

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA LÚCIA ALVES DE ARRUDA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Jacaranda cuspidifolia* Mart.  
(BIGNONIACEAE)**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.**

**Orientador: Dr. Luiz Alberto Simeoni  
Co-orientadora: Dra. Rachel O. Castilho**

**BRASÍLIA  
2009**

**ANA LÚCIA ALVES DE ARRUDA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (BIGNONIACEAE)**

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

**Aprovado em: 14 / 12 / 2009**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. LUIZ ALBERTO SIMEONI (PRESIDENTE)  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

---

**Dra. RACHEL OLIVEIRA CASTILHO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

---

**Dra. DÂMARIS SILVEIRA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

---

**Dr. DARIO ABBUD RIGHI  
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA**

---

**Dr. CARLOS FREDERICO DE SOUZA CASTRO  
IF – GOIANO**

***Dedico este trabalho aos meus queridos pais Rui e Miriam.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a serenidade, coragem e sabedoria de que tanto necessitava nos momentos de aflição, sendo estas graças alcançadas através da oração intitulada de “Oração da Serenidade”.

*Deus me dê **Serenidade** para aceitar as coisas que não posso mudar,  
**Coragem** para mudar aquilo de que sou capaz e  
**Sabedoria** para ver a diferença”.*

*(Oração da Serenidade)*

Ao meu orientador professor Dr. Luiz Alberto Simeoni a quem devoto a mais sincera e profunda admiração.

A Dra. Rachel Oliveira Castilho pela amizade, carinho, paciência e sabedoria e a quem devoto a mais profunda admiração tanto ao nível pessoal quanto profissional.

A Dra. Dâmaris Silveira pelas valiosas contribuições para a execução deste trabalho.

A Dra. Simone Palma Favaro por ter me concedido à oportunidade de participar dos seus projetos, frutos dos quais também contribuíram para a realização deste trabalho.

A Dra. Susana Elisa Moreno pela disponibilidade na execução dos ensaios de Atividade Anti-inflamatória.

A Dra. Clarice Queico Leite Fujimura e Dr. Fernando Rogério Pavan pela valiosa contribuição na realização dos Ensaios de Atividade Antimicobacteriana.

A Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan pela disponibilidade na realização das Análises Cromatográficas.

A Dra. Alaíde Braga de Oliveira e ao Dr. Fernão Castro por ter me recebido e permitido realizar as análises no laboratório de Fitoquímica.

A Dr. José Dias Souza Filho pela boa vontade na realização das Análises Espectrométricas.

Ao colega Geraldo Célio Brandão pela valiosa contribuição na elucidação das estruturas.

Às amigas Geisa Helmold Asphesi e Maria Carolina Silva Marques por ter me ajudado no planejamento, elaboração das aulas e provas enquanto estava executando este trabalho.

À amiga Ana Carolina de Melo Miranda por ter me ajudado no processamento dos espectros.

À amiga Regilene Fátima de Oliveira pelo apoio no fornecimento de materiais, pela sua disponibilidade e por estar sempre pronta para me ajudar na realização dos testes biológicos.

Aos meus amigos Lincoln Carlos Silva Oliveira, Eduardo José de Arruda e Neusa Maria Mazzaro Somera por ter me ajudado a ingressar neste programa de pós-graduação fornecendo as cartas de apresentação.

Às queridas alunas, amiguinhas e colegas de profissão Daniela Garcia de Souza e Carla Juliana de Barros Vieira pela dedicação, preocupação, responsabilidade e ajuda na realização da minha parte experimental, principalmente, nos momentos em que eu me encontrava com muitas tarefas para realizar.

Às secretárias Aparecida Rosa de Freitas e Ângela Costa Ferreira pela amizade, preocupação e disposição em querer sempre me ajudar nos meus momentos de angústia e sufoco.

À amiga Dra. Karla Rejane de Andrade Porto pelo carinho, compreensão e preocupação com a minha pessoa, principalmente, nos momentos de fechamento deste trabalho.

Aos coordenadores dos Cursos de Farmácia, Fisioterapia, Biologia e Enfermagem, da Universidade Católica Dom Bosco, por ter sempre procurado fazer a minha lotação em disciplinas nos horários em que eu pudesse conciliar as aulas com a parte experimental desta tese.

Às coordenadoras dos Cursos de Enfermagem e Estética da Universidade da Grande Dourados, pela compreensão, paciência, carinho e disponibilidade em me ajudar nos meus momentos de ansiedade e preocupação.

Aos amigos Dr. Albert Schiaveto de Sousa e Dra. Ivanilde Herrera Saad pela realização das Análises Estatísticas.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) pelo apoio financeiro.

Por último, a todos que participaram direta ou indiretamente e contribuíram para a realização deste trabalho.

***O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem, mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que faz ele existir.***

***(Albert Einstein)***

## RESUMO

O presente trabalho descreve a análise fitoquímica, o isolamento dos constituintes majoritários e as atividades biológicas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart., espécie pertencente à família Bignoniaceae, conhecida como caroba, jacarandá e bolacheira, comum no bioma Cerrado de Mato Grosso do Sul e usada na medicina popular como anti-inflamatória, antisifilítica e antigonorreica. Da análise do extrato hexânico de folhas por CG/EMS, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C, foi obtida uma mistura contendo hidrocarbonetos de 15 carbonos (pentadecano), 17 carbonos (heptadecano) e 20 carbonos (icosano). A prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos brutos das cascas, folhas e do caule realizada por cromatografia em camada delgada permitiu detectar a presença de taninos, flavonoides, naftoquinonas, terpenos, esteroides, saponinas e alcaloides. O perfil em cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos metanólicos das cascas mostrou 4 grandes picos com tempos de retenção e comprimentos de onda similares aos derivados do verbascosídeo. Da fração clorofórmica da casca foi isolado o fenilpropanoide glicosilado, verbascosídeo. Os extratos hexânicos brutos das cascas, caule e folhas de *J. cuspidifolia* apresentaram inibição da acetilcolinesterase *in vitro*, similar à fisostigmina. Os extratos metanólicos das cascas apresentaram atividade anti-inflamatória *in vitro* e antigonorreica, as quais confirmam o seu uso na medicina popular. Nenhuma atividade antifúngica foi encontrada para os extratos e frações de *J. cuspidifolia* Mart. Para os quatro modelos de atividade antioxidante propostos, os extratos metanólicos das cascas e folhas apresentaram atividade. É a primeira vez que a espécie *Jacaranda cuspidifolia* Mart. é investigada quanto à sua composição micromolecular e quanto à atividade biológica. Além disso, é o primeiro relato da presença do verbascosídeo nesta espécie.

