al. 2006), bem como é uma das 79 plantas de interesse do SUS.

3.5.1- Descrição Botânica

Anacardiaceae é uma família botânica representada por 70 gêneros e cerca de 700 espécies. No Brasil ocorrem cerca de 15 gêneros e cerca de 70 espécies. Possuem distribuição tropical e subtropical (Souza e Lorenzi, 2005).

Schinus terebinthifolius Raddi é largamente distribuída por todo território brasileiro, de Alagoas até Rio Grande do Sul e pode ser encontrada na Europa, onde a cultivam como espécie ornamental (Corrêa, 1984). É conhecida por diversos nomes populares, como aroeira-mansa, aroeira-vermelha, araguaraíba, brasilian pepper, christmas berry, false pepper, entre outros.

A aroeira é uma árvore de médio porte. Atinge a altura de 5 a 10 metros. Suas folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminente na parte de cima do limbo.

Os frutos (Figura 6) são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. A casca é vermelha, seca e envolve a única semente, que é única, marrom-escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (Degáspari, et al. 2005).



Figura 6 - Os frutos de *Schinus terebinthifolius*

Este fruto insere-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O seu sabor suave e levemente picante, como sua bonita aparência, de uso decorativo, permite o seu emprego podendo ser utilizado na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, a aroeira é utilizada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes (Degáspari, et al. 2005).

3.5.2 Propriedades Químicas

A aroeira tem sido frequentemente estudada sob o ponto de vista químico e já foram relatados a presença de várias substâncias tais como: terpenos (Lloyd et al. 1977; Campello e Marsaioli, 1975) fenóis (Bernardes, 2010; Ceruks et al. 2007; Stahl et al. 1983), Pentagaloliglicose - precursor de muitas estruturas complexas de taninos (Bernardes, 2010; Hayashi et al. 1989) e flavonoides (Bernardes, 2010; Degaspari et al. 2005; Kassem et al. 2004). Além disso, a análise química da casca de *Schinus terebinthifolius* provou a existência de antraquinonas, xantonas e esteroides livres (Lima et al. 2009).

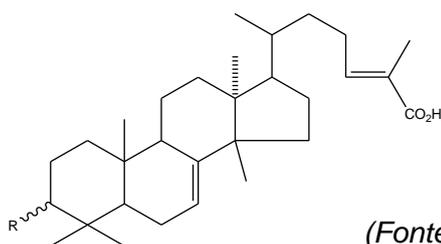
Para uma melhor organização para esta espécie, serão apresentadas as substâncias isoladas a partir dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, seguido das pesquisas a partir das folhas da fonte vegetal.

Dentre os terpenoides, dois triterpenos isolados a partir do extrato de acetato de etila dos frutos de *S. terebinthifolius* foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A₂ (Jain, et al. 1995). Onde 1 representa o

ácido masticadienoico e 2 representa o álcool schinol, sua estrutura molecular está esquematizada na Figura 7.

De acordo com o trabalho de Degáspari e colaboradores (2005), os frutos da aroeira-vermelha apresentam baixo teor de compostos fenólicos, quando comparados a outros vegetais.

1 R = α -OH, H; 2 R = (=O)



(Fonte: Jain, et al., 1995)

Figura 7 - Estrutura molecular do ácido masticadienoico e do álcool schinol.

O extrato alcoólico apresentou concentração significativa da flavona apigenina (Bernardes, 2010), além de ácido elágico. Já na amostra obtida a partir do extrato aquoso, foi avaliada baixa concentração da flavanona naringina (Figura 8) (Degáspari, et al. 2005).

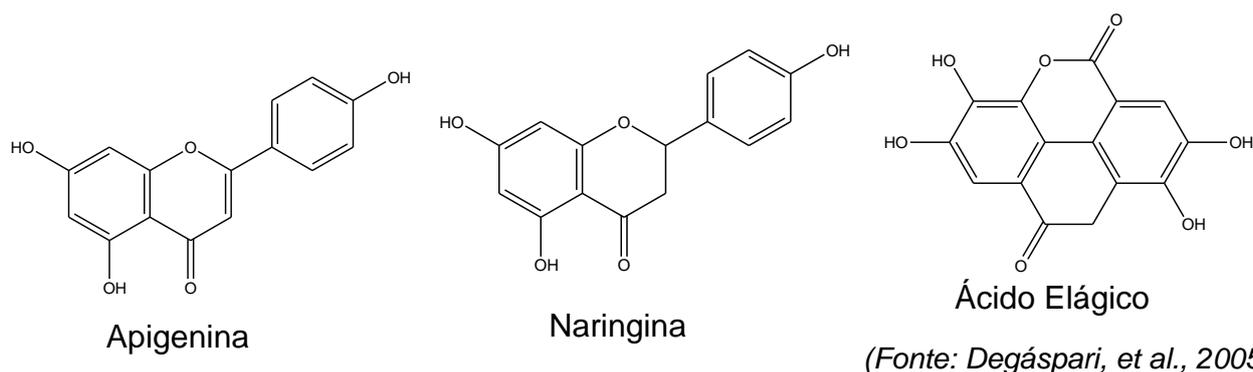


Figura 8 - Estrutura química dos constituintes caracterizados a partir dos frutos da aroeira.

Já foram identificados e isolados os biflavonoides agatisflavona, robustaflavona e tetrahidrorobustaflavona nos frutos (Kassem et al. 2004) (Figura 9).

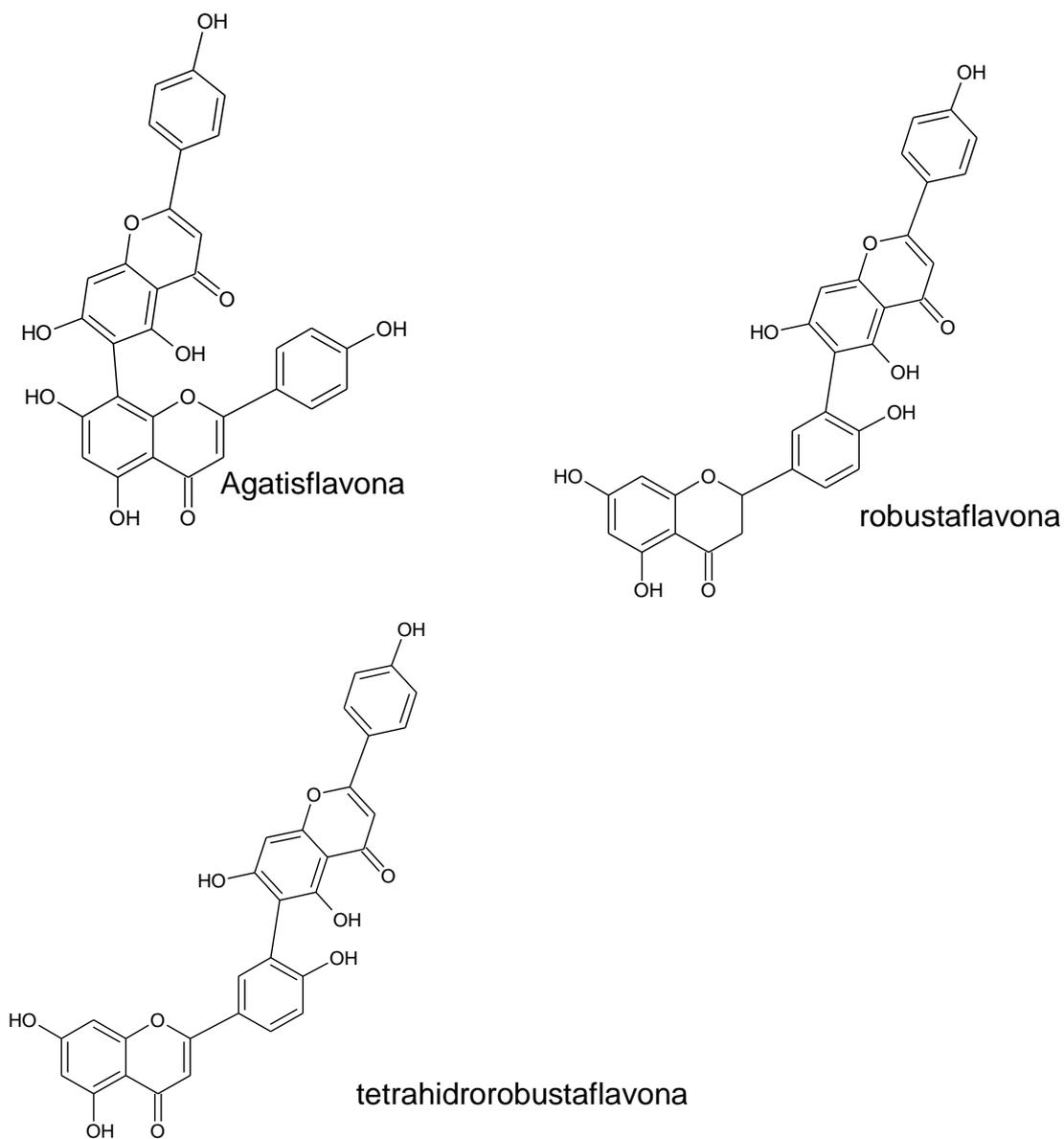


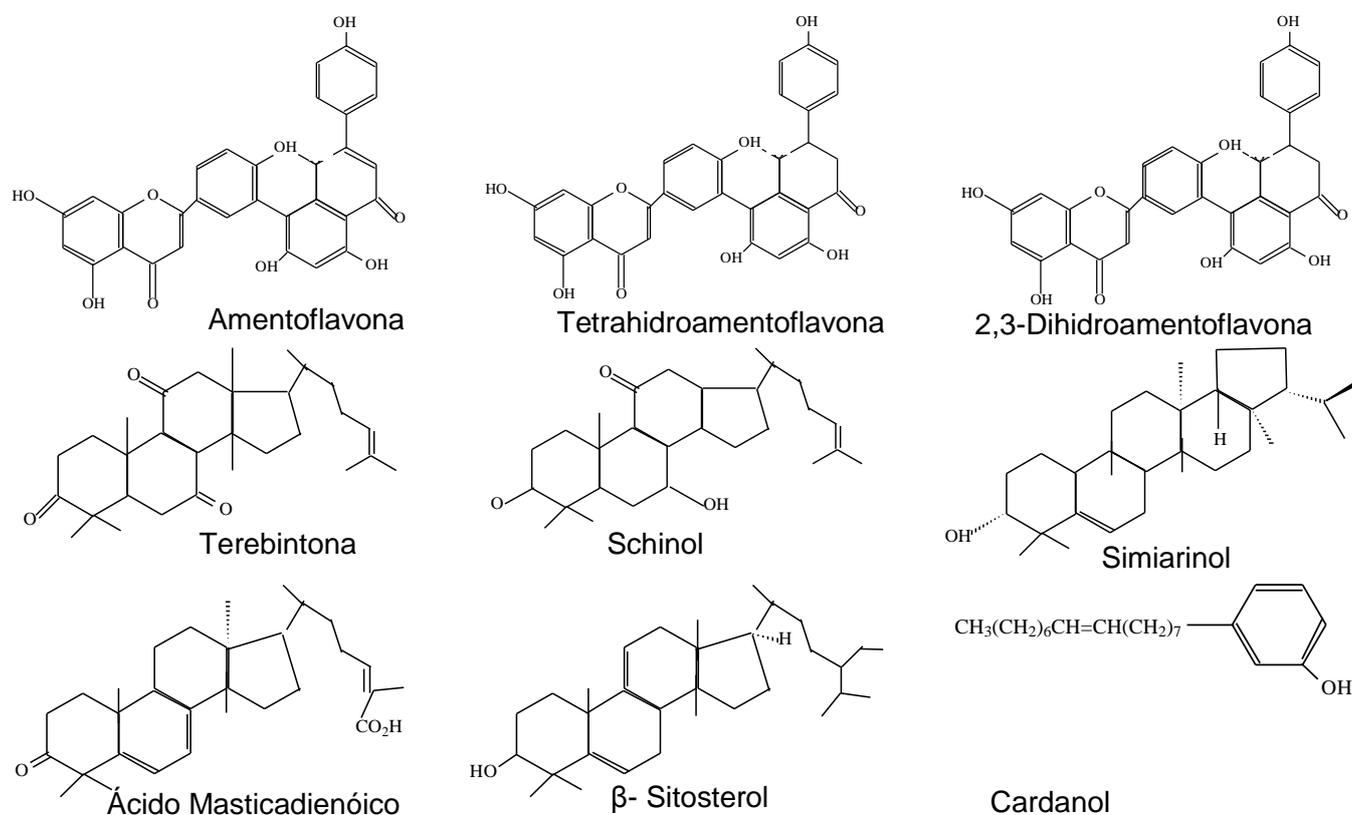
Figura 9 - Estrutura química dos biflavonoides isolados a partir dos frutos da aroeira.

No trabalho de Barbosa e colaboradores (2007), foram analisados os óleos voláteis dos frutos e das folhas de *Schinus terebinthifolius*. Entre as

amostras de óleos presentes nas folhas frescas, folhas frescas em floração e nos frutos verdes se observa a predominância dos mesmos constituintes químicos, destacando-se os compostos β -pineno (10,21%), α -terpineol (5,35%), β -elemeno (5,92%), (E)-cariofileno (13,61%), germacreno-D (37,55%), biciclogermacreno (20,82%), Epi- α -murolool (9,89%), δ -cadineno (15,48%) e α -cadinol (20,60%), a maioria sesquiterpenos.

A amostra de óleo presente nos frutos maduros e na amostra de óleo comercial, destacam-se os compostos α -pineno (18,82%), β -pineno (5,02%), α -felandreno (23,55%), δ -3-careno (29,22%), β -felandreno (18,08%) e germacreno-D (11,89%), a maioria monoterpenos.

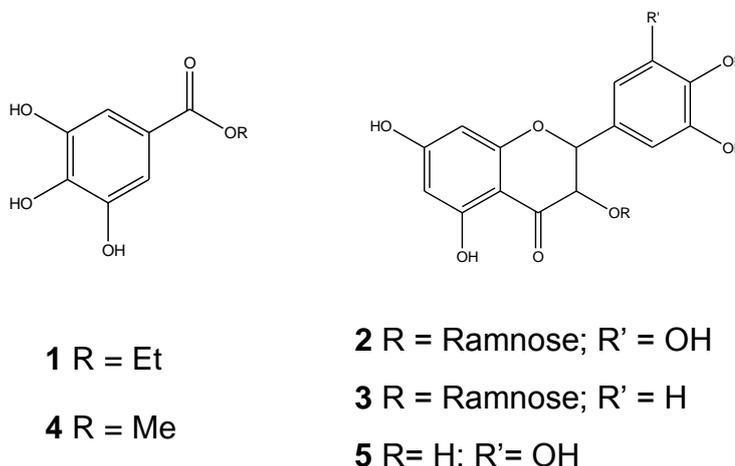
A partir das folhas de *S. terebinthifolius*, Viana, et al. (1995) relataram a detecção dos flavonoides amentoflavona, tetrahydroamentoflavona, 2,3-dihidroamentoflavona, dos esteroides schinol, simiarinol e β -sitosterol, além do ácido masticadienóico e do álcool de cadeia longa cardanol (Figura 10).



(Fonte: Viana, et al., 1995)

Figura 10 - Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

No trabalho de Ceruks e colaboradores (2007), a partir das folhas de *Schinus terebinthifolius*, foram isolados a partir da fração em acetato de etila, oriunda do extrato em etanol, o galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricetina (5), como mostra a Figura 11.

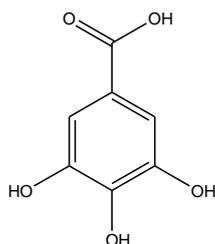


(Fonte: Ceruks, et al., 2007)

Figura 11 - Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

No trabalho de Santos (2009), foi isolado a partir das folhas de aroeira o ácido gálico (Figura 12) com potencial alelopático.

Com relação aos flavonoides isolados de *Schinus terebinthifolius* destacam-se seis relatos sobre o isolamento dos flavonoides a partir das folhas, os flavonoides são amentoflavona, tetrahydroamentoflavona, 2,3-dihydroamentoflavona (Viana, 1995), miricetrina, mirecitina e quercetrina (Ceruks et al. 2007).



(Fonte: Santos, 2009)

Figura 12 - Estrutura química do ácido gálico isolado das folhas de aroeira.

Outro dado interessante com relação a *Schinus terebenthifolius* consiste na resina proveniente de suas cascas, que pode ser utilizada para o preparo da própolis. A própolis, substância resinosa coletada a partir de várias fontes vegetais de diversas partes das plantas por abelhas, tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa (Silva, 2008). Dados relatam que no Brasil, ainda não foi possível identificar as diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para retirada de resina, mas o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), o pinheiro (*Pirus* sp.), a aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e o eucalipto (*Eucalyptus* sp.) são alguns exemplos (Abreu, 2008; Simões, 2007; Pamplona, 1997). A importância de se estudar os componentes da própolis e a origem da resina estão no fato que os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis são os flavonoides como a galangina (Mendonça, 2011).

Com relação aos frutos, parte da planta escolhida para esse trabalho de doutorado, apenas o ácido gálico (Santos, 2009), dois flavonoides foram identificados apigenina (Bernardes, 2010; Degáspari, et al. 2005) e naringina (Degáspari, et al. 2004), e os biflavonoides agatisflavona, robustaflavona e tetrahidrorobustaflavona (Figura 13) (Kassem, et al. 2004), o que faz desta parte da planta alvo de pesquisas.

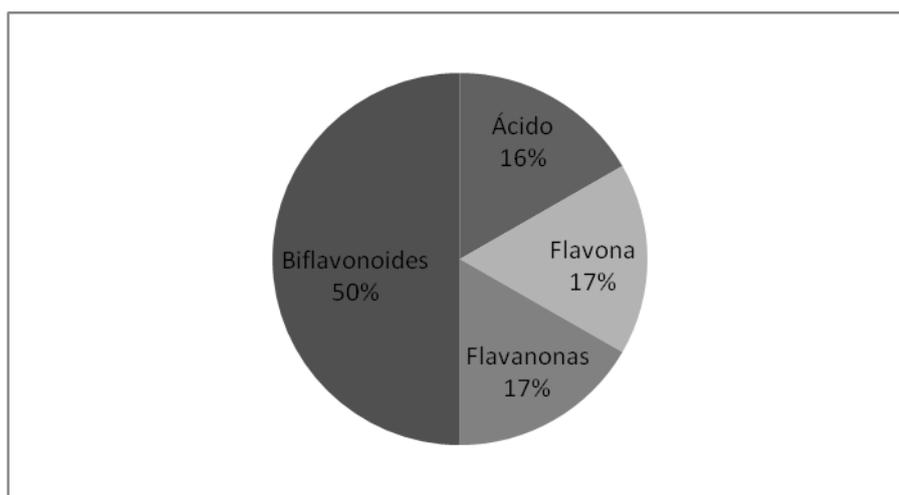


Figura 13 - Gráfico representando a porcentagem de ácidos e flavonoides nos frutos de aroeira.

3.5.3- Propriedades Biológicas

As atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* que são relatadas para os extratos de *Schinus terebinthifolius* possuem ação como antibacteriana, antifúngica, leishmanicida e cicatrizante (Lima et al. 2006; Lucena et al. 2006). Contudo, os dados de literatura indicam que o principal estudo com esta planta seria relacionado à atividade antimicrobiana (Lima et al. 2009; Lima et al. 2006; Degáspari et al. 2005), onde o extrato hidroalcoólico das folhas de aroeira mostrou significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando, também, ação antifúngica contra *Candida albicans*, em concentrações de 12,6 e 6,3 mg/mL (Martinez et al. 1996). Em outro estudo realizado por Lima et al. (2006; 2009), o extrato etanólico das cascas de *Schinus terebinthifolius* (1 mg/mL), demonstrou excelente atividade contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, apresentando a concentração mínima inibitória (MIC) \leq 100mg/mL. Ainda em relação à sua ação antimicrobiana, observa-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e do *Bacillus cereus* ATCC 11778. O extrato aquoso não apresentou efeito inibitório aos micro-organismos testados (Degáspari, et al. 2005).

As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentam propriedades adstringente, antidiarreica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga (Ceruks, et al. 2007).

Em um estudo realizado por Braga e colaboradores (2007), foi considerado que entre os 24 extratos metanólicos utilizados contra *Leishmania amazonensis*, o extrato preparado a partir das folhas de *Schinus* se apresentou como potente inibidor do crescimento do micro-organismo.

Cavalher-Machado e colaboradores (2008), ao avaliar a fração em acetato de etila das folhas de aroeira, estas mostraram propriedade antialérgica, inibindo a liberação de histamina durante a degranulação dos mastócitos, diminuindo a formação de edema e influxo de eosinófilos.

Além destas atividades, estudos na literatura mostram o potencial antioxidante observado para o extrato metanólico das folhas da aroeira quando comparadas com o radical livre DPPH, onde o valor do IC₅₀ para o extrato a

partir das folhas é de 8.8 µg/mL de amostra para reduzir completamente esta espécie radicalar (Ceruks, et al. 2007).

Aos frutos desta espécie vegetal, atribui-se propriedade diurética (Corrêa, 1984), entretanto, a maior aplicabilidade se encontra na culinária, sob a forma desidratada dos frutos que são conhecidos como pimenta rosa.

Em 1999 foi lançada, no Brasil, uma preparação farmacêutica em gel contendo extrato de aroeira. Este fármaco é utilizado no tratamento da vaginose bacteriana e apresentou taxa de cura de 84% para o grupo dos tratados com o gel, contra 47,8% para o grupo do placebo. O gel foi lançado no mercado farmacêutico do Brasil com o nome de Kronel® (Hebron Laboratório, Brasil) (Leite, et al. 2010; Amorim e Santos, 2003).

Com relação aos testes *in vitro* já descritos na literatura para a espécie *Schinus terebinthifolius* destacam-se o trabalho de Jain e colaboradores (1994), onde dois triterpenoides estruturalmente relacionados, ácido masticadienoico e ácido masticadienólico (schinol) foram identificados e caracterizados como inibidores competitivos específicos da fosfolipase A2, uma enzima envolvida no processo inflamatório. Uma vez que a fosfolipase A2 é utilizada para controlar uma variedade de processos que vão desde a mobilização de eicosanoides no metabolismo de fosfolídeos, os inibidores desta fosfolipase poderiam ser úteis para controlar processos inflamatórios, tais como, artrite reumatoide, asma e psoríase (Jain et al. 1994).

Testes de citotoxicidade com extratos de aroeira foram testados contra células de linhagens tumorais como HCT-8 (carcinoma do cólon humano), HL-60 (leucemia), SF-295 (cérebro) e MDA-MB-435 (melanoma), apresentando forte citotoxicidade com valores de IC₅₀ inferiores a 5 µg/mL (Mesquita et al. 2009).

No trabalho de Bernardes (2010) foi verificada a ação do extrato de aroeira frente ao óxido nítrico (NO), pois os compostos capazes de inibir a produção de NO, pela supressão da expressão ou da atividade da iNOS (enzima responsável pela produção de NO), possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios (Hamalainen et al. 2007). Neste trabalho foi verificado que o extrato metanólico de aroeira apresentou capacidade inibitória de produção de óxido nítrico (NO) ($0,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, para a concentração de 500

$\mu\text{g/mL}$, e na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi $2,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$). Com relação ao conjunto, resultante do fracionamento cromatográfico em coluna aberta de fase inversa RP-2, este mostrou maior capacidade de inibir a produção de NO, visto que nas três concentrações testadas (500 , 100 e $20 \mu\text{g/mL}$) houve quase que completa inibição desta produção ($0,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, e a concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi $2,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$). A substância isolada apresentou inibição da produção de NO até mesmo na concentração de $0,8 \mu\text{g/mL}$. Com relação à toxidez, o extrato e conjunto apresentaram em torno de 50% de toxicidade na maior concentração, sendo esta toxidez diminuída, nas menores e com a purificação do extrato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos relacionados à parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), com a colaboração dos Laboratórios de Biologia do Reconhecer (LBR), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) para toda a parte imunofarmacológica, e do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) para a parte biológica, todos os laboratórios pertencentes à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

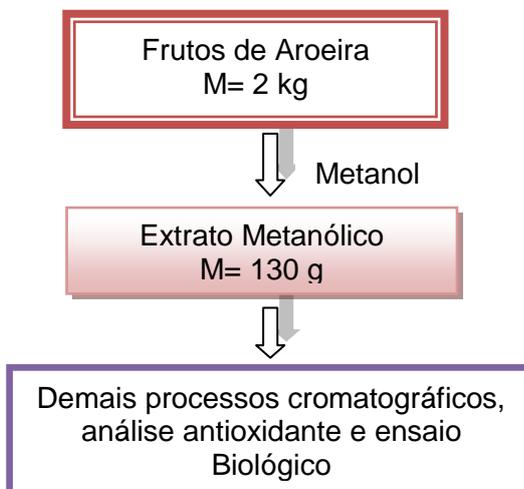
4.1 Coleta de material vegetal

Os frutos maduros de aroeira foram coletados no distrito de Farol de São Tomé, localizado no município de Campos dos Goytacazes - RJ (Latitude = 21° 44' Sul; = 41° 18' Oeste = altitude 12 m do nível do mar), no mês de março de 2010. Os períodos de frutificação são nos meses de março e abril. A exsicata foi depositada no herbário da UENF sob o código H 5073.

4.2- Preparo do extrato metanólico

Os frutos foram limpos, e secos à temperatura ambiente, durante um dia. Depois foram submetidos à extração exaustiva, por maceração estática com

metanol (esquema 1), durante 30 dias, sendo filtrados 2 vezes por semana. O extrato foi evaporado a 35°C em banho-maria ao abrigo da luz (AOAC, 1995).



Esquema 1: Obtenção do extrato metanólico dos frutos de aroeira.

4.3- Fracionamento do extrato, isolamento e identificação da substância

Após o preparo do extrato, foram realizadas técnicas para isolar e identificar as substâncias com características semelhantes às substâncias aromáticas. Para essa finalidade foi utilizada a técnica de partição com o solvente acetato de etila, onde a partir desta etapa foram obtidas duas frações, uma aquosa e outra orgânica, onde se concentraram as substâncias de interesse.

Neste trabalho, algumas técnicas cromatográficas foram utilizadas como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que consiste em placas cromatográficas impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ em Alumínio, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm) sendo cortadas na medida de 4 cm de comprimento. As aplicações das amostras foram feitas a aproximadamente 0,7 cm acima da borda do inferior da placa e cerca de 0,5 cm de distância das bordas laterais. Para a separação de flavonoides, a fase móvel preparada foi acetato de etila:hexano (75:25) (Mabry, et al. 1970).

Após o desenvolvimento da cromatografia, é necessário o uso de reveladores químicos e físicos (Sabudak et al. 2005). Neste caso, as placas com sílica estavam pré-impregnadas com material fluorescente, portanto,

reveladas sob lâmpada de ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 332 nm (método físico). Como revelador químico foi utilizado a solução ácida sulfato cérico, que para o seu preparo é necessário ácido sulfúrico concentrado (98%) e água. Após o preparo deste revelador, ele foi borrifado na placa cromatográfica e depois de aquecido, as manchas que apresentaram coloração amarela são características para os flavonoides e moléculas aromáticas e assim, de interesse (Sabudak et al. 2005).

Após a avaliação por CCD, a fração orgânica foi fracionada por Cromatografia em Coluna (CC) para purificação e as subfrações oriundas acompanhadas por CCD seguindo o protocolo acima. As sílicas para a montagem das colunas para a cromatografia utilizadas neste trabalho foram:

1- Sílica de fase inversa RP-2. Esta denominação se deve ao fato de sua fase estacionária ser não-polar, geralmente um hidrocarboneto, contendo, geralmente, grupos de alcanos saturados como as cadeias de C₈ ou C₁₈, que formam uma camada apolar sobre o suporte (Hage e Carr, 2012), e a fase móvel é relativamente polar, como água. Essa denominação é o contrário do sistema cromatográfico que utiliza a fase normal, onde a fase estacionária é altamente polar, como água, suportadas em partículas de sílica, e a fase móvel é relativamente não-polar, como hexano, de modo geral, contém grupos capazes de formar ligações de hidrogênio ou de sofrer interações de dipolo, retendo assim compostos polares mais fortemente (Skoog, et al. 2002);

2- Sílica para a cromatografia de exclusão por tamanho. Este empacotamento consiste de partículas pequenas (~ 10 µm) de sílica ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a serem eluídas. Moléculas com diâmetro menores que dos poros podem penetrar através do emaranhado de poros e ficar retidas por tempos maiores, e estas são as últimas a serem eluídas. A sílica utilizada foi o gel de Sephadex LH-20 (Skoog, et al. 2002).

Outras técnicas cromatográficas foram empregadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que é uma técnica que apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do

detector utilizado, da informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004). Esta técnica foi empregada a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico do extrato.

As análises por CLAE neste estudo foram realizadas no aparelho:

1. Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 332 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 μ L.

A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250 mm). O sistema de solvente foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,5) e acetonitrila, a eluição foi gradiente, conforme ilustrado na tabela 1, usando fluxo de 1 mL/min. O extrato metanólico foi preparado na concentração de 6 mg/mL (p/v), e as frações foram preparadas nas concentrações de 1 mg/mL.

Tabela 1: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE

Tempo (min)	Concentração de A Água Acidificada (pH 3,5)	Acetonitrila
0	100	0
5	75	15
10	80	20
15	70	30
20	60	40
25	59	41
30	58	42
40	50	50
45	100	0

Para a quantificação das substâncias isoladas foi realizada uma curva padrão (área do pico X massa em μ g) utilizando-se uma amostra pura da substância isolada. Foi preparada uma curva padrão nas concentrações de 25, 50, 100, 500 e 1000 μ g/mL.

Para a identificação e caracterização dos pigmentos isolados foi necessária a utilização de métodos espectroscópicos como a Ressonância

Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , que é uma técnica espectroscópica importantíssima para a elucidação estrutural da molécula. O espectro de RMN fornece um mapa do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado.

O equipamento utilizado foi:

- Varian 400 MHz, do LAMAR - NPPN/ UFRJ (Laboratório de Análises Multiusuários por RMN);
- Bruker 400 MHz do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones (Departamento de Bioquímica - UFRJ).

Para a realização desta tese de doutorado foram utilizadas técnicas químicas e biológicas. Tais métodos seguem abaixo.

4.4- Atividade Antioxidante

4.4.1 – Sequestro do Radical Livre DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).

Este método se baseia no sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) pelos antioxidantes, que produzem uma diminuição de absorção em 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor (Ali, et al. 2009).

Essa técnica química consiste em adicionar 1 mL do extrato em concentrações que variam de 0,1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$. A este foi adicionado 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), a reação foi processada em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade sequestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância

aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT), quercetina, rutina e ácido ascórbico. Posteriormente, foi calculado o percentual sequestrador (PS%) de radicais livres (Koleva et al. 2002). A capacidade de sequestrar radical livre será expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{DPPH}}) * 100$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorvância da amostra em solução.

4.4.2- Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP

O método do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se baseia em reações de transferência de elétrons. Esta metodologia foi desenvolvida como alternativa para análise de fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros, podendo ser aplicada tanto para estudos da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, como em substâncias puras (Tiveron, 2010; Pulido et al. 2000).

A reação ocorre pela formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe (III), de cor amarelada. Na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, dando origem ao $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de colocação azul-escura.

A reação acontece em pH de 3,6 e a absorvância máxima é de 595 nm. Os valores de pH têm efeito importante na redução da capacidade de antioxidantes. Em condições ácidas, a redução da capacidade pode ser suprimida devido à protonação com compostos antioxidantes, enquanto que em meio básico, ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos que podem aumentar a capacidade de reduzir uma amostra (Huang, 2005).

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com algumas modificações para diminuir o volume final da solução, visto a pouca

massa resultante do fracionamento. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 150 µL de extrato foi adicionada a 2850 µL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas a 595 nm após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi feita com Trolox (50-2000 µM), e os resultados foram expressos em µM trolox/g amostra.

4.4.3 Inibição da Produção de Óxido Nítrico

4.4.3.1 - Cultura Celular e preparo dos ensaios de macrófagos RAW 264.7

Para avaliar a inibição da Produção de Óxido Nítrico e viabilidade celular foram utilizados métodos químicos e biológicos, onde os métodos biológicos se basearam na utilização de macrófagos e químicos com a leitura da absorbância ao final do experimento. Os macrófagos murinos peritoneais da linhagem celular RAW 264.7 obtidos da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), foram cultivados em Dulbecco's Modified Medium F-12 (DMEM F-12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Células RAW 264.7 (5×10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida em estufa de 37°C e 5% CO₂ por 3 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo ou não lipolissacarídeo, [1 µg/mL] (LPS, *Escherichia coli* 055:B5) na ausência ou presença dos extratos, das frações ou substâncias isoladas. A placa foi mantida em estufa de 37°C, 5% CO₂ e após 24h de incubação, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação quanto à capacidade de inibição de NO, TNF-α e citotoxicidade. Nos experimentos os extratos foram testados nas concentrações de 4 µg/mL, 20 µg/mL, 100 µg/mL e

500 µg/mL, enquanto as substâncias isoladas foram testadas nas concentrações de 0,8 µg/mL, 4 µg/mL, 20 µg/mL e 100 µg/mL.

4.4.3.2- Ensaio da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. 50 µl dos sobrenadantes (obtido conforme item 4.5) foram adicionados aos 100 µL de reagente de Griess (*p*-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico), recém-preparado. Após 10 min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro de placa. A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada usando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células. Foram utilizados como controle macrófagos estimulados com LPS a 1 µg/mL (negativo) e macrófagos não estimulados (positivo), ambos não tratados com as amostras (Chi, et al. 2001). Também foi utilizado um inibidor padrão de iNOS, L-NMMA (Acetato de N^G-Metil-L-Arginina) para comparação da capacidade de inibição da produção de NO.

4.4.3.3- Testes de citotoxicidade (ensaio de MTT e LDH)

O teste de citotoxicidade dos extratos, das frações e substâncias isoladas foi efetuado utilizando o ensaio de LDH e de MTT. Para o MTT, as células foram plaqueadas na concentração e condição de cultura citados no item 4.6, em um volume final de 100 µL. Após 2 horas para a aderência dos macrófagos, as células foram estimuladas ou não com 1 µg/mL de LPS sozinho ou em combinação com os extratos, as frações e substâncias isoladas por 24 horas. Ao final da incubação, 5 µL de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol [5mg/mL] foram adicionados em cada poço e 2 h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados solubilizados por HCl (4 mM) adicionado em isopropanol. A leitura foi realizada por espectrofotômetro de placa a 570 nm (Raso et al. 2001). As DOs. obtidas foram convertidas em

percentual de citotoxicidade para comparação com os resultados obtidos nos ensaios de LDH, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$100 - ((D.O._{amostra} - D.O._{C-}) * 100 / (D.O._{Triton} - D.O._{C-}))$$

No caso do LDH, para analisar o teor da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura, estas também foram plaqueadas e tratadas conforme realizado para o MTT e mantidas em incubação por 24 h. 50 µL do sobrenadante da amostra foram coletados e acrescidos de 100 µL de solução de alúmen férrico e substrato, mantendo-se a 37°C por 3 min. Após, acrescenta-se 100 µL da solução de NAD e fenasina metassulfato, mantendo-se a 37°C por mais 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 490 nm. Para obtenção da lise máxima em ambos os testes de citotoxicidade foram utilizados 1% de Triton x-100 (controle positivo) e lise mínima, o sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados e não tratados (controle negativo) (Moraes et al. 2010). Para o cálculo de percentual de citotoxicidade nos ensaios de LDH utiliza-se:

$$(D.O._{amostra} - D.O._{C+}) * 100 / (D.O._{Triton} - D.O._{C+})$$

4.4.3.4- Bioensaio com células L929 e análise da produção de TNF-α por macrófagos

As células L929 (linhagem de fibroblasto murinos) foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB durante o período necessário para formação de uma monocamada celular. Para o bioensaio, o sobrenadante celular foi removido e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X para remoção completa de SFB e em seguida tratadas com solução de tripsina 0,025%+ EDTA 0,2% (ácido etilenodiamino tetra-acético). As células foram centrifugadas (1200 rpm, 5', 22°C) e ressuspensas em meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 µg/mL de gentamicina, sendo plaqueadas na concentração 2×10^5 células/mL, em placa de 96 poços. Após a incubação a 37°C por 24h, o meio de cultura foi removido e 50 µL de DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 2 µg/mL de actinomicina D foram

adicionados em cada poço, seguidos de 50 μ L do sobrenadante proveniente da cultura celular de RAW 264.7. Após nova incubação por 24h a 37°C e 5% CO₂, a viabilidade celular da L929 foi determinada através da técnica do MTT (Shiau et al. 2001; Mosmann, 1983). Para mensurar a concentração de TNF- α encontrada nas amostras foi utilizada uma curva padrão com TNF- α recombinante murino.

4.5- Ensaio biológico do extrato metanólico, da fração orgânica e das substâncias isoladas.

4.5.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram a bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e três cepas de *Staphylococcus aureus*: cepa padrão ATCC 25923, ATCC 33591 (MRSA) e uma cepa clínica isolada de um paciente, cujas caracterizações estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos

Micro-organismo	Grupo	Cepa	Procedência
<i>S. epidermidis</i>	Gram-positiva	ATCC 12228	Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 25923	Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 33591	Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	Cepa clínica humana	Isolado de um paciente em um hospital de Campos dos Goytacazes - RJ

4.5.1.1 Meio de cultura

Nos ensaios da atividade antibacteriana foi empregado o caldo Müller Hinton CAT. M391 (Himedia), preparado de acordo com as instruções do fabricante, à temperatura ambiente (25°C).

4.5.1.2 Preparo dos inóculos

As cepas de *Staphylococcus sp.* foram distintamente cultivadas em ágar estoque (BHA-Brain Heart agar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativadas para caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5 McFarland em fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França), equipado com leitor para comprimento de onda 550 nm (Araújo et al. 2004).

4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato metanólico, da fração orgânica e das substâncias isoladas, foi empregado o método da microdiluição em meio líquido, baseado na metodologia descrita por Lemos 1997 e foram solubilizadas em DMSO P.A.

Logo após a solubilização, 10 µL da amostra diluída foram adicionadas a 170 µL do meio Müller Hinton (MH) líquido (Himedia, Índia) em eppendorfs, juntamente com um volume de 20 µL de suspensão da bactéria utilizada, padronizada pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (inóculo). Após a incubação dos eppendorfs em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas, uma alíquota de 50 µL do conteúdo de cada eppendorf foi semeado em placas de Petri contendo meio MH sólido (Himedia, Índia), conforme ilustra o esquema mostrado na Figura 14. Após o período de incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C por 24 horas), foi identificada a presença ou não de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas em cada experimento, com subsequente comparação com o controle.

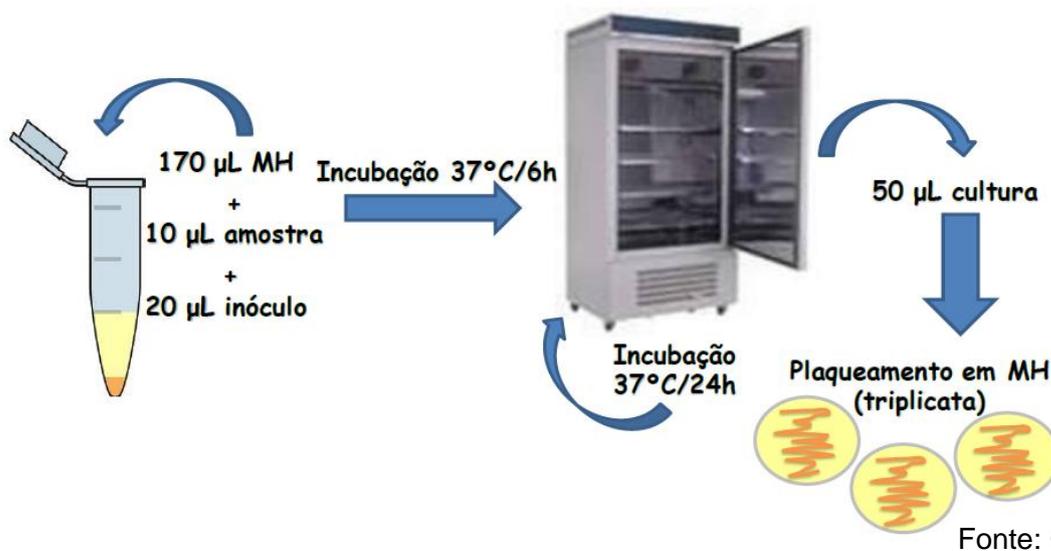


Figura 14 - Esquema da atividade antimicrobiana do extrato metanólico, da fração orgânica e das substâncias isoladas dos frutos de aroeira pelo método da diluição em meio líquido.