Palavras-chave: *Jacaranda cuspidifolia* Mart.; Bignoniaceae; Fenilpropanoides; Verbascosídeo; Atividade Biológica.

## ABSTRACT

The present work describes the phytochemical analysis, the isolation of the major micromolecular components and the biological activities of *Jacaranda cuspidifolia* Mart., species that belongs to the Bignoniaceae family, known as caroba, jacarandá and bolacheira, commonly found in the Brazilian Cerrado biome of Mato Grosso do Sul and used as an anti-inflammatory, antisiphilitic and anti-gonorrhea drug in traditional medicine.

A mixture containing hydrocarbons of 15 carbons (pentadecane), 17 carbons (heptadecane) and 20 carbons (icosane) was obtained from the analysis of the hexane extract of leaves by CG/EMS, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C. The phytochemical analysis of the crude methanolic extracts taken from barks, stem, and leaves through thin layer chromatography allowed the detection of the presence of tannins, flavonoids, naphthoquinones, terpenes, steroids, saponins and alkaloids. The high-performance liquid chromatography profile of methanol extracts of barks showed 4 major peaks with retention times and wavelengths similar to verbascoside derivatives. Verbascoside, a glycoside phenylpropanoid, was obtained from the chloroform fractions. The crude hexane extracts of barks, stem and leaves of *J. cuspidifolia* presented inhibition profile of anticholinesterasic *in vitro*, similar to physostigmine. The methanol extract of barks presented *in vitro* anti-inflammatory activity and anti-gonorrhea activity, confirming its use in traditional medicine. No antifungal activity was found for the extracts and fractions of *J. cuspidifolia* Mart. For the four proposed model assays of antioxidant activity, the methanol extracts of barks and leaves presented activity. It is the first time that the *Jacaranda cuspidifolia* Mart. species is analyzed as to its micromolecular components and biological activity. In addition, this is the first report about the occurrence of verbascoside in this species.

Keywords: *Jacaranda cuspidifolia* Mart.; Bignoniaceae; Phenylpropanoids; Verbascoside; Biological Activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Folhas, frutos, flores e cascas de <i>J. cuspidifolia</i> Mart.	19
<b>Figura 2</b> - Árvore <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	28
<b>Figura 3</b> - Obtenção dos extratos hexânicos (EH) e metanólicos (EM) do material vegetal de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	38
<b>Figura 4</b> - Fracionamento preliminar do Extrato Metanólico das cascas de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	43
<b>Figura 5</b> - Curva analítica de calibração do ácido ascórbico – método do fosfomolibdênio.	48
<b>Figura 6</b> - Curva Analítica de Calibração da Rutina – Determinação do Conteúdo de Flavonóides.	52
<b>Figura 7</b> - Curva-Analítica Padrão do Ácido Gálico. Método de Folin-Ciocalteu.	53
<b>Figura 8</b> - Cromatogramas dos Extratos Metanólicos das cascas (A), das folhas (B) e do caule (C), obtido por CLAE-FR.	64
<b>Figura 9</b> - Espectro de varredura no UV pelo detector de DAD para os picos majoritários (62, 63, 64 e 65) dos cromatogramas dos extratos metanólicos de <i>J. cuspidifolia</i> Mart.	65
<b>Figura 10</b> - Cromatograma do verbascosídeo (A), ácido ferúlico (B), ácido caféico (C), $\beta$ -sitosterol (D), kaempferol (E), lupeol (F), $\alpha$ -lapachona (G), $\beta$ -lapachona (H), lapachol (I), quercetina (J), rutina (K) e seus respectivos espectros de UV obtidos <i>on line</i> por detector DAD.	66
<b>Figura 11</b> - Cromatograma da mistura de hidrocarbonetos isolados do extrato hexânico das folhas <i>J. cuspidifolia</i> (A) e da mistura de hidrocarbonetos utilizados para a construção da curva analítica de calibração (B).	71
<b>Figura 12</b> - Espectro de Massas da mistura de hidrocarbonetos de 15C (A), 17C (B) e 20C (C).	72
<b>Figura 13</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura de hidrocarbonetos (CDCl <sub>3</sub> – 200MHz).	73
<b>Figura 14</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura de hidrocarbonetos (CDCl <sub>3</sub> – 200MHz)	73
<b>Figura 15</b> - DEPT 135 da mistura de hidrocarbonetos (CDCl <sub>3</sub> –	

200MHz).	74
<b>Figura 16</b> - Cromatogramas da Fração Clorofórmica da Casca de <i>J. cuspidifolia</i> Mart. obtido por CLAE-FR.	75
<b>Figura 17</b> - Espectro de Varredura no UV pelo detector de DAD para os picos majoritários (62, 63, 64 e 65) dos cromatogramas da fração clorofórmica de <i>J. cuspidifolia</i> Mart.	76
<b>Figura 18</b> - Cromatograma do verbascosídeo, da co-injeção substância 62 e verbascosídeo 66 e da substância 62.	77
<b>Figura 19</b> - Cromatogramas das substâncias 63 (A), 64(B) e 65 (C) da fração clorofórmica da casca de <i>J. cuspidifolia</i> obtido por CLAE-FR.	79
<b>Figura 20</b> - Reação Química entre a substância antioxidante (AH) e o radical DPPH'	83
<b>Figura 21</b> - Valores de CE <sub>50</sub> de rutina (padrão) comparada aos extratos metanólicos das cascas, do caules, das folhas e da fração clorofórmica das cascas de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart. pelo método do DPPH (* P<0.05 vs rutina) .	86
<b>Figura 22</b> - Valores de CE <sub>50</sub> do ácido ascórbico (controle) comparada aos extratos metanólicos das cascas e das folhas de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart. pelo Método de Varredura de Peróxido de hidrogênio ( n=3; *P<0,05 vs ácido ascórbico)	89
<b>Figura 23</b> - Valores de CE <sub>50</sub> do ácido ascórbico (controle) comparados aos extratos metanólicos das cascas e das folhas de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart. pelo Método de Sequestro de Radicais Livres (n=3; *P<0,05 vs ácido ascórbico).	91
<b>Figura 24</b> - Reação de formação do complexo-flavonoide-alumínio, em meio básico, dos extratos e da rutina.	92
<b>Figura 25 A</b> - Atividade anti-inflamatória do extrato metanólico da casca em diferentes concentrações.	102
<b>Figura 25 B</b> - Atividade anti-inflamatória do extrato metanólico da casca comparado com o padrão dexametasona.	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Ações Biológicas de algumas espécies da família Bignoniaceae.	18
<b>Tabela 2</b> - Espécies de <i>Jacaranda</i> sp identificadas no Brasil	20
<b>Tabela 3</b> - Uso etnobotânico reconhecido de <i>Jacaranda</i> sp.	21
<b>Tabela 4</b> - Rendimento dos extratos hexânicos (EH) e metanólicos (EM) obtidos por maceração a frio de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	38
<b>Tabela 5</b> - Sistema de eluição exploratória empregado na obtenção de perfis cromatográficos por CLAE.	42
<b>Tabela 6</b> - Rendimento das frações hexânica, aquosa e clorofórmica obtidas do extrato metanólico das cascas de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	43
<b>Tabela 7</b> - Tempos de retenção (em minutos) e máximos de absorção no espectro de UV dos compostos 1, 2, 3 e 4.	63
<b>Tabela 8</b> - Prospecção Fitoquímica dos Extratos Metanólicos das cascas, folhas e caule de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.	70
<b>Tabela 9</b> - Hidrocarbonetos da fração hexano-diclorometano do Extrato Hexânico das folhas de <i>J. cuspidifolia</i> .	72
<b>Tabela 10</b> - Porcentagem de inibição (%) radicalar pelo Método do DPPH do extrato metanólico das cascas (EMC), das folhas (EMF), dos caules (EMCa), da fração clorofórmica das cascas (FClorC) em comparação com o padrão rutina. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=3; *P<0,05).	85
<b>Tabela 11</b> - Valores de CE <sub>50</sub> para a fração clorofórmica das cascas (FClorC), extratos metanólicos das cascas (EMC), caules (EMCa), folhas (EMF) e rutina (padrão). Os resultados de CE <sub>50</sub> foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3).	85
<b>Tabela 12</b> - Valores de CE <sub>50</sub> para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e ácido ascórbico (padrão). Os resultados de CE <sub>50</sub> foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3).	88
<b>Tabela 13</b> - Valores de CE <sub>50</sub> para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e ácido ascórbico (padrão). Os resultados de CE <sub>50</sub> foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3)	91
<b>Tabela 14</b> - Valores de conteúdo de flavonoides (mg de rutina/mg da amostra) para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e do caule (EMCa).	92
<b>Tabela 15</b> - Valores de conteúdo de Fenóis Totais mg de ácido gálico /mg da amostra) para os extratos metanólicos das cascas (EMC) e das folhas (EMF).	93

<b>Tabela 16</b> - Atividade antibacteriana dos extratos e frações de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart, segundo o método de difusão em ágar. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. (na=não ativo).	96
<b>Tabela 17</b> - Atividade antibacteriana dos controles segundo o Método de Difusão em Agar. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. (na=não ativo).	96
<b>Tabela 18</b> – Valores de concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos e frações de <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). (na=não ativo)	97
<b>Tabela 19</b> - Perfil de Sensibilidade dos Antifúngicos Comerciais frente às cepas padrões de fungos filamentosos e leveduriformes. <sup>(a)</sup> Diâmetro médio do halo de inibição em milímetros pelo Método de Difusão em Agar (79); NIST: nistatina; ANFOT: anfotericina B; ICZ: itraconazol; MCZ: miconazol; CTR: clotrimazol; KET: cetoconazol; NT: não testado.	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.  
ATCI – Iodeto de acetilcolina.  
ATCC – American type culture collection.  
BDA – Agar batata dextrose.  
CCD – Cromatografia em camada delgada.  
CCT – Coleção de cultura tropical.  
CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado.  
CE<sub>50</sub> – Concentração eficaz 50%.  
CG / EMS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.  
CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Mínima.  
CLAE - FR – Cromatografia Líquida de alta eficiência - fase reversa.  
CMI – Concentração mínima inibitória.  
COSY – HH Correlation spectroscopy.  
DAD – Detector de arranjo de diodos.  
DEPT - Distortionless enhancement by polarization transfer.  
DMSO-d<sub>6</sub> – Dimetilsulfóxido deuterado.  
DP – Desvio padrão.  
DPPH – 2,2-Difenil-1-picrilidrazila.  
DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico]  
EH – Extrato hexânico.  
EM – Extrato metanólico.  
EHC – Extrato hexânico das cascas.  
EMC – Extrato metanólico das cascas.  
EHF – Extrato hexânico das folhas.  
EMF – Extrato metanólico das folhas.  
EHCa – Extrato hexânico dos caules.  
EMCa – Extrato metanólico dos caules.  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
FClorC – Fração clorofórmica das cascas.  
FC – Folin Ciocalteau.  
FM – Fase móvel.  
HMBC – Heteronuclear multiple bond correlation.