Os controles foram preparados de maneira similar ao extrato e às frações, sendo que foi adicionado a 170 µL de meio MH líquido e 20 µL de inóculo, 10 µL do antibiótico gentamicina na concentração de 200 µg/mL como controle positivo, 10 µL do solvente DMSO P.A. como controle negativo e plaqueado somente o inóculo. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.6- Método para Dosagem de Fenóis Totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado um método químico que se baseia na redução dos ácidos fosfotungstíco ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdático ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos fenólicos presentes na amostra a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) em meio alcalino. Estes óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorbância da solução na região do visível (760 nm).

As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Foram retirados 30 µL dessas amostras e transferidas para placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 50 µL do reagente de Folin-

Ciocalteau (1 N) e acrescentados 100 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% após 10 min. A leitura da absorvância foi realizada a 760 nm após 2 h de incubação à temperatura ambiente. A curva padrão foi realizada com ácido gálico, em concentrações que variavam de 5,0 a 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O experimento foi realizado em triplicata. Através de uma curva de calibração de ácido gálico foi possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) (Zimmer, et al. 2012).

A figura abaixo (Figura 15) representa um resumo com esquema das colunas preparadas e utilizadas neste trabalho de doutorado, bem como quais amostras foram selecionadas para realizar os testes químicos e biológicos. Lembrando que os testes foram bioguiados pela técnica de CCD com o objetivo de isolar os compostos com características fenólicas.

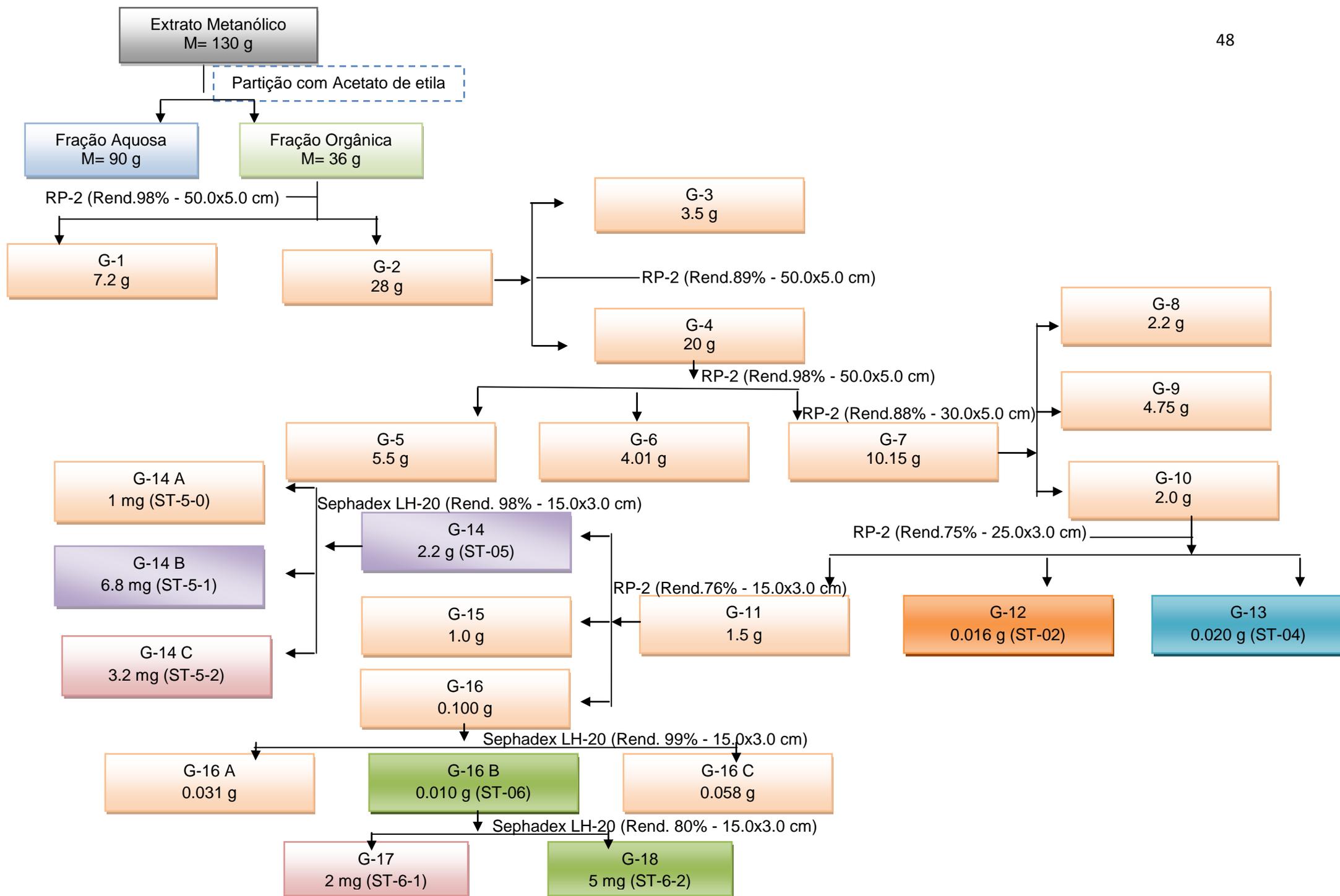


Figura 15 - Resumo das colunas preparadas e utilizadas neste trabalho de doutorado

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises Cromatográficas

Neste trabalho de doutorado foram realizadas algumas análises cromatográficas como Coluna Aberta (RP-2 e Sephadex), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato metanólico, da fração orgânica e aquosa, e das substâncias isoladas, ST-02, ST-04, ST-05 e ST-06.

Vale ressaltar que este estudo foi bioguiado e, portanto, o fracionamento foi realizado de acordo com os resultados obtidos nos ensaios biológicos.

5.1.1 Extrato Metanólico

Inicialmente o perfil cromatográfico do extrato metanólico (Figura 16), foi submetido à Cromatografia em Camada Delgada.

Verifica-se na figura 16 que o sistema de solventes utilizado mostrou-se satisfatório, pois houve separação de algumas manchas, assim se pode notar que a concentração de substâncias fenólicas é elevada, uma vez que é possível notar quatro manchas majoritárias características para tais substâncias, como descrito no item 4.3.

Essas manchas apresentam como fatores de referência (R_f), os valores de 0,47; 0,52; 0,64 e 0,90 que sob revelação em luz UV (332 nm) apresentam coloração azul. Nota-se nesta figura (16) que a mancha 1 é a mais polar, quando comparada com as demais manchas, e esta se apresenta com

coloração amarela mais intensa em luz visível. Devido às características observadas (manchas largas, intensa e com arraste), sugere ser uma mistura de substâncias que correspondem aos compostos fenólicos (Sabudak et al. 2005).

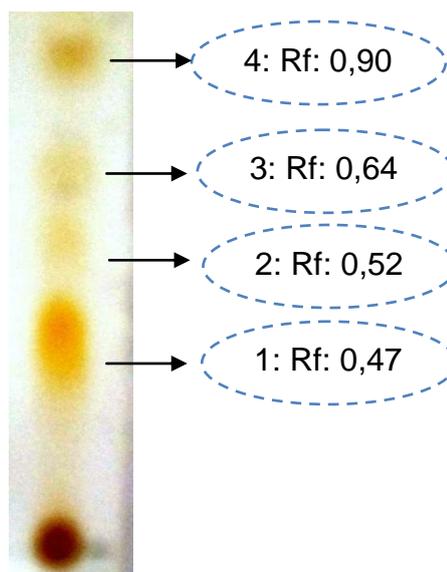


Figura 16 - Cromatograma do extrato metanólico realizado por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

Com o intuito de conhecer o perfil químico deste extrato, este foi submetido à outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para conhecer as substâncias presentes (Figura 17). Essa técnica desempenha um papel central na separação de misturas complexas, como por exemplo, os flavonoides e as substâncias fenólicas. Estudos quanto ao tempo de retenção (Tr) em diferentes suportes e eluentes têm sido aperfeiçoados e tabelados, a fim de se obter condições ótimas de análise (Oliveira, 2005).

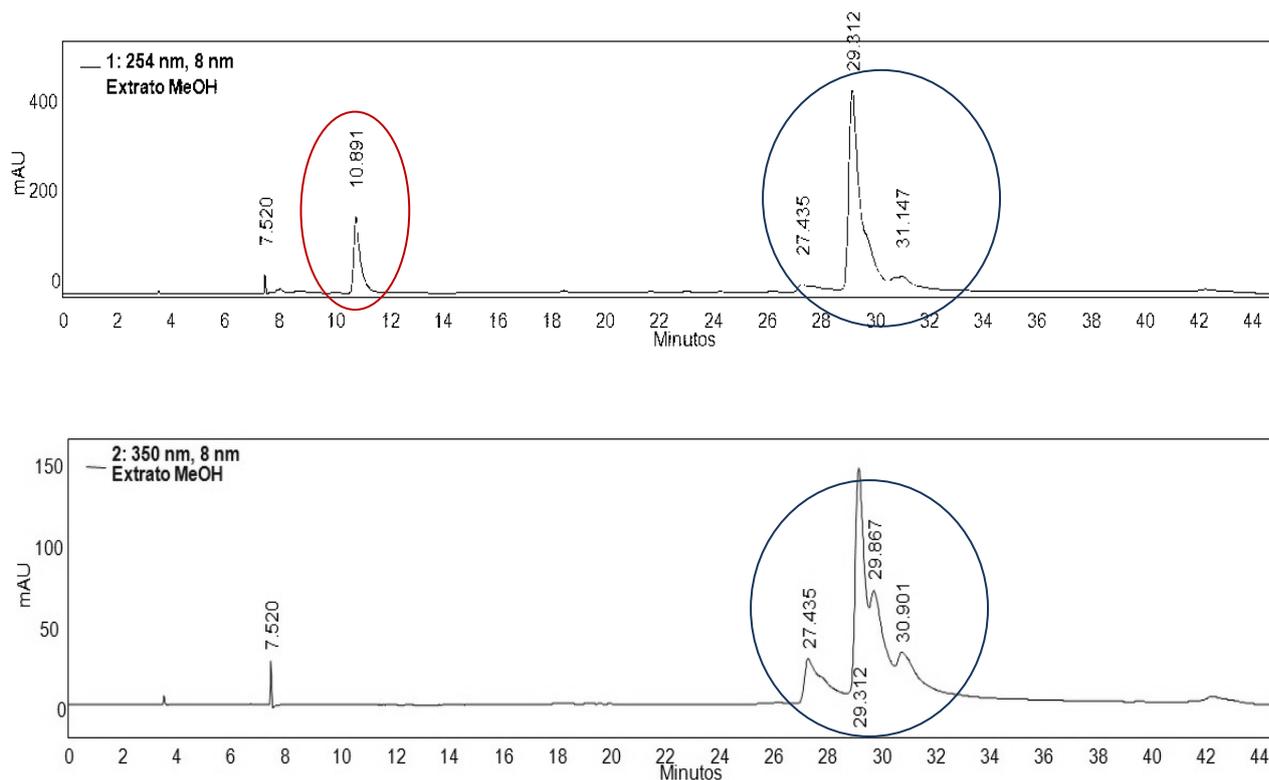


Figura 17 - Cromatograma 1, perfil químico do extrato metanólico avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL

Depois de realizada a CLAE com o extrato metanólico, pode-se observar um pico bastante intenso no tempo de retenção em 10,891 minutos (circulado em vermelho) no comprimento de onda de 254 nm, com área de 9.632.224, o mesmo pico não se observa no comprimento de onda de 350 nm.

É de fácil percepção que os picos com tempo de 27.435, 29.312, 29.867 e 30.901 minutos se apresentam exarcebados no comprimento de onda de 350 nm, e que o pico com tempo de 29.312 minutos é o majoritário no cromatograma.

Dados de literatura mostram que flavonoides solubilizados em metanol apresentam duas bandas de absorção característica no espectro de UV na região de 240-400 nm, o que corrobora com os picos observados no CLAE. Essas bandas (Figura 18) são conhecidas como banda I (300-380 nm), e estão associadas à absorção do sistema cinamoil do anel B, e banda II (240-280 nm),

ocasionada pela absorção do sistema benzoil do anel A (Alonso-Salces et al. 2004).

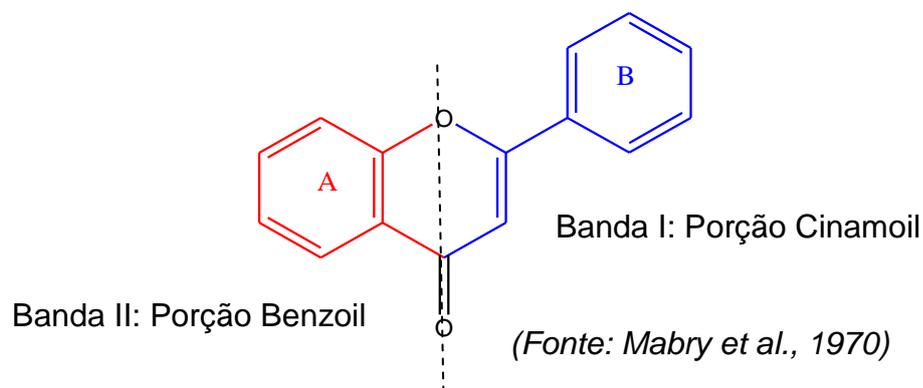


Figura 18 - Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

Com base nesta informação a Figura 19 mostra os espectros de UV para estes picos (Figura 17). Pode-se observar que os espectros revelam as bandas em aproximadamente 240 e 350 nm, o que em tese confirmam a presença de flavonoides com características para as bandas I e II.

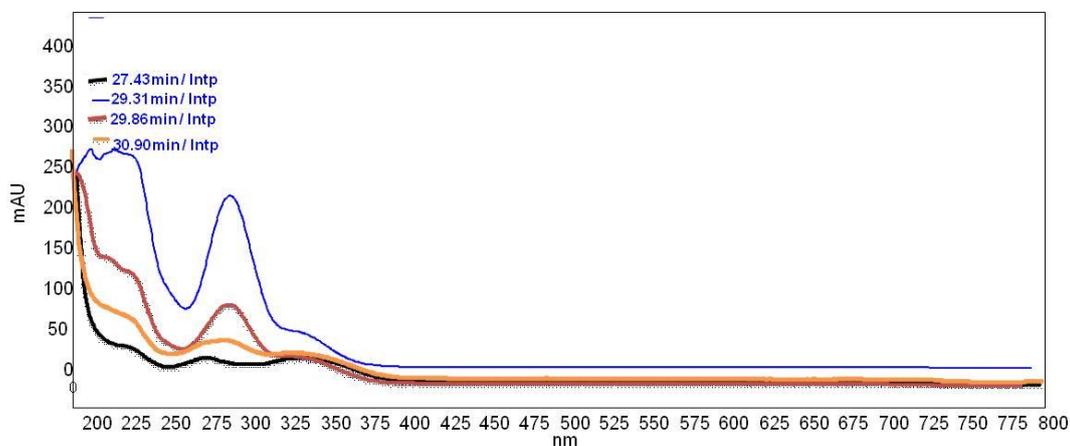


Figura 19 - Espectros de Ultravioleta dos picos de tempo de retenção (TR) igual a 27.43 min, correspondente ao pico 1 (Preto); 29.31 min, correspondente ao pico 2 (Azul), 29.86 min, correspondente ao pico 3 (Rosa) e 30.90 min, correspondente ao pico 4 (laranja).

Assim, com o objetivo de separar essas substâncias de interesse (flavonoides), o extrato metanólico foi fracionado conforme indicado no Tópico 4.3, e o Resumo da Purificação na página 48.

5.1.2- Fracionamento do Extrato Metanólico

Após o preparo do Extrato Metanólico, este foi fracionado com acetato de etila com o intuito de concentrar os compostos fenólicos (Sabudak et al. 2005). A figura 20 mostra o CCD resultante dessa partição.



Fração Fração
Aquosa Orgânica

Figura 20 - Cromatograma da partição com acetato de etila realizada a partir do Extrato Metanólico por CCD. Fase móvel: acetato de etila:hexano (75:25) e revelado com sulfato cérico.

A partir da Figura 20 pode-se observar que a partição foi eficiente, visto que a Fração orgânica concentrou os compostos de interesse. Pode-se comprovar que de acordo com as características observadas (manchas largas, intensas e com arraste), a Fração Orgânica se apresenta como uma mistura de substâncias que correspondem aos compostos fenólicos devido à sua intensa coloração amarela após a utilização de revelador químico (Sabudak et al. 2005). A fim de se conhecer o perfil químico resultante do fracionamento do extrato metanólico e confirmar a eficiência da partição, foi realizada a técnica do CLAE tanto para a Fração Aquosa (Figura 21), quanto para a Fração Orgânica (Figura 22).

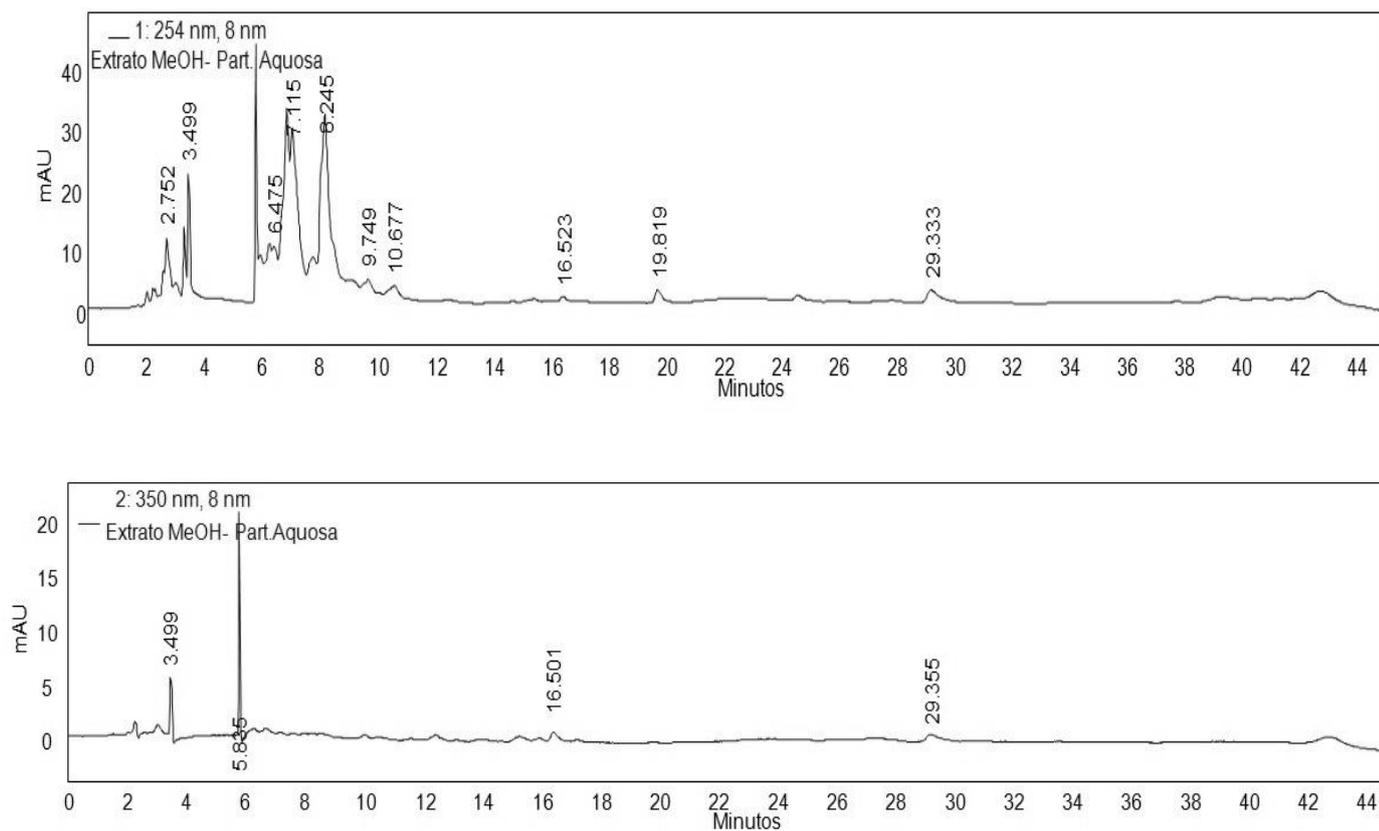


Figura 21 - Cromatograma 2, perfil químico da Fração Aquosa avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL.

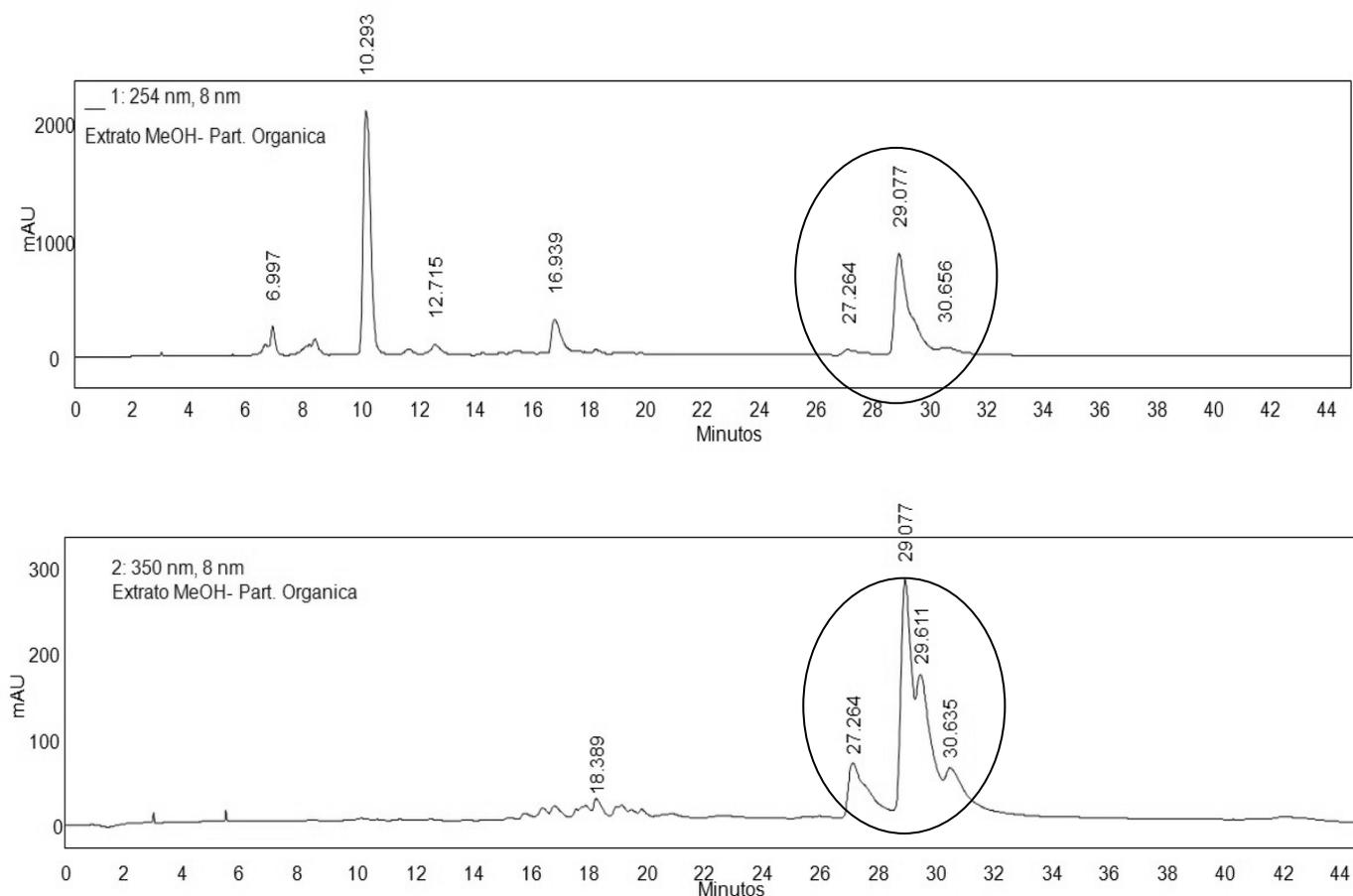


Figura 22 - Cromatograma 3, perfil químico da Fração Orgânica avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 10 mg/mL.

A partir das análises por CLAE pode-se observar inicialmente um perfil muito semelhante àquele observado para o extrato metanólico (Figura 17), o que de certa forma confirma que o fracionamento concentrou as substâncias de interesse, já que se observa um pico com tempo de retenção em 10.293 min majoritário, e os picos com tempos de retenção entre 27.264 a 30.635 presentes apresentando absorção nos dois comprimentos de onda, como discutido anteriormente, e presentes somente na Fração Orgânica.

Com relação à Fração Aquosa apesar de ter se obtido maior massa (90 g) quando comparado com a Fração Orgânica (36 g), pode-se observar através

da Figura 21 que os compostos de interesse não foram compatíveis com esse fracionamento, porém quanto aos ácidos há indícios de sua presença nessa Fração evidenciados por picos entre 2 a 8 minutos, porém em baixas concentrações conforme observado pelo cromatograma (Figura 21).

A partir desse resultado, os fracionamentos seguintes foram realizados a partir da Fração Orgânica, visto que foi confirmado que esta concentra as substâncias de interesse.

5.1.3 - Fracionamento da Fração Orgânica

A partir dessa Fração foram realizadas diversas cromatografias em coluna aberta, principalmente de fase inversa RP-2 conforme esquema na página 48 (Figura 15).

Para melhorar o entendimento da origem das substâncias isoladas, são apresentadas abaixo, de forma simplificada, as diversas cromatografias em coluna aberta, até o isolamento das substâncias ST-02 e ST-04, onde se observa que ambas se originaram do Grupo 10 (Figura 23).

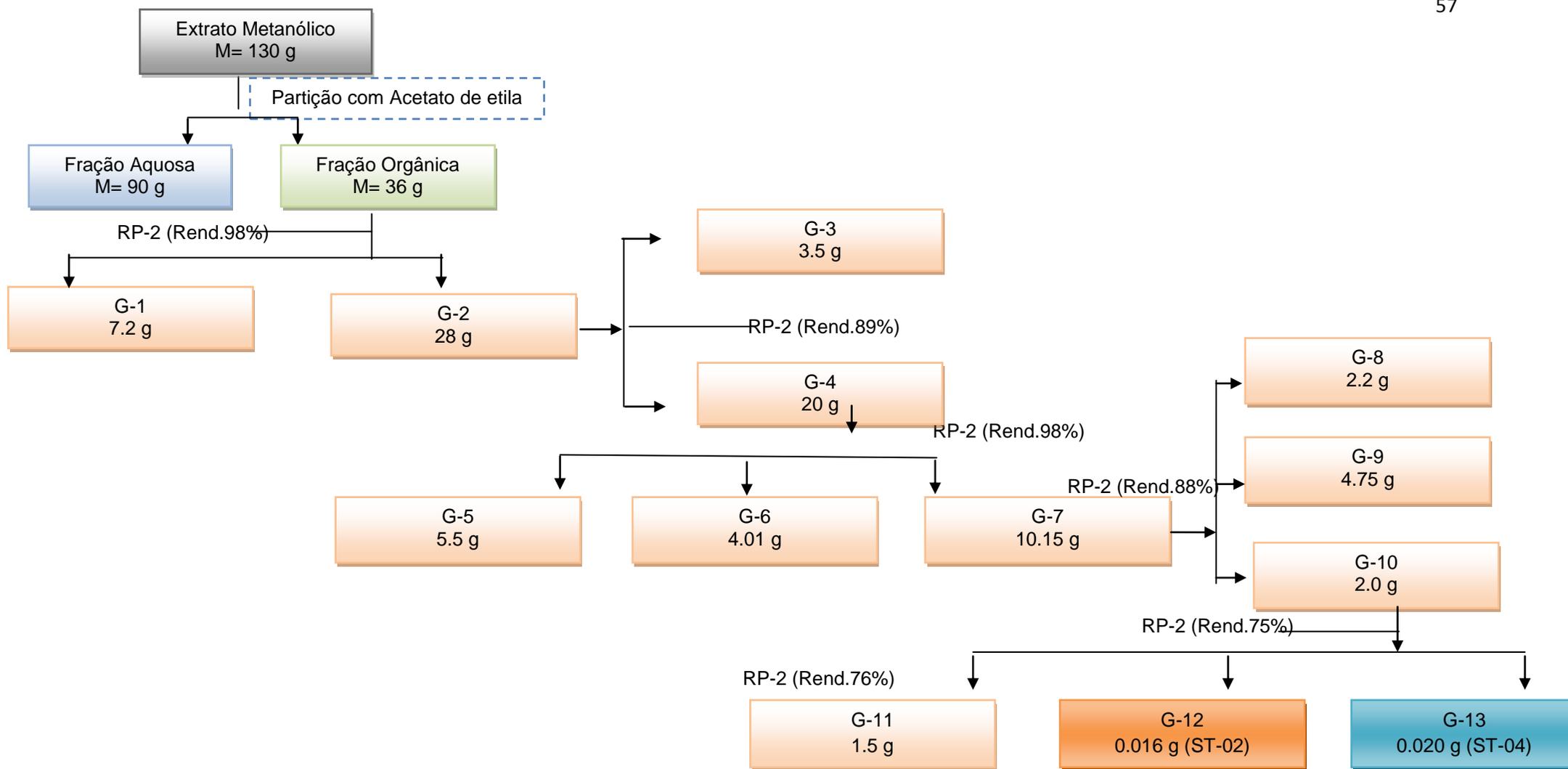


Figura 23 - Esquema simplificado mostrando a origem das substâncias ST-02 e ST-04.

Com o intuito de verificar o isolamento e o perfil químico dessas substâncias foi realizado a CLAE e a avaliação do espectro de UV da substância ST-02 (Figura 24 e 25) e da substância ST-04 (Figura 26 e 27).

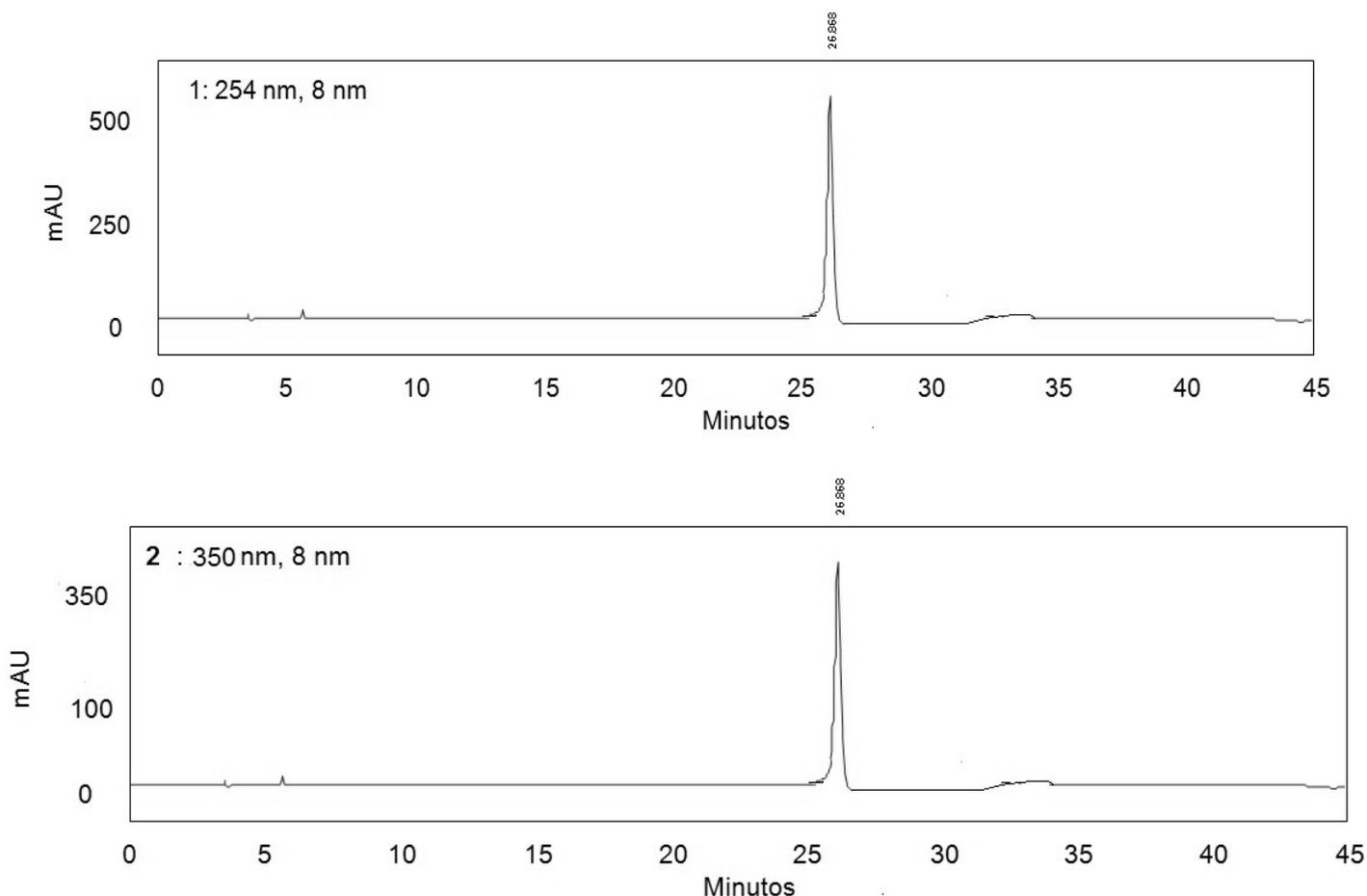


Figura 24 - Cromatograma 4, perfil químico da substância isolada ST-02 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.

A partir da figura 24 pode-se observar apenas um único pico intenso com tempo de retenção em 26.82 min, comprovando o isolamento dessa substância. O espectro de UV também foi realizado a fim de se comparar com o espectro de UV de flavonoides, sendo assim observa-se na figura 25 um espectro com uma única banda em torno de 250 nm e outro, menos intenso em 350 nm, o que em tese confirmam a presença de flavonoide com

características para as bandas I e II, sistemas cinamoil e benzoil, respectivamente.

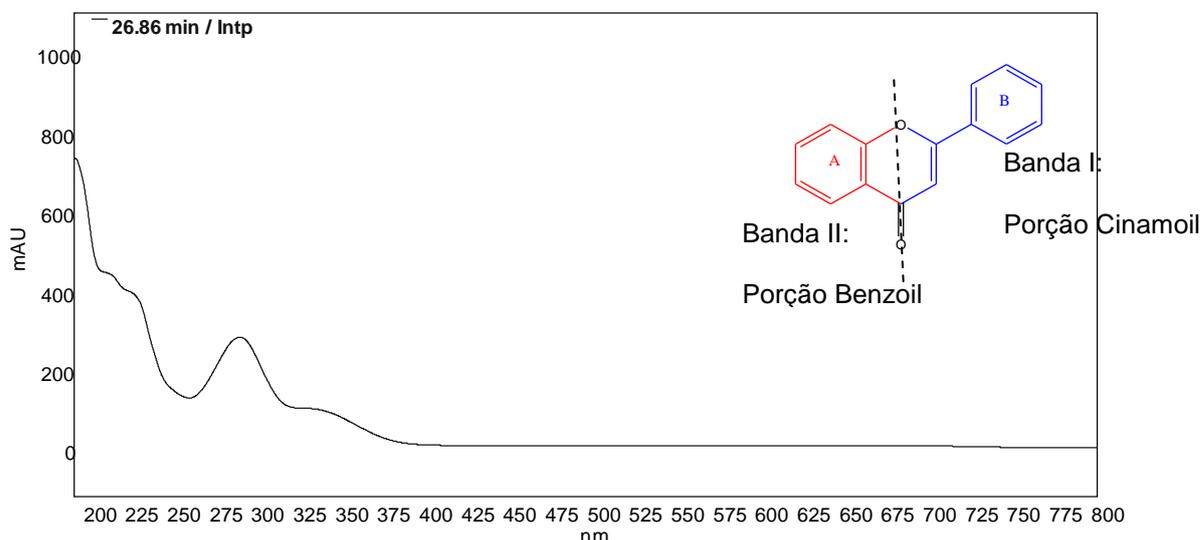


Figura 25 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 26.86 min, correspondente ao pico do ST-02.

Para confirmação e elucidação estrutural essa amostra foi enviada a análise de RMN. Com relação à amostra isolada e codificada ST-04, também foi avaliado seu perfil químico conforme figura 26.

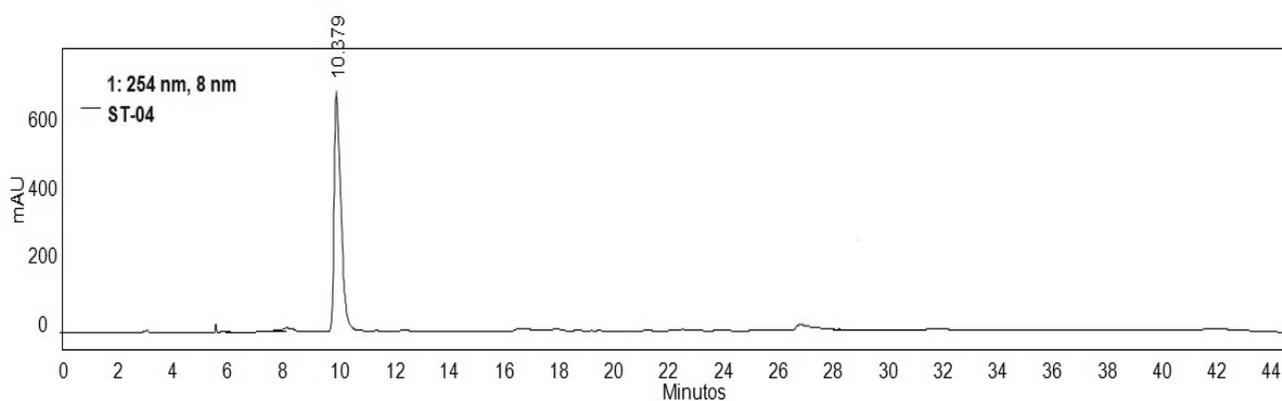


Figura 26 - Cromatograma 5, perfil químico da substância isolada ST-04 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.

Vale a pena ressaltar que essa amostra também só apresentou apenas um único pico com tempo de retenção no tempo de 10.37 min apresentando detecção apenas no comprimento de onda de 254 nm. A figura 27 mostra o espectro de UV dessa substância.

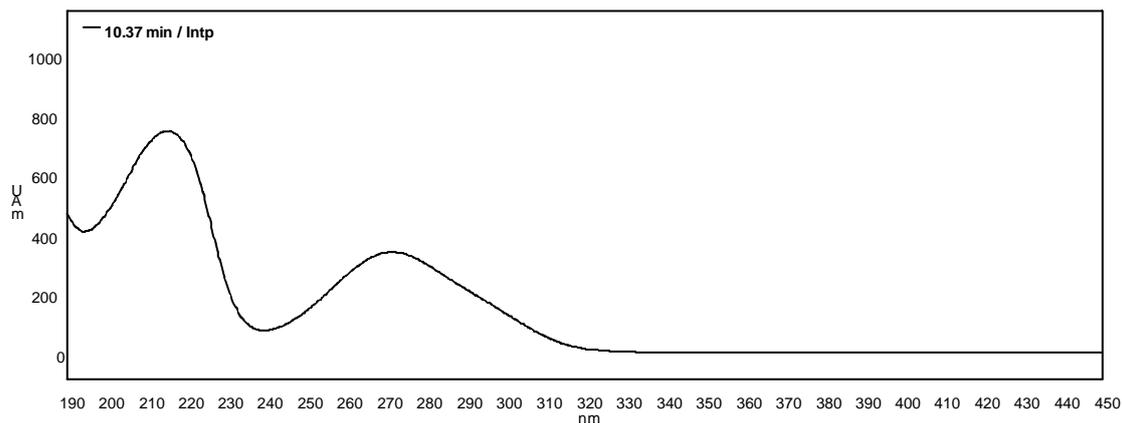


Figura 27 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 10.37 min, correspondente ao pico do ST-04.

Através desses resultados pode-se concluir que a amostra ST-04 não apresenta as características para os flavonoides, mas sim para os ácidos fenólicos, pois apresentam bandas intensas nas faixas espectrais de 190-220 e 260-280 nm (Michelyn, 2008; Oleszek e Bialy, 2006). A elucidação estrutural foi avaliada através de técnicas espectroscópicas como o RMN.

Após o isolamento dessas duas substâncias, continuou-se a purificação da fração orgânica a fim de se isolar as demais substâncias presentes no extrato metanólico dos frutos de aroeira.

A figura 28 mostra a continuação deste fracionamento, vale ressaltar que o fracionamento continuou a partir do Grupo 10, onde resultou em três subfrações, Gr. 11, ST-02 e ST-04.

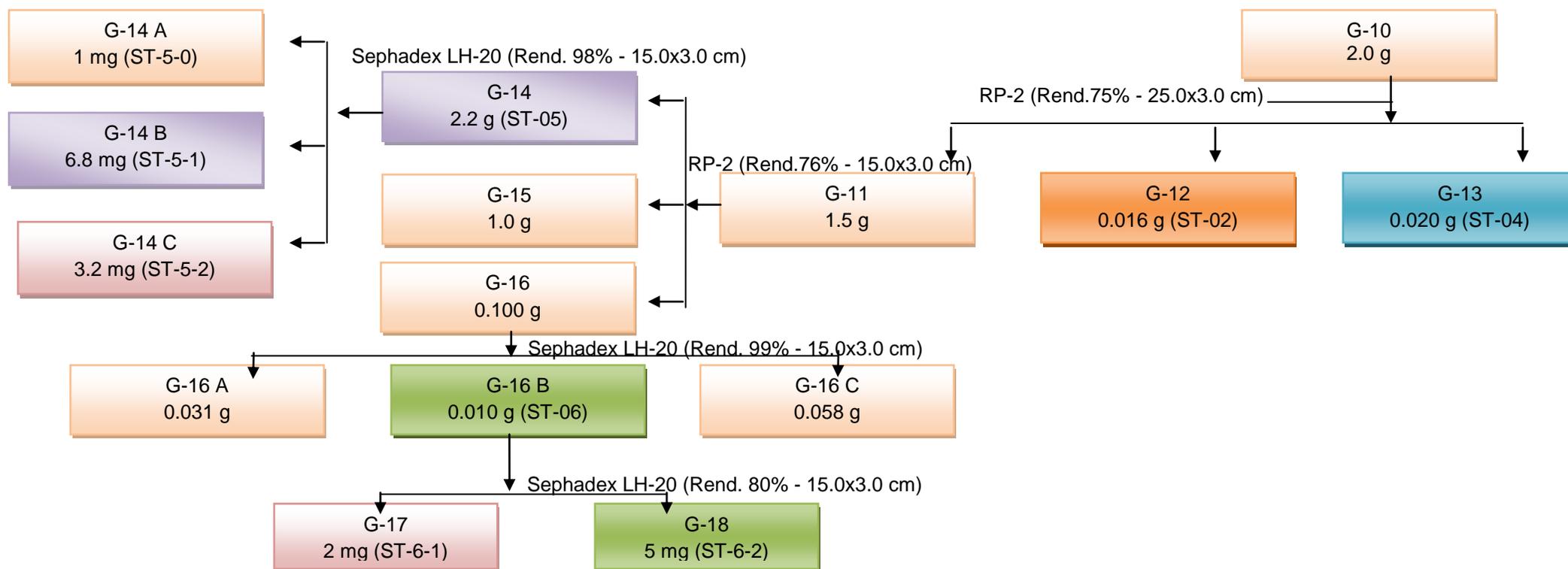


Figura 28 - Esquema simplificado mostrando a origem das substâncias ST-05 e ST-06.

Através do esquema simplificado, pode-se observar a pouca massa obtida (1.5 g) de Gr.11 para se dar continuidade ao processo de fracionamento, porém quando analisado por CLAE, este conjunto apresentou somente 3 grupos de interesse, como pode ser observado pela Figura 29.

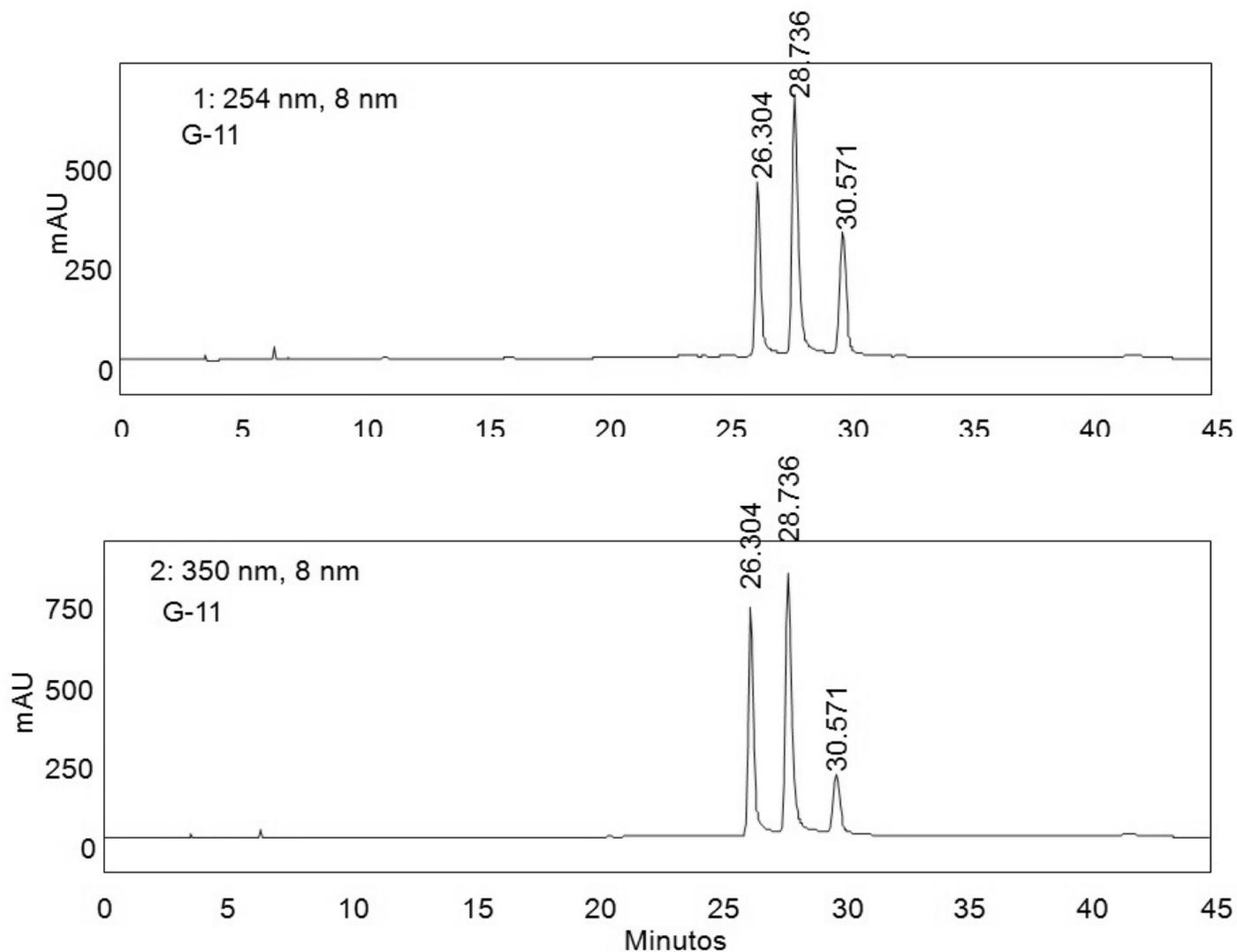


Figura 29 - Cromatograma 6, perfil químico do Gr.11 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.

O conjunto G11 foi então submetido a uma nova etapa cromatográfica para purificação, resultando em três novos grupos. Deve-se destacar que o Grupo 14, através de CLAE, mostrou-se com um único pico, porém apresentando um pico largo, que poderia ser uma mistura de substâncias (Figura 30).

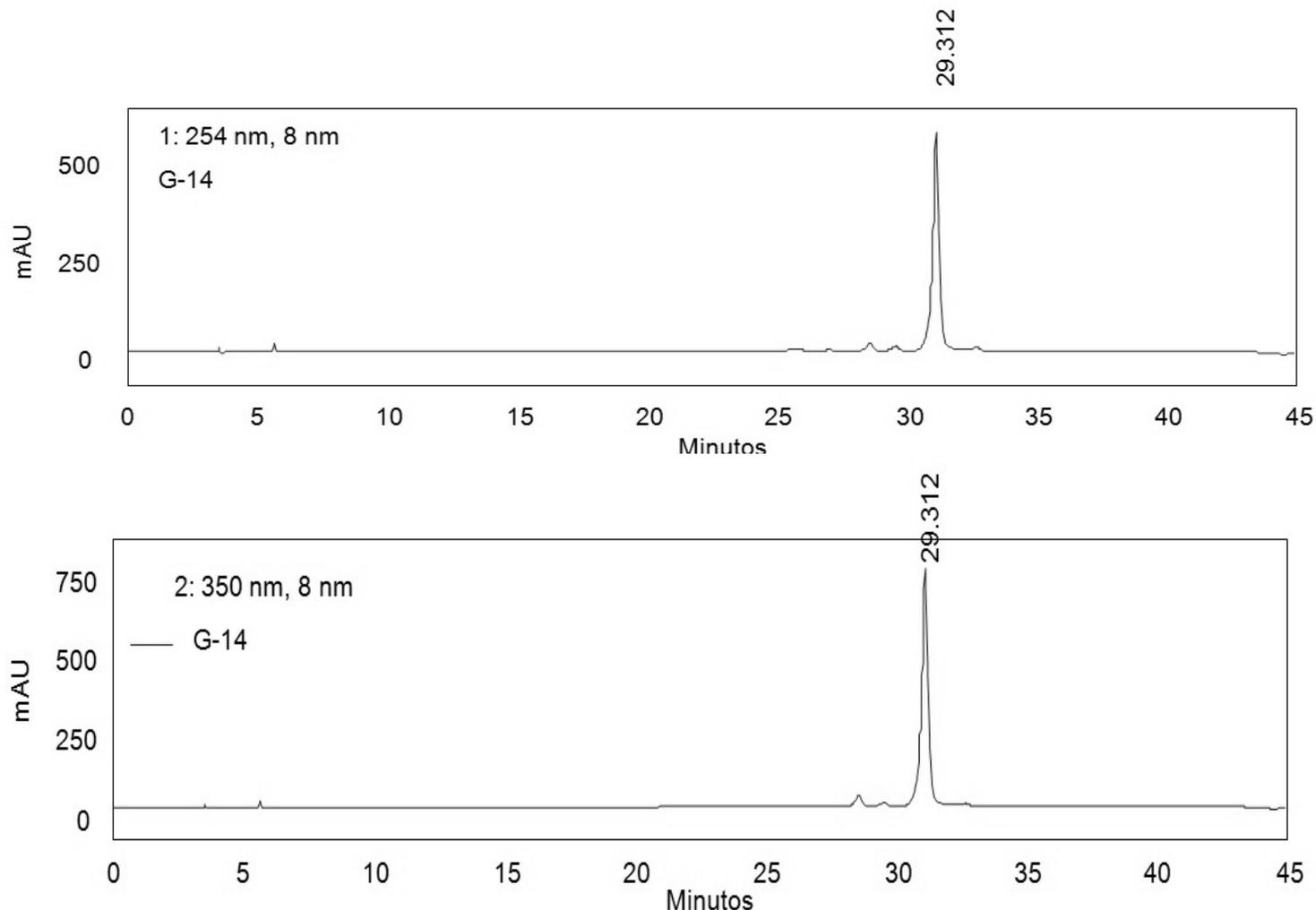


Figura 30 - Cromatograma 7, perfil químico do Gr.14 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shimadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.

Pode-se observar a partir desse resultado que essa amostra apresenta um pico intenso com tempo de retenção de 29.31 min, porém com pico alargado. Essa

amostra também foi avaliada quanto ao espectro de UV para verificar a presença das bandas características para os flavonoides (Figura 31).

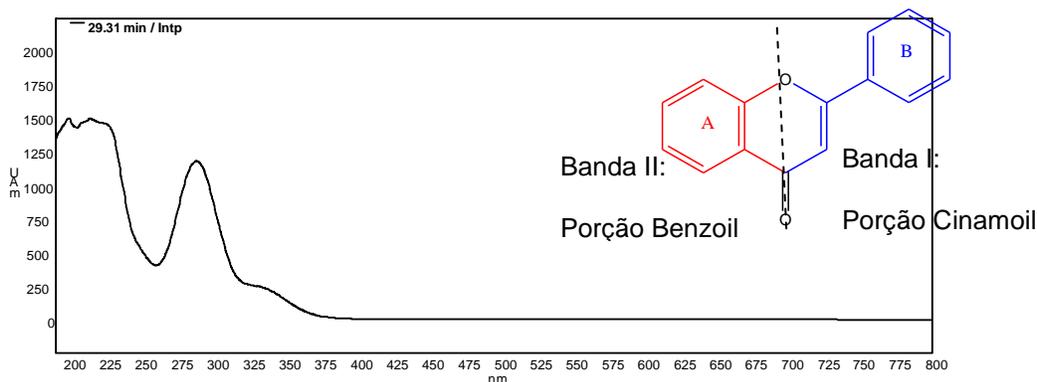


Figura 31 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 29.31 min, correspondente ao pico do ST-05.

Com base no espectro de UV observam-se dois picos característicos para a porção benzoil, próximo a 250 nm e cinamoil, a 350 nm, dos flavonoides na amostra. Sendo assim, através das análises realizadas por CLAE e pelo UV é possível demonstrar que essa amostra pertence ao grupo dos flavonoides.

Porém, a fim de se verificar o real isolamento dessa substância foi realizado uma Cromatografia em Coluna utilizando a sílica Sephadex LH-20, o qual resultou, através de CCD em três manchas (Figura 32), onde a primeira mancha apresenta um R_f de 0.40 e as duas outras manchas apresentam R_fs com valores bem próximos de 0.70.

Devido a pouca massa resultante desse fracionamento, apenas a amostra codificada como ST-5-1 (6.8 mg) foi enviada ao RMN para sua elucidação estrutural.



Figura 32 - CCD resultando do fracionamento utilizando Sephadex LH-20 do G-14, resultando em 3 subfrações.

Dando continuidade ao fracionamento a partir do Gr. 16 este resultou em três subgrupos (G-16 A, G-16 B e G-16 C), onde foi escolhido o G-16 B, pois é possível se observar a partir da figura 28 uma substância que quando avaliada por CLAE (Figura 33) e pelo seu espectro de UV (Figura 34) se apresenta como um padrão de flavonoide. Também através de CLAE apresentam um único pico, porém como na amostra codificada como ST-05, apresentou um pico alargado.

Devido a esse resultado, também foi realizado uma nova cromatografia em coluna, utilizando a sílica Sephadex LH-20 a fim de se confirmar o isolamento da amostra.

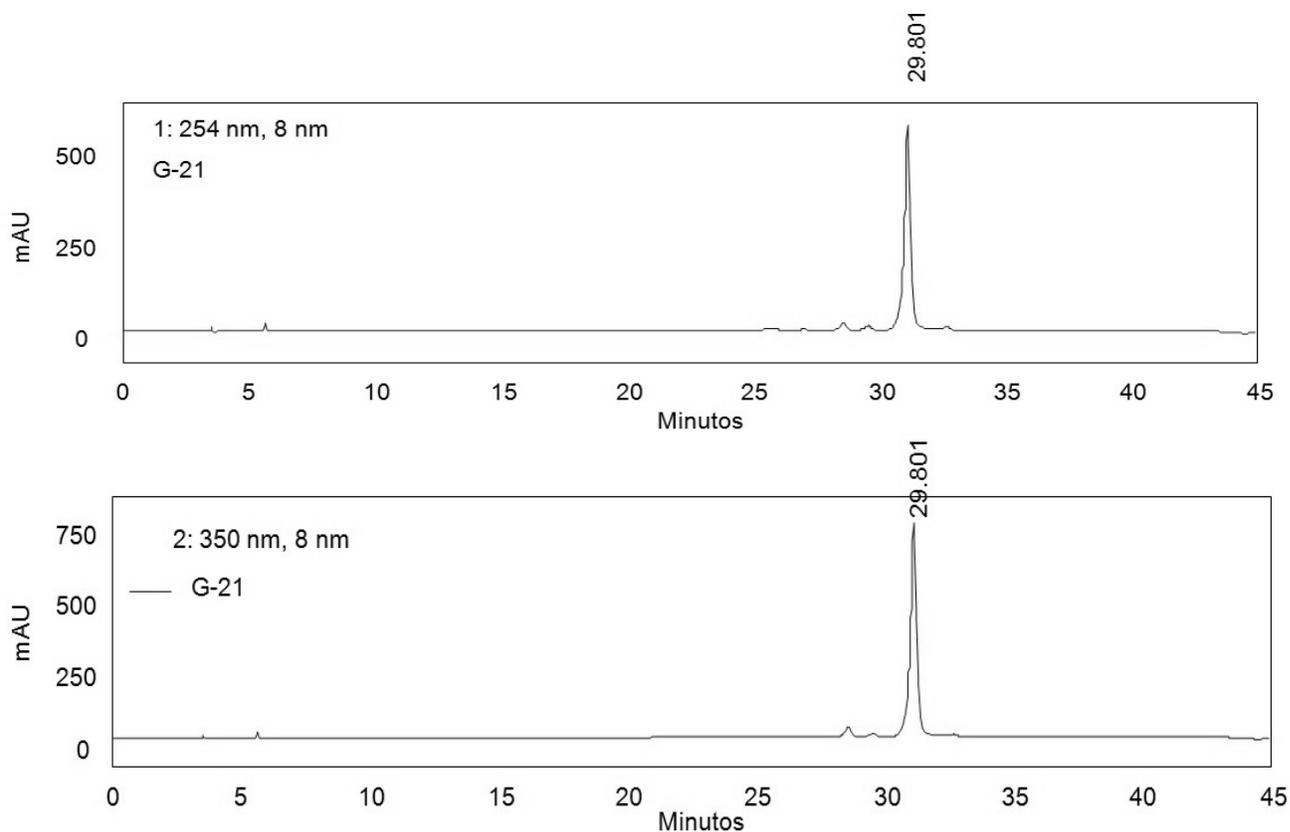


Figura 33 - Cromatograma 8, perfil químico do Gr.21 avaliado por CLAE. O equipamento utilizado foi da marca Shumadzu class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de (A) 254 nm e (B) 350 nm com volume de injeção de 20 μ L. A coluna utilizada foi uma RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm). C= 2 mg/mL.

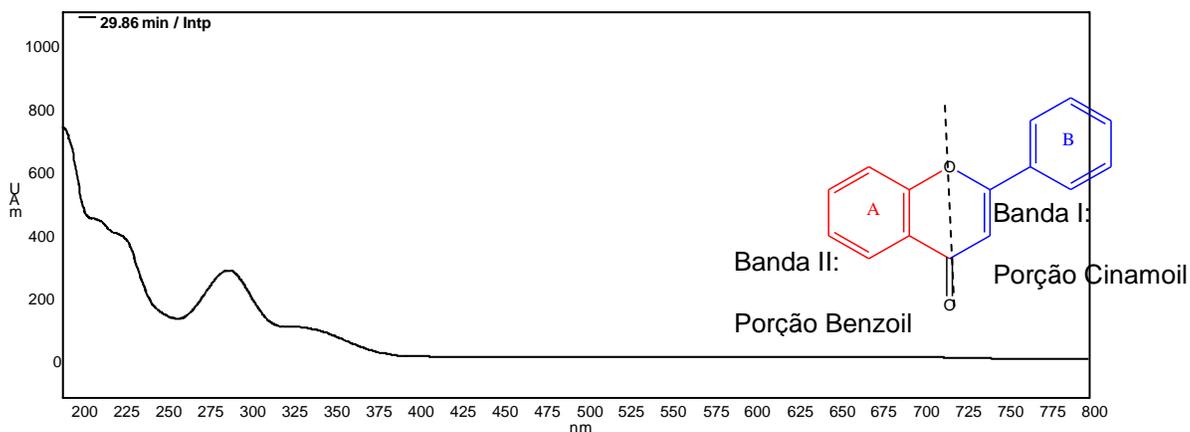


Figura 34 - Espectro de Ultravioleta do pico de tempo de retenção (TR) igual a 29.80 min, correspondente ao pico do Gr. 21.

Conforme CCD resultante desse fracionamento (Figura 35) é possível observar duas manchas com Rfs bem próximos (0.70), porém as manchas apresentam ainda mais dois sinais, ou seja, essa amostra não está purificada. Sendo assim, não foi possível elucidar essa estrutura, visto a pouca massa resultante do fracionamento.



Figura 35 - CCD resultando do fracionamento utilizando Sephadex LH-20 do G-16 B, resultando em 2 subfrações.

Para a elucidação estrutural das amostras isoladas nesse trabalho (ST-02, ST-04 e ST-5-1) foram necessárias técnicas para auxiliar na sua identificação como o método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.2.1- RMN da Substância ST-02

5.2.1.1 Técnicas monodimensionais

Após a purificação do G-10, o que conduziu a substância ST-02, que foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , os dados estão listados na tabela 3:

Tabela 3: Sinais listados de ^1H para a substância ST-02.

RMN ^1H (DMSO- d_6) PPM
H-6 (5,9; s)
H-8, (6,0; s)
H-3', 5' (6,68; d; J= 10.0 Hz)
H-4'; (6,82 d; J= 10.2 Hz)
H-2', 6' (7,20; d; J= 7.4 Hz)

Inicialmente, foi analisado o espectro de RMN ^1H da amostra ST-02 obtido em DMSO- d_6 (500 MHz) (Figura 36).

Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de cinco sinais, sendo dois correspondentes à região do anel A (5,90 e 6,05 ppm; núcleo mais protegido) e três para a região do anel B (6,68, 6,82 e 7,20 ppm; núcleo mais desprotegido) (Figura 36) (Mabry et al. 1970).

Na região dos sinais dos hidrogênios aromáticos (6,00 – 8,00 ppm) (Figura 36), pode-se observar dois singletos na região do anel A, sendo um em 5,90 ppm (H-6) e outro em 6,05 ppm (H-8). Deduz-se com esses dados, que o anel A apresenta-se como um núcleo 5,7-di-substituído. A distinção entre flavonas (H-3) e flavonol (RO-3) foi verificada pela ausência do singlete em região próxima a 6,52 ppm referente ao H-3 da flavona (Silva et al. 2009).

Os sinais para os hidrogênios em 6,68 correspondem aos sinais de H-3', H5'. O sinal em 6,82 corresponde ao H-4', bem como o sinal em 7,20 foi atribuído para os H-2' e H6'.

Ao analisar a região do anel B, observa-se que esse anel encontra-se não substituído devido à presença de três dubletos correspondentes aos sinais H-3'/H-5', H-2'/H-6' e para o sinal do H-4'. É possível observar dois dupletos correspondentes

aos dois pares de átomos de hidrogênios (H-2'/H-6': δ_H 7.22 – 7.20; e H-3'/H-5': δ_H 6.69 – 6.71) acoplados através de interação spin-spin em posição *orto* ($j = 7.4$ e 10.2 Hz), observa-se que as constantes de acoplamento se apresentam com valor elevado, característico desse tipo de acoplamento. Já em 6.82 ppm observa-se uma constante de acoplamento elevada ($j = 10.0$ Hz), sugerindo que os hidrogênios de H-4': δ_H 6.83 – 6.85, estejam acoplado em posição *orto*. Sendo assim, deduz-se com esses dados que o anel B não apresenta nenhuma substituição.

O sinal em 12,18 ppm remete à hidroxila do C-5 (Agrawal, 1989).

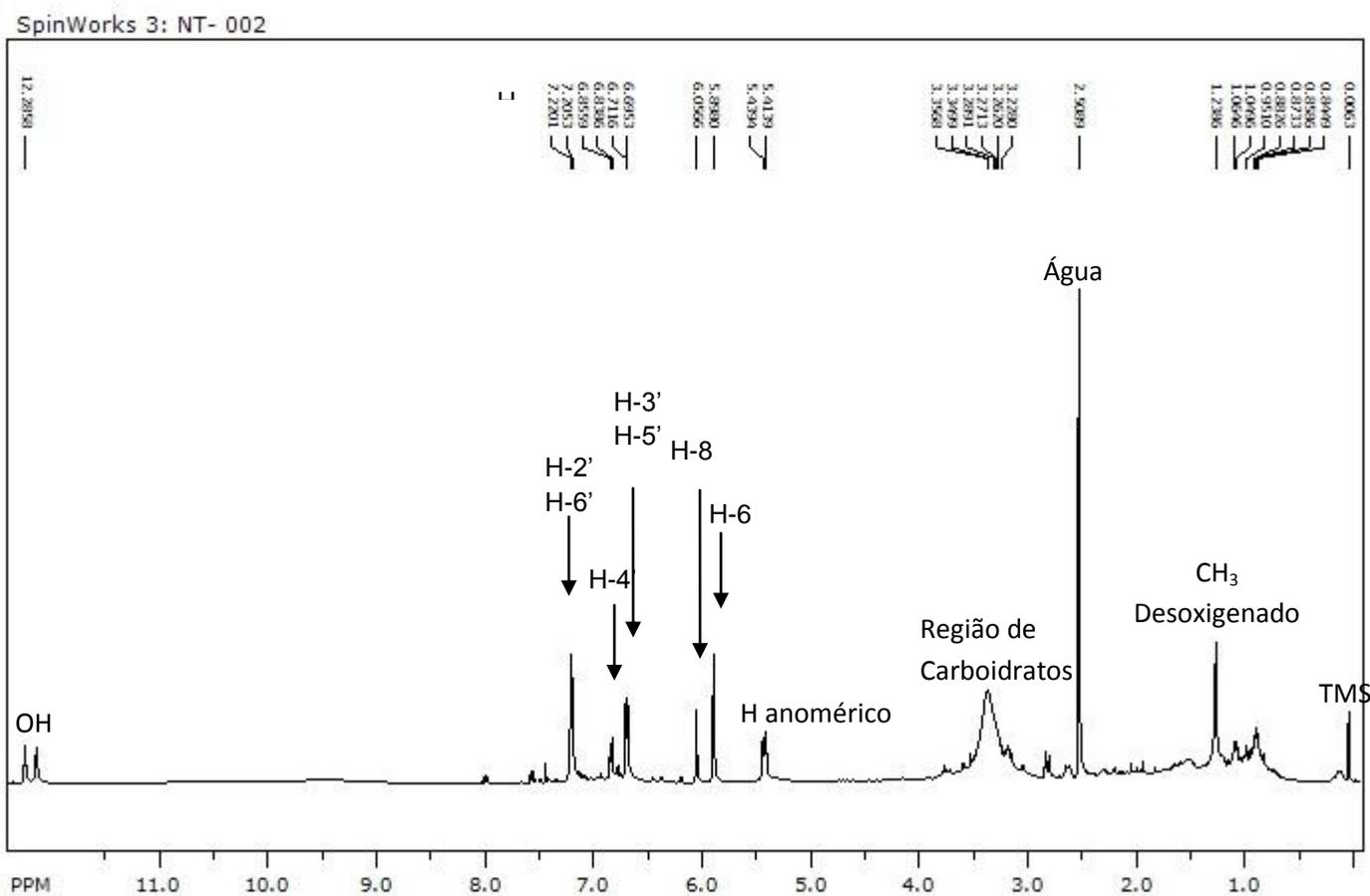


Figura 36 - Espectro de RMN ^1H de **ST-02** (500 MHz).

A partir do espectro de RMN de ^1H foi possível propor a presença de uma unidade de ramnopiranosose. Esta unidade de açúcar pôde ser detectada a partir da

presença do dubleto de um hidrogênio anomérico em δ 5,41 ($J = 12$ Hz). Este valor apresentado pela constante de acoplamento ($J = 12$ Hz) para o H-1'' sugere que o açúcar está em configuração *beta*, pois para ligação *alfa* a constante de acoplamento seria em torno de 3 Hz (Santos, et al. 2005).

Segundo Markham & Geiger (1994), o deslocamento químico para H-1'' sugere que a unidade de açúcar esteja ligada à posição 7 (δ 4,90-5,50 ppm), e não à posição 5 (δ 4,56-4,79 ppm), 3' (δ 4,80-5,00 ppm) ou 4' (δ 4,80-5,00 ppm) da aglicona. Outra característica é a presença do sinal relativo a uma metila em 1,23 ppm e entre os açúcares mais comuns se encontra a ramnose. Sendo assim, de acordo com esses dados parciais, pode-se propor para ST-02 a estrutura da Galangina 7-O-ramnopiranosídeo, onde o açúcar ligado diretamente ao esqueleto da aglicona trata-se de uma ramnose (Figura 37).

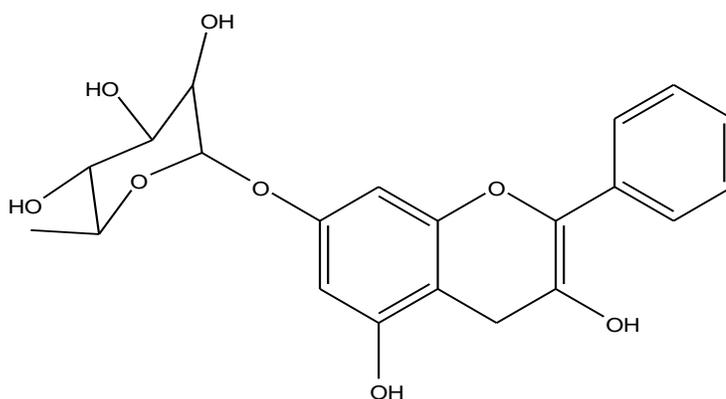


Figura 37 - Estrutura proposta de ST-02 Galangina 7-O-ramnopiranosídeo (3, 5, 7 trihidroxi flavonol).

Os sinais de ^1H encontrados remetem à aglicona da Galangina, e para confirmar esta estrutura tais sinais foram comparados com os dados da galangina na literatura (Tabela 4) (Kaouadji, 2014; Agrawall, 1989).

Tabela 4: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-02 e os sinais da galangina observados na literatura.

δ_{H} ST-02 (DMSO- d_6)	δ_{H} Literatura (DMSO- d_6) (Kaouadji, 2014)
H-6 (5.9; s)	H-6 (6,4; s)
H-8, (6.0; s)	H-8, (6,5; s)
H-3', 5' (6.68; d; J= 10.2 Hz)	H-3', 5' (7.55; d; J= 7.3 Hz)
H-4' (6.82; d; J= 10.0 Hz)	H-4' (7.49; m)
H-2', 6' (7,20; d; J= 7,4 Hz)	H-2', 6' (8,20; d; J= 7,3 Hz)

Devido a esse isolamento ter resultado em pouca massa (2,6 mg) não foi possível realizar as outras técnicas de RMN como ^{13}C , APT, e as técnicas bidimensionais COSY, HMBC e HSQC. Por esse motivo, a proposta estrutural foi baseada nos dados de ^1H .

Para os frutos de aroeira este é o primeiro relato de isolamento deste flavonoide, todavia na literatura existem relatos sobre essa aglicona nas cascas de *Schinus terebenthifolius* (Abreu, 2008), mas na forma glicosilada (Galangina 7-O-ramnopiranosídeo) este é o primeiro relato na literatura.

A Galangina foi isolada pela primeira vez em 1881 a partir da raiz da galanga, *Alpinia officinarum* (Wollenweber, 1988) e sintetizada por Heap e Robinson em 1926 (Afolayan e Meyer, 1997). Desde então, tem sido encontrada em muitos extratos de angiospermas (Kaouadji, 2014; Afolayan e Meyer, 1997; Sabatier et al. 1992). A galangina juntamente com a crisina, pinobanksina e pinocembrina são flavonoides característicos da própolis e cera de abelha (Kaouadji, 2014; Afolayan e Meyer, 1997; Soler et al. 1995).

A própolis, substância resinosa coletada a partir de diversas fontes vegetais das plantas por abelhas, é usada como um selante nos espaços abertos da colmeia e contém basicamente substâncias vegetais, cera e outras secreções da abelha (Lotti et al. 2010). Portanto, na produção da própolis, as abelhas as coletam de

diversas árvores e arbustos que ocorrem no litoral, e possui como fonte a espécie escolhida para este trabalho, a aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), bem como o cajueiro (*Anacardium occidentale*), o *Rizophora mangle* (mangue vermelho) e *Dalbergia ecastophyllum* (Abreu, 2008; Lima, 2006).

5.2.2- RMN da Substância ST-04

5.2.2.1 Técnicas monodimensionais

5.2.2.1.1 RMN ^1H

Após a purificação do G-10, o que conduziu a outra substância ST-04, que foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , e os dados estão listados na tabela 5:

Tabela 5: Sinais listados de ^1H para a substância ST-04.

RMN ^1H (DMSO- d_6) PPM
H-2 e H-6 (6,9; s)

Inicialmente, foi analisado o espectro de RMN ^1H da substância ST-04 obtida em DMSO- d_6 (500 MHz) (Figura 38).

Na região do espectro correspondente ao núcleo aromático (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de apenas um sinal em 6.9 ppm (Eldahshan, 2011). Os sinais para os hidrogênios em 6,9 correspondem aos sinais de H-2 e H-6.

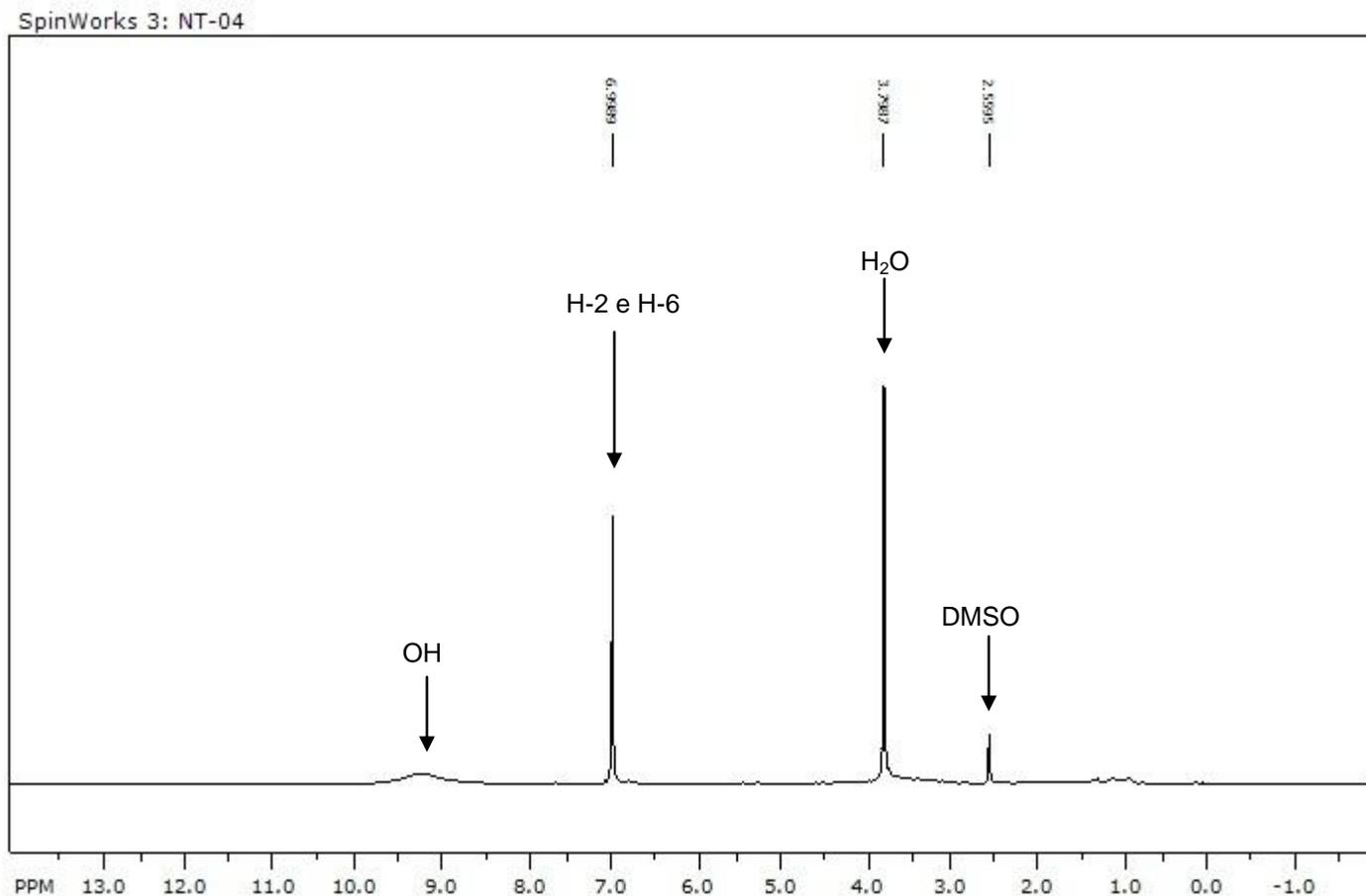


Figura 38 - Espectro de RMN ¹H de **ST-04** (500 MHz).

Os sinais de ¹H remetem à estrutura de uma molécula aromática tetrasubstituída, e para confirmar esta estrutura tais sinais foram comparados com os dados desse ácido na literatura (Tabela 6) (Moura, et al. 2011).

Tabela 6: Comparação dos sinais de ¹H da amostra ST-04 e os sinais do ácido gálico observados na literatura.

δ_H ST-04 (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ_H Literatura (DMSO- <i>d</i> ₆) (Moura et al. 2011)
H-2 e H-6 (6,99; s)	H-2 e H-6 (6,92; s)

Desse modo, com os sinais de ^1H obtidos por este espectro e comparando com os dados da literatura, se pode deduzir que a estrutura em questão é o ácido gálico (Figura 39).

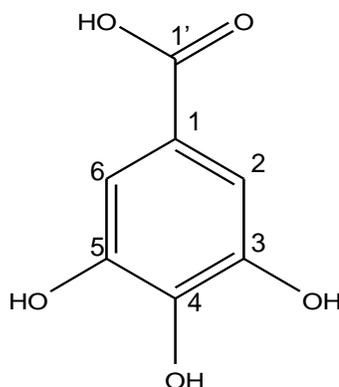


Figura 39 - Estrutura proposta de ST-04, ácido gálico.

5.2.2.1.2 RMN APT

O espectro de RMN de APT forneceu 5 sinais (Figura 40), onde o sinal em 108,9 corresponde aos carbonos C-2 e C-6, e o sinal em 146,02 corresponde aos carbonos C-3 e C-5.

Observa-se um sinal mais desprotegido do espectro, em 166,7 ppm, que refere-se ao carbono C1' correspondente à carbonila do ácido carboxílico (Eldahshan, 2010).

O segundo sinal mais desprotegido do espectro está listado para os carbonos C-3 e C-5 (146,02 ppm), devido à sua ligação com a hidroxila.

O sinal listado em 138,86 foi assinalado para o C-4 que está em região desprotegida, devido à sua ligação com a hidroxila. O sinal em 108,90 ppm corresponde ao C-2 e C-6 que está ligado ao hidrogênio (Figura 40). E o carbono 1 possui sinal em 119,71 ppm.

A tabela 7 correlaciona os sinais de APT do espectro obtido da amostra ST-04 com os sinais do ácido gálico descritos na literatura (Moura et al. 2011). A partir dos dados de APT e ^1H foi possível corroborar a proposta do Ácido Galico (Figura 41).