HMQC – Heteronuclear multiple quantum correlation

LJ – Lowestein - Jensen.

M - média

MABA – Microplate Alamar Blue Assay

MHz – Megahertz.

RMN<sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

RMN<sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13.

PBS – tampão fosfato.

rpm – rotações por minuto.

TMS – tetrametilsilano.

TR – Tempo de retenção.

UFC – Unidade formadora de colônia.

UV – ultravioleta.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Principais espécies reativas do oxigênio (ERO) citadas na literatura.	81
<b>Quadro 2</b> - Reação de formação do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila.	87
<b>Quadro 3</b> - Reação de formação do radical hidroxila em presença de íons ferro.	90
<b>Quadro 4</b> - Reação de formação do complexo hidroxilado de salicilato.	91

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (1).

Assim, a natureza tem se destacado como fonte de novos agentes ativos para uma grande diversidade de doenças. A descoberta da conexão entre planta e saúde é responsável pelo início de uma nova geração de terapia baseada no uso da própria planta ou de suas partes. Nos últimos 25 anos, cerca de 30% dos novos fármacos aprovados são produtos naturais ou derivados destes. Em se tratando de fármacos anticancerígenos, este número sobe para 42%. O conhecimento do arsenal químico de plantas pelos povos primitivos e pelos indígenas constitui o fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas no reino vegetal (1,2).

O uso de plantas com finalidade medicinal teve início com o nascimento da humanidade e foi se transformando com o passar dos anos (3).

Em diferentes países, a medicina popular por meio de plantas é amplamente praticada por raizeiros e pequenos ervanários e apresenta-se em expansão. Podem ainda ser citados os medicamentos fitoterápicos cujo mercado também se encontra em ampliação. No outro extremo, encontra-se o usuário que se adapta ao mercado de acordo com sua situação sócio-econômica, mas com interesse em solucionar as suas necessidades primárias de saúde (4).

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento depende das plantas medicinais para o tratamento de doenças, devido às condições de pobreza e falta de acesso aos medicamentos (5). Porém o problema maior está no fato de que estas plantas, na maioria das vezes, são usadas por pessoas que não possuem o necessário conhecimento de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas.

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos. Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil apresenta entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Dados

estatísticos indicam que existem cerca de 55 mil espécies de plantas ainda desconhecidas (6).

A savana brasileira, conhecida como cerrado, ocupa mais de 2 milhões de quilômetros quadrados, do território brasileiro (7). É bastante rica em espécies usadas na medicina popular, em função de suas características morfológicas, como cascas e xilopódios, que acumulam reservas e, com freqüência, possuem substâncias farmacologicamente ativas. Além disso, este bioma apresenta grande diversidade em famílias, gêneros e espécies que contribuem para uma maior diferença e diversidade química entre elas, demonstrando assim, sua importância para pesquisas com plantas medicinais (8).

O Estado do Mato Grosso do Sul apresenta uma grande diversidade de plantas nativas consideradas endêmicas, como é o caso do gênero *Jacaranda* (9, 10, 11).

Uma espécie amplamente utilizada por habitantes desse Estado é a *Jacaranda cuspidifolia* Mart., pertencente a família Bignoniaceae, conhecida popularmente como caroba, bolacheira ou jacarandá. Na região é encontrada em abundância enfeitando os jardins das praças e canteiros das cidades, sendo usada como planta ornamental, devido à beleza das suas flores arroxeadas. As cascas e folhas são usadas pela população no tratamento da sífilis e da blenorragia (11). As raízes apresentam propriedades inseticidas sendo empregadas no tratamento da sarna. É considerada uma planta depurativa do sangue (11). A sua madeira é empregada na construção de móveis e outros utensílios domésticos (11). Contudo, apesar de ampla utilização, poucos são os estudos no sentido de corroborar com as propriedades alegadas (12).

Neste sentido, o interesse acadêmico, de profissionais de diversas áreas e de pesquisadores a respeito do uso popular de uma planta nativa do cerrado sul-mato-grossense torna-se bastante importante, uma vez que contribui com o conhecimento químico e farmacológico de uma espécie cujos estudos são escassos e até mesmo inexistentes e também com a geração de novas moléculas que possam servir como protótipo para a síntese de novos fármacos.

## **CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de fármacos a partir de ervas remonta às tribos primitivas em que as mulheres se encarregavam de extrair das plantas os princípios ativos para a cura das suas doenças. À medida que estes povos se tornavam mais habilitados em suprir as suas necessidades de sobrevivência, estabeleceram-se papéis sociais, como a figura do curandeiro, o qual desenvolveu um repertório de substâncias que poderiam ser usados no tratamento de doenças (13).

Muitas civilizações descreveram a utilização de ervas e outros vegetais, como forma de medicamentos, em seus registros e manuscritos. Em 2600 a.C. babilônios e sumerianos usavam em seus remédios frutos, folhas, flores, cascas e raízes de lótus, oliveira e alho. A *“Tabuinha Sumeriana”*, uma coleção de textos médicos em tabletes de argila foi considerada o mais antigo tratado de Medicina (14, 15, 16, 17).

Os egípcios (1500 a.C.) relatavam o uso de azeite, figo, cebola, alho, funcho, açafraão, ópio, hortelã e pimenta. O *“Papyrus Erbers”*, coleção egípcia contendo 811 prescrições, menciona 700 drogas vegetais, minerais e animais, incluindo o salgueiro, acácia e sedativos extraídos de *Ephedra* (14, 15, 18).

Várias receitas gregas citavam o uso de compressas com raízes no estancamento de hemorragias, uso de óleo de rícino e couve como purgativo, raiz de tácia como emético, suco de salsa e aspargo como diuréticos e beladona e ópio como narcóticos (15, 18).