Tabela 7: Comparação dos sinais de APT de ST-04 e os sinais do ácido gálico observados na literatura.

	δ_c (DMSO- d_6)	δ_c (DMSO- d_6)
	ST-04	Literatura (Moura et al. 2011)
Ácido Gálico		
1	119,71	120,7
2	108,9	108,8
3	146,02	145,4
4	138,86	138,0
5	146,02	145,4
6	108,9	108,8
1'	166,77	167,6

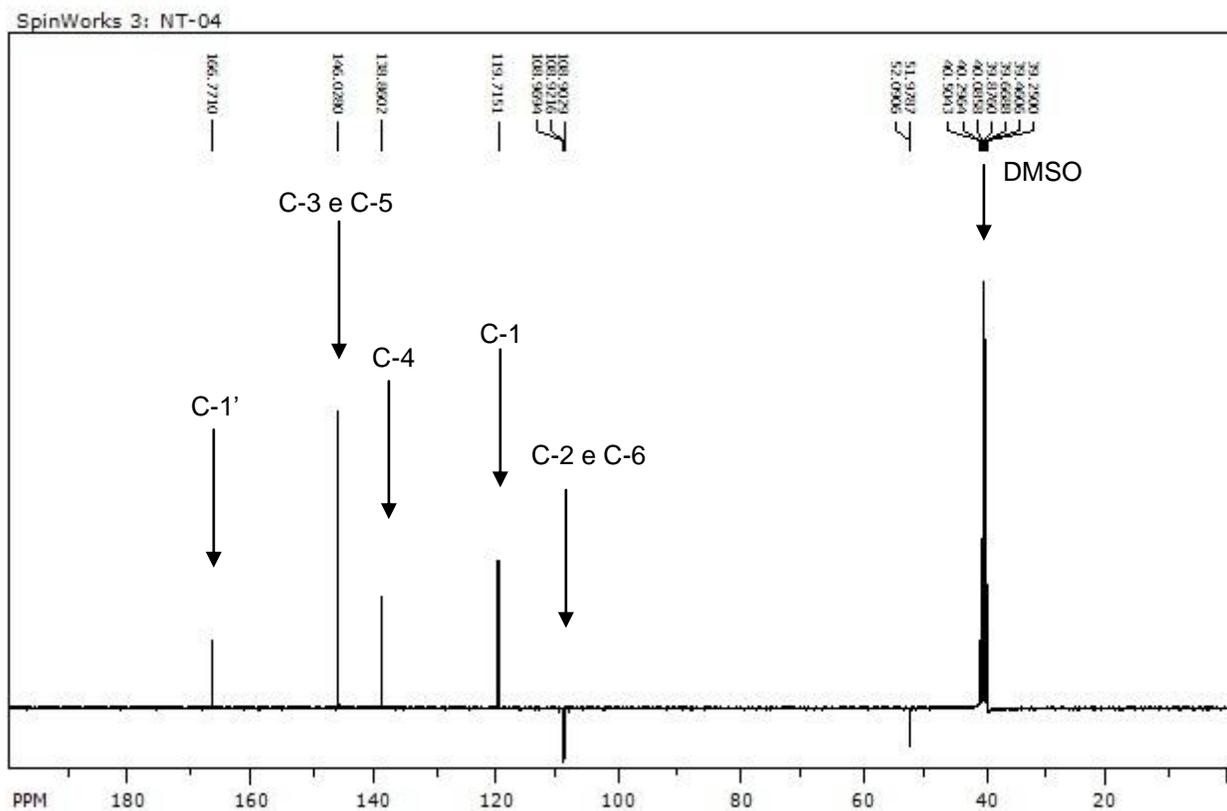
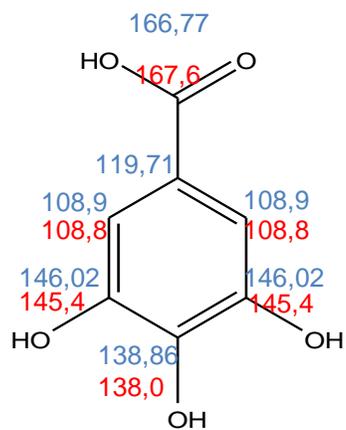


Figura 40 - Espectro de RMN APT de **ST-04** (500 MHz).



ST-1

Literatura

Figura 41 - Sinais de APT do ácido gálico (ST-04) comparados com os dados da literatura (Moura et al. 2011).

A tabela 8 mostra um resumo dos sinais de RMN ^1H e RMN APT verificados para ST-04 e comparados com os dados da literatura (Moura et al. 2011).

Tabela 8: Comparação dos sinais de ST-04 e os sinais do ácido gálico da literatura (Moura et al. 2011).

	δ_c ST-04 (DMSO- d_6)	δ_c Literatura (DMSO- d_6)	δ_H ST-04 (DMSO- d_6)	δ_H Literatura (DMSO- d_6)
Ácido Gálico				
1	119,71	120,7	----	---
2	108,9	108,8	6,99	6,92
3	146,02	145,4	---	---
4	138,86	138,0	---	---
5	146,02	145,4	---	---
6	108,9	108,8	6,99	6,92
1'	166,77	167,6	---	---

5.2.3 Técnicas bidimensionais

5.2.3.1 COSY ^1H - ^1H

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos H-2 e H-6 (vermelho). É possível verificar pelo espectro somente essa correlação, visto que apenas estes dois hidrogênios estão acoplado. A figura 42 mostra o espectro de COSY, com essa correlação.

SpinWorks 3: NT-04

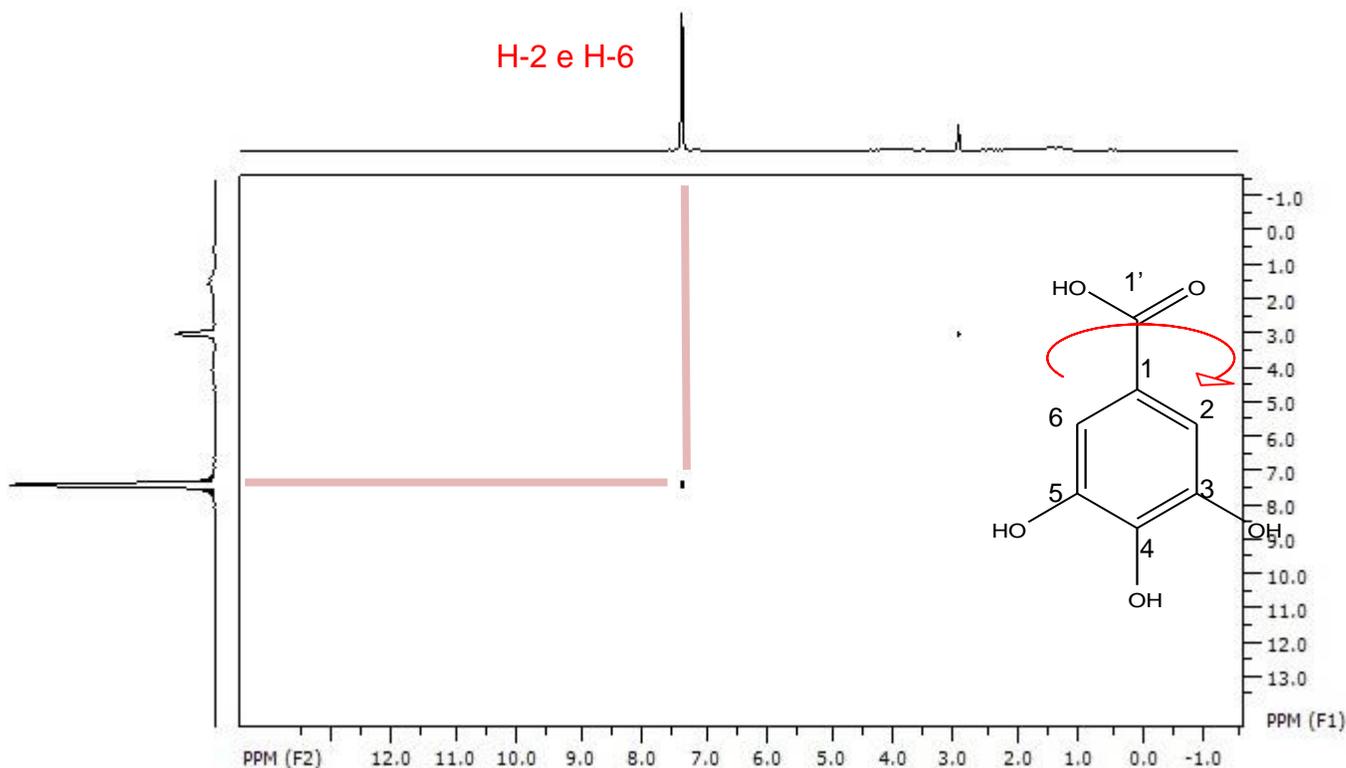


Figura 42 - Espectro de RMN 2D- COSY para ST-04.

5.2.3.2 HMQC

A partir dos dados do espectro de HMQC (Figura 43) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C a eles diretamente ligados. Com isso, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar os valores dos deslocamentos químicos (δ) dos carbonos da molécula que possuía um hidrogênio a eles ligado.

Pelo espectro de HMBC é possível correlacionar os sinais de H-2 e H-6 com os carbonos C-2 e C6 (linha azul), ou seja, a correlação dos hidrogênios e carbonos ligados diretamente a eles.

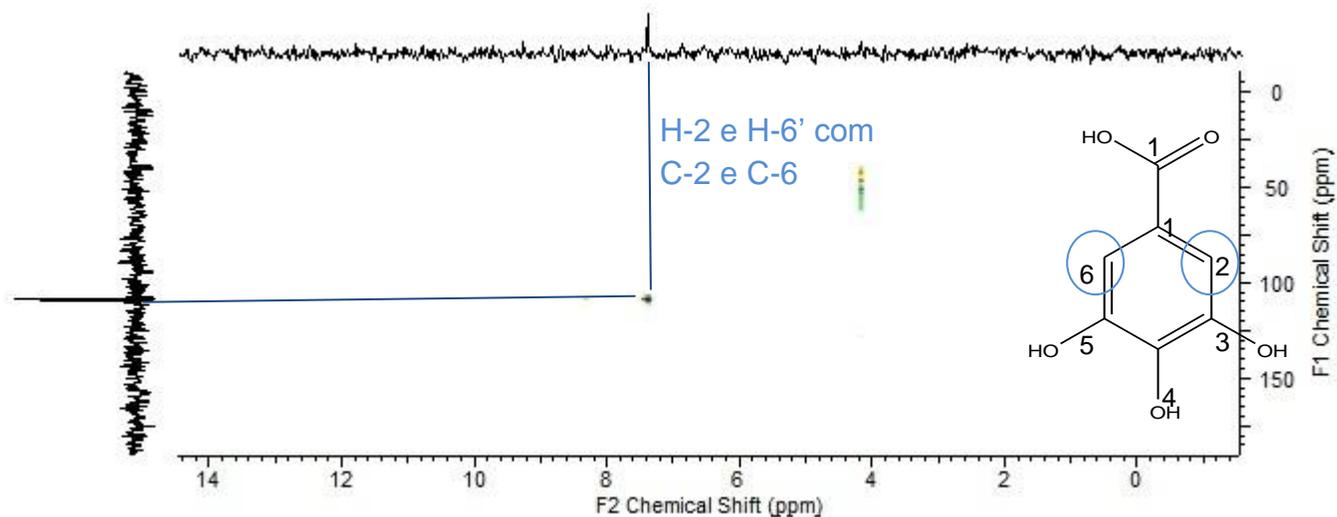


Figura 43 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-04.

5.2.3.3 HMBC

Através da análise das correlações a longa distância ^1H - ^{13}C (Figura 44) foi possível detectar a correlação entre os núcleos de ^1H e os núcleos de ^{13}C , a duas ou mais ligações de distância. A partir da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar a correlação entre os sinais de H-2 e H-6 com os carbonos C-2 e C6 (linha azul), bem como com C-4 (linha vermelha), C-5 e C-3 (Linha verde) e por fim com o C-1' (Linha preta) (Figura 44).

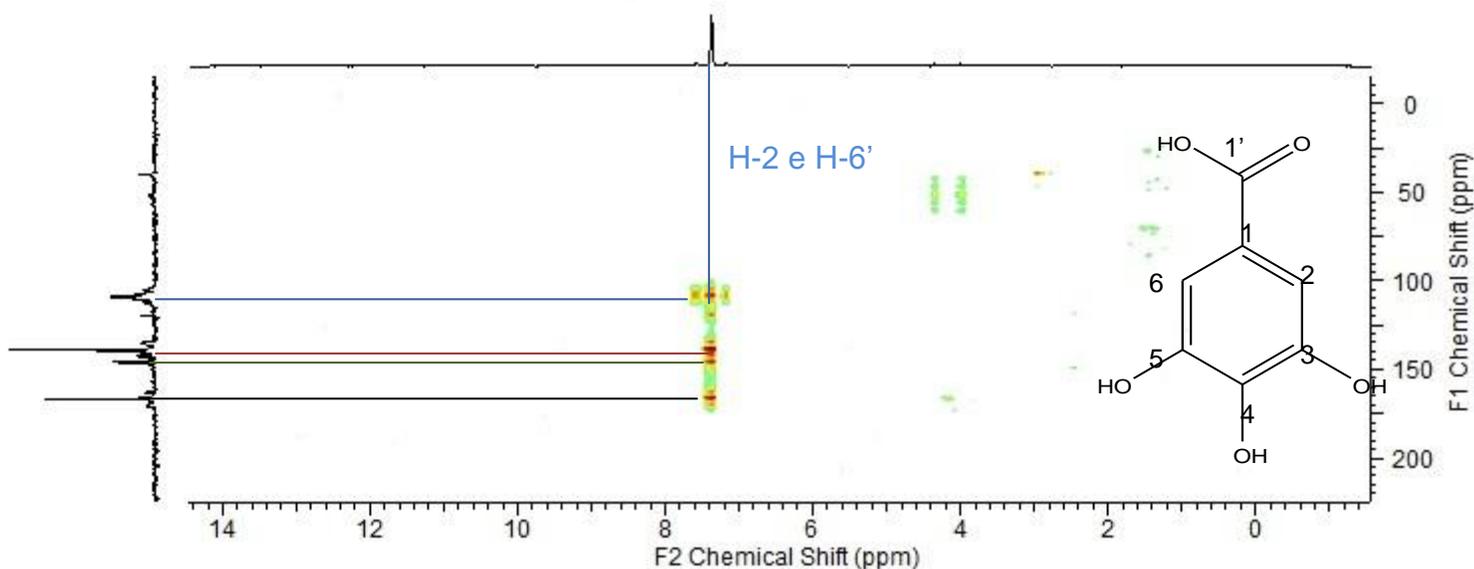


Figura 44 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-04.

5.2.3.4 Proposta Estrutural

A análise dos espectros mono e bidimensionais revelou a presença do ácido gálico (Figura 45). Os sinais de RMN de ^{13}C e ^1H estão listados na Tabela 8 e a comparação com dados da literatura (Moura et al. 2011).

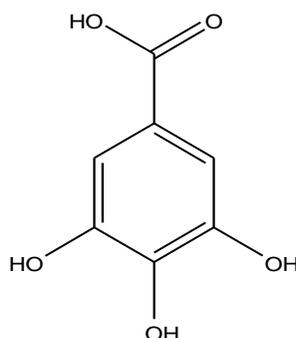


Figura 45 - Estrutura de ST-04 (Ácido gálico).

Esta molécula já foi isolada anteriormente no trabalho Skopp e Schwenker (1986) a partir dos frutos de aroeira. Também se pode encontrá-la nas folhas (Santos, 2009; Carvalher-Machado et al. 2008), e nas cascas de *S. terebinthifolius* (Martorelli et al. 2011).

O ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzóico) é um ácido orgânico aromático descoberto em 1786 por C.W. Scheele. É o constituinte básico dos taninos hidrolisáveis, originado pela rota biossintética via ácido chiquímico, sendo derivado do ácido benzoico, encontrado amplamente em plantas lignificadas, frequentemente na forma do seu dímero, o ácido elágico (Longhini, 2006, Simões et al. 2004). É mais frequentemente encontrado em plantas na forma de éster como um tanino hidrolisável, que exibe atividades similares (Krogh, 2001). Uma atividade muito especial apresentada pelo ácido gálico é a indução de morte celular (apoptose) em células cancerosas com alta seletividade, muito maior que em células normais. Além disso, o ácido gálico induz apoptose em células de leucemia promielocítica HL-60RG (Krogh, 2001; Inoue et al. 1994).

5.2.4 – Quantificação do ácido gálico no extrato metanólico

Tendo em vista a existência e elucidação do ácido gálico nos frutos de aroeira optou-se por avaliar o quão representativo é essa substância no extrato. Sabe-se que o ácido gálico exibe intensa absorção na região do ultravioleta, e isso permite sua avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia de alta eficiência (CLAE) (De Souza, 2004). Sendo assim, para a quantificação desse ácido fenólico no extrato por CLAE, foi realizada uma curva padrão (área do pico X massa em µg) utilizando-se uma amostra pura de ácido gálico (Figura 46).

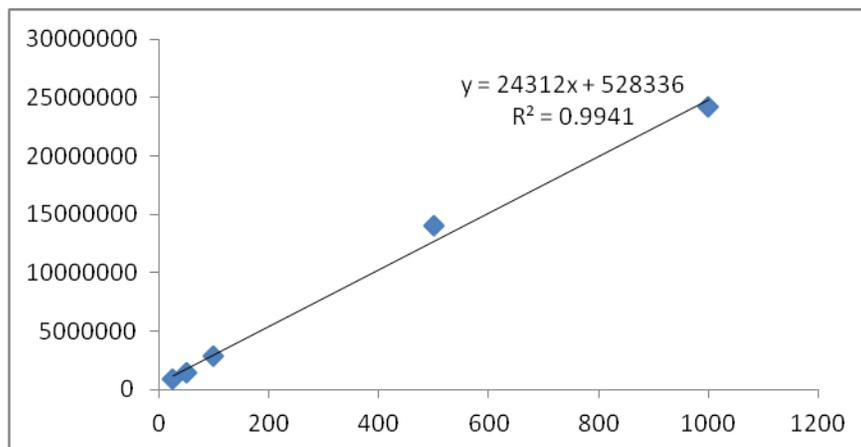


Figura 46 - Curva padrão do ácido gálico.

Desta forma, a partir da curva padrão de ácido gálico elaborada (Figura 46) foi possível quantificar esse ácido presente no extrato (Tabela 9; CLAE - Figura 17, página 51).

Tabela 9: Quantificação do ácido gálico presente no extrato metanólico dos frutos de aroeira.

Amostra	Tr (min)	Extrato MeOH ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido gálico	10.89	677.3

Esse resultado demonstra o quão significativo é a presença desse ácido nos frutos de aroeira. No trabalho de Bezerra (2012) a concentração de ácido gálico encontrado nas cascas de aroeira foi de apenas 0.86 $\mu\text{g/mL}$.

O resultado obtido neste trabalho é semelhante às concentrações de frutos com elevado teor de compostos fenólicos como a framboesa, onde no trabalho de Rampazzo et al. (2010) foi quantificado 880 $\mu\text{g/mL}$ deste ácido .

Vale a pena ressaltar a importância desse fruto em concentrar elevados teores desse ácido, visto que este é conhecido por apresentar elevado potencial antioxidante, agindo como inibidor de radicais livres (Bezerra, 2012).

5.2.5 - RMN da Substância ST-5-1

5.2.5.1 Técnicas monodimensionais (^1H)

Após a purificação do G-14, o que conduziu à substância ST-05-1 (G-14B), que foi submetida à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , os dados estão listados na tabela 10:

Tabela 10: Sinais listados de ^1H para a substância ST-05-1.

RMN ^1H (DMSO-d_6) PPM
H-6 (6,18; br)
H-8 (6.18; br)
H-3', 5' (6.81; dd; J= 4.0 Hz)
H-4' (7.48; m)
H-2', 6' (8.0; s)

Inicialmente, foi analisado o espectro de RMN ^1H da amostra ST-05-1 obtido em DMSO- d_6 (400 MHz) (Figura 47).

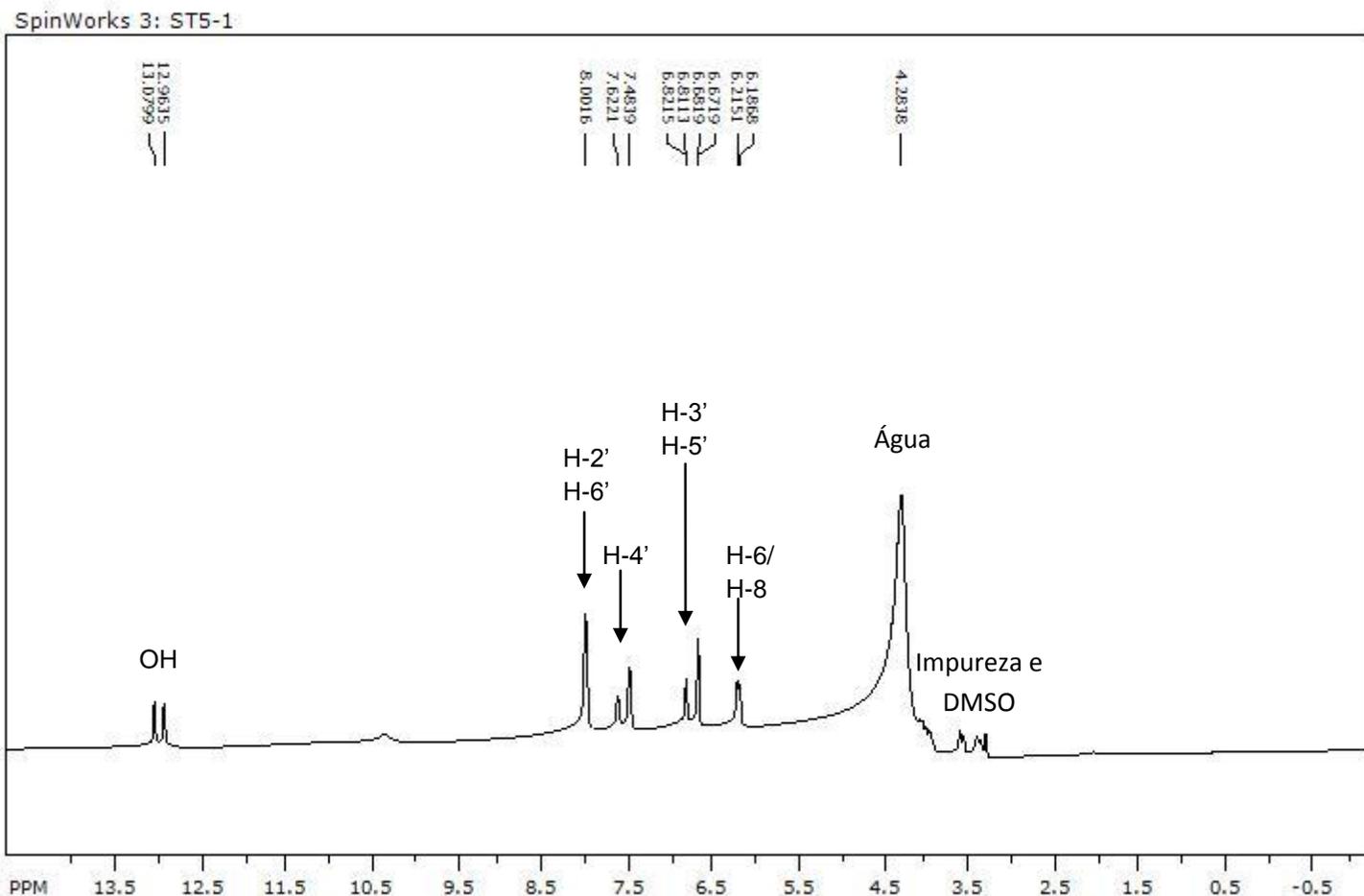


Figura 47 - Espectro de RMN ^1H de **ST-05-1** (400 MHz).

O espectro de RMN de ^1H para ST-5-1 apresentou o mesmo padrão de aglicona apresentado pelo flavonoide ST-02, porém sem a presença da região característica para os carboidratos.

O sinal mais deslocado, ou seja, mais desblindado, como um singleto em 12,9 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila 5 da aglicona que se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em 4.

Na região do espectro correspondente aos núcleos aromáticos (6,00 - 8,00 ppm), pode-se observar a presença de quatro sinais, sendo um correspondente a

região do anel A (6.18 ppm; núcleo mais protegido) e três para a região do anel B (6.81, 7.48 e 8.0 ppm; núcleo mais desprotegido) (Mabry et al. 1970).

Para o anel A foram observados sinais em 6,18 ppm que apresentam-se sobrepostos, mostrando-se como um sinal largo (broad) (Silva et al. 2009), ou seja, os hidrogênios correspondentes ao H-6 e H-8, apresentam o mesmo ambiente químico, apresentando constantes de acoplamento pequenas, o que indica um acoplamento meta entre esses dois hidrogênios, mostrando tratar-se de um flavonoide 5,7- diidroxilado no anel A.

Ao analisar a região do anel B, observa-se que esse anel encontra-se não substituído devido à presença de dois dupletos e um singleto correspondentes aos sinais H-3'/H-5', H-4' e para o sinal do H-2'/H-6'. É possível observar dois dupletos correspondentes aos átomos de hidrogênios (H-3'/H-5': δ_H 6.81 – 6.82; e H-4': δ_H 7.48 – 7.62) apresentando constantes de acoplamento *para* ($j = 4.0$ Hz) e outra constante com valor elevado, indicando a presença de multipletos. No sinal em 8.0 ppm observa-se a presença dos hidrogênios de H-2'-6', representado por um singleto. Sendo assim, deduz-se com esses dados que o anel B não apresenta nenhuma substituição.

Os sinais de 1H encontrados remetem à estrutura da galangina, e para confirmar esta estrutura tais sinais foram comparados com os dados dessa aglicona na literatura (Tabela 11) (Kaouadji, 2014; Agrawall, 1989).

Tabela 11: Comparação dos sinais de ^1H da amostra ST-5-1 e os sinais da galangina observados na literatura.

δ_{H} ST-5-1 (DMSO- d_6)	δ_{H} Literatura (DMSO- d_6) (Kaouadji, 2014)
H-6 (6,18; br)	H-6 (6,4; s)
H-8 (6,18; br)	H-8, (6,5; s)
H-3', 5' (6,81; d; J= 4.0 Hz)	H-3', 5' (7,55; d; J= 7.3 Hz)
H-4' (7,48; m)	H-4' (7,49; m)
H-2', 6' (8,0; s)	H-2', 6' (8,20; d; J= 7,3 Hz)

Assim, com os sinais de ^1H obtidos por este espectro e comparando com os dados da literatura, se pode deduzir que a estrutura da aglicona é a galangina (Figura 48).

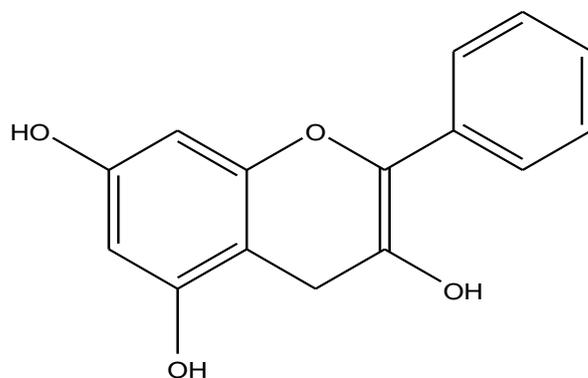


Figura 48 - Estrutura proposta de ST-5-1 Galangina (3, 5, 7 trihidroxi flavonol).

5.2.5.2 RMN APT

O espectro de RMN de APT forneceu 13 sinais (Figura 49), que se referem a 13 carbonos, conforme tabela 12, uma vez que o sinal em 128.4 corresponde aos carbonos C-3' e C-5', e o sinal em 131.8 corresponde aos carbonos C-2' e C-6'.

Observa-se para o anel C da aglicona um sinal mais desprotegido do espectro, em 196,8 ppm, o que confirma a presença de uma carbonila cetônica em C-4 α - β insaturada (Yoshikawa et al. 2000).

O segundo sinal mais desprotegido do espectro está listado em 163,9 e foi assinalado para o C-7 que está em região desprotegida, devido à sua ligação com a hidroxila. O sinal em 160.46 ppm corresponde ao C-5, que está hidroxilado (Figura 37). O carbono 6 e C-8 estão ligados a um hidrogênio e seu sinal está em 95,3 ppm e 97.2 ppm, respectivamente.

Em 157.8 ppm encontra-se o sinal atribuído ao C-2. Com base no deslocamento observado (mais desprotegido), a posição 3 da aglicona está com a presença de um substituinte, uma vez que, quando esta posição não está substituída, o deslocamento para C-2 fica próximo de 148 ppm (Mabry et al., 1970). O valor para C-3 é de 131.8 ppm, característico para flavonol (Mabry et al. 1970).

Para o anel B quatro sinais são observados, todavia os sinais em 128.4 ppm correspondem aos carbonos C-3' e C-5', e o sinal em 120.6 ppm corresponde aos carbonos C-2' e C-6'. Os sinais em 129.4 e 131.8 ppm foram atribuídos aos carbonos C-1' e C4', respectivamente.

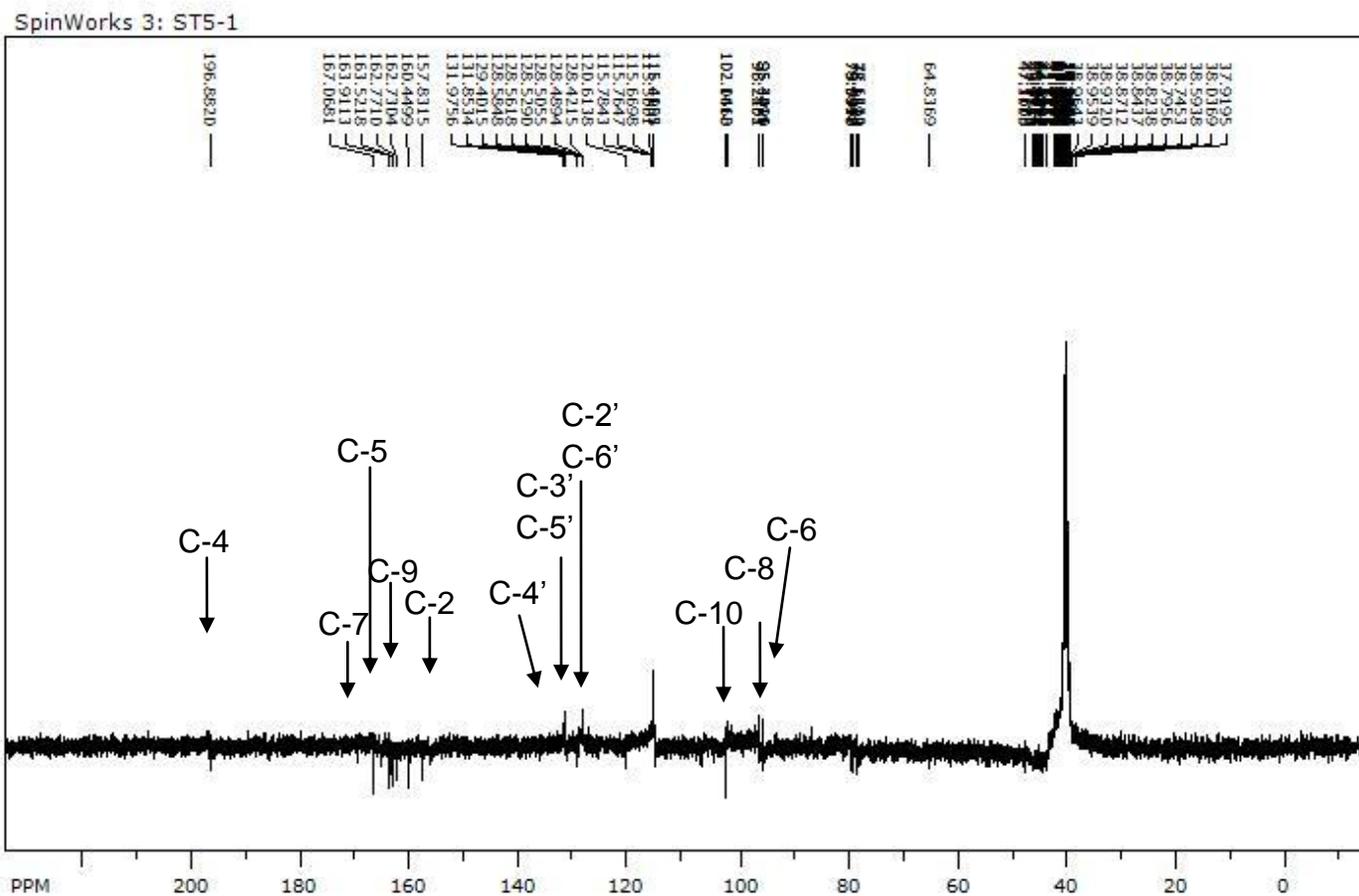


Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C de **ST-5-1** (400 MHz).

A Tabela 12 correlaciona os sinais de ^{13}C do espectro obtido da amostra ST-5-1 com os sinais da galangina encontrados na literatura (Kaouadji, 2014; Agrawal, 1989).

Tabela 12: Comparação dos sinais de ^{13}C de ST-5-1 e os sinais da galangina observados na literatura.

	δ_c (DMSO- d_6) ST-5-1	δ_c (DMSO- d_6) Literatura (Kaouadji, 2014)
Galangina		
2	157.8	145.0
3	131.8	136.6
4	196.8	175.4
5	160.4	160.8
6	95.3	98,6
7	163,9	165.3
8	97.2	92.8
9	160,4	157.0
10	102.0	103.8
1'	129.4	130.8
2'	120.6	128,6
3'	128.4	127.6
4'	131.8	130.3
5'	128.4	127.6
6'	120.6	128,6

Com os dados de ^{13}C foi possível corroborar a proposta da aglicona galangina (Figura 48).

A tabela 13 mostra um resumo dos sinais de RMN ^1H e RMN APT verificados para ST-5-1 e comparados com os dados da literatura (Kaouadji, 2014; Agrawal, 1989).

Tabela 13: Comparação dos sinais de ST-5-1 e os sinais da galangina da literatura (Kaouadji, 2014; Agrawall, 1989).

	δ_c ST-5-1 (DMSO- d_6)	δ_c Literatura (DMSO- d_6)	δ_H ST-5-1 (DMSO- d_6)	δ_H Literatura (DMSO- d_6)
Galangina				
2	157.8	145.0	----	---
3	131.8	136.6	----	----
4	196.8	175.4	---	---
5	160.4	160.8	---	---
6	95.3	98,6	6,18	6,40
7	163,9	165.3	---	---
8	97.2	92.8	6,68	6,51
9	160,4	157.0	---	---
10	102.0	103.8		
1'	129.4	130.8	---	---
2'	120.6	128,6	8,0	8.20
3'	128.4	127.6	6.81	7.55
4'	131.8	130.3	7.48	7.49
5'	128.4	127.6	6.81	7.55
6'	120.6	128,6	8,0	8.20

5.2.6 Técnicas bidimensionais

5.2.6.1 COSY 1H - 1H

A partir da análise do COSY foi possível identificar a correlação entre os hidrogênios vizinhos H-2', 6' com H-3'-5' (vermelho). Também se observa a correlação entre H-4' e o H-2', 6' (azul). A figura 50 mostra o espectro de COSY, com essa correlação.

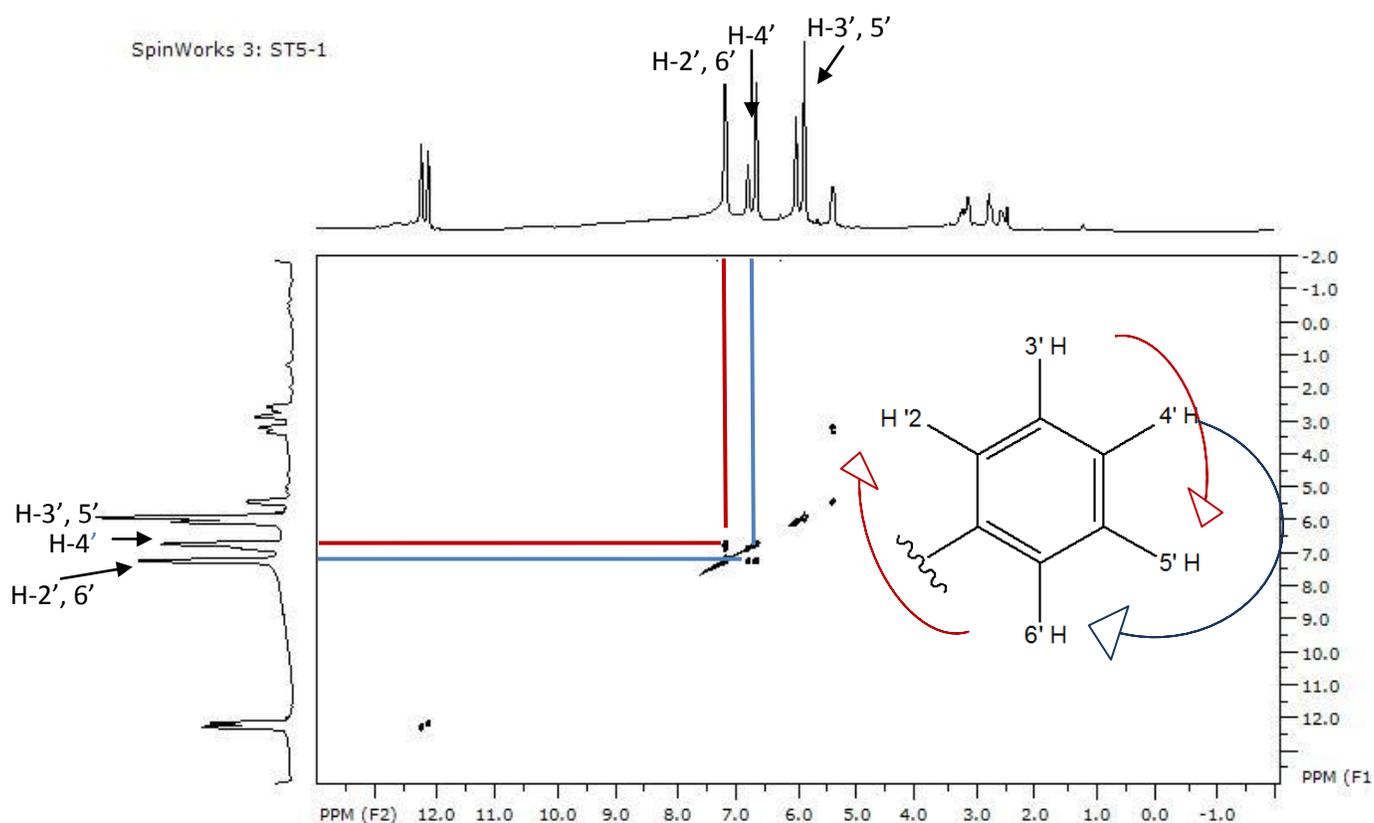


Figura 50 - Espectro de RMN 2D- COSY para ST-5-1.

5.2.6.2 HMQC

A partir dos dados do espectro de HMQC (Figura 51) foi possível estabelecer a correlação direta entre os núcleos de ^1H com os núcleos de ^{13}C a eles diretamente ligados. Dessa forma, através da avaliação dos resultados desta análise foi possível confirmar os valores dos deslocamentos químicos (δ) dos carbonos da molécula que possuía um hidrogênio a eles ligado.

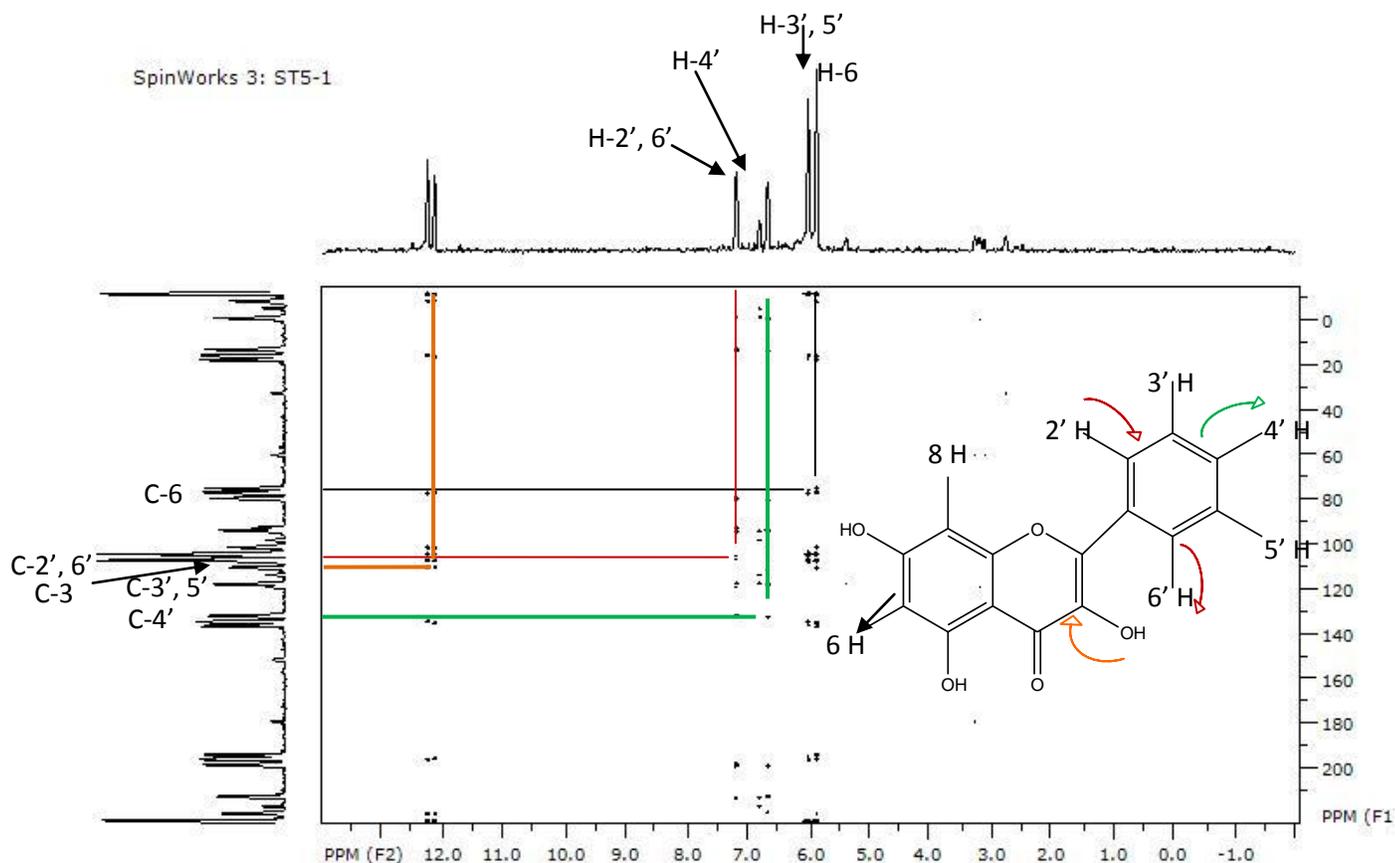


Figura 51 - Espectro de RMN-2D HMBC para ST-5-1

Pelo espectro de HMBC é possível correlacionar os sinais de H-4' correlacionando com o C-4' (verde) e os sinais de H-2', 6' com os carbonos C-2' e C-6' (linha vermelha), ou seja, a correlação dos hidrogênios e carbonos ligados diretamente a eles. Para o anel C é possível observar a correlação da hidroxila (OH) ligada ao C3 (laranja), comprovando o isolamento de um flavonol. E por fim, a correlação do H-6 com o C-6 (preto), presentes no Anel A.

5.2.6.3 Proposta Estrutural

A análise dos espectros mono e bidimensionais revelou a presença da aglicona galangina (Figura 52), onde condiz com o mesmo espectro da substância ST-02, porém sem a presença do carboidrato. Os sinais de RMN de APT e ^1H estão

listados na Tabela 13 e a comparação com dados da literatura (Kaouadji, 2014; Agrawall, 1989).

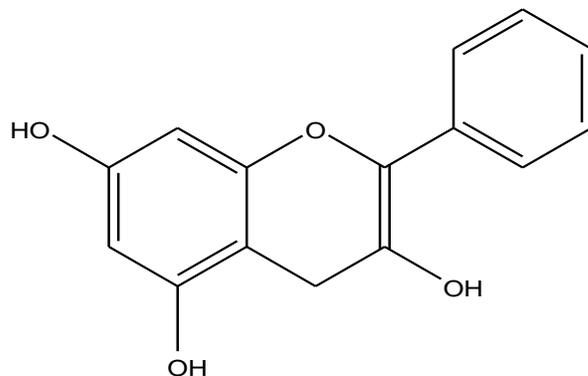


Figura 52 - Estrutura proposta de ST-5-1 Galangina (3, 5, 7 trihidroxi flavonol).

Vale a pena ressaltar que devido a pouca massa resultante do fracionamento (6,8 mg), não foi possível avaliar as demais atividades biológicas com esse flavonol.

5.3 – Teor de Fenóis Totais

Os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo de vegetais e atuam na proteção da planta contra condições adversas. Eles contribuem para as características como adstringência, cor, flavour e também para a estabilidade oxidativa da planta (Naczki e Shahidi, 2004).

Com o passar dos anos, estudos mostraram evidências que o consumo de compostos fenólicos traz benefícios ao organismo, e este fato estaria associado ao seu poder antioxidante. Como exemplos, pode-se citar o estudo realizado na Holanda, que mostrou a correlação inversa entre a incidência de risco de doença coronariana e o consumo diário desses compostos (Halliwell, 2007).

O resultado do teor de fenóis totais do extrato metanólico e das partições aquosa e orgânica está listado na tabela 14.

Tabela 14: Teor de fenóis totais do extrato metanólico, partição aquosa e orgânica.

Amostras	Concentração (mg/mL)
Extrato MeOH	0,66 ± 1,0
Part. Aquosa	0,27 ± 1,2
Part. Orgânica	1,4 ± 0,5

De acordo com os dados demonstrados na Tabela 14, pode-se observar que a partição orgânica apresenta a maior concentração de fenóis totais, seguido do extrato metanólico e da partição aquosa. Tal resultado confirma a concentração das moléculas de interesse (substâncias fenólicas) no processo de fracionamento do extrato metanólico, como pode ser observado no cromatograma 3 (Figura 22).

No trabalho de Degápari et al. (2005) foi obtido do extrato alcóolico 685 µg de catequina/g de amostra, esse resultado indica que os dados obtidos nesta tese de doutorado apresentaram valores superiores de fenóis totais. Estas diferenças podem ser atribuídas à variedade botânica, à maturidade da planta, à extração e aos métodos analíticos, bem como à origem geográfica das plantas (Zimmer et al. 2012).

Este resultado corrobora com trabalhos (Barbosa-Pereira et al. 2014; Bendary et al. 2013; Woraratphoka et al. 2012) que demonstram a correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de extratos de diferentes plantas, visto que se comparados os resultados da atividade antioxidante avaliados por diferentes métodos, explicados mais a frente no item 4.5 páginas 81 (Método DPPH) e 88 (Método FRAP), a partição orgânica apresentou melhor potencial antioxidante, seguido do extrato metanólico e da partição aquosa.

De acordo com Barbosa-Pereira e colaboradores (2014), os polifenóis apresentam diversas aplicações industriais como aditivos naturais com propriedades antioxidantes, por exemplo, nos cosméticos e nas indústrias de alimentos. Além disso, os compostos fenólicos apresentam benefícios positivos para a saúde na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (Scalbert, et al. 2005).

Atualmente, há um crescente interesse em fitoquímicos como novas fontes de antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos (Barbosa-Pereira et al. 2014; Robards, 2003). A utilização de antioxidantes sintéticos na área de alimentos e na indústria, como os hidroxianil butilado (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP), terc- butil hidroquinona (TBHQ) e palmitato de ascorbila (AP) está severamente limitada pela legislação sobre sua aplicação e suas concentrações (Barbosa-Pereira et al. 2014). Além disso, há alguns problemas de segurança relacionados com a toxicidade residual de conservantes químicos (EFSA, 2012).

Por isso, observa-se uma tendência para evitar ou pelo menos reduzir o uso de aditivos sintéticos, criando a necessidade de uma alternativa barata, renovável, natural e possivelmente fontes mais seguras de moléculas naturais com propriedades antioxidantes e atividades antimicrobianas para estabilizar os alimentos contra o ranço oxidativo e a deterioração microbiana (Cruz et al. 2007; Moure et al. 2001).

5.4 - Atividade Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparadas a um substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Handelman, 2001; Sies e Sthal, 1995). O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos de ação têm sido muito estudados, uma vez que estes são amplamente empregados, principalmente, com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos (Ramalho e Jorge, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para se determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Observa-se um aumento no uso da avaliação da capacidade antioxidante em alimentos, produtos naturais, fármacos e cosméticos (Bezerra, 2012; Oliveira et al. 2009). Este interesse começou a se expandir a partir da década de 90, quando começou a ser constatada a influência benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana (Tomei e Salvador, 2007). Da mesma forma, tornou-se também

crecente a busca e a validação de metodologias para a avaliação da atividade antioxidante em matrizes complexas, como alimentos, produtos naturais e fluidos biológicos (Tiveron, 2010; Roginski e Lissi, 2005; Sanchez-Moreno, 2002).

Dentre os métodos utilizados para se estimar a capacidade antioxidante estão o DPPH (redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil) e o FRAP (Método de redução do ferro). A tabela 15 relaciona as vantagens e limitações dessas duas técnicas.

Tabela 15: Vantagens e limitações das técnicas antioxidantes DPPH e FRAP.

Técnica	Vantagens	Limitações
DPPH	Relativa simplicidade; Baseado na capacidade do DPPH' reagir com doadores de hidrogênio (Tomei e Salvador, 2007)	Os radicais DPPH podem interagir com outros radicais (alquil), e, a curva de resposta em tempo para atingir o estado estacionário não ser linear, com diferentes relações de antioxidante/DPPH' (Roginsky e Lissi, 2005).
FRAP	Baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe ³⁺ em Fe ²⁺ ; Boa alternativa para análise de fluidos biológicos e soluções aquosas (Pulido et al. 2000).	Consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra. Como o método não inclui um substrato oxidável, ou seja, uma degradação oxidativa real, não há informações fornecidas sobre as propriedades dos antioxidantes (Roginsky e Lissi, 2005).

5.4.1 – Sequestro do Radical Livre DPPH

A oxidação dos lipídios é considerada uma das principais causas da deterioração do alimento, afetando tanto a qualidade nutricional / sensorial e a segurança destes, em especial, produtos ricos em lipídios têm sido um desafio para preservação de alimentos. Entre as várias estratégias empregadas para controlar a oxidação dos lipídios, a adição de antioxidantes é a abordagem mais eficaz, conveniente e econômica (Zhong e Shahidi, 2012).

Além dos efeitos prejudiciais dos radicais livres na alimentação, pode-se observar o efeito do estresse redox no corpo humano. Esse estresse redox é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, enxofre e nitrogênio, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (Vasconcelos et al. 2007; Rahman et al. 2006). Todo esse estresse redox está associado a diversos fatores, como hábitos de vida considerados inapropriados (consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico realizado de forma extrema e exposição à radiação não ionizante ultravioleta e outras ondas curtas); condições ambientais impróprias (temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional); envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional. Há também patologias crônicas (diabetes mellitus, hipertensão arterial, câncer, entre outras) e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Sendo assim, o uso de antioxidantes é considerado eficiente estratégia para se evitar danos, tanto na saúde humana quanto na indústria de alimentos. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (Souza, 2006).

A fim de se verificar o potencial antioxidante dos frutos de aroeira e das substâncias resultantes do seu fracionamento, estes foram submetidos à avaliação

da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH, onde se observa na Tabela 16 os resultados obtidos. Os padrões utilizados neste trabalho foram os flavonoides quercetina, rutina e apigenina e o padrão comercial de estrutura fenólica, Butil-hidroxitolueno (BHT). Também é possível de se verificar na Tabela 16 o potencial da atividade antioxidante através do EC_{50} das amostras testadas neste trabalho, o qual é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH.

Os flavonoides foram utilizados como padrões devido ao seu efeito protetor nos sistemas biológicos, que são atribuídos à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres, também ativam as enzimas antioxidantes e inibem as oxidases (Agati et al. 2012; Heim, 2002). De acordo com Ross e Kasum (2002), a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura, em especial pela facilidade com que um átomo de hidrogênio a partir de uma hidroxila do anel aromático pode ser doado para um radical livre. E a capacidade de um composto aromático em estabilizar um elétron não emparelhado (Figura 53).

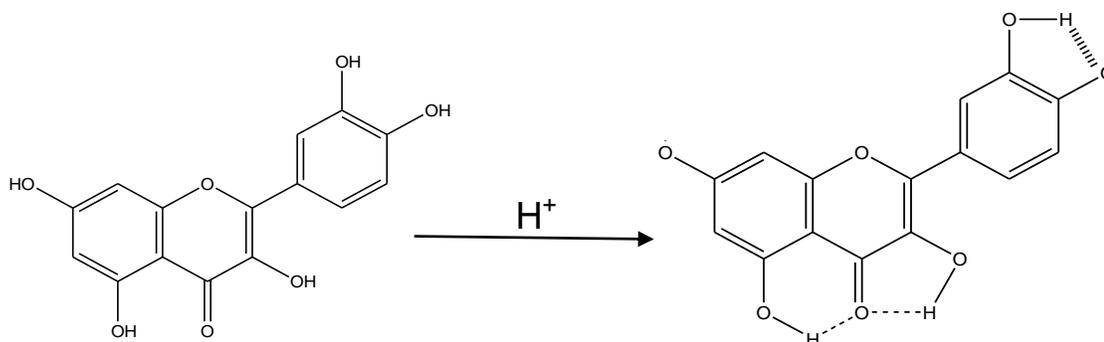


Figura 53 - Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado.

Tabela 16: Atividade antioxidante pelo método DPPH e EC_{50} do extrato metanólico, da partição aquosa, da orgânica, das frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT).

Espécies Vegetais	Concentrações			EC_{50}
	1000 $\mu\text{g/mL}$ (%)	10 $\mu\text{g/mL}$ (%)	10 $\mu\text{g/mL}$ (%)	
Extrato MeOH	94,1 \pm 0,1	94,3 \pm 0,3	67,8 \pm 0,1	14,4 \pm 1,1
Part. Aquosa	93,2 \pm 0,2	44,1 \pm 0,9	1,1 \pm 1,0	127,3 \pm 1,1
Part. Orgânica	94,3 \pm 0,4	92,1 \pm 0,9	90,1 \pm 0,6	0,9 \pm 1,6
Ácido Gálico (ST-04)	96,7 \pm 1,3	94,4 \pm 0,3	93,6 \pm 0,7	0,5 \pm 1,8
ST-05	69,6 \pm 0,7	26,8 \pm 0,2	12,3 \pm 0,5	328,1 \pm 1,1
ST-06	93,6 \pm 0,5	91,8 \pm 0,8	17,6 \pm 0,3	27,6 \pm 1,3
Quercetina	95,3 \pm 0,9	93,4 \pm 1,2	91,3 \pm 3,0	0,7 \pm 1,9
Rutina	88 \pm 0,9	86,4 \pm 1,1	0,84 \pm 0,9	41,3 \pm 1,4
Apigenina	60 \pm 1,5	41,3 \pm 2,7	9,5 \pm 1,0	270,6 \pm 1,3
BHT	100 \pm 0,9	52,1 \pm 2,2	43,6 \pm 1,5	40,3 \pm 1,5

*Média \pm Desvio Padrão (n=3).

Neste estudo, o potencial antioxidante do extrato metanólico, das frações aquosas e orgânicas, ST-05 e ST-06, bem como a substância isolada ácido gálico (ST-04) foram avaliados com base na capacidade de sequestrar o DPPH. Este teste é muito importante para fornecer informações sobre a reatividade dos compostos orgânicos com os radicais livres estáveis, devido ao número ímpar de elétrons. O reagente DPPH apresenta uma forte banda de absorção em 517 nm no espectro visível (de cor violeta escura). Como o elétron ficou estabilizado no sequestro de radicais livres, a absorção diminuiu e com isso, ocorreu mudança da cor resultante (Bulbul et al. 2011; Anup et al. 2010). É possível verificar pela Tabela 16 que todas as amostras testadas na maior concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram mudança de coloração, apresentando capacidade de sequestro de radicais livres.

O ácido gálico (ST-04) foi a amostra que se apresentou como o melhor antioxidante frente ao DPPH (EC_{50} 0,52 \pm 1,8 $\mu\text{g/mL}$), seguido da partição orgânica (EC_{50} 0,9 \pm 1,6 $\mu\text{g/mL}$), do extrato metanólico (EC_{50} 14,39 \pm 1,12 $\mu\text{g/mL}$), ST-06 (EC_{50}

27,6 ± 1,3 µg/mL), da partição aquosa (EC₅₀ 127,3 ± 1,14 µg/mL), e por fim ST-05 (EC₅₀ 328,1 ± 1,1 µg/mL).

O extrato metanólico apresentou alta capacidade de sequestro de radicais livres (94%) nas duas concentrações testadas (1000 e 100 µg/mL), sendo que na menor concentração (10 µg/mL) este apresenta atividade superior a 50% (EC₅₀ 14,4 ± 1,1 µg/mL). Tal atividade também se apresenta superior ao padrão comercial BHT, e do flavonoide apigenina, que na concentração mais alta apresenta atividade de 60 % (EC₅₀ 270,6 ± 1,4 µg/mL). Esse resultado confirma que esse extrato possui alta atividade antioxidante.

Esse resultado é similar aos dados de literatura, Woraratphoka e colaboradores (2012) determinaram um EC₅₀ para extratos de folhas de aroeira de 5,54 ± 0,13 µg/mL. Entretanto, no trabalho de Degáspari e colaboradores (2004) foi determinada a atividade antioxidante das frações etanólica e aquosa, extraídas dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, cuja melhor atividade foi obtida para fração etanólica, embora tenha apresentado uma atividade 4 vezes menor que aquela encontrada em soluções 25 µg/mL de BHA e BHT pelo ensaio caroteno-ácido-linoleico. Para os frutos de aroeira esse trabalho é pioneiro no que tange ao método DPPH.

A partir desse resultado foi avaliado o potencial antioxidante das partições aquosa e orgânica, sendo que a partição orgânica apresentou atividade semelhante ao extrato metanólico nas concentrações mais altas (atividade superior a 90%), e na menor concentração (10 µg/mL) essa atividade continuou superior a 90 %. Esse resultado confirma a correlação entre o potencial antioxidante dessa partição e seu elevado teor de fenóis totais (Tabela 14). Juntos, esses resultados confirmam o sucesso do fracionamento do extrato metanólico, avaliados por cromatografia (CLAE) (Figura 23), que mostra a concentração das substâncias de interesse, resultando em uma atividade superior a 90 % (EC₅₀ 0,97 ± 1,6 µg/mL). Esse resultado é superior aos antioxidantes BHT, apigenina e rutina, mostrando a capacidade sequestrante de radicais livres, semelhante ao flavonoide quercetina.

A partição aquosa apresentou boa capacidade de sequestro apenas na maior concentração testada (1000 µg/mL), com atividade superior a 90 % (EC₅₀ 127,3 ±

1,14 µg/mL). Na concentração de 100 µg/mL, este apresentou perfil semelhante ao padrão BHT (52,1 %) e ao flavonoide apigenina (41,3 %), com 44 % de atividade sequestradora de radicais livres.

A fração ST-05 foi a amostra que apresentou menor potencial antioxidante quando comparada às demais amostras (EC_{50} 328,1 ± 1,12 µg/mL). Ainda assim, na concentração de 1000 µg/mL, este apresentou 60% de sequestro. Porém, nas demais concentrações essa atividade ficou abaixo de 25%. Esse resultado difere do trabalho de Yang e colaboradores (2011), onde foi relatado o potencial antioxidante da galangina com o EC_{50} de 17,02 ± 0,02 µg/mL, mostrando o potencial antioxidante desse flavonol. Contudo, esse resultado pode ser explicado visto que na fração ST-05, a galangina não estava purificada, o que poderia interferir nesse potencial antioxidante.

Com relação à fração ST-06, esta apresentou alto potencial antioxidante nas concentrações de 1000 e 100 µg/mL (acima de 90%) (EC_{50} 27,6 ± 1,3 µg/mL), resultado semelhante aos padrões fenólicos quercetina e rutina e atividade superior ao BHT e à apigenina.

A amostra isolada ácido gálico (ST-04) apresentou capacidade de sequestro acima de 90 % em todas as concentrações testadas (EC_{50} 0,5 ± 1,8 µg/mL). Dados que corroboram o potencial já descrito na literatura para esse ácido fenólico (Bezerra, 2012; Rampazzo et al. 2010).

Esses resultados indicam que o extrato, a partição, as frações e as substâncias isoladas dos frutos de aroeira possuem características de doadores de elétrons, onde estes reagem com os radicais livres, convertendo-os em produtos mais estáveis e finalizando a ação do radical em promover espécies reativas e instáveis eletronicamente. Esses resultados são importantes na proteção do DNA celular, dos lipídios e das proteínas dos danos dos radicais livres (Bulbul et al. 2011; Ercisli et al. 2009).

É importante ressaltar que a eficiência antioxidante de substâncias bioativas em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua abundância no alimento. Vale ressaltar que a concentração destas substâncias nos alimentos é fortemente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau

de maturação e variedade da planta. Sabe-se, ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binômio tempo-temperatura (Naczk e Shahidi, 2004; Moure et al. 2001). Com isso, em grande parte dos trabalhos relatados, procura-se identificar o princípio ativo com atividade antioxidante ou apenas isolar as frações detentoras dessa atividade (Agati et al. 2012; Bulbul et al. 2011).

Deve-se ressaltar que a atribuição, algumas vezes, inequívoca de atividade antioxidante biológica, mesmo que *in vitro* ou *ex vivo*, de substâncias isoladas e identificadas a partir de um extrato não é simples, pois diversos fatores devem ser avaliados. Pode-se ressaltar:

1) A ação sinérgica dos constituintes supostamente ativos, sua absorção pelo sistema gastrointestinal, velocidade de metabolização e excreção, possíveis atividades tóxicas colaterais, dose-resposta entre outras;

2) A necessidade de se identificar marcadores em um extrato que ateste a reprodutibilidade de sua preparação e atividade se faz necessária, uma vez que a composição química de qualquer espécie varia segundo muitos fatores como a variedade da planta, o local de cultivo, a estação e a hora de coleta, as características da entomofauna (Oliveira et al. 2009);

3) A presença de heterosídeos, de modo geral na forma de β -glicosídeos, dificilmente são computados no conteúdo total de fenóis, uma vez que não são facilmente extraídos pelos solventes usuais, como acontece com os fenóis livres. (Oliveira et al. 2009; Walle, 2004; Griffiths e Barrow, 1972).

Outra característica que se deve considerar é que neste trabalho foi priorizada a extração e o isolamento de moléculas fenólicas, com enfoque sob os flavonoides. Vários estudos mostram a relação estrutura-atividade dessa classe de compostos e têm apontado para a importância do número e a localização dos grupos OH para a eficaz atividade sequestradora de radicais livres (Oliveira et al. 2009; Heim et al. 2002; Middleton et al. 2000; Yokozawa et al. 1998).

Apesar de um grande número de pesquisas consistentes existem evidências que apoiam que alguns componentes específicos estruturais na atividade

sequestradora de radical, a correlação entre flavonoides e suas estruturas químicas permanecem evasivos (Amic et al. 2003; Cotelle, 2001).

De acordo com Rice-Evans e colaboradores (1997), quimicamente, existem três características que conferem aos flavonoides suas propriedades antioxidantes:

- Os substituintes de hidrogênio (doadores de grupos hidroxila), ligados às estruturas de anel aromático de flavonoides, que permitem que estes possam passar por uma reação redox que os ajude a varrer os radicais livres mais facilmente;
- Um estável sistema de localização, consistindo em anéis aromáticos e heterocíclicos, bem como múltiplas ligações insaturadas, que ajudam a estabilizar os radicais livres;
- A presença de certos grupos estruturais que são capazes de formar complexos quelante de metais que podem regular a produção de espécies reativas de oxigênio tais como OH^\cdot e $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Tem sido demonstrado que os flavonoides poli-idroxilados, durante o processo de sequestro do radical livre pela remoção do hidrogênio, podem formar eletronicamente estados excitados capazes de sofrer isomerização rápida a diferentes formas tautoméricas. Estes tautômeros podem ser envolvidos em rápidos estados excitados de transferências de prótons e elétrons, e para o equilíbrio entre as formas predominantes poderiam determinar a bioatividade, e as diferenças de potencial antioxidante dessas moléculas (Mendoza-Wilson et al. 2011).

No trabalho de Ross e Kasum (2002) a propriedade antioxidante dos flavonoides está relacionada com sua estrutura, e os compostos que se apresentam hidroxilados, principalmente os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Outro aspecto que intensifica a atividade antioxidante que está relacionada a este grupo fenólico é a presença de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 (Harborne e Williams, 2000; Rice-Evans et al. 1996).

5.4.2 - Método de redução do ferro – FRAP

Ensaio *in vitro* como método de Redução do Ferro (FRAP) (Benzie e Strain, 1996), e o sequestro do Radical livre DPPH (1,1 - difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams et al. 1995) são simples, de baixo custo, de fácil interpretação (Wootton-Beard e Ryan, 2012). Enquanto a metodologia do FRAP se baseia na exposição ou capacidade de redução do radical livre (FRAP), o DPPH é uma inibição direta deste radical. Além disso, diversas metodologias podem oferecer uma comparação e dessa forma, obtendo-se mais informações detalhadas sobre essas amostras e seu potencial antioxidante (Wootton-Beard e Ryan, 2012; Bravo, 1998).

O FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Corresponde ao Poder Antioxidante de Redução do Ferro, é utilizado como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos a partir de outras metodologias mais complexas (Pulido et al. 2000).

Na tabela 17 pode-se observar a atividade antioxidante do extrato metanólico dos frutos de aroeira, bem como das partições aquosa e orgânica, ST-05 e ST-06, bem como do ácido gálico (ST-04).

Como pode ser observado pela tabela 17, o ácido gálico foi a amostra que conseguiu reduzir a maior quantidade de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} ($650,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de Trolox/mg) seguida da partição orgânica ($201,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ de Trolox/mg), do Extrato metanólico ($172,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ de Trolox/mg), da Partição aquosa ($160,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ de Trolox/mg), ST-06 ($143,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ de Trolox/mg) e por fim ST-05 ($72,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$ de Trolox/mg).

Quando comparados essa metodologia de redução do ferro com o DPPH que se baseia no sequestro, pode-se observar que as amostras apresentam alta capacidade antioxidante. O ácido gálico nas duas metodologias foi o que apresentou melhor potencial antioxidante (EC_{50} $0,52 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$ – DPPH e $650,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de Trolox/mg – FRAP).

Tabela 17: Atividade antioxidante pelo método FRAP do extrato metanólico, da partição aquosa, orgânica, das frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina e apigenina.

Amostras	Concentração (μM de Trolox/mg)
Extrato MeOH	172,4 \pm 0,9
Part. Aquosa	160,0 \pm 0,4
Part. Orgânica	201,8 \pm 0,6
Ácido Gálico (ST-04)	650,6 \pm 0,8
ST-05	72,6 \pm 1,7
ST-06	143,8 \pm 0,4
Quercetina	407,5 \pm 0,3
Rutina	395,1 \pm 0,2
Apigenina	236,4 \pm 0,6

*Média \pm Desvio Padrão (n=3).

Quando comparados com dados de literatura, essa tese de doutorado encontrou valor superior, visto que no trabalho de Biskup e colaboradores (2013) foi encontrado uma EC_{50} de 4,328 μM de Trolox/mg. Esse resultado mostra que medir a capacidade antioxidante de cada substância individualmente torna-se muito difícil, por isso vários métodos têm sido desenvolvidos para estimar o potencial antioxidante de diferentes amostras e materiais vegetais (Barba et al. 2013; Benmeddour et al. 2013).

Quando comparados o potencial redutor da galangina, flavonol presente na fração ST-05 com dados de literatura, estes se apresentam de maneira semelhante, visto que no trabalho de Yang et al.; 2011, não foi possível detectar concentrações da galangina pela metodologia do FRAP, enquanto neste trabalho a fração ST-05 apresentou o menor potencial redutor do Fe^{3+} em Fe^{2+} (72,6 \pm 1,7 μM de Trolox/mg).

Vale a pena ressaltar as discrepâncias entre as metodologias, visto que no método do DPPH a galangina apresentou excelente resultado no sequestro de radicais livres e não mostrou atividade frente ao poder redutor do FRAP, indicando a importância de se testar diversas metodologias (Yang et al. 2011).

De acordo com Woraratphoka e colaboradores (2012), as propriedades antioxidantes das moléculas fitoquímicas são muito complexas e variam devido às diferentes metodologias. Quando comparadas as metodologias (DPPH e FRAP) a única diferença observada quanto à capacidade antioxidante das amostras foi que no DPPH, a amostra ST-06 apresentou melhor capacidade de sequestro que a partição aquosa, enquanto que na metodologia do FRAP a partição aquosa teve poder de redução maior que o ST-06. Esse resultado confirma a importância de se testar diversas metodologias para avaliar o potencial antioxidante das amostras.

Estudos relacionam que a elevada concentração de moléculas fenólicas poderia contribuir de forma importante para um alto potencial antioxidante e que esses compostos podem apresentar maior eliminação de radicais livres que alguns flavonoides (Woraratphoka et al. 2012; Yokozawa et al. 1998). Tal resultado confirma o alto potencial antioxidante do ácido gálico ao contrário de ST-05 e ST-06, cujo perfil químico apresenta-se característico para substâncias, cujo esqueleto é compatível para os flavonoides. Outra característica do potencial antioxidante é que os compostos fenólicos presentes em extrato, dependem de fatores como a concentração e o tipo de aglicona presente. Ainda, a ação pode existir sob a forma de sinergismo entre os diferentes compostos (Jardini, 2010; Hassimotto et al. 2002).

5.5 Atividade Imunofarmacológica

5.5.1 Atividade do extrato metanólico na inibição da produção de NO por macrófagos e citotoxicidade

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, encontrada no ar atmosférico em baixas concentrações, altamente tóxica por ser um radical livre, o que o torna um agente químico altamente reativo (Chakraborty et al. 2011; Muzitano, 2006; Bogdan, 2001). A produção fisiológica de NO é extremamente importante na defesa do organismo, porém uma superprodução deste e de seus metabólitos tem implicado no desenvolvimento de diversas patologias, como uma sepsia bacteriana, bem como uma inflamação crônica (Chakraborty et al. 2011; Bogdan, 2001; Wadsworth e Koop, 2001).

De acordo com Bogdan (2001), quando o óxido nítrico (NO) entrou formalmente a cena da imunologia, entre 1985 e 1990, o seu papel no sistema imunológico era simplesmente definido: o NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas, por compostos microbianos ou ambos, é derivado a partir do aminoácido L-arginina pela atividade enzimática da iNOS (iNOS ou NOS₂) e funciona *in vitro* e *in vivo* como um molécula tumoricida e antimicrobiana. Embora esta definição básica ainda seja aceita, durante os últimos anos tem sido reconhecido que o NO desempenha outros papéis no sistema imune, bem como em outros sistemas orgânicos (Shibata et al. 2010).

Um mecanismo de ação proposto para o extrato de *Schinus terebinthifolius* baseia-se na sua capacidade em inibir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Os compostos capazes de inibir a produção de NO, pela supressão da expressão ou da atividade da iNOS, possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios e antioxidantes (Hamalainen et al. 2007).

Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos e macrófagos ativados podem gerar quantidades significativas de ERO's, e em algumas situações espécies reativas de nitrogênio (ERN's) (Van Berlo, et al. 2010) . Os neutrófilos ativados produzem H₂O₂ via ativação da NADPH oxidase (NOX₂) (Bosmann e Ward, 2013; Moore e MacKenzie 2009). Os netrófilos mieloperoxidases geram derivados de H₂O₂ (tais

como o ácido hipocloroso), enquanto que o radical hidroxila (OH), o mais reativo de todos os radicais de oxigênio, é produzido em uma forma que requer ferro reduzido (Fe^{2+}) (Lipinski, 2011).

Os produtos das espécies reativas de nitrogênio são gerados por células fagocíticas e incluem óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito (ONOO), o que pode reagir com uma variedade de alvos. Esses produtos podem trazer mudanças químicas reversíveis ou irreversíveis (oxidação, nitrosilação e nitroação) em proteínas, lipídios e DNA, o que resulta em funções bioquímicas diminuídas (Valko, 2007). As ERO's e ERN's podem induzir danos no DNA, levando a sua fragmentação (Bosmann e Ward, 2013; Martin, 2008). Em geral, a quantidade excessiva de Produtos ERO's e ERN's que são produzidos durante a sepse são prejudiciais às células e aos órgãos (Bosmann e Ward, 2013).

A influência do extrato metanólico, das partições aquosa e orgânica na inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264-7 estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi avaliada em quatro diferentes concentrações, 4, 20, 100 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 54), bem como as amostras ST-05 e ST-06, e as substâncias isoladas ácido gálico e galangina foram avaliadas em quatro diferentes concentrações, 0,8, 4, 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 55).

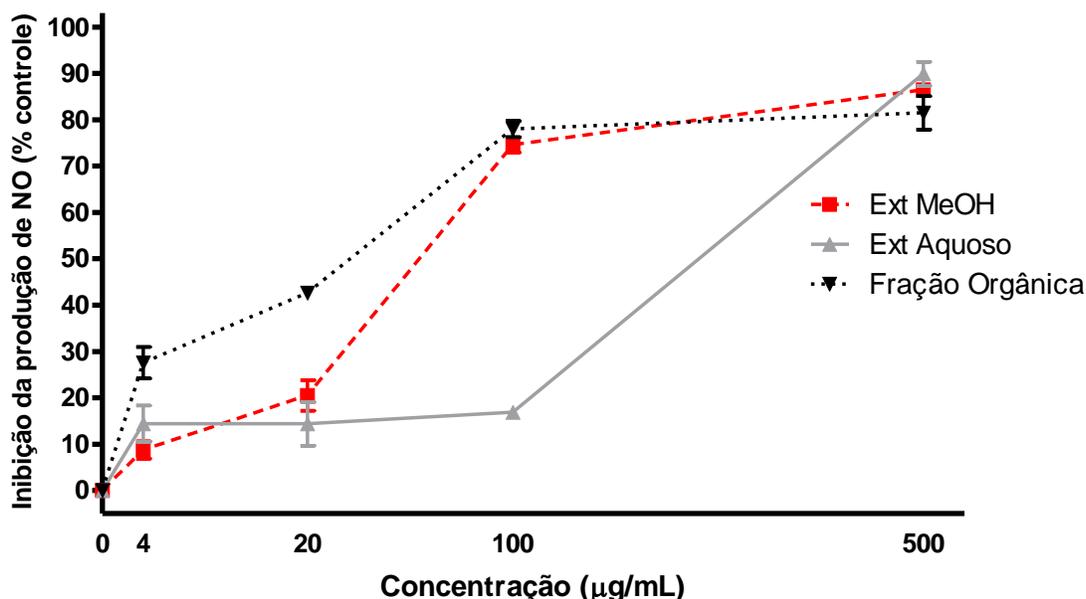


Figura 54 - Efeito inibidor do extrato metanólico dos frutos de *S. terebinthifolius*, bem como das partições aquosa e orgânica em 4, 20, 100 e 500 µg / mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A produção de NO foi quantificada indiretamente no sobrenadante da cultura como NO₂, pelo método de Griess. Controle positivo- macrófagos estimulados com LPS e tratados com L-NMMA a 20 µg / mL (inibindo 43,8 ± 3,8 % da produção de NO) (69,4 ± 0.5 µM de NO). Controle Negativo - macrófagos não tratados e não estimulados com LPS (inibindo 0,0 ± 3,5 % a produção de NO – 0,0 ± 0.6 µM de NO). Média aritmética ± desvio padrão (n = 3).

O potencial anti-inflamatório e antioxidante *in vitro* foi avaliado com base na utilização etnobotânica de *S. terebinthifolius* concentrando em dois aspectos importantes:

- 1) a inibição da produção de NO por macrófagos e;
- 2) a capacidade de sequestro de radicais livres.

A partição orgânica apresentou a melhor capacidade em inibir a produção de NO quando comparado com o extrato metanólico e a partição aquosa (Figura 54), resultado semelhante ao potencial antioxidante avaliado pelas metodologias do DPPH e FRAP. Sendo que na concentração de 100 e 500 µg/mL apresentou inibição da produção de NO superior a 70 % (IC₅₀ de 23,2 ± 1,2 µg/mL). Na concentração de 20 µg/mL, a quantidade de NO produzida foi de 39,2 ± 1,33 µM (44,47 ± 1,88 % de

inibição), mostrando ser tão ativa em comparação com o controle tratado com L-NMMA a 20 $\mu\text{g/mL}$ ($43,8 \pm 3,8$ % de inibição da produção de NO), indicando um excelente efeito inibidor na produção de NO.

Com relação ao extrato metanólico, este apresentou boa capacidade de inibir a produção de NO, visto que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a quantidade de NO produzida foi de $16,5 \pm 2,0$ μM (IC_{50} de $55,0 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$). Já a partição aquosa apresentou inibição da produção de NO na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ de $89,9 \pm 1,7$ % de inibição. Esses resultados sugerem um potencial anti-inflamatório e antioxidante dessas amostras.

Com relação às amostras purificadas e isoladas dos frutos de aroeira, estas foram avaliadas em concentrações mais baixas quando comparado com o extrato e as partições devido à sua pureza e sua reduzida quantidade disponível (Figura 55).

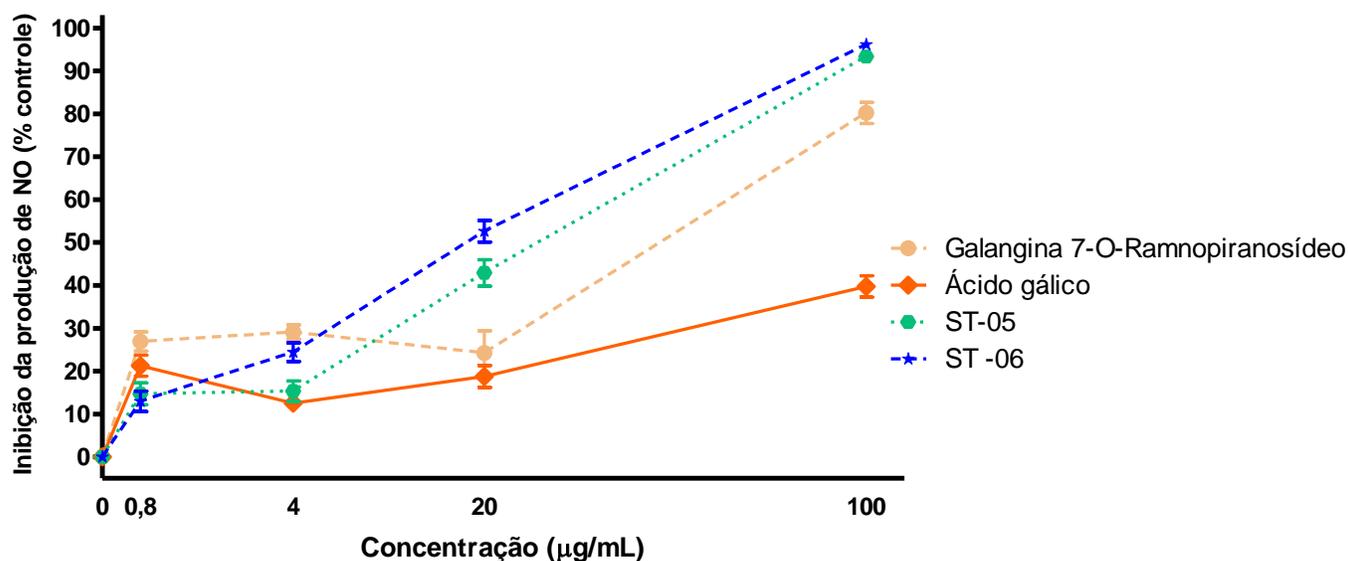


Figura 55 - Efeito inibidor das amostras isoladas dos frutos de *S. terebinthifolius*, bem como das frações ST-05 e ST-06 em 0,8; 4; 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A produção de NO foi quantificada indiretamente no sobrenadante da cultura como NO₂, pelo método de Griess. Controle positivo- macrófagos estimulados com LPS e tratados com L-NMMA a 20 $\mu\text{g/mL}$ (inibindo $43,8 \pm 3,8$ % da produção de NO) ($69,4 \pm 0,5$ μM de NO). Controle Negativo - macrófagos não tratados e não estimulados com LPS (inibindo $0,0 \pm 3,5$ % a produção de NO – $0,0 \pm 0,6$ μM de NO). Média aritmética \pm desvio padrão (n = 3).