Os primeiros registros fitoterápicos datam do período de 2968 a.C. quando o imperador chinês Shen Nung, considerado o fundador e patrono da farmácia chinesa, catalogou 365 ervas medicinais e venenos que eram usados sob inspiração taoísta de Pan Ku, considerado o Deus da criação. Esse primeiro herbário dependia de dois pólos opostos: o yang (luz, céu, calor, esquerdo) e o yin (trevas, terra, frio, direito). Por volta de 1500 a.C. a base da medicina hindu já estava revelada em dois textos sagrados: Veda (Aprendizado) e Ayurveda (Aprendizado de longa vida) (19).

Alguns cientistas representaram etapas marcantes no desenvolvimento da ciência desmistificando que a cura das doenças era responsabilidade dos deuses (16, 20).

O médico grego Hipócrates (460-377 a.C.) descreveu inúmeros medicamentos incluindo vegetais, vinho e bolores para o tratamento e cura de doenças do trato urogenital. Catão (234-149 a.C.), considerado o promotor da toxicologia, foi reconhecido como descobridor da arte dos venenos gerais, bem como das ações necessárias para neutralizá-los (14, 18).

Durante o Império Romano e após o declínio da cultura grega houve um súbito desinteresse pela pesquisa envolvendo plantas e, assim, os tratamentos medicinais voltaram a ter um caráter de magia e religião. Somente nos primórdios da era Cristã é que alguns pesquisadores como o médico Aulus Cornelius Celsus escreveu livros a respeito dos medicamentos de origem vegetal. Dioscórides elaborou um dos maiores ervanários existentes contendo 600 plantas. Nesta obra foi relatada a descrição de plantas, como conservar e escolher as ervas medicinais para os tratamentos. Coube ao médico grego Claudius Galenus a escrita de cerca 83 livros em que apresentava numerosas drogas de origem natural combinadas em diversas formulações e métodos de manipulação, entre esses medicamentos estão a pimenta da Índia, aipo e salsa para doenças renais (14, 15, 20).

Durante a Idade Média (século V-VII), a igreja passou a ter poder sobre os conhecimentos das plantas medicinais. Tais informações passaram a ser copiadas, traduzidas e preservadas nas bibliotecas dos mosteiros (14). Já no período da Renascença, houve um grande estímulo ao pensamento científico, sendo Paracelso um dos responsáveis pela revolução de conceitos na área da medicina e farmácia, introduzindo as formas farmacêuticas das tinturas herbáticas e a associação de mineral a salsaparilha para o combate da sífilis (15).

Em um estágio mais avançado do uso de plantas medicinais foram criadas teorias e observações que contribuíram para a Fitoterapia atual. No século XVII, o botânico Robert B. Turner criou a famosa “Teoria das Assinaturas” a qual relacionou as formas das partes das plantas com a sua utilização (17).

As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, legando ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico presente no reino vegetal e até hoje indispensável à medicina. No continente americano, as civilizações Incas, Maias e Astecas consignaram à civilização moderna a quina, a coca, a ipecacuanha e outras drogas de valor terapêutico (21).

A vinda da Corte Real para o Brasil, em 1808, e o decreto de D. João VI que permitiu a abertura dos portos brasileiros às nações amigas pode ser considerado

um dos marcos oficiais na ciência brasileira, uma vez que por meio deste decreto começaram a chegar ao país as primeiras expedições científicas, cujo objetivo principal era dar conhecimento aos europeus da exuberância da nossa flora e fauna. A maioria dos naturalistas destas expedições chegou com a finalidade de coletar espécies de animais e de plantas para os museus europeus. Porém não se pode deixar de mencionar que a Europa já tinha conhecimento, há muito tempo, de plantas medicinais brasileiras, por meio da obra “Historia Naturalis Brasiliae”. Um dos homens responsáveis pelo conteúdo do livro foi o médico de Maurício de Nassau, Willem Piso. A contribuição de Piso consistiu de quatro extensas discussões: a primeira sobre o ar, a água e a topografia do Brasil; a segunda, sobre doenças endêmicas locais; a terceira sobre venenos e antídotos e a quarta sobre plantas medicinais. Este livro representou a primeira história natural completa da América do Sul (21, 22).

Com a comitiva da princesa Leopoldina veio o médico português Bernardino Antônio Gomes responsável pelo isolamento da cinchocina das cascas da quina, antes de Caventou ter isolado a quinina das cascas da mesma planta. Na mesma expedição científica vieram dois iniciadores do estudo sistemático da flora e da fauna brasileira, o zoólogo Johann Baptist Spix e o médico e botânico Carl Friederich von Martius. Martius teve implicação direta com o início da fitoquímica brasileira (23) porque sugeriu que o jovem alemão Theodoro Peckolt, em 1847, viesse ao Brasil para estudar a nossa flora.

Neste contexto histórico, o Brasil com a grandeza do seu litoral e de sua flora não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais, sendo considerado o país com a maior biodiversidade mundial e por abrigar aproximadamente 22% de todas as espécies biológicas do mundo (24).

O registro do pronunciamento da professora Norma Saraiva Siqueira (UFRGS) ao Jornal de Ciência Hoje, do dia 27 de julho de 1990, citado por Braz-Filho (25), ilustra de forma clara a biodiversidade do país: *o Brasil possui de 40 a 200 mil espécies vegetais, um terço das existentes no Planeta. Cerca de 10 mil delas são medicinais. A China tem 27 mil espécies vegetais, com 5 mil medicinais (20%), e a Índia, 18 mil, com 2,5 mil medicinais (20%). Temos, portanto, uma das floras mais ricas do mundo em matérias primas para fitoterápicos. Somos, no entanto, grandes importadores de plantas e matérias-primas vegetais.*

## 2.2 IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS

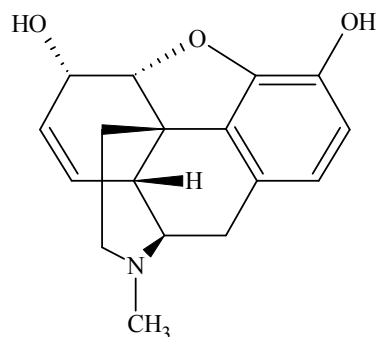
As plantas sintetizam uma variedade de biomoléculas consideradas essenciais à sua sobrevivência e ao seu desenvolvimento. Algumas dessas substâncias são comuns a todos os organismos vivos e fazem parte do chamado metabolismo primário. Entretanto, existem compostos característicos de um grupo ou determinado grupo específico, de distribuição limitada nas plantas, mas que expressam as características individuais de uma determinada espécie. Tais substâncias fazem parte, então, do chamado metabolismo secundário das plantas, cuja função e benefícios ainda permanecem desconhecidos (26).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção dos vegetais, apesar de apresentarem estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, sabe-se que estas substâncias estão diretamente envolvidas com os mecanismos que permitem a adequação do organismo produtor ao seu meio (27). Várias substâncias pertencentes a esta classe de metabólitos tiveram suas funções reconhecidas, tais como, proteção do organismo contra os raios ultravioleta, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, defesa contra herbívoros e microrganismos, bem como sua participação em alelopatias. Outra característica dos vegetais em relação ao metabolismo secundário é a sua elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade em uma mesma espécie (27).

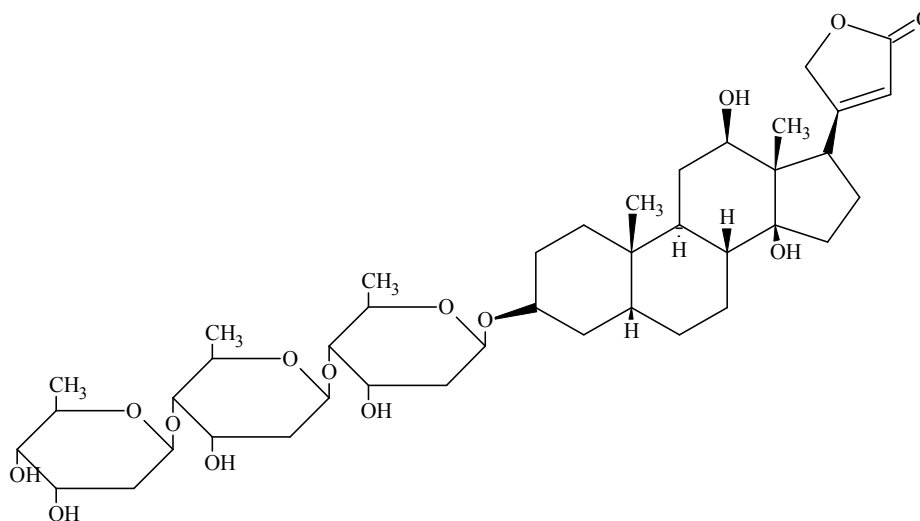
De acordo com Harborne (1988) (28), *a riqueza de metabólitos secundários em plantas é, pelo menos parcialmente, explicável no simples fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar; eles não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis aos animais.*

Na Natureza, o aparecimento de metabólitos ativos é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução das plantas e demais organismos conduz à síntese de metabólitos secundários com função de defesa e proteção (29). Sendo assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, com frequência, podem apresentar atividades biológicas interessantes, tanto na área farmacêutica quanto na área alimentícia, de perfumarias, na agronomia, dentre outras (27).

O estudo e isolamento da morfina **1** da *Papaver somniferum*, em 1803, por Séquin e Sertürner no início do século XIX marcou o início do processo de obtenção de princípios ativos de plantas (1).

**1**

A partir daí, outros compostos foram isolados e têm contribuído com sucesso em várias áreas da medicina, principalmente na Cardiovascular. A digoxina **2** obtida da *Digitalis purpurea* constitui um exemplo clássico. Este fármaco é usado, hoje, na prática médica no tratamento da Insuficiência Cardíaca Congestiva e da Fibrilação Atrial (30).

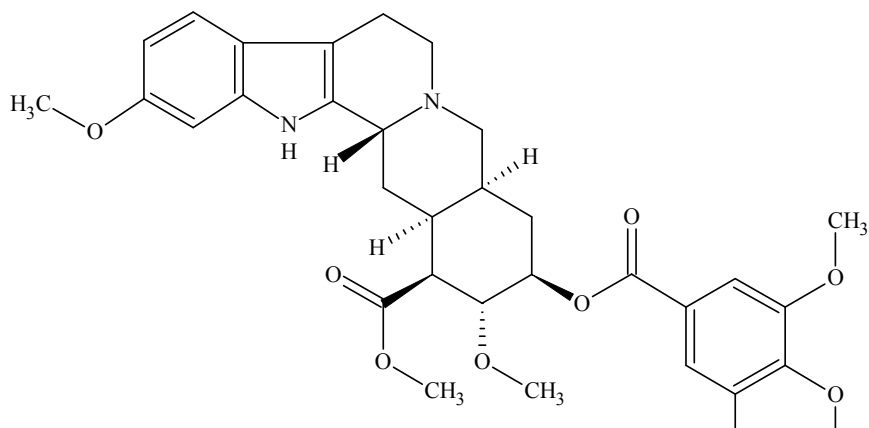
**2**

Há cinco décadas, uma segunda descoberta da atividade cardiovascular em produtos naturais levou ao isolamento da reserpina **3**.