Como podem ser observadas pela figura 55, as frações ST-05 e ST-06 apresentaram as melhores inibições da produção de NO (IC_{50} de $20,9 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ e IC_{50} de $14,2 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), até mesmo quando comparadas com a partição orgânica. Vale a pena ressaltar que a amostra ST-06 na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, a quantidade de NO produzida foi de $32,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$.

Com relação ao flavonoide isolado de *S. terebinthifolius*, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, inibiu significativamente a produção de NO (IC_{50} de $22,5 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$) (Figura 55). Com relação ao ácido gálico, este não apresentou boa capacidade em inibir a produção de NO por macrófagos visto que até na maior concentração testada ($100 \mu\text{g/mL}$) a inibição da produção de NO foi de $39,9 \pm 2,3 \%$.

No trabalho de Raso et al. (2001) foi observado que a aglicona galangina inibiu a produção de NO em macrófagos J774A.1 na concentração de $50 \mu\text{M}$. Outros relatos na literatura mostram o efeito anti-inflamatório desse flavonol na inibição da atividade da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase, diminuindo a liberação de prostaglandina e da isoforma indutível da COX, bem como inibindo a fosfolipase A_2 (Kim et al. 2013; Lattig et al. 2007). Não foram encontrados relatos na literatura para a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, sendo este trabalho pioneiro sobre a atividade desse flavonol glicosilado.

No que se refere à citotoxicidade, somente o extrato metanólico e ST-05 mostraram toxicidade nas maiores concentrações ($500 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) acima de 50%. Todas as demais amostras não apresentaram toxidez (Tabela 18).

Tabela 18: Atividade citotóxica do extrato metanólico, das partições aquosa e orgânica, ST-05 e ST-06, bem como das substâncias isoladas a partir de frutos de *Schinus terebinthifolius*. A citotoxicidade foi medida pela porcentagem de liberação específica de lactato desidrogenase (LDH). A liberação específica foi calculada como a porcentagem de macrófagos tratados com detergente (1% de Triton X-100) como controle positivo (100% Lise - DO 1,6) e os macrófagos não tratados como controle negativo (Lise 0% - DO 0,4). Média Aritmética \pm desvio padrão (n = 3).

Amostras	LDH - specific release (% control)				
	0,8 μ g/mL	4 μ g/mL	20 μ g/mL	100 μ g/mL	500 μ g/mL
Extrato MeOH	-	8,7% \pm 0,6	7,7% \pm 0,7	9,9% \pm 1,1	100,0% \pm 1,0
Part. Aquosa	-	3,9% \pm 1,7	5,5% \pm 0,8	6,2% \pm 1,5	7,2% \pm 1,3
Part. Orgânica	-	7,0% \pm 1,2	8,3% \pm 1,5	29,2% \pm 0,5	75,8% \pm 1,8
Galangina (ST-02)	0,0% \pm 0,5	0,0% \pm 1,8	0,5% \pm 1,7	4,0% \pm 1,3	-
Ác. gálico (ST-04)	5,4% \pm 1,9	6,6% \pm 0,3	7,0% \pm 1,3	10,2% \pm 0,9	-
ST-05	2,7% \pm 1,8	6,0% \pm 1,5	6,0% \pm 1,1	53,1% \pm 1,1	-
ST-06	4,7% \pm 1,5	9,7% \pm 1,2	8,0% \pm 1,9	41,8% \pm 1,2	-

Vale a pena ressaltar que na concentração de 100 μ g/mL, o extrato metanólico teve sua toxidez diminuída para 9,9% \pm 1,1 no teste do LDH e 0.0% \pm 0.51 no ensaio de MTT, sendo que a inibição da produção de NO manteve-se elevada (Figura 54). Ressalta-se com esse resultado o potencial na inibição de NO do extrato metanólico e a sua baixa toxidez (IC₅₀ 190,2 \pm 1,4 μ g/mL LDH e 300,1 \pm 1,6 μ g/mL MTT).

Resultado semelhante também pode ser observado para a partição orgânica, visto que apresentou alta inibição da produção de NO (IC₅₀ 23,2 \pm 1,1 μ g/mL), e através da Figura 56 e Tabela 18, pode-se verificar a baixa toxidez dessa partição (IC₅₀ 200,7 \pm 1,1 μ g/mL no LDH e 427,8 \pm 1,6 μ g/mL no MTT).

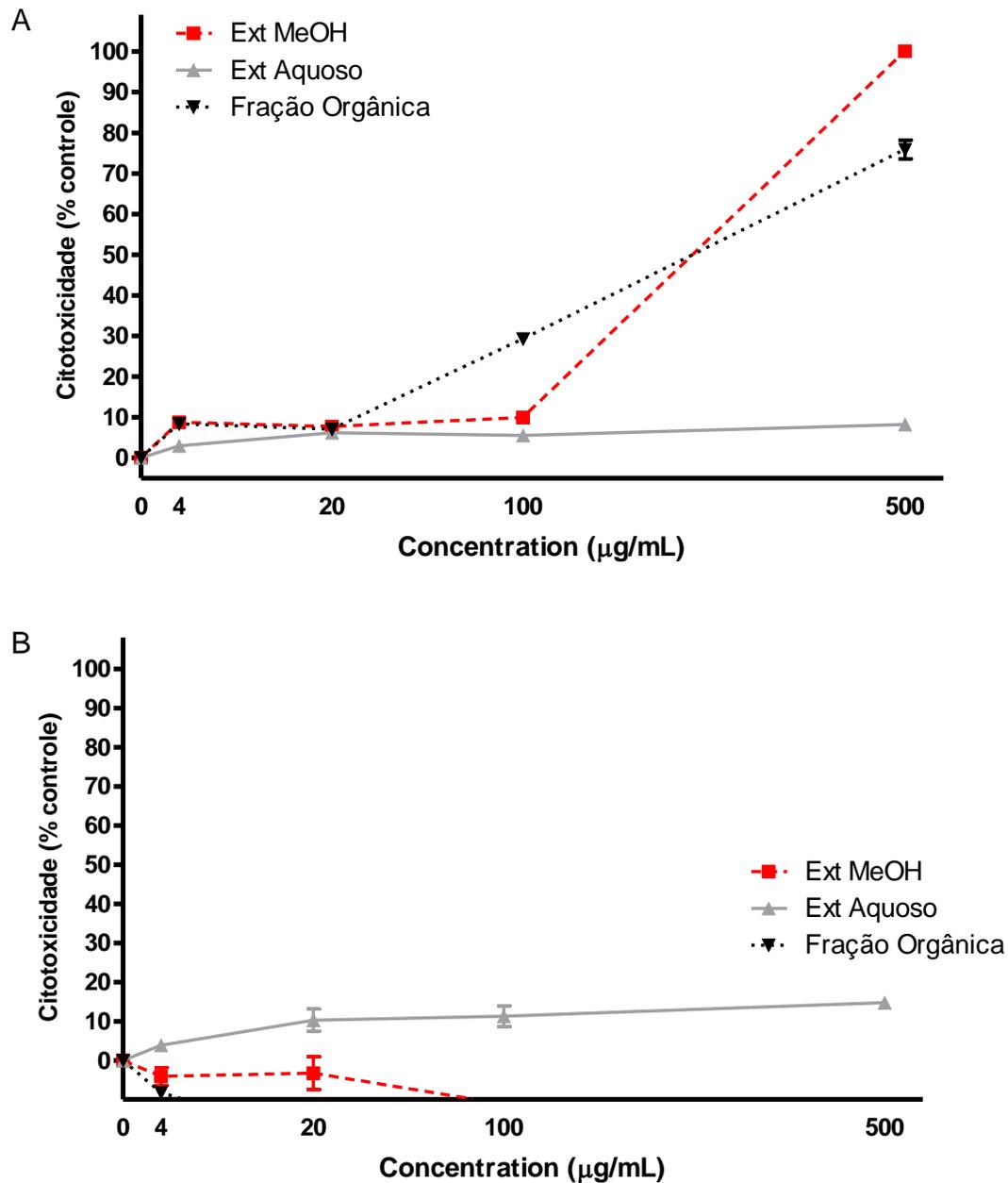


Figura 56 - Atividade citotóxica do extrato metanólico e as partições aquosa e orgânica. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS 1 µg/mL e tratados com as amostras nas concentrações de 500, 100, 20 e 4 µg/mL. (A) Os percentuais de citotoxicidade por LDH foram comparados aos controles negativo: 0,1%±0,5/ D.O. 0,4±0,01 e positivo: 99,9±0,5/ D.O. 1,6±0,03. (B) Percentuais de citotoxicidade por MTT aos controles negativo: 5,4%±1,7/ D.O. 0,08±0,02 e positivo: 100,0±0,08/ D.O. 1,26±0,05.

Com relação ao flavonol isolado Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, este não apresentou toxidez (Tabela 18, Figura 57), sendo que até na maior concentração avaliada (100 µg/mL), este apresentou uma taxa de liberação de LDH de $4,0 \pm 1,3 \%$ ($IC_{50} 2427 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$) e $22,5 \pm 1,6 \%$ de morte celular avaliada por MTT ($IC_{50} 466,5 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$). O mesmo fato se observa para as substâncias ST-05 e ST-06, onde ambas apresentam baixa toxidez (Tabela 18, Figura 57) ($IC_{50} 107 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ e $145,2 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e elevada capacidade de inibir a produção de NO (Figura 55).

Com base nesses resultados, é possível confirmar o potencial inibidor da produção de NO por macrófagos dos frutos de aroeira, bem como a baixa toxidez dessas amostras através dos métodos de liberação da enzima citoplasmática LDH e do sal de tetrazol MTT (Figura 57).

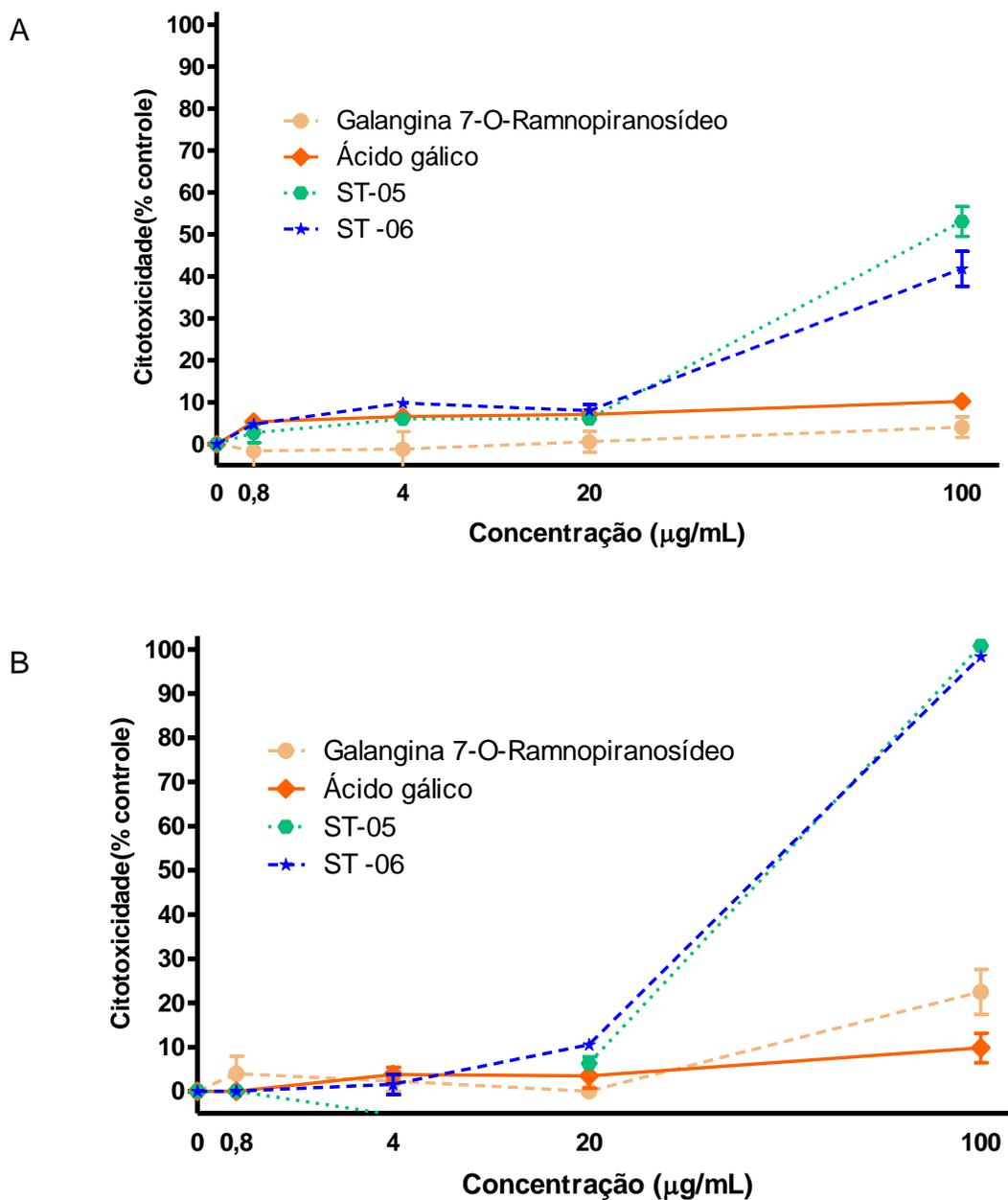


Figura 57 - Atividade citotóxica do flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, do ácido gálico e das substâncias ST-05 e ST-06. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS 1 µg/mL e tratados com as amostras nas concentrações de 100, 20, 4 e 0,8 µg/mL. Os percentuais de citotoxicidade por LDH foram comparados aos controles negativo: 0,1%±0,5/ D.O. 0,4±0,01 e positivo: 99,9±0,5/ D.O. 1,6±0,03. (B) Percentuais de citotoxicidade por MTT aos controles negativo: 5,4%±1,7/ D.O. 0,08±0,02 e positivo: 100,0±0,08/ D.O. 1,26±0,05.

5.5.2- Modulação da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelo extrato metanólico, pelas substâncias isoladas e pelas frações dos frutos de aroeira

As respostas inflamatórias e imunológicas são desencadeadas por estímulos irritantes e patógenos invasores. Observa-se inicialmente, a interação do patógeno com o organismo e esta interação, leva ao reconhecimento por células apresentadoras de antígenos (APC), como os macrófagos teciduais e as células dendríticas. Quando o antígeno é um micro-organismo, este possui componentes conservados em sua estrutura chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's) que são essenciais no seu processo de reconhecimento (Correa, 2007; Rang et al. 2004).

Uma vez o antígeno interagindo com as glicoproteínas presentes nos receptores expressos nas APC, uma série de respostas é iniciada ativando as principais citocinas pró-inflamatórias imediatas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e outras. Essas citocinas aumentam a permeabilidade vascular, permitindo a exsudação de líquido contendo outros mediadores inflamatórios, quimiotaxinas, expressão de moléculas de adesão (selectinas e integrinas) e fatores de transcrição pró-inflamatórios (Range et al. 2004).

Dessa maneira buscou-se verificar a modulação da produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelo extrato metanólico, pela partição aquosa e orgânica (figura 58), bem como as substâncias isoladas (Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo e ácido gálico) e as frações dos frutos de aroeira, ST-05 e ST-06 (Figura 59).

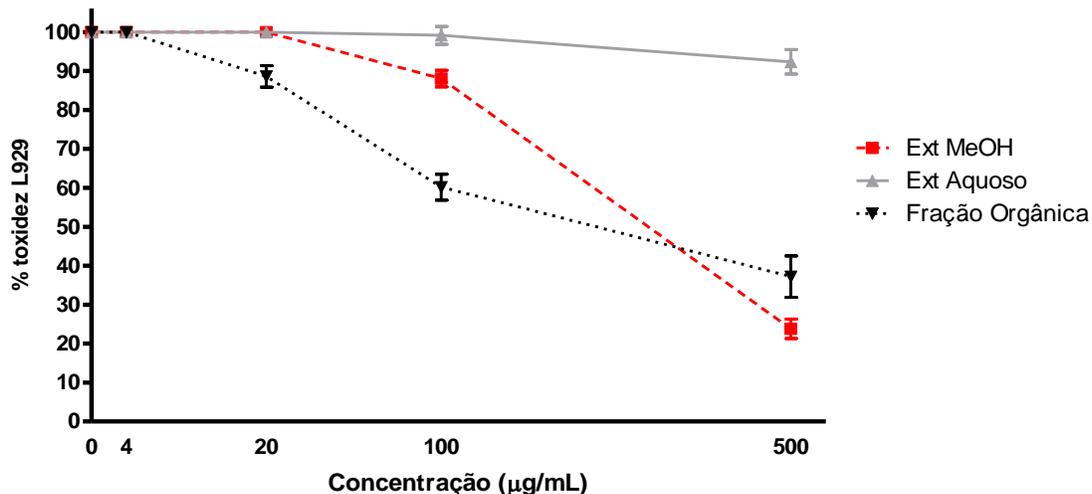


Figura 58 - Percentual de citotoxicidade frente ao TNF- α em fibroblastos murinos L929 através do método de MTT. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados e tratados com o extrato metanólico e as partições aquosa e orgânica selecionadas na concentração de 500, 100, 20 e 4 $\mu\text{g/mL}$ por 24h. O sobrenadante da cultura foi adicionado à cultura de células L929 previamente plaqueadas por mais 24h. Avaliação da concentração de TNF- α no sobrenadante da cultura de fibroblastos murinos L929 foi comparada à curva padrão de TNF- α murinho recombinante. Os percentuais de citotoxicidade por MTT foram comparados aos controles negativo: $1,95 \pm 1,9$ $\mu\text{g/mL}$ e positivo: $100,0 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$.

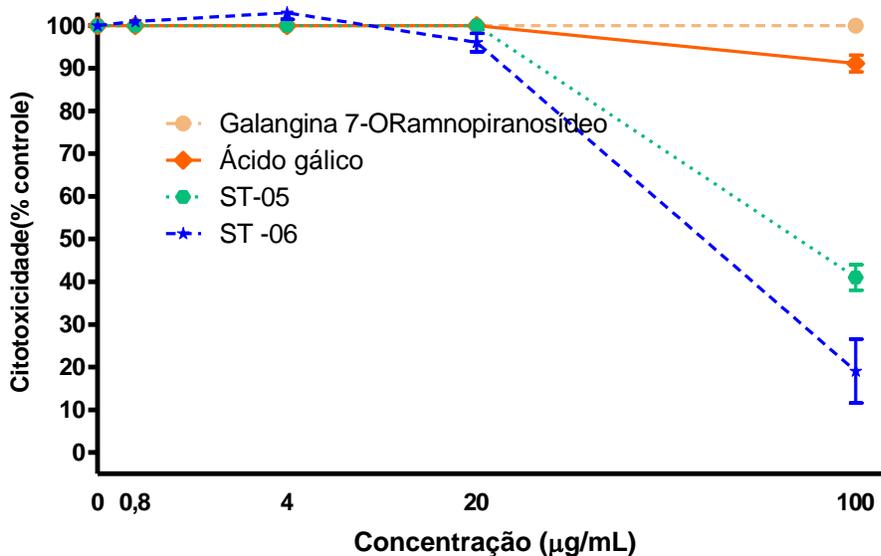


Figura 59 - Percentual de citotoxicidade frente ao TNF- α em fibroblastos murinos L929 através do método de MTT. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados e tratados com as substâncias isoladas dos frutos de aroeira Galangina 7-O-

Ramnopiranosídeo (ST-02), ácido gálico (ST-04) e as frações ST-05 e ST-06 na concentração de 100, 20, 4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ por 24h. O sobrenadante da cultura foi adicionado à cultura de células L929 previamente plaqueadas por mais 24h. Avaliação da concentração de TNF- α no sobrenadante da cultura de fibroblastos murinos L929 foi comparada à curva padrão de TNF- α murinho recombinante. Os percentuais de citotoxicidade por MTT foram comparados aos controles negativo: $1,9 \pm 1,9$ pg/mL e positivo: $100,0 \pm 0,6$ pg/mL.

Neste ensaio, foi observada, de forma indireta, a presença de TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados e tratados com o extrato metanólico, as partições aquosa e orgânica nas concentrações de 500, 100, 20 e 4 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 58) e para as substâncias isoladas Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02), ácido gálico (ST-04) e as frações ST-05 e ST-06 nas concentrações de 100, 20, 4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 59). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura celular foi repassado à cultura de L929 e nesta foi adicionado meio de cultura acrescido de actinomicina D (2 $\mu\text{g/mL}$). Pelo fato das células L929 serem sensíveis à presença de TNF- α , a quantidade do mesmo no sobrenadante da cultura está associada ao índice de morte celular.

Como pode ser observado pela Figura 58, apenas o extrato metanólico e a fração orgânica na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiram a produção de TNF- α em $23,8 \pm 1,6\%$ e $37,2 \pm 0,5\%$, respectivamente em relação ao controle tratado. O IC_{50} tanto do extrato metanólico quanto da fração orgânica é de $308,9 \pm 1,3$ e $208,5 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$.

Com relação às substâncias isoladas dos frutos de aroeira, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e o ácido gálico (ST-04), nenhuma apresentou influência sob o TNF- α , ou seja, os sobrenadantes dessas substâncias não apresentaram influência sobre a produção dessa citocina. Nos poços tratados com estas amostras se observou alto efeito citotóxico para a L929 provocado pelo TNF- α . Até mesmo na maior concentração testada não houve diferença significativa em relação ao controle positivo ($\text{IC}_{50} > 500$ $\mu\text{g/mL}$ para ambos) (Figura 59).

As frações isoladas do extrato metanólico ST-05 e ST-06 apresentaram atividade moduladora na produção de TNF- α na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ com

inibição de $11,6 \pm 1,8 \%$ e $19,0 \pm 2,8 \%$, respectivamente (IC_{50} $62,7 \pm 1,8$ e $60,7 \pm 1,3$ $\mu\text{g/mL}$).

No trabalho de Kim et al. (2013) foi possível observar o efeito inibitório da galangina frente às citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8 em células HMC-1, em concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Tal resultado difere deste trabalho de doutorado, e tal fato pode-se justificar devido à diferença entre as linhagens celulares, as diferenças entre as metodologias e nesse trabalho foi verificada a ação da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo.

Sabe-se que a citocina pró-inflamatória TNF- α produzida pelos macrófagos, assim como o NO, possui efeitos deletérios quando em altas concentrações (Balkwill et al. 2001), e a partir desses resultados, é possível afirmar que tanto o extrato metanólico, a fração orgânica, ST-05 e ST-06 possuem capacidade de inibir a produção dessa citocina.

Além da inibição dessa citocina, também é possível verificar que o extrato metanólico, a fração orgânica, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02), ST-05 e ST-06 apresentam inibição da produção de NO e baixa citotoxicidade. Esses resultados sugerem o potencial imunofarmacológico dessas amostras, bem como seu alto potencial antioxidante.

Estudos que comprovam tal resultado são importantes, visto que diversas doenças, como infecção do trato urinário, tuberculose, malária, sepse estão associadas em pacientes e no processo de tumorigênese, onde as altas concentrações espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são responsáveis pela angiogênese, hiperpermeabilidade vascular e conseqüentemente desenvolvimento do tumor (Guzik et al. 2003). É interessante notar que alguns fitoquímicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, esteroides e saponinas foram descritos na literatura com potencial antioxidante, ou seja, com capacidade de sequestrar ou neutralizar espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Sendo assim, a essência destes metabólitos secundários também é essencial para a manutenção da saúde humana e o controle das doenças crônicas degenerativas (Bulbul et al. 2011).

5.6 – Atividade Antibacteriana

De acordo com González-Lamothe e colaboradores (2009), os produtos do metabolismo secundário das fontes vegetais podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multiresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção. Sendo assim, a busca por substâncias com atividades antimicrobianas e antioxidantes é uma prioridade em vista do surgimento de cepas patogênicas resistentes e do aumento das doenças degenerativas.

É importante ressaltar que esses são os primeiros ensaios realizados relacionando a ação antibacteriana do extrato, a partição aquosa e orgânica, as frações e substâncias isoladas de aroeira com a sua atividade antioxidante avaliadas pelo método do DPPH, FRAP e inibição da produção de NO por macrófagos.

Neste experimento foi avaliado o extrato metanólico, a partição orgânica, as frações ST-05 e ST-06, bem como as substâncias isoladas ácido gálico (ST-04), e o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As amostras foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana em diluição em meio líquido e foi observada se as mesmas atingiam a Concentração Mínima Inibitória (CMI ou CMI₅₀), ou seja, se apresentam um número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) entre trinta e trezentos (Schortemeyer et al. 1996; Clark, 1965).

Denomina-se Concentração Mínima Inibitória quando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste, de forma que, quanto menor a CMI, maior o potencial antimicrobiano do extrato e, conseqüentemente, maior a dificuldade da bactéria em se desenvolver (Ostrosky et al. 2008).

Todas as amostras citadas acima dos frutos de aroeira foram testadas frente à inibição do crescimento das seguintes cepas de *Staphylococcus*: *Staphylococcus*

aureus ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana. A tabela 19 mostra as cepas testadas, bem como as concentrações das amostras para cada cepa.

Tabela 19: Concentração das amostras de acordo com cada cepa bacteriana.

Amostras	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. aureus</i> Cepa clínica humana
Extrato MeOH	2,5 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL	2 mg/mL
Fração Orgânica	2,5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL
Galangina (ST-02)	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
Ácido gálico (ST-04)	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
ST-05	2 mg/mL	1,25 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL
ST-06	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL

Vale a pena ressaltar que devido a pouca massa das substâncias isoladas Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e ácido gálico (ST-04), estes foram avaliados em apenas 1 única concentração (20 mg/mL), e nesta concentração houve inibição do crescimento, porém não atingiu o CMI, como será mostrado mais a frente.

5.6.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A primeira cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Conforme mostra a Tabela 19, tanto o extrato metanólico dos frutos de aroeira quanto a partição orgânica apresentaram um CMI de 50 mg/mL. Na Figura 60 e 61 é mostrada em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, com crescimento confluyente

na placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina), em que se observa que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado outro controle sem DMSO, e a atividade do extrato metanólico dos frutos de aroeira (Figura 60). Na figura a seguir, observa-se a partição orgânica (Figura 61) onde se pode notar que na concentração de 2,5 mg/mL ocorreu inibição do crescimento de *S. aureus* tanto para o extrato metanólico quanto para a partição orgânica.

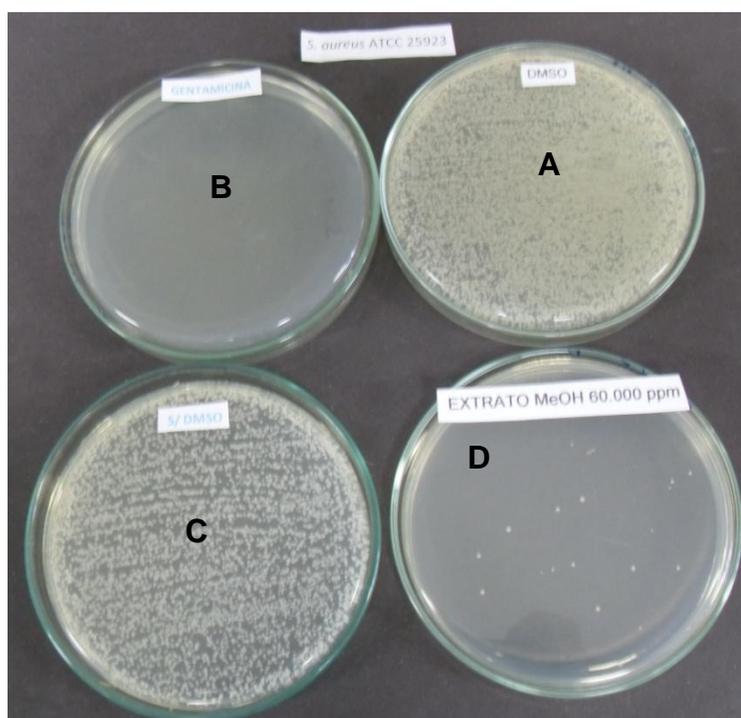


Figura 60 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO), (A e C) do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), e do extrato metanólico (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

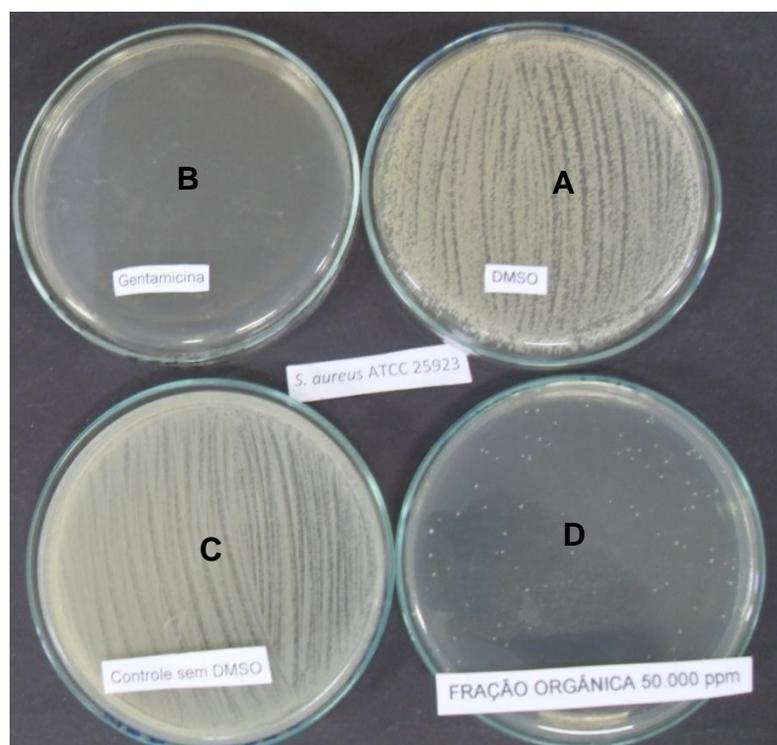


Figura 61 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B), e da partição orgânica (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Com relação às frações ST-05 e ST-06, estas apresentaram potencial inibidor de crescimento bacteriano, sendo que ST-05 apresentou inibição na concentração de 2 mg/mL (Tabela 19) e ST-06 inibição na concentração de 1 mg/mL (Tabela 19). É possível observar pela figura 62 e 66 que tanto ST-05 quanto ST-06 mostraram significativa inibição quando se observa com os controles.

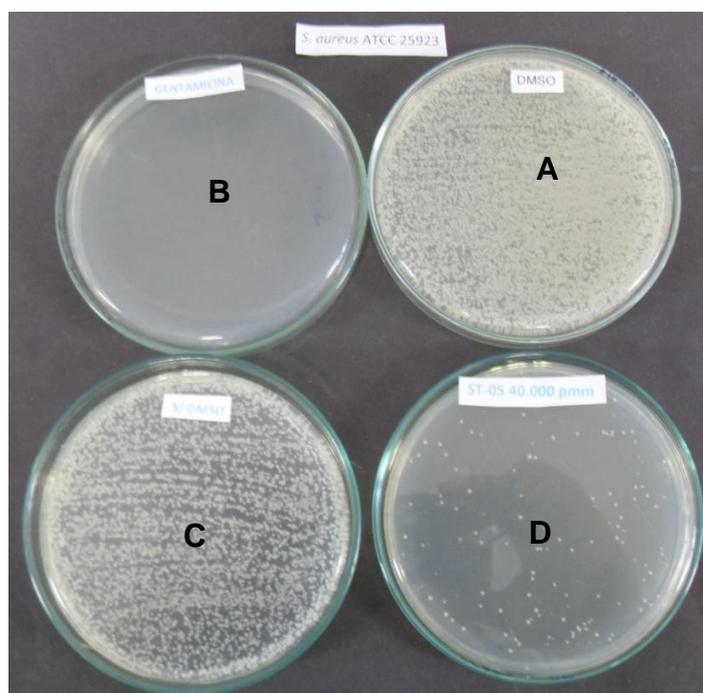


Figura 62 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B) e da fração ST-05 (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

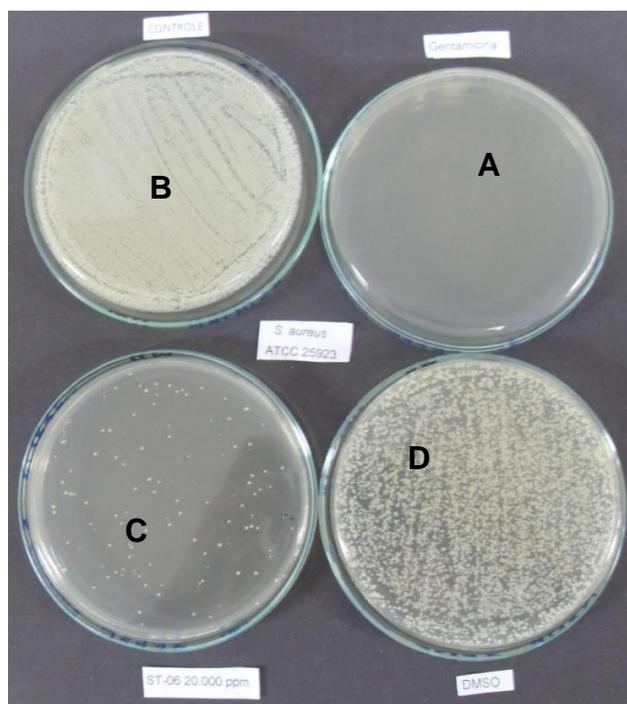


Figura 63: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e C), e da fração ST-06 (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Com relação às substâncias isoladas, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) (Figura 64) e o ácido gálico (ST-04) (Figura 65) pode-se observar que não foi possível observar a concentração mínima inibitória na concentração testada que foi de 1 mg/mL. Entretanto, é nítida a observação da inibição do crescimento bacteriano que o flavonol galangina (ST-02) apresentou frente a essa cepa testada.

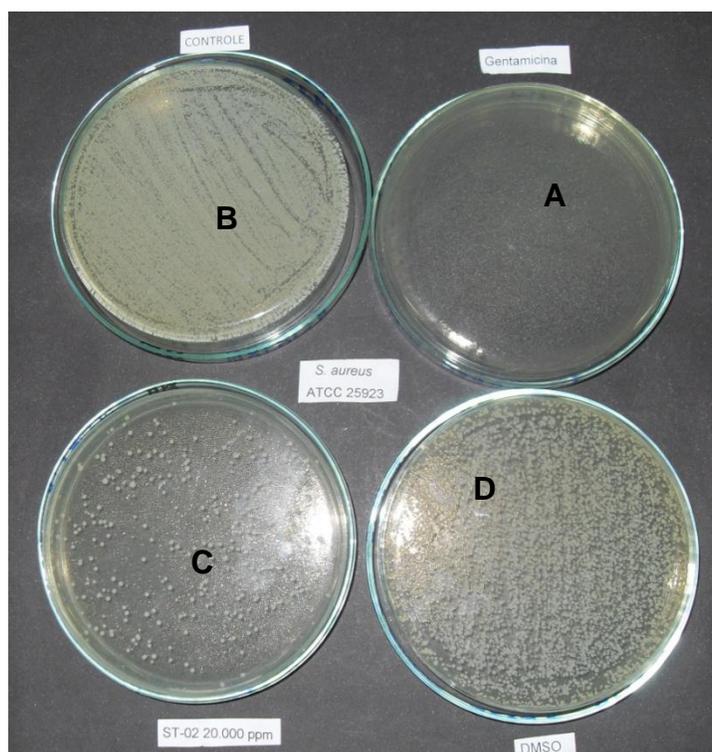


Figura 64 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O ácido gálico não apresentou efeito inibitório do crescimento bacteriano, visto que houve crescimento bacteriano semelhante aos controles com e sem DMSO (Figura 65).

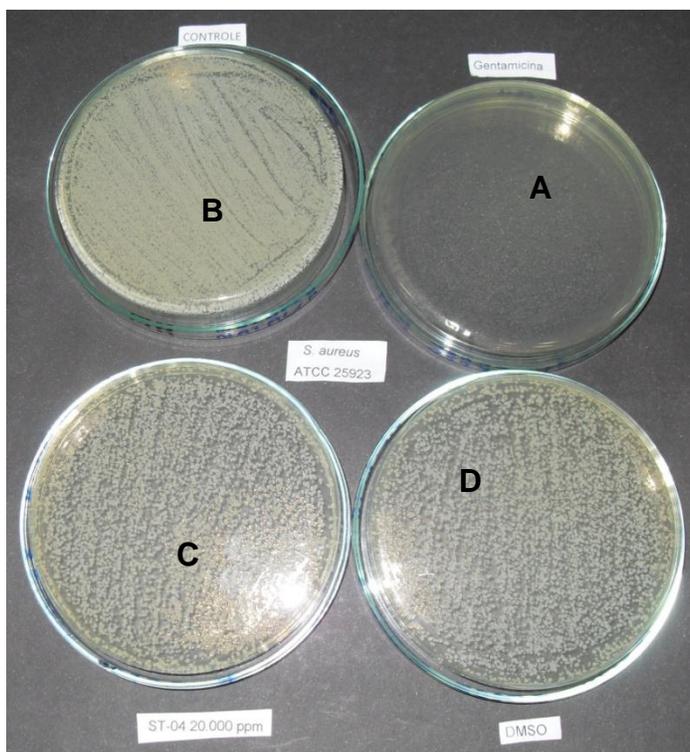


Figura 65 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e do ácido gálico (ST-04) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5.6.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA)

A segunda cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, que é uma cepa resistente ao antibiótico meticilina. Na Figura 66 é mostrada, em sentido anti-horário, a atividade do controle positivo (antibiótico gentamicina) onde o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Em seguida é ilustrado o controle negativo (sem DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Logo abaixo está representado a atividade do extrato metanólico dos frutos de aroeira onde se pode notar que houve uma grande inibição no crescimento de bactérias alcançando a CMI. Ao lado encontra-se a placa com o controle negativo (DMSO), no qual ocorreu total crescimento bacteriano.

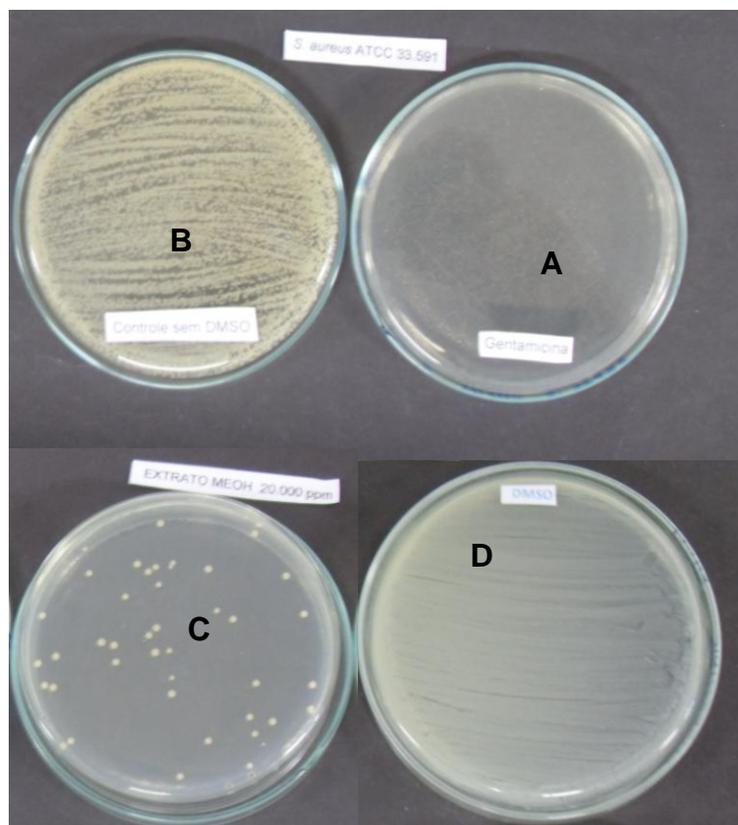


Figura 66 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e do extrato metanólico (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Observa-se na tabela 19 que tanto o Extrato metanólico, quanto a partição orgânica (Figura 67) e a fração ST-06 (Figura 68) apresentam uma ótima inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 na concentração de 1 mg/mL, apresentando quantidades de UFCs dentro da faixa de CMI. A fração ST-05 (Figura 69) apresentou boa capacidade de inibição bacteriana, com concentração de 1,25 mg/mL.

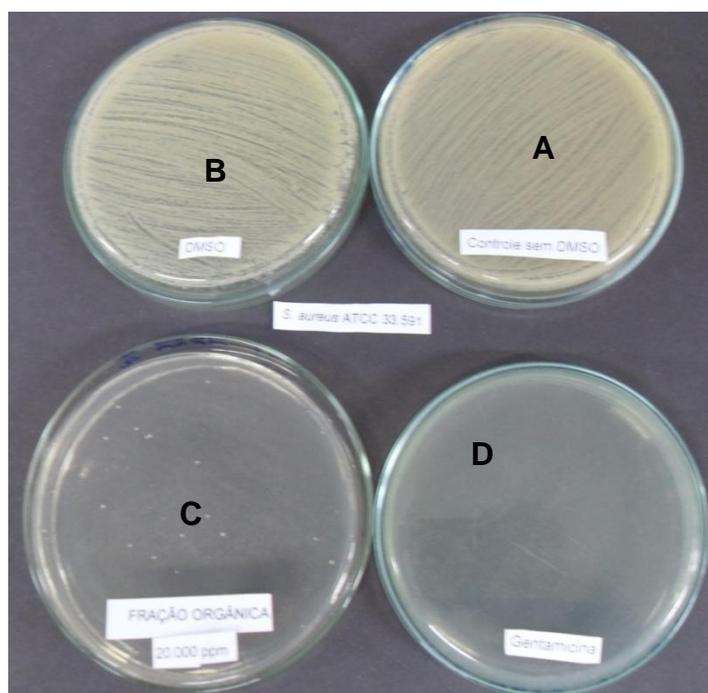


Figura 67 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e B), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e da partição orgânica (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

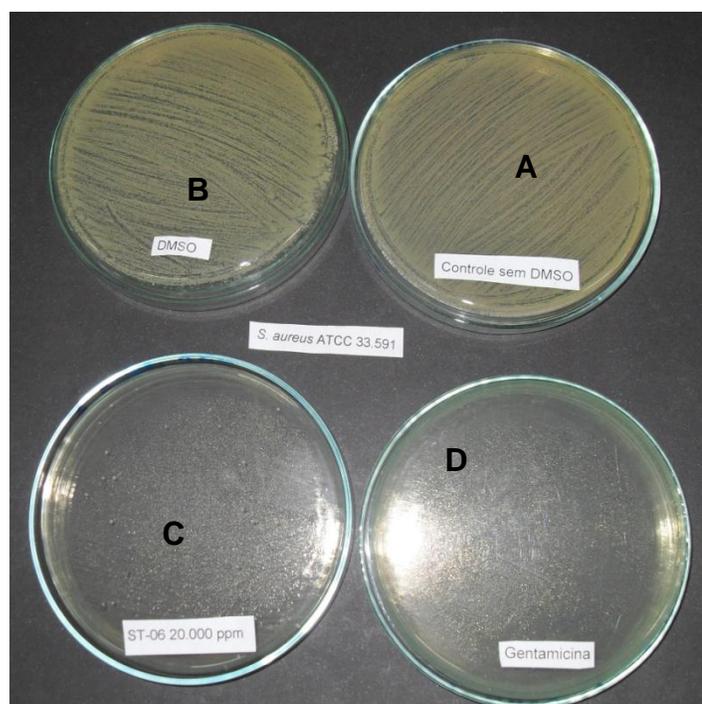


Figura 68 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e B), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e da fração ST-06 (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

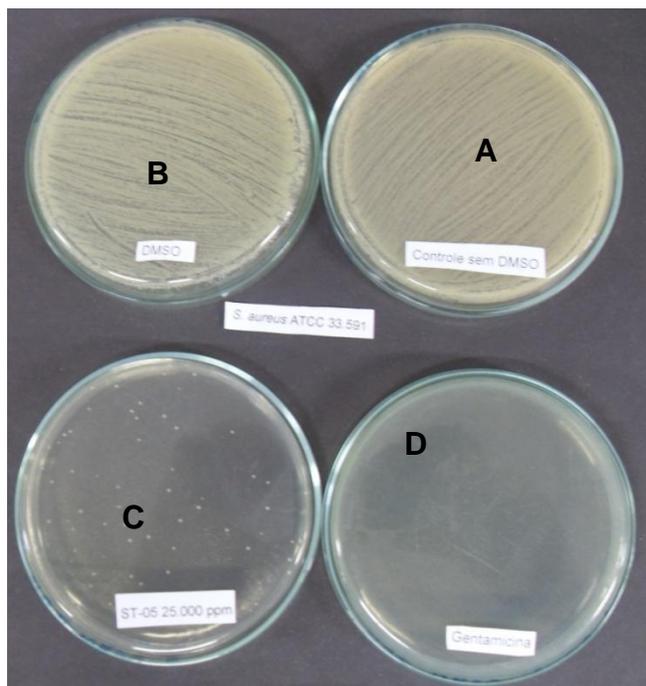


Figura 69 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e B) do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e da fração ST-05 (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Com relação ao flavonoide Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e ao ácido gálico (ST-04), estes apresentaram atividade microbiana semelhante à cepa de *S. aureus* 25923, onde para o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo houve uma inibição do crescimento (Figura 70), porém não alcançando a CMI. E o ácido gálico (ST-04) não ocorreu inibição bacteriana na concentração de 1 mg/mL (Figura 71).

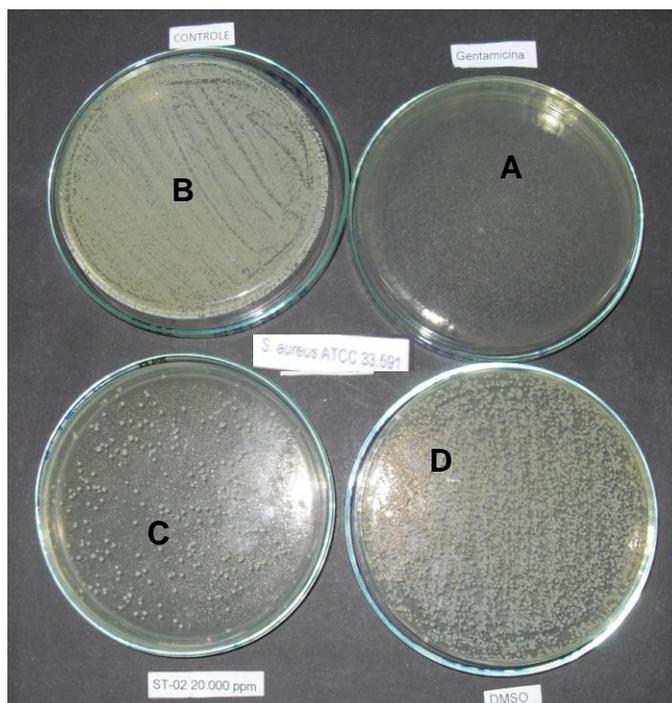


Figura 70 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e do flavonol galangina (ST-02) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

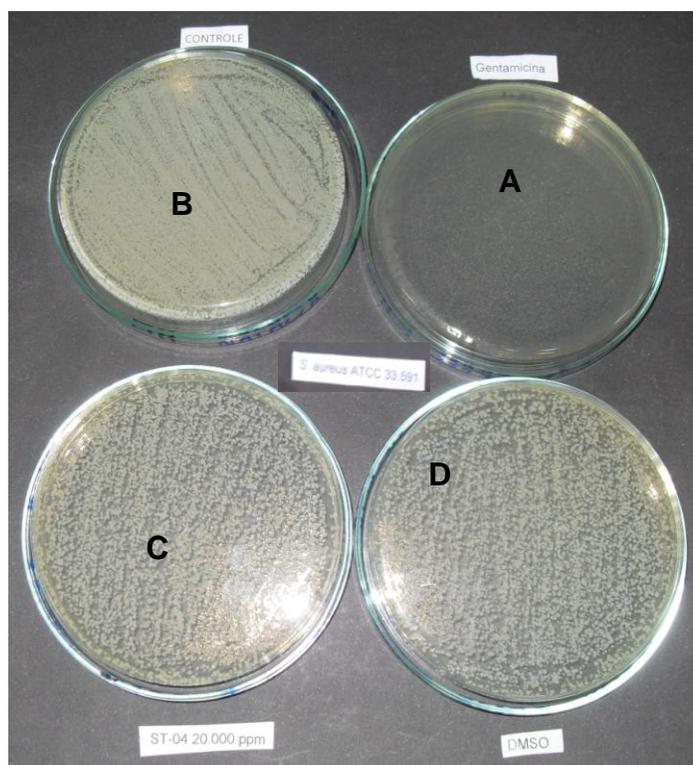


Figura 71 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e do ácido gálico (ST-04) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

5.6.3 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

A próxima cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. As bactérias *S. epidermidis*, assim como as *S. aureus*, são consideradas um habitante normal da pele e das mucosas de membranas humanas e de animais, apesar de também causarem infecções, principalmente hospitalares (Carlos et al. 2010; Vuong et al. 2000). Esta espécie apresenta a característica de formar biofilmes, sendo responsável, principalmente, por infecções em pacientes que fazem uso de material invasivo de plástico (cateter, próteses e sondas). Os biofilmes dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção (Vuong et al. 2000).

Na Figura 72 está apresentada, em sentido anti-horário, a atividade do controle positivo (antibiótico gentamicina) onde o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Em seguida é ilustrado o controle negativo (sem DMSO) no qual houve crescimento bacteriano observado. Logo abaixo está representado o outro controle negativo (DMSO) com total crescimento bacteriano. A seguir observa-se a atividade do extrato metanólico de *S. terebinthifolius* onde se pode notar que houve uma inibição no crescimento de bactérias, apesar de mesmo assim terem se desenvolvido UFCs, o que permite dizer que o extrato metanólico alcançou a CMI na concentração de 3 mg/mL (Tabela 19).

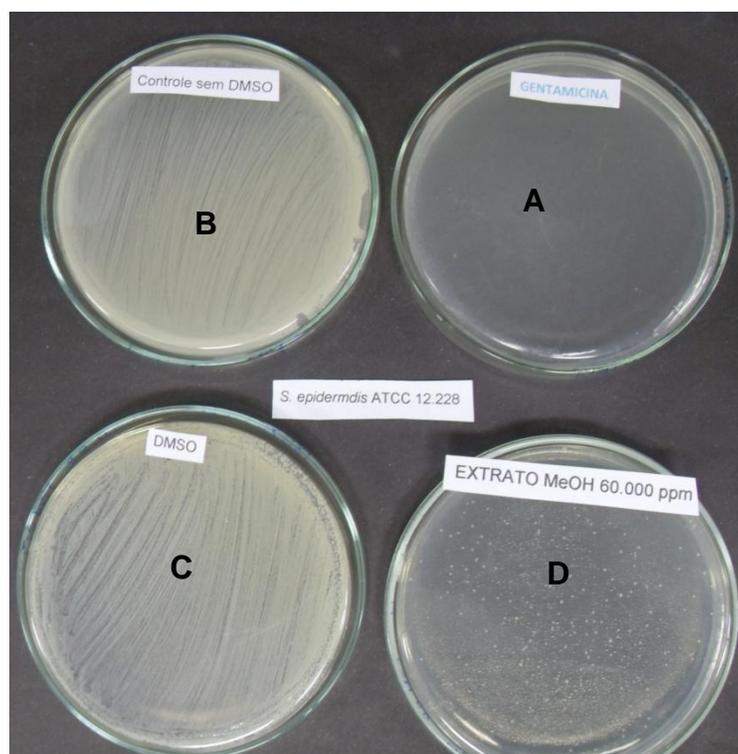


Figura 72 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e C), e do extrato metanólico (D) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Em seguida (Figura 73) encontra-se a partição orgânica que possui uma atividade bacteriana com concentração mínima inibitória menor que o extrato metanólico (2 mg/mL). Pode-se observar pela Figura 73 que a fração orgânica na concentração de 2 mg/mL, apresentou poucas UFC's, caracterizando boa capacidade na inibição do crescimento bacteriano.

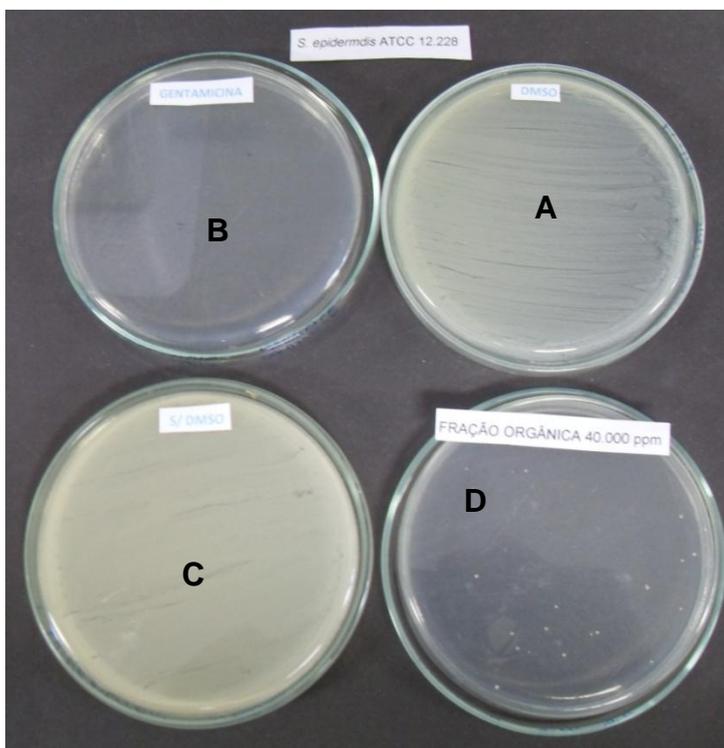


Figura 73 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B), e da partição orgânica (D) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Com relação às frações ST-05 (Figura 74) e ST-06 (Figura 75), estas apresentaram boa capacidade de inibir o crescimento bacteriano, visto que a concentração mínima inibitória foi de 2 e 1 mg/mL, respectivamente (Tabela 19).

Observa-se tanto pela figura 74 quanto pela figura 75 que ST-05 e ST-06 apresentam significativas UFC's, porém com crescimento entre 30 e 300 colônias, que significa que está compatível com a concentração mínima inibitória.

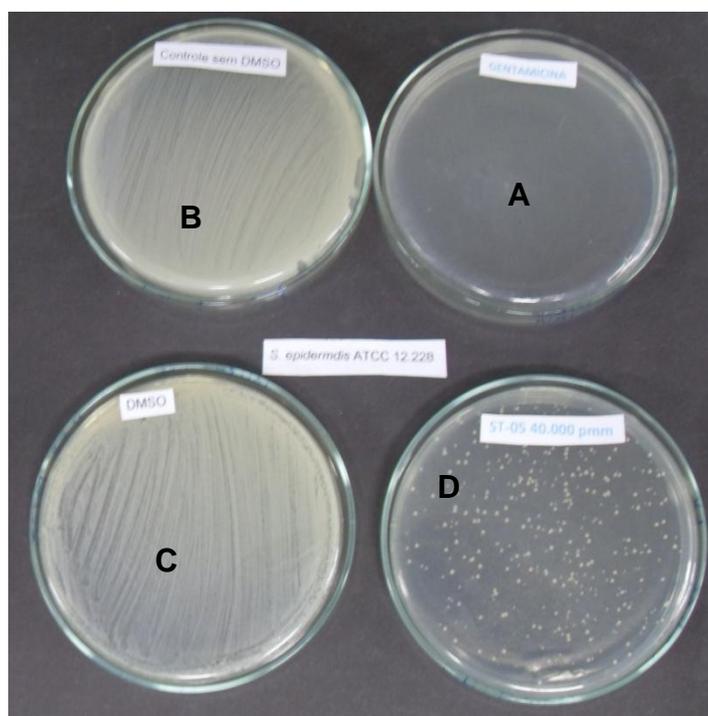


Figura 74 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e C), e da fração ST-05 (D) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

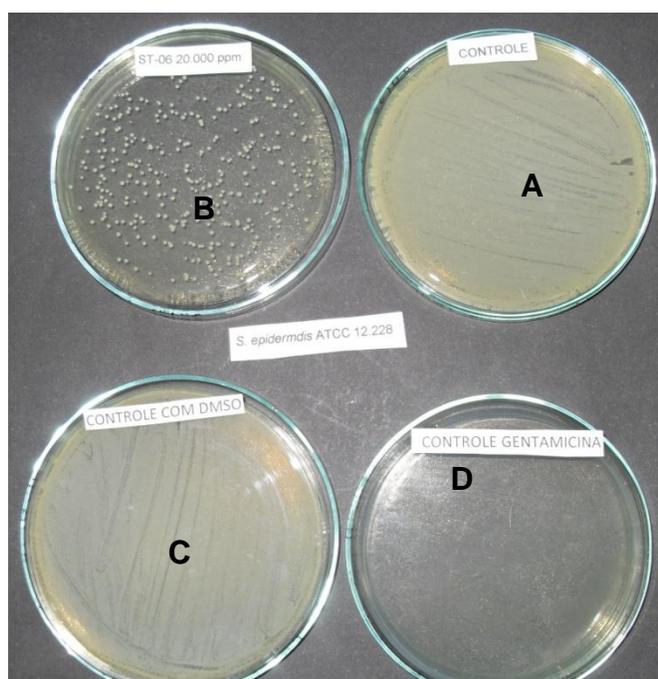


Figura 75 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e da fração ST-06 (B) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Com relação ao flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) (Figura 76) e ao ácido gálico (ST-04) (Figura 77), o crescimento bacteriano foi total, resultado esse semelhante ao do controle negativo, ou seja, não ocorreu nenhuma inibição por parte dessa fração.

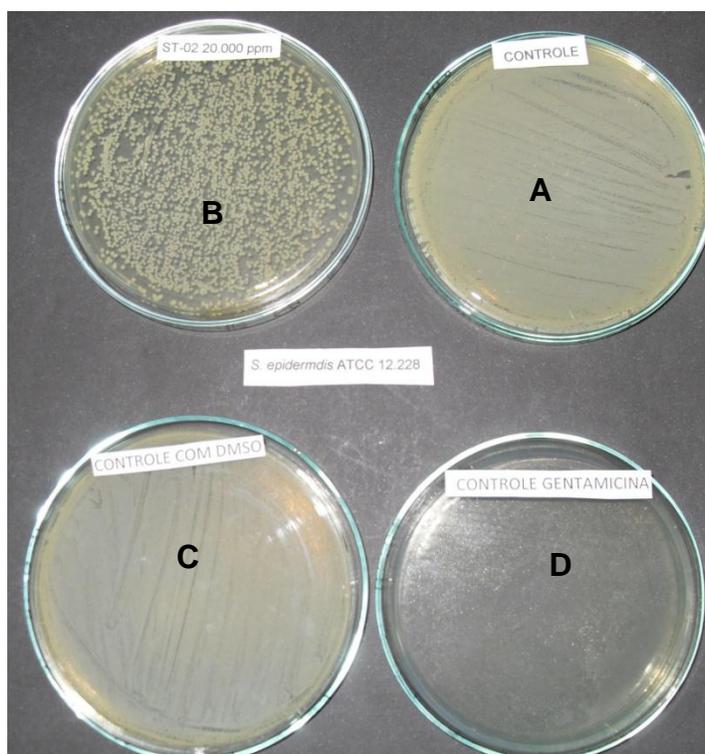


Figura 76 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) (B) frente à cepa *Staphylococcus epidermitis* ATCC 12228.

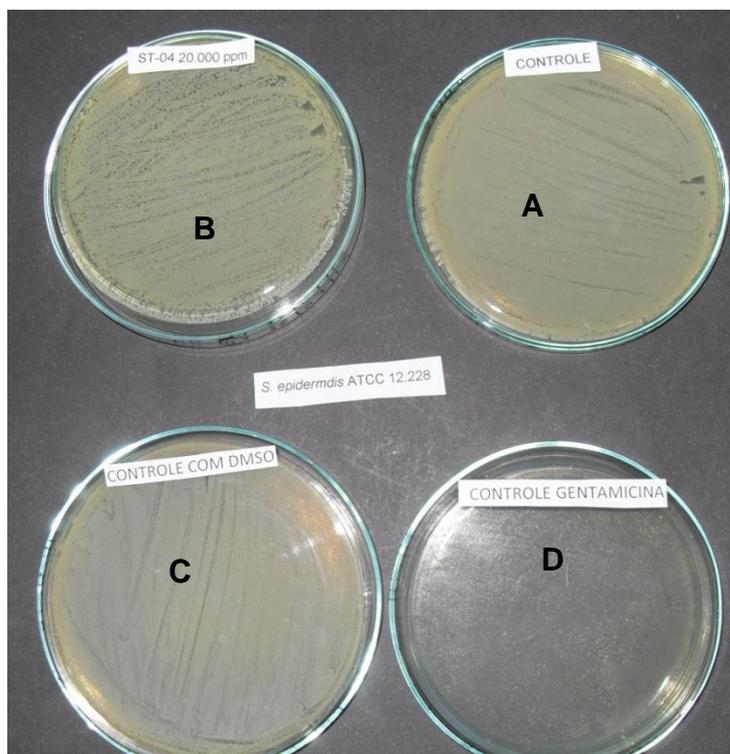


Figura 77 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (D), e do ácido gálico (ST-04) (B) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

5.6.4 *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana

A última cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana que foi isolada de um paciente em um hospital do município de Campos dos Goytacazes - RJ.

Na Figura 78 é mostrada, em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina), em que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado o outro controle negativo (sem DMSO) com total crescimento bacteriano. A seguir, observa-se a atividade do extrato metanólico obtido a partir dos frutos de aroeira, e pode-se notar que houve inibição no crescimento de bactérias, apesar de se observar o desenvolvimento de UFCs. De

acordo com a tabela 19 a concentração mínima inibitória desse extrato é de 2 mg/mL.

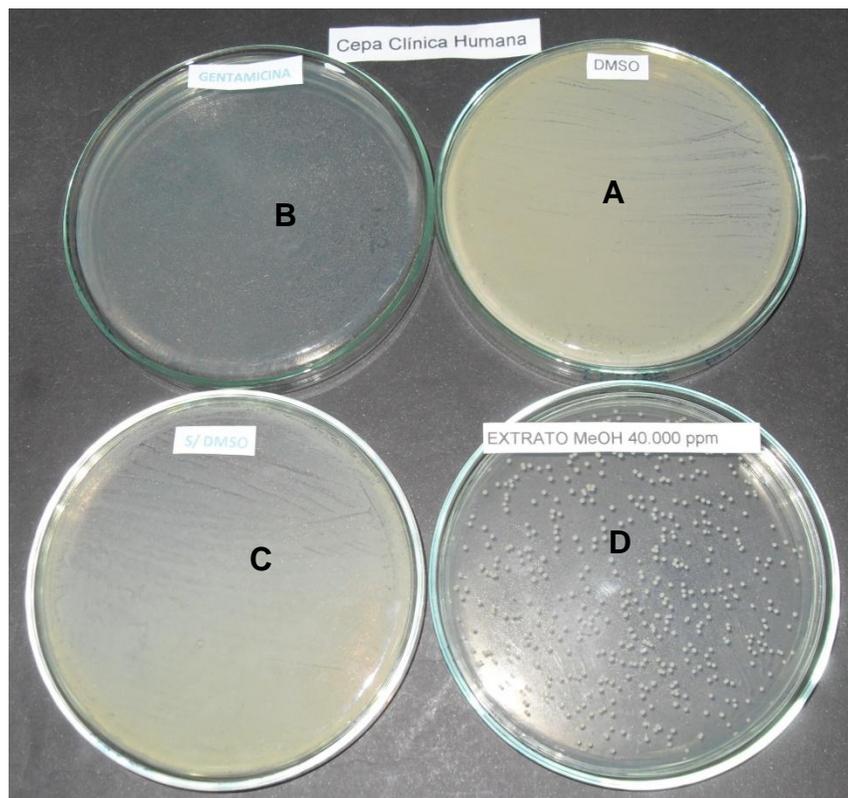


Figura 78 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B), e do extrato metanólico (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

A partição orgânica (Figura 79) e ST-05 (Figura 80) também apresentaram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* cepa clínica humana na mesma concentração que o extrato metanólico (2 mg/mL), indicando assim ter essa partição e fração uma boa atividade antibacteriana já que atingiu a CMI. É possível observar pelas figuras 79 e 80 que houve quase que completa inibição do crescimento bacteriano pela partição orgânica e fração ST-05, respectivamente, na concentração de 2 mg/mL.

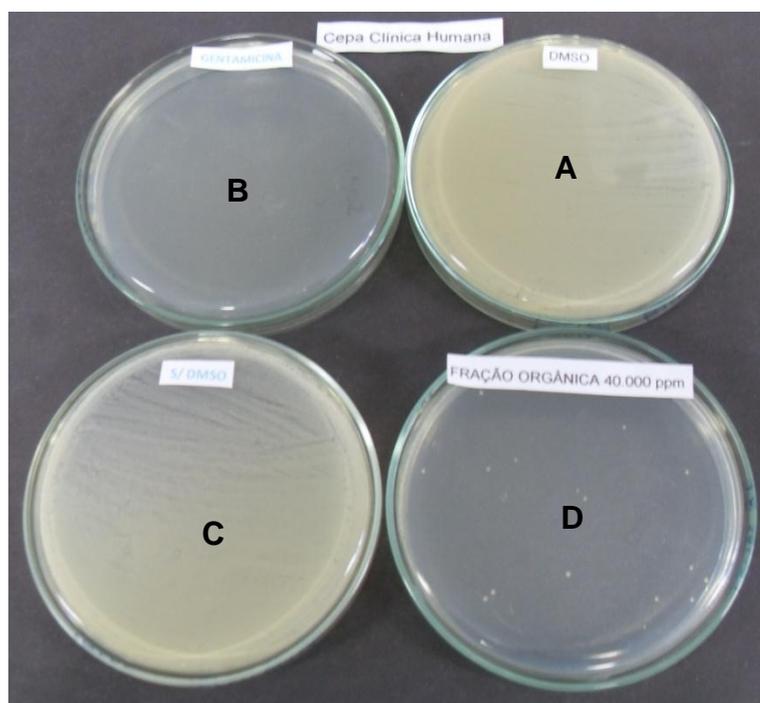


Figura 79 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B), e da partição orgânica (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

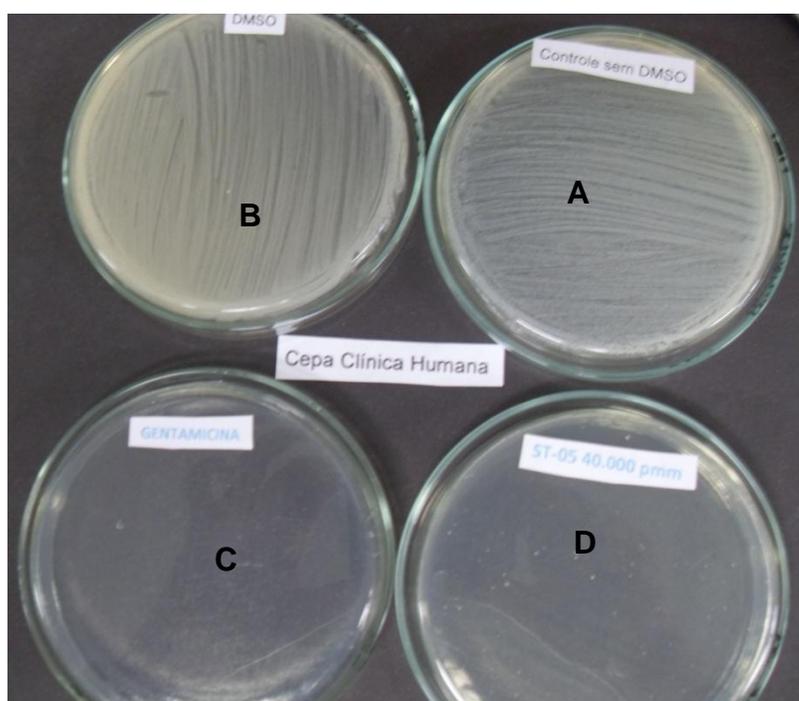


Figura 80 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e B), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (C), e da fração ST-05 (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Já a fração ST-06, mais uma vez apresentou o melhor resultado (Figura 81). De acordo com a Tabela 19 e como pode ser observado pela figura 81 essa fração apresentou boa capacidade inibitória frente a essa cepa clínica na concentração de 1 mg/mL. Com base nesse resultado, a fração ST-06 apresenta uma boa interferência no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus*. Com isso, tem-se que para a bactéria em questão, a fração que apresentou a melhor atividade antibacteriana foi ST-06, assim como para as demais cepas aqui testadas.

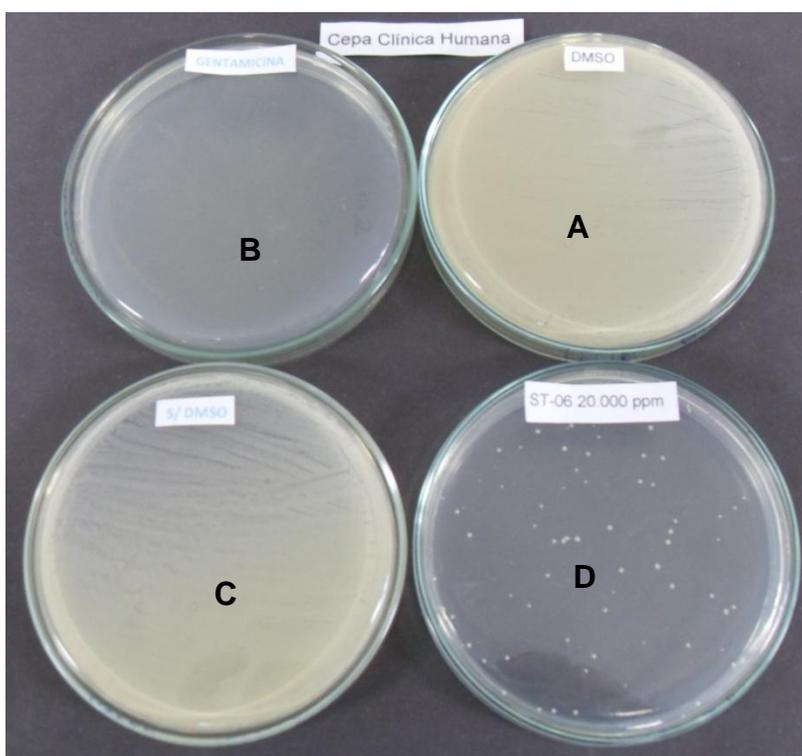


Figura 81 - Atividade antibacteriana do controle negativo (com e sem DMSO) (A e C), do controle positivo (antibiótico gentamicina) (B), e da fração ST-06 (D) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Com relação ao flavonoide isolado dos frutos de aroeira, a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02), este apresentou inibição microbiana, porém não atingindo sua concentração mínima inibitória (Figura 82). Contudo, o ácido gálico, também isolado dos frutos de *S. terebinthifolius* não apresentou inibição, visto que houve total crescimento bacteriano (Figura 83).

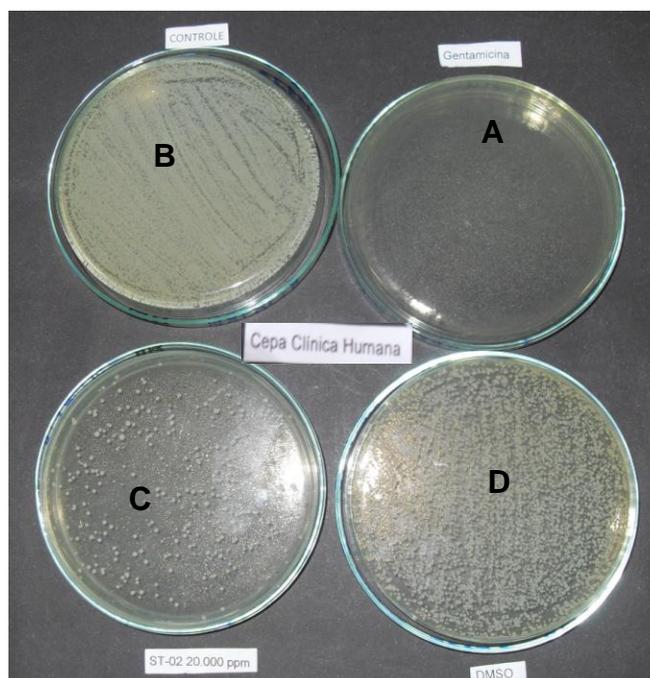


Figura 82 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e da Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

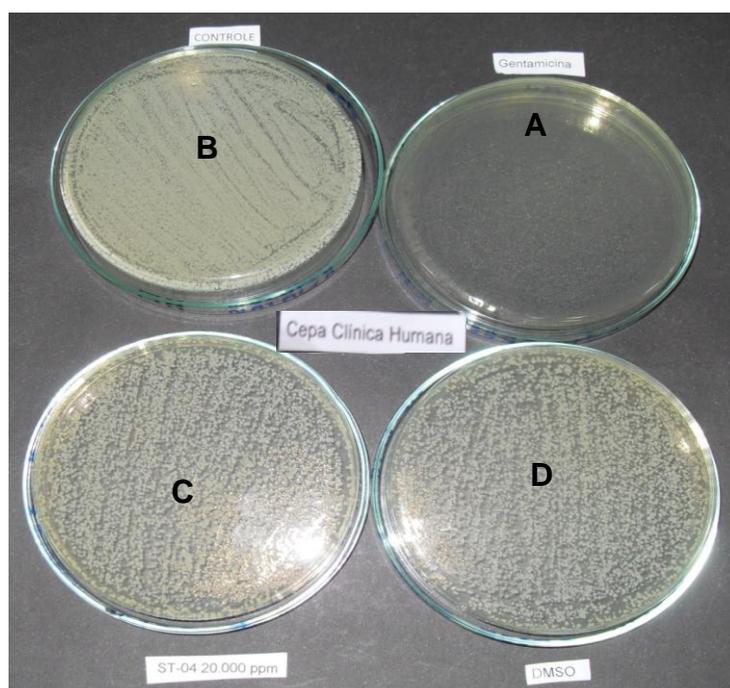


Figura 83 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina) (A), do controle negativo (com e sem DMSO) (B e D), e do ácido gálico (ST-04) (C) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

5.6.5 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente às diferentes cepas de *Staphylococcus*

De acordo com os resultados apresentados nos tópicos anteriores sobre a atividade microbiana, é possível relacionar quais amostras apresentaram maior ou menor efeito na inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus* usadas no presente trabalho (Tabela 19).

Como pode ser observado na tabela 19 para todas as cepas trabalhadas a fração ST-06 apresentou o melhor resultado, com concentração de 1 mg/mL.

As amostras menos eficientes foram a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e o ácido gálico (ST-04), onde não foi possível observar a concentração mínima inibitória dessas amostras para todas as cepas trabalhadas, visto que devido a pouca massa resultante do fracionamento, só foi possível avaliar a atividade microbiana em apenas uma única concentração (1 mg/mL). No entanto, é possível observar que o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo apresentou inibição do crescimento bacteriano, mas não foi possível observar a concentração mínima inibitória.

É possível salientar que o melhor poder inibidor do crescimento bacteriano a partir dos frutos de aroeira foi com a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), uma cepa Resistente à metilicina. *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi detectada pela primeira vez no início dos anos 60, logo após a introdução da metilicina para uso clínico (Ugur e Ceylan, 2003).

Alguns trabalhos confirmam a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Schinus terebenthifolius*. Degáspari, e colaboradores (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos, tanto o aquoso quanto o alcoólico, obtidos a partir dos frutos de aroeira e o relacionaram com compostos fenólicos presentes nestas amostras. Esses autores verificaram que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Bacillus cereus* ATCC 11778, apresentando concentração significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico. Contudo, o extrato aquoso, não apresentou efeito inibitório sob o crescimento dos micro-organismos testados e possuía apenas a flavanona naringina.

Lima et al. (2004) verificaram a atividade do extrato aquoso de *S. terebenthifolius* contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e outras bactérias e fungos, encontrando atividade inibitória de crescimento dessas bactérias. Os autores discutem que esta atividade antibacteriana e antifúngica está, possivelmente, associada à presença de certos compostos químicos, em especial de taninos, além de compostos presentes em menor quantidade, como os alcaloides, esteroides e chalconas. Outros autores destacam a atividade do extrato etanólico das folhas e cascas do caule de aroeira frente a *S. aureus* ATCC 25923 (Lima et al. 2006; Tonial, 2010).

Há certas contradições no espectro de ação dos extratos descritos na literatura, porém a atividade antimicrobiana de extratos de *Schinus terebenthifolius* Raddi é inquestionável, visto que já foi desenvolvido um gel de aroeira específico para o tratamento da vaginose bacteriana, o qual teve sua eficácia e segurança comprovadas e também apresentou efeitos benéficos sobre a microbiota vaginal (Amorim e Santos, 2003) e o uso odontológico da ação antimicrobiana da aroeira também tem sido bastante explorado (Tonial, 2010). Soares et al. (2006) testaram a susceptibilidade *in vitro* da tintura de aroeira sobre bactérias bucais (*S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 2575, *S. sobrinus* ATCC 27609, *S. mitis* ATCC 9811, *S. sanguis* ATCC 10557 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469) e destacaram a atividade da aroeira.

Com relação ao flavonoide Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) diversos trabalhos mostram a atividade antimicrobiana relacionada apenas à sua aglicona (Cushnie e Lamb, 2005; Cushnie et al. 2003). Mas, há relatos na literatura que essas discrepâncias nos resultados podem ser devido aos variados ensaios a ser utilizados (Cushnie e Lamb, 2005; Basile et al. 2000), incluindo a técnica de diluição em ágar, o ensaio de difusão em disco de papel, o método de difusão em poço em ágar, a técnica de macrodiluição e microdiluição em caldo. Em particular, os ensaios que dependem da diluição dos flavonoides nem sempre apresentam um resultado quantitativo da atividade antibacteriana confiável, porque um potente flavonoide pode ter uma baixa taxa de diluição no meio de cultura (Cushnie e Lamb, 2005).

Alguns estudos evidenciam o potencial antimicrobiano e antifúngico do ácido gálico (Panizzi et al. 2002; Penna et al. 2001). No trabalho de Cardoso (2009) foi verificado um CMI de 1000 µg/mL para *S. aureus* 25923. Através da metodologia de microdiluição, Kang et al. (2008) detectaram a atividade antimicrobiana do ácido gálico contra *S. mutans*, inibindo a produção de biofilmes bacterianos na cavidade oral, porém a mesma atividade não foi observada para *E. coli* e *S. aureus* (Saxena et al. 1994). No trabalho de Cardoso (2009) por disco-difusão, não foi possível detectar a atividade antimicrobiana do ácido gálico. Por microdiluição, foi possível detectar uma redução considerável do crescimento bacteriano de 86,64% para *S. aureus*, porém somente na maior concentração avaliada (1000 µg/mL).