A reserpina é um alcaloide indólico extraído da raiz de *Rauwolfia serpentina*, da família Apocynaceae, usada no tratamento da hipertensão leve a moderada. O

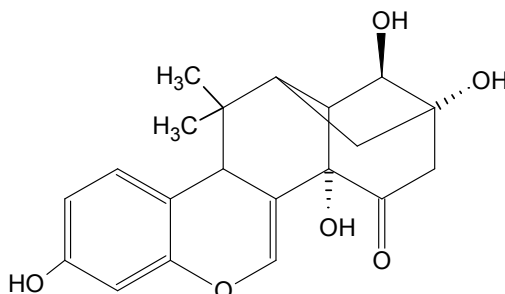


uso indiscriminado deste anti-hipertensivo resulta em depressão e efeitos semelhantes ao Parkinson (30).



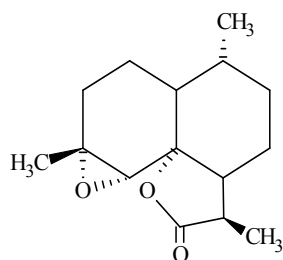
**3**

No que se refere à terapêutica hormonal, a substância natural miroestrol **4**, isolada de *Pueraria mirifica*, da família Leguminosae, revelou-se três vezes mais eficaz como abortivo do que o dietilestilbestrol, produto sintético usado na medicina como substituinte da estrona, devido à sua maior atividade (31).

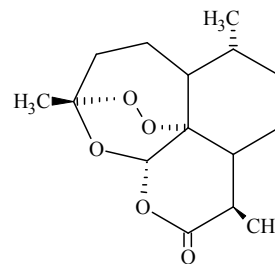


**4**

Em relação à participação da Química de Produtos Naturais na Quimioterapia, dois compostos com potente atividade anti-malária foram descobertos partir da planta medicinal chinesa *Artemisia annua* (Asteraceae), a arteanuína **5** e artemisina **6** (31, 32).

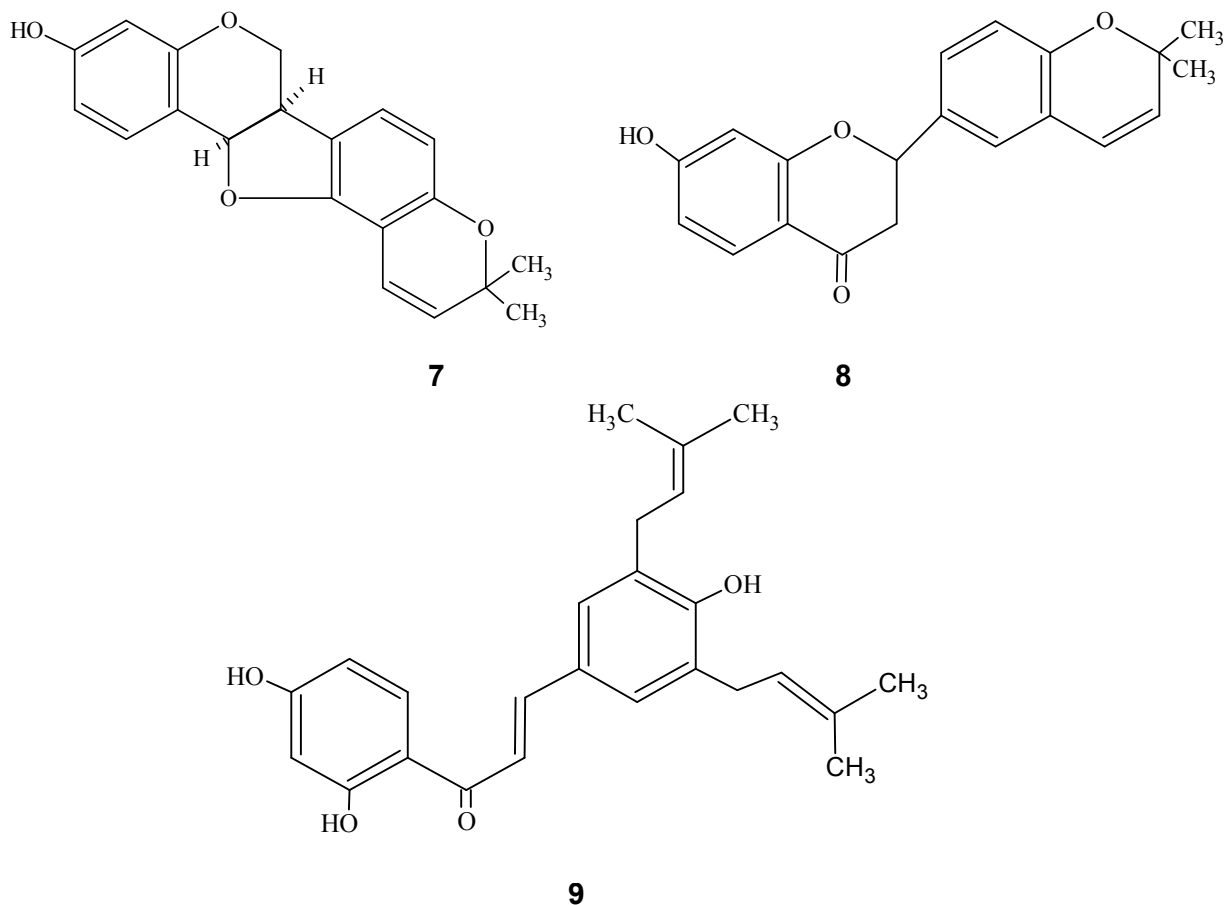


**5**

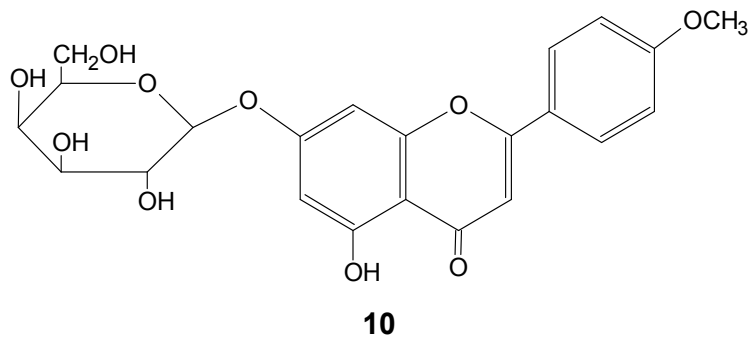


**6**

Ainda dentro desta área, foram obtidas das cascas das raízes de *Erythrina abyssinica*, da família Fabaceae, o pterocarpano **7**, a flavanona **8** e a chalcona **9** os quais apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *Treponema pallidum*, causadora da sífilis (33).

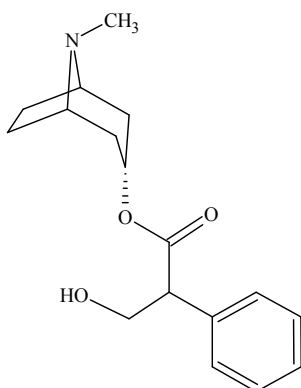
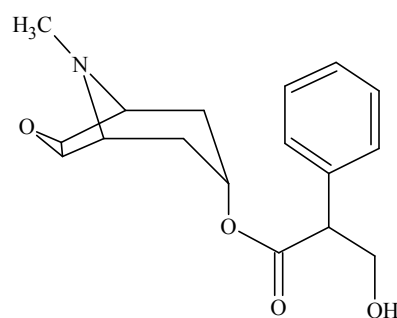


A Química de Produtos Naturais também se faz presente na luta contra a AIDS. O flavonoide 7-O- $\beta$ -D-galactopiranosilacetina **10** isolado da espécie vegetal *Chrysanthemum morifolium* (família Asteraceae), revelou importante atividade anti-HIV (34).

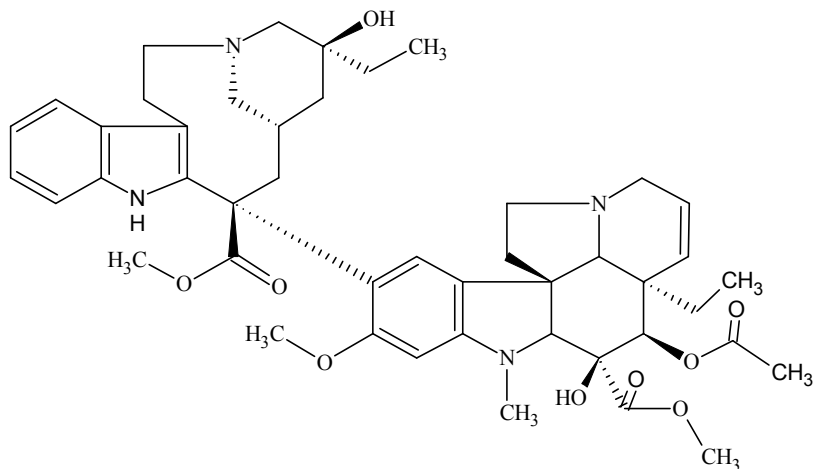
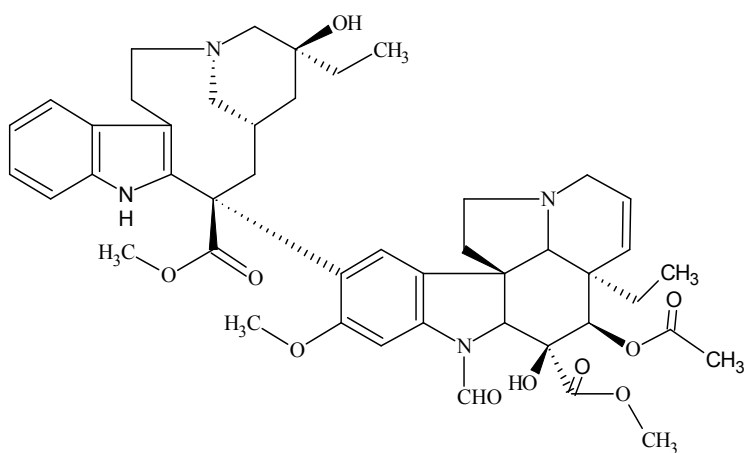
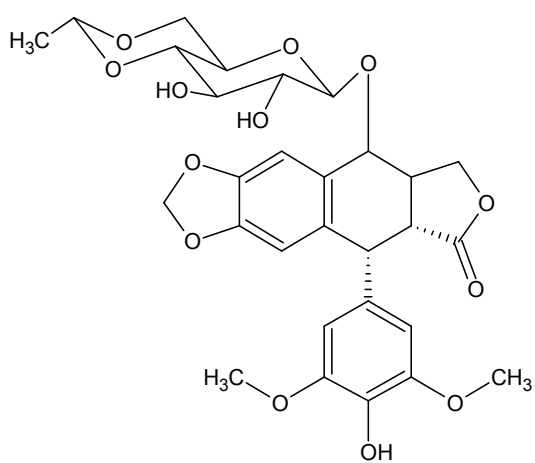
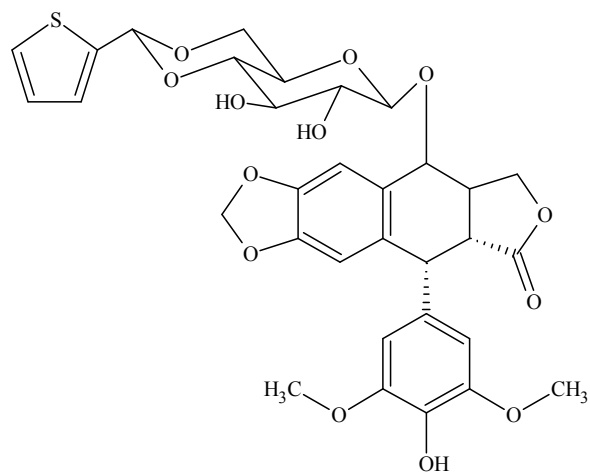