Staphylococcus aureus é a segunda principal causa de bacteremia e a principal causa de endocardite infecciosa (Salgado-Pabón et al. 2013; Murdoch et al. 2009; Fowler et al. 2005). Apesar dos avanços médicos, o uso de dispositivos intravasculares, próteses e alguns procedimentos cirúrgicos, além de uma população crescente com condições precárias, apresentando doenças tais como diabetes mellitus, doenças hepáticas, hemodiálise renal e doenças imunossupressoras, têm contribuído para o surto de infecções por *S. aureus* em ambientes de cuidados de saúde e na comunidade (Salgado-Pabón et al. 2013; Fowler et al. 2005). Resultados de bacteremia por *S. aureus*, muitas vezes a partir de infecções da pele, por uso de cateteres, feridas cirúrgicas, pneumonia, ou por via intravenosa por uso de drogas, podendo evoluir de uma bacteremia para a sepse, nota-se uma taxa de mortalidade de 20 a 40%, (Salgado-Pabón et al. 2013; Park et al. 2012; Fowler et al. 2003).

A sepse é um enorme e dispendioso problema médico enfrentado por todo o mundo. Na América do Norte, estima-se que são mais de 600.000 casos de sepse por ano, com uma taxa de mortalidade que varia entre 30% e 50% (Bosmann e Ward, 2013; Martin et al. 2003). Atualmente, não há intervenções terapêuticas específicas que são aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento da sepse. Sendo assim, é de extrema importância a busca por alimentos e compostos que possuam potencial para reduzir o crescimento bacteriano e as inflamações recorrentes do sistema imune para eliminá-lo (Bosmann e Ward, 2013).

É importante para o término da inflamação que, depois que os neutrófilos tenham desempenhado as suas funções, como a fagocitose de partículas estranhas e/ou eliminar as bactérias, que rapidamente sofram apoptose e sejam então fagocitados pelos macrófagos (Kurosaka, et al. 2003). Se este mecanismo falha, os neutrófilos e os macrófagos podem produzir uma quantidade excessiva de radicais superóxido e de nitrogênio como o óxido nítrico no local da inflamação, o que causaria danos nos tecidos. Ou então, eles poderiam submeter a uma apoptose tardia para induzir a uma outra resposta inflamatória, isto é, se tornando um ciclo vicioso. Além disso, a excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α após a indução de necrose ou ao fracasso da remoção de células em apoptose, poderia provocar uma inflamação crônica (Shibata et al. 2010; Fadok et al. 2001) .

Sendo assim, compostos que consigam inibir a produção de NO, por inibir a expressão ou a atividade da *i*NOS, ou sequestrando esse radical livre possuem alto potencial como agentes anti-inflamatórios e antioxidantes (Hamalainen et al. 2007), bem como bactericidas (Bosmann e Ward, 2013).

Esta tese de doutorado objetivou relacionar essas atividades e pode-se concluir que tanto o extrato metanólico dos frutos de aroeira, quanto a partição orgânica e a fração ST-06, obtiveram uma alta capacidade de sequestro de radicais livres pelo método do DPPH (em torno de 90 % de sequestro) e pela redução do Fe³⁺ a Fe²⁺ 201,8 \pm 0,6 μ M de Trolox/mg, para a partição orgânica, de 172,4 \pm 0,9 μ M de Trolox/mg para o Extrato metanólico e 143,8 \pm 0,4 μ M de Trolox/mg para a fração ST-06. Esses resultados mostram o alto potencial antioxidante dessas amostras e que poderiam justificar a elevada inibição da produção de NO por macrófagos e atividade microbiana dos frutos de aroeira.

Mas, o ácido gálico, foi a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante pelos dois métodos utilizados, sendo o EC₅₀ 0,52 \pm 1,83 % para o método do DPPH e 650,6 \pm 0,8 μ M de Trolox/mg para o método do FRAP e não apresentou inibição da produção de NO e nem inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado sugere que outros mecanismos além das propriedades antioxidantes podem estar relacionados com as atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas.

Com base nestas observações, é de suma importância o descobrimento de substâncias químicas presentes em fontes vegetais que possam apresentar tanto atividades antioxidantes quanto antimicrobiana e anti-inflamatórias. Assim, essas substâncias seriam uma excelente alternativa para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho se avaliou o perfil químico dos frutos de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), a medida da quantificação da atividade antioxidante, sua capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos e a capacidade das amostras em inibir o crescimento de cepas bacterianas de espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, o que em tese pode justificar seu uso popular como anti-inflamatório e um possível alimento funcional.

Para a obtenção do extrato bruto, os frutos de aroeira foram submetidos à extração exaustiva com metanol. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter as substâncias purificadas e para o conhecimento do perfil químico do extrato. Após a purificação das substâncias isoladas, estas foram enviadas ao RMN para sua elucidação estrutural, tendo como isolamento e identificação o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02), o ácido gálico (ST-04) e a galangina (ST-5-1).

Com relação ao teor de fenóis totais, é possível concluir que houve concentração das moléculas de interesse (substâncias fenólicas) no processo de fracionamento do extrato metanólico, visto que a partição orgânica apresentou $1,4 \pm 0,5$ mg/mL, seguido do extrato metanólico ($0,66 \pm 1,0$ mg/mL) e da partição aquosa com $0,27 \pm 1,2$ mg/mL de fenóis totais.

O extrato, a partição aquosa e orgânica, as frações ST-05 e ST-06, as substâncias isoladas e os padrões químicos foram avaliados quanto à sua atividade

antioxidante por diferentes métodos. Tanto o extrato metanólico, a partição orgânica e a fração ST-06, obtiveram uma alta capacidade de sequestro de radicais livres pelo método do DPPH (em torno de 90 % de sequestro) e pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} $201,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ de Trolox/mg, para a partição orgânica, de $172,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ de Trolox/mg para o Extrato metanólico e $143,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ de Trolox/mg para a fração ST-06. Com relação às substâncias isoladas, o ácido gálico, foi a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante pelos dois métodos utilizados, sendo o EC_{50} $0,52 \pm 1,83 \%$ para o método do DPPH e $650,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ de Trolox/mg para o método do FRAP. Não foi possível realizar os ensaios com as demais substâncias isoladas devido a pouca massa.

Com relação à inibição da Produção de NO, a partição orgânica apresentou a melhor capacidade de inibição quando comparado com o extrato metanólico e a partição aquosa, resultado semelhante ao potencial antioxidante avaliado pelas metodologias do DPPH e FRAP. É possível observar que até na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, a quantidade de NO produzida foi de $39,2 \pm 1,33 \mu\text{M}$ ($44,47 \pm 1,88 \%$ de inibição), mostrando ser tão ativa em comparação com o controle tratado com L-NMMA a $20 \mu\text{g/mL}$ ($43,8 \pm 3,8 \%$ de inibição da produção de NO), indicando um excelente efeito inibidor na produção de NO. Com relação às frações ST-05 e ST-06, estas apresentaram as melhores inibições da produção de NO (IC_{50} de $20,90 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$ e IC_{50} de $14,20 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), até mesmo quando comparadas com a partição orgânica. Vale a pena ressaltar que a amostra ST-06 na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, a quantidade de NO produzida foi de $32,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$. O flavonoide isolado de *S. terebinthifolius*, Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo, inibiu significativamente a produção de NO (IC_{50} de $22,47 \pm 1,61 \mu\text{g/mL}$). Com relação ao ácido gálico, este não apresentou boa capacidade em inibir a produção de NO por macrófagos, visto que até na maior concentração testada ($100 \mu\text{g/mL}$) a inibição da produção de NO foi de $39,9 \pm 2,3 \%$. No que se refere à citotoxicidade, somente o extrato metanólico e ST-05 mostraram toxicidade nas maiores concentrações ($500 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) acima de 50%. Todas as demais amostras não apresentaram toxidez.

Com relação à atividade antimicrobiana, é possível concluir que para todas as cepas trabalhadas de *Staphylococcus* a fração ST-06 apresentou o melhor resultado, com concentração de 1 mg/mL. As amostras menos eficientes foram a Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo (ST-02) e o ácido gálico (ST-04), onde não foi possível observar a concentração mínima inibitória dessas amostras para todas as cepas trabalhadas, visto que devido a pouca massa resultante do fracionamento, só foi possível avaliar a atividade microbiana em apenas uma única concentração (1 mg/mL). Mas, é possível observar que o flavonol Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo apresentou inibição do crescimento bacteriano, porém não foi possível observar a concentração mínima inibitória.

Todos os resultados obtidos neste trabalho mostram o alto potencial antioxidante dessas amostras e que poderiam justificar a elevada inibição da produção de NO por macrófagos e atividade microbiana dos frutos de aroeira. Mas, o ácido gálico apresentou melhor atividade antioxidante pelos dois métodos utilizados, e não apresentou inibição da produção de NO e nem inibição do crescimento bacteriano. Esse resultado sugere que outros mecanismos além das propriedades antioxidantes podem estar relacionados com as atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Com base nestas observações, é de suma importância o descobrimento de substâncias químicas presentes em fontes vegetais que possam apresentar tanto atividades antioxidantes quanto antimicrobiana e anti-inflamatórias. Assim, essas substâncias seriam uma excelente alternativa para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2005) *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Elsevier, 5a edição, Rio de Janeiro, RJ.
- Abreu, A. P. L. (2008) *Estudo Comparativo da Atividade Anti-inflamatória e Antifúngica de Extratos de Própolis Vermelha e Verde*. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Estadual do Ceará. 71 páginas.
- Abreu, I. N.; Pinto, J. E. B. P.; Bertolucci, S. K. V.; Moraes, A. R.; Geromel, C.; Ladeira, A.; Lameira, O. A. (2003). Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus Sicyoides*, Uma Planta Medicinal. *Acta amazônica*. 33:1-7.
- Afolayan, A. J., Meyer, J. J. M. (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* 57:177–181.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67– 76.
- Agrawal, P. K. (1989) *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Ahmad, R., Ali, A.M., Israf, D.A., Ismail, N.H., Shaari, K., Lajis, N.H. (2005) Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. *Life Science*. 76:1953-1964.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International* 41:1–15.
- Allahverdiyev, A. M., Bagirova, M., Abamor, E. S., Ates, S. C., Koc, R. C., Miraloglu, M., Elcicek, S., Yaman, S., Unal, G. (2013) The use of platensimycin and platencin to fight antibiotic resistance. *Infection and Drug Resistance* 6: 99–114.

- Alonso-Salces, R. M.; Barranco, A.; Abad, B.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:2938-2952.
- Amorim, M. M. R., Santos, L. C. (2003) Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 25:95-102.
- Anup, K., C, Harikrishna, R., Shailaja, B. (2010) Evaluation of Antioxidant Activity of the Leaves of Eupatorium Odoratum Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2(4):77-79.
- Araújo, R., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 53:783-786.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (1995) Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists. Arlington. 957 páginas.
- Azadmehr, A.; Afshari, A.; Baradaran, B., Hajiaghaee, R.; Rezazadeh, S., Monsef-Esfahani, H. (2009) Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages in vitro and ex vivo by *Scrophularia striata* ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 124: 166–169.
- Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24:64-70.
- Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet Review*, 357: 539-545.
- Bandyopadhyay, M.; Chakraborty, R.; Raychaudhuri, U. (2007) A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT* 40:842–851.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V. and Frigola, A. (2013). A comparative study of the analysis of antioxidant activities of liquid foods employing spectrophotometric, fluorometric, and chemiluminescent methods. *Food Analytical Methods* 6: 317–327.
- Barbosa, L. C. A., Demuner, A. J., Clemente, A. D. (2007) Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. *Química Nova*. 30:1959-1965.
- Barbosa-Pereira, L., Bilbao, A., Vilches, P., Ângulo, I., Luis, J., Fité, B., Paseiro-Losada, P., Cruz, J. M. (2014) Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimisation of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry* 145: 191–197.
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobianchi, R., Vuotto, M.L., Ferrara, L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 71: S110–S116.

- Bauer, A.W., Perry, D.M., Kirby, W.M.M. (1960) Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. *Journal of the American Medical Association* 173:475-480.
- Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., El Hady, S. (2013) Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Science* 58(2): 173–181.
- Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Le Meurlay, D., Louaileche, H. (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods* 5: 346–354.
- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, p. 70-76.
- Bernardes, N. R. (2010). Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – 131 p.
- Bernardo, W.I., Bariollo, M.F.G., Goncalvez, R.B., Höfling, J.F.(2005) *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. *Rev. Inst. Med. Trop.* 47(1): 19 – 24.
- Bezerra, B. P. (2012) Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Teor de Ácido Gálico e Catequina no Fitoterápico Sanativo ® por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z. (2013) Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 67: 958-963.
- Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2:906-916.
- Bosmann, M., Ward, P. A. (2013) The inflammatory response in sepsis. *Trends in Immunology* 34(3): 129-136.
- Brandão, M. G. L.; Cosenza, G. P.; Moreira, R. A.; Monte-Mor, R. L. M. (2006). Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopoeia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 408–420.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 28(1): 25-30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.

- Bulbul, I. J., Zulfiker, A. H. M., Hamid, K., Khatun, M. H., Begum, Y. (2011) Comparative Study of In vitro Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxic Activity of Two Bangladeshi Medicinal Plants- *Luffa cylindrica* L. and *Luffa acutangula*. *Pharmacognosy Journal* 3:23.
- Buzby, J.C., Roberts, T. (2009) The Economics of Enteric Infections: Human Foodborne Disease Costs. *Gastroenterology*. 136:1851–62.
- Câmara, M. C. C., Marinho, C. L. C., Guilam, M. C., Braga, A. M. C. B. (2008) A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 23(1): 52-58.
- Campello, J. P.; Marsaioli, A. J. (1975). Terebenthifolic acid and bauerenone, new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 14, 2300–2302.
- Cardoso, C. R. P. (2009) Avaliação do Potencial Biológico de Plantas Pertencentes ao Cerrado Brasileiro e Seus Compostos de Interesse Farmacológico. Tese de Doutorado apresentada a Universidade Estadual Paulista.
- Carlos, L. A., Amaral, K. A. S., Vieira, I. J. C., Mathias, L., Braz-Filho, R., Samarão, S. S., Vieira-da-Motta, O. (2010) *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with *staphylococcal* density, enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:612-620.
- Carvalho, A. C., Braga, J. M. A. B., Gomes, J. M. L., Souza, J. S., Nascimento, M. T. (2006) Comunidade Arbórea de Baixada Aluvial no Município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Cerne*. 12:157-166.
- Cassettari, V.C., Strabelli, T., Medeiros, E.A.S. (2005) *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9(1):70-76.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*.122:402-405.
- Cavalher-Machado, S. C., Rosas, E. C., Brito, F. A., Heringe, A. P., Oliveira, R. R., Kaplan, M. A. C., Figueiredo, M. R., Henriques, M. G. M. O. (2008) The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*. 8:1552–1560.
- Ceruks, M.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Lago, J. H. G. (2007). Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova* 30, 597–599.
- Chakraborty, S. P., KarMahapatra, S., Das, S., Roy, S. (2011) Alteration of some cellular function in amikacin resistant *Pseudomonas aeruginosa* transfected macrophages: a time dependent approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 482-487.
- Chi, Y. S.; Cheon, B. S., Kim, H. P. (2001) Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of

- inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochemical Pharmacology*, 61: 1195–1203.
- Clark, F.E. (1965) Agarplate method for total microbial count. In: Black, C.A.; Evans, D.D.; Ensminger, L.E.; White, J.L.; Clark, F.E. *Methods of soil analysis*. Madison: *American Society of Agronomy*, 2: 14601466.
- Coleman, J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1:1397–1406.
- Copland, A., Nahar, L., Tomlinson, C.T.M., Hamilton, V., Middleton, M., Kumarasamy, Y., Sarker, S.D. (2003) Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*. *Fitoterapia*. 74:133-135.
- Corrêa, M. F. P. (2007) Aspectos químicos e potencial terapêutico de *Vochysia divergens* (Vochysiaceae), uma planta do Pantanal matogrossense. Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Corrêa, M. P. (1984) Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional* - Rio de Janeiro: v. 6, p.170-171.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M., (2001). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 35–43.
- Cruz, J. M., Moldes, A. B., Bustos, G., Torrado, A., & Domínguez, J. M. (2007). Integral utilization of barley husk for the production of food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1000–1008.
- Cruz-Galvez, A.M., Aldapa-Gómez, A., Villagómez-Ibarra, J.R., Chavarría-Hernández, N., Rodrigues-Baños, J. (2013) Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*. 32:289-295.
- Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343–356.
- Cushnie, T.P.T., Hamilton, V.E.S., Lamb, A.J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 158 (4): 281–289.
- Das D., Saha, S.S., Bishayi, B. (2008) Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines. *Inflamm Res* 57: 340-349.
- De Souza, T.P. (2004) Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produto seco por asperção de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Degáspari, C. H. (2004) Propriedades Antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* RADDI). Tese de Doutorado – Curitiba – PR. Universidade Federal do Paraná. 104 páginas.
- Degáspari, C. H., Waszczynskij, N., Prado, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências agrotécnica*. 29:617-622.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) (2012). Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, 10(3): 2588.
- Eldahshan, O. A. (2011) Isolation and Structure Elucidation of Phenolic Compounds of Carob Leaves Grown in Egypt. *Current Research Journal of Biological Sciences* 3(1): 52-55.
- Ercisli S, Coruh I, Gormez A, Sengu M. (2008) Antioxidant and Antibacterial Activities of Portulaca Oleracea L. Grown Wild in Turkey. *Ital J Food Sci*. 4:20.
- Erlund, I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research* 24:851–874.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Toma's-Barberan, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 68:2986–3008.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L, Guthrie, L., Henson, P. M. (2001) Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases, *J. Immunol*. 166: 6847–6854.
- Fang, Y. N., Liu, G. T. (2002) Effect of isorhapontigenin on respiratory burst of rat neutrophils. *Phytomedicine*. 9:734-738.
- Forkmann, G., Martens, S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 :155-160.
- Fowler, V.G., Jr, Miro., J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein E, Corey GR, Spelman D, Bradley SF, Barsic B, Pappas PA, Anstrom KJ, Wray D, Fortes CQ, Anguera I, Athan E, Jones P, van der Meer JT, Elliott TS, Levine DP, Bayer AS, ICE (2005). Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA* 293: 3012–3021.
- Gaestel, M.; Kotlyarov, A., Kracht, M. (2009) Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 480-499.
- Gloria, L. L (2013) *Cucurbita moschata* (abóbora): Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 121 pag.
- Goldberg, R. A., Knoop, C. I., Stroock, L.M. (2000) Promise of Functional Foods. *Harvard Business School Cases*. 1-15.

- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M. S., Malouin, F., Bouarab, K. (2009) Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(8): 3400-19.
- Griffiths, L. A.; Barrow, A. (1972). Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochemistry Journal*. 130:1161–1162.
- Guilarde, A.O., Turchi, M.D., Martelli, C.M.T., Primo, M.G.B., Batista, L.J. (2007) Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 53 (1): 34-38.
- Guzik, T. J.; Korbout, R., Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54: 469-487.
- Hage, D. S., Carr, J. D. (2012) Química analítica e análise quantitativa. 1ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall.
- Halliwel, B. (2007) Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc. Res*. 73: 341-347.
- Halliwel, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46:531–542.
- Halliwel, B.; Gutteridge, J. M. C.; (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford.
- Halliwel, B.; Gutteridge, J.M.C. (1985) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Journal of Biochemistry*, 4: 291.
- Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 1:1-10.
- Handelman, G.J. (2001) The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*, 17(10): 818-822.
- Harborne, J. B. (1994) Phenolics *In*: Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V. *Natural Products. Their chemistry and biological significance*. 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, p. 361-388.
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition*. 16:688-689.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, I.S.; Lajolo, F.M. (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem*. 53: 2928-2935.
- Hayashi, T.; Nagayama, K.; Arisawa, M.; Shimizu, M.; Suzuki, S.; Yoshizaki, M.; Morita, N. (1989). Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a paraguayan crude drug, “molle-l” (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52, 210–211.

- Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., Holden, J. M. (2013) Sources of variability in the flavonoid content of foods. *Procedia Food Science* 2: 46 – 51.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572–584.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 139:1–21.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Huang, G. C., Chow, J. M., Shen, S. C., Yang, L. Y., Lin, C. W., Chen, Y. C. (2007) Wogonin but not Nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *International Immunopharmacology*. 7:1054–1063.
- IFIC - International Food Information Council Foundation (2006) Functional Foods. <<http://www.ific.org/nutrition/functional>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2013.
- Ikeda, A. A., Moraes, A., Mesquita, G. (2010) Considerações sobre Tendências e Oportunidades dos Alimentos Funcionais. *Revista P&D em Engenharia de Produção* 08 (02): 40-56.
- Inoue, M.; Suzuki, R.; Koide, T.; Sakaguchi, N.; Ogihara, Y.; Yabu, Y. (1994) Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204(2): 898-904.
- Jain, M. K., Yu, B. Z., Rogers, J. M., Smith, A. E., Boger, E. T. A., Ostrander, R. L., Rheingold, A. L. (1995) Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase a 2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 39:537-547.
- Jardini, F. A (2010) Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum*, L) - avaliação in vivo e em cultura de células. Tese de doutorado apresentada a Universidade de São Paulo. 115 páginas.
- Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. (2001). Betalains—A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 49:5178–5185.
- Kaouadji, M. (2014) Further prenylated flavonols from *Platanus acerifolia*'s unripe buds. *Tetrahedron Letters*.
- Kassem, M. E. S.; El-Desoky, S. K.; Sharaf, M. (2004). Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chemistry of Natural Compounds* 40, 447–450.
- Kawanishi, S.; Hiraku, Y.; Oikawa, S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res*. 488:65–76.
- Khan, M.A.; Baseer, A. (2000) Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease, *J Pak Med Assoc*. 50:261–264.

- Kim, H. H., Bae, Y., Kim, S. H. (2013) Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 57: 209–216.
- Koehn, F. E.; Carter, G. T. (2005). The Evolving Role Of Natural Products In Drug Discovery. *Nature Reviews/Drug Discovery*.4:206-220.
- Koleva, L. I., Van Beek, T .A., Linssen, J. P. H., De Groot, A., Evstatieva, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13:8-17.
- Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. (2005) Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4: 471-479.
- Korkina, L.G.; Afans'ev, I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol*. 38:151–163.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., e Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion Paper* 30:1-10.
- Krogh, R.; Tunes, R.A.; Andricopulo, A.D. (2001) Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivates. *Il Farmaco* 55: 730-735.
- Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji, P., Ciric, A., Stojkovic, D., Sokovic, M. (2008) Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107(2): 861-868.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y., (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages, *J. Immunol*. 171: 4672–4679.
- Lattig, J., Bohl, M., Fischer, P., Tischer, S., Tietbohl, C., Menschikowski, M., Gutzeit, H.O., Metz, P., Pisabarro, M.T. (2007). Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A₂ by flavonoids: rationale for lead design. *J. Comput. Aid. Mol. Des*. 21: 473–483.
- Leite, S.R.R.F.; Amorim, M.M.R.; Sereno, P.F.B.; Leite, T.N.F.; Ferreira, J.A.C.; Ximenes, R.A.A. (2010). Randomized clinical trial comparing the efficacy of the vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the treatment of bacterial vaginosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Online Provisional Version.
- Lima, C. R.; Costa-Silva, J. H.; Lyra, M. M. A.; Araújo, A. V.; Arruda, V. M.; Dimech, G. S.; Evêncio, L. B.; Fraga, M. C. C. A.; Lafayette, S. S. I.; Wanderley, A. G. (2006) Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 25: 544-549.
- Lima, L. B.; Vasconcelosa, C. F. B.; Maranhão, H. M. L.; Leite, V. R.; Ferreira, P. A.; Andrade, B. A.; Araújo, E. L. H.S.; Xavier, S. S. L.; Lafayette, A. G. Wanderley (2009). Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 126:468–473.

- Lima, M. R. F., Luna, J. S., Santos, A. F., Andrade, M. C. C., Sant'Ana, A. E. G. G., Genet, J. P., Marquez, B., Neuville, L., Moreaub, N. (2006). Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 137–147.
- Lipinski, B. (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 809696.
- Lloyd, H. A.; Jaouni, T. M.; Evans, S. L.; Morton, J. F. (1977). Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 16, 1301–1302.
- Longhini, R. (2006) Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum.
- Lotti, C., Fernandez, M.C., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O. Hernandez, I.M. Rastrelli, L. (2010) Chemical constituents of red Mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2209-2213.
- Lucena, P.L.H.; Ribas Filhas, J.M.; Mazza, M.; Czczeko, N.G.; Dietz, U.A.; Correa Neto, M.A.; Henriques, G.S.; Santos, O.J.; Ceschin, A.P, Thiele, E.S. (2006) Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21: 46-51.
- Luiking, Y. C.; Engelen, M. P. K. J.; Deutz, N. E. P. (2010). Regulation of Nitric Oxide Production in Health and Disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13:97–104.
- Maalouf, S. W.; Talhouk, R. S.; Schanbacher, F. L. (2010). Inflammatory responses in epithelia: endotoxin-induced IL-6 secretion and iNOS/NO production are differentially regulated in mouse mammary epithelial cells. *Journal of Inflammation*. 7:58.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas. M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.
- Mariod, B. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., Ismail, N. (2009) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* 118:120–127.
- Markham, K.R.; Geiger, H. (1994) ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: HARBORNE, J.B. The flavonoids. Advances in research since 1986, p.441-497, Florida: Chapman & Hall.
- Martin, G.S., Mannino, D. M., Eaton, S., Moss, M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546–1554.
- Martin, L.J. (2008) DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67: 377–387.
- Martinez, M. J., Betancourt, J., Alonso-Gonzalez, N., Jauregui, A. (1996) Screening of some Cuban medicinal plants activity for antimicrobial. *Journal of Ethnopharmacology*. 52:171-174.

- Martorelli, S.B.F.; Pinheiro, A.L.B.; Souza, I.A.; Higino, J.S.; Bravo, F. (2011) Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) a 30% em orobase - estudo "in vivo". *International Journal of Dentistry*, 10: 80-90.
- Mendonça, L. S. (2011) Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. Dissertação de Mestrado apresentado a Universidade de Tiradentes MG. 67 páginas.
- Mendoza-Wilson, A. M., Glossman-Mitnik, D., Chih-D, F. T. (2011) Determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *J. Mol. Struct.(Theochem)*, 681(1-3): 71-76.
- Mesquita, M. L., Paula, J. E., Pessoa, C., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L. V., Grougned, R., Michel, S., Tillequin, F. O., Espindola, L. S. (2009). Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123:439–445.
- Michelin, D. C. (2008) Estudo Químico-Farmacológico de *Operculina macrocarpa* L. Urb. (Convolvulaceae). Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 144 páginas.
- Millezi, A. F., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F. Cardoso, M. G., Piccoli, R. H. (2012) *In vitro* antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 32(1): 167-172.
- Ministério da Saúde (2009). Plantas de interesse ao SUS. Portal da Saúde - [www_Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br) - Fitoterapia. Site acessado em 22 de janeiro de 2014.
- Moore, S.F., MacKenzie, A.B. (2009) NADPH oxidase NOX₂ mediates rapid cellular oxidation following ATP stimulation of endotoxin-primed macrophages. *J. Immunol.* 183: 3302–3308.
- Moura, A. C. S., Vilegas, W., Santos, L. C. (2011) Identificação de Alguns Constituintes Químicos de *Indigofera Hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-LES-em (TOF) e Avaliação da Atividade Antirradicalar. *Quim. Nova*, 34:7, S1-S8.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171.
- Murdoch, D.R., Corey, G.R., Hoen, B., Miró, J.M., Fowler, V.G., Bayer, A.S., Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, ChuVH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH. (2009) International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study (ICEPCS) Investigators. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch. Intern. Med.* 169: 463–473.
- Muzitano, M. F., Cruz, E. A., Almeida, A. P., Silva, S. A. G., Kaiser, C. R., Guette, C., Rossi-Bergmann, B., Costa, S. S. (2006) Quercetrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica.* 72:81-83.

- Naczek, M.; Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*. 1054: 95-111.
- Niva, M. (2007). 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* 48, 384–393.
- Noonan, W.P., Noonan C. (2004) Legal requirements for “functional foods” claims. *Toxicology Letters*. 150: 19-24.
- O’prey, J.; Brown, J.; Fleming, J.; Harrison, P.R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemistry Pharmacology*, 66:2075-2088.
- Ojeda-Sanaa, A.M., Barenb, C.M., Elechosac, M.A., Juárezc, M.A., Morenoa, S. (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 31:189-195.
- Oleszek, W. e Bialy, Z. (2006) Chromatographic determination of plants saponins – An update (2002-2005). *J. Chromat. A*, 1112(1-2): 78-9.
- Oliveira, A. B. A., Paula, C. M. D., Capalonga, R., Cardoso, M. R. I., Tondo, E. C. (2010) Doenças Transmitidas por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos e Aspectos Gerais: Uma Revisão. *Rev HCPA* 30(3):279-285.
- Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S. (2009) Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova* 32(3): 689-702.
- Oliveira, D. B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro- RJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 18:301-307.
- Otaki, N, Kimira, M., Katsumata, S., Uehara, M., Watanabe, S., Suzuki, K. (2009) Distribution And Major Sources Of Flavonoids Intakes In The middle-aged Japanese womem. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*. 44: 231–238.
- Pamplona, B. (1997) Própolis: composição e atividades terapêuticas. *R. Racine*, 7(37): 49-53.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2): 165–168.
- Park, K.H., Lee, M., Hong, H.L., Kim, T., Park, H.J., Park, S.Y., Moon, S.M., Chong, Y.P., Kim, S.H., Lee, S.O., Choi, S.H., Jeong, J.Y., Kim, M.N., Woo, J.H., Kim, Y.S. (2012). Persistent catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia after catheter

- removal and initiation of antimicrobial therapy. *PLoS One* 7:e46389. doi: 10.1371/journal.pone.0046389.
- Penna, C., Marino, S., Vivot, E., Cruanes, M. C., Munoz, J. deD., Cruanes, J., et al. (2001). Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases: isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1): 37–40.
- Polakowska, K., Lis, M.W., Helbina, W.M., Dubind, G., Dubind, A., Niedziolka, J.W., Miedzobrodzka, J., Wladykad, B. (2012) The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. *Microbes and Infection*. 14(14):1352-1362.
- Povh, J. A., Santos, F. B., Silva, K. R. (2012) Teor de fenóis totais e flavonoides em quatro espécies do gênero *Hyptis Jacq.* ocorrentes no cerrado stricto sensu. *Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium*, 3(2): 520-528.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant Activity of dietary as determined by a modified ferric reducing / antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(8): 3396-3402.
- Radovanovic, A., Rdovanovic, B., Jovancicevic, B. (2009) Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*. 117:326-331.
- Rahman, A., Kang, S.C. (2009) In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*. 116:670-675.
- Rahman, I.; Biswas, S.; Kode, A. (2006) Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur.J. Pharmacol.* 533.
- Ramalho, V. C; Jorge, N. (2006) Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. *Química Nova* 24, 755-760.
- Rampazzo, V., Takikawa, A. Y., Haminiuk, C. W. I. (2010) Quantificação De Compostos Fenólicos em Frutas Vermelhas (*Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Morus nigra*). *Revista Universidade Tecnológica Federal do Paraná*. Pág 1-7.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. (2001) Óxido Nítrico. *In: Farmacologia*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 156-163.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I., & Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20: 522–531.
- Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences* 68: 921–931.

Raud, C. (2008) Os Alimentos Funcionais: A Nova Fronteira da Indústria Alimentar Análise das Estratégias da Danone e da Nestlé no Mercado Brasileiro de Iogurtes. *Rev. Sociol. Polít.* 16(31): 85-100.

Ravishankar, K., Kiranmayi, G.V.N., Appa Reddy, G.V., Sowjanya, V.V.L., Sainadh, V.B., Durga, V.G.L., Prasad, V.S., Swaminaidu, P.V., Prasad, T. (2012). Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. *International journal of research in pharmacy and chemistry.* 2:86-91.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine.* 20:933-956.

Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000: 657–691.

Rodrigues, P. A. (2008) Atividade Gastroprotetora e Antioxidante de Extratos e Constituintes Químicos de *Byrsonima Sericea* dc. e *Plectranthus Grandis* Cramer (Willensem). Tese apresentada a Universidade Estadual do Ceará. 145 páginas.

Roginski, V.; Lissi, E.A. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2): 235-254.

Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition.* 22:19–34.

Sabatier, S., Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S., (1992). Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science* 57: 773–774.

Sabudak, T., Dokmech, D., Ozygit, F., Isik, E., Aydogdu, N. (2005) Antiinflammatory and Antioxidant Activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* Extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 20:1491-1496.

Salgado-Pabón, W., Breshears, L., Spaulding, A. R., Merriman, J. A., Stach, C. S. Horswill, A. R., Peterson, M. L., Schlievert, P. M. (2013) Superantigens Are Critical for *Staphylococcus aureus* Infective Endocarditis, Sepsis, and Acute Kidney Injury. *mBio* 4(4): 00494-13.

Sanchez-Moreno, C. (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8(3): 121-137.

Santos, L. M. (2009) Avaliação dos constituintes químicos polares e da atividade alelopática de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado. Campos dos Goytacazes- RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 90 páginas.

Sastre, J.; Pallardo, F.V.; Vina, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life.* 49:427–435.

Saxena, G.; Mccutcheon, A.R.; Farmer, S.; Towers, G.H.N.; Hancock, R.E.W. (1994) Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *J. Ethnopharmacol.* 42: 95-99.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287–306.
- Schijlen, E.G., Ric, Vos. C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G. (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*. 65(19):2631-48.
- Schneider, C. D., Oliveira, A. R. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10:308-313.
- Schortemeyer, M.; Hartwig, U.A.; Hendrey, G.R.; Sadowsky, M.J. (1996) Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1717-1724.
- Shami, N. J. I., Moreira, E. A. M. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*. 17:227-236.
- Shibata K, Yatera Y, Furuno Y, Sabanai K, Morisada N, Nakata S. (2010) Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases. *Circ J* 74: 2681 – 2692.
- Sies, H. (1995) Strategies of antioxidant defence: review. *Eur. J. Biochem*. 215(2): 213-219.
- Silva, B. B. (2008) Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP.
- Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G., Braz-Filho, R. (2009) Estudo Espectroscópico em Elucidação Estrutural de Flavonoides de *Solanum Jabrense* Agra & Nee E S. *Paludosum Moric. Quim. Nova*, 32(5): 1119-1128.
- Silveira, G.P., Nome, F., Gesser, J.C., Sá, M.M. (2006) Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova*. 29(4): 844-855.
- Simões, C. C. (2007) Estudo Bioquímico da Ação da Própolis Frente aos Microrganismos Presentes na Saliva de Humanos. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade federal da Bahia. 106 páginas.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., De Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (2004) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC.
- Singh, R. B., Dubnov, G., Niaz, M. A., Ghosh, S., Singh, R., Rastogi, S. S., Manor, O., Pella, D., Berry, E.M. (2003) Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomized single-blind trial. *Lancet*. 360:455-1461.
- Siró, I; Ka'polna, E.; Ka'polna, B.; Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite* 51:456-467.

- Skippen, P.; Kisson, N.; Waller, D.; Northway, T., Krahn, G. (2008) Sepsis and Septic Shock: Progress and Future, Considerations. *Indian Journal of Pediatrics*, 75: 599-607.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman
- Skopp, G.; Schwenker, G. (1986) Biflavonoids from *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung B*, 41(11): 1479-82.
- Soares, D.G.S. (2006) Susceptibilidade in vitro de bacterias bucais a tinturas de fitoterápicos. *Revista Odonto Ciência* 21(53): 232-238.
- Soares, S. E. (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*. 15:71-81.
- Soler, C., Gil, M., Garcaviquera, C., Tomas-Barberan, F.A. (1995). Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie* 26:53–60.
- Souza V. C.; Lorenzi H. (2005) Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Plantarum*, Nova Odessa.
- Sprague, A. H.; Khalil, R. A. (2009). Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol*. 78:539–552.
- Stahl, E.; Keller, K.; Blinn, C. (1983). Cardanol, a skin irritant in Pink Pepper. *Planta Medica* 48, 5–9.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2009) Fisiologia vegetal. 4.Ed.Porto Alegre: Artmed.
- Takabe, W.; Niki, E.; Uchida, K.; Yamada, S.; Satoh, K.; Noguchi, N. (2001). Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein, *Carcinogenesis*. 22:935–941.
- Tiveron, A. P. (2010) Atividade Antioxidante e Composição Fenólica de Legumes e Verduras Consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado Apresentada a Universidade de São Paulo. 103 páginas.
- Tomei, R.R.; Salvador, M.J. (2007) Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: Encontro Latino Americano De Iniciação Científica, 11. Encontro Latino Americano De Pós Graduação, 7. Vele do Paraíba Anais: 1963-1967.
- Tonial, F. (2010) Atividade Antimicrobiana de Endófitos e de Extratos Foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira). Dissertação de Mestrado apresentado a Universidade Federal do Paraná.
- Ugur, A., Ceylan, O. (2003) Occurrence of Resistance to Antibiotics, Metals, and Plasmids in Clinical Strains of *Staphylococcus* spp. *Archives of Medical Research* 34: 130–136.
- Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 39: 44–84.

- van Berlo, Wessels, A., Boots, A.W., Wilhelmi, V., Scherbart AM (2010) Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. *Free Radic. Biol. Med.* 49: 1685–1693.
- Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T. (2007) Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação. *Quim. Nova* 30: 1323.
- Verbeke, W. (2010) Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference* 21:75–81.
- Viana, G. S. B., Matos, F. J. A., Bandeira, M. S. N. (1995) Aroeira-do-Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) Estudo Botânico, Farmacogóstico, Químico e Farmacológico. *Universidade Federal do Ceará: Fortaleza*, 160p.
- Vicentino A. R. R, Menezes F. S. (2007) Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 17:384-387.
- Vo, T.S, Kim, S.K. (2013) Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. *Journal of Functional Foods.* 5:16–27.
- Vuong, C., Götz, F., Otto, M. (2000) Construction and characterization of an agr deletion mutant of *staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity.* 68(3):1048-1053.
- Wach, A., Pyrzyńska, K., Biesaga, M. (2007) Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry.* 100:699-704.
- Wadsworth, T. L., Koop, D. R. (2001) Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions.* 137:43–58.
- Walle, T (2004). Absorption and Metabolism of Flavonoids. *Free Radical Biology e Medicine.* 36:829 – 837.
- Wannmacher, L. (2004) Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? *Uso Racional de Medicamentos.* 1(4) s/p.
- Ward, P.A. (2010) The harmful role of C5a on innate immunity in sepsis. *J. Innate Immun.* 2: 439–445.
- Wilkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology.* 126: 485–493.
- Williams, C. A.; Harborne, J. B. (1994) In: Harborne JB, editor. The Flavonoids. Advances in research since 1986. London Chapman & Hall; 337- 85.
- Wollenweber, E., (1988). Occurrence of flavonoid aglycones in medicinal plants. In: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., Beretz, A. (Eds.), Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. *Allan R.* 45–55.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L. (2012) Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and

after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44:217-224.

Woraratphoka, J., Intarapichet, K. O., Indrapichate, K. (2012) Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Six Selected, Regional, Thai Vegetables. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 4 (2): 108-117.

Woraratphoka, J., Intarapichet, K.-O., Indrapichate, K. (2007). Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chemistry*, 104, 1485-1490.

Yang, H., Dong, H, Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X. (2011) Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* 16: 3444-3455.

Yokozawa T., C.P., Chen, E., Dong, T., Tanaka, G.I. Nonaka and I. Nishioka, (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol.*, 56: 213-222.

Yoshikawa, M., Shimada, H., Shimoda, H., Murakami, N., Yamahara, J., Matsuda, H. (2000) Bioactive constituents of Chinese natural medicines II. *Rhodiola Radix*. (1). Chemical structures and antiallergic activity of rhodiocyanoside A and B from the underground part of *Rhodiola quadrifida* (PALL.) FISH. et MEY. (Crassulaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44:2086-2091.

Young, I. S., Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54:176-186.

Zhong, Y., Shahidi, F. (2012) Lipid Oxidation: Measurement Methods. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set.

Zimmer, A. R., Leonardia, B., Mirona, D., Schapovalova, E, Oliveira, J. R., Gosmanna, G. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 228– 233.

Zinner, S.H. (2007) Antibiotic use: present and future. *New Microbiol.* 30(3):321–325.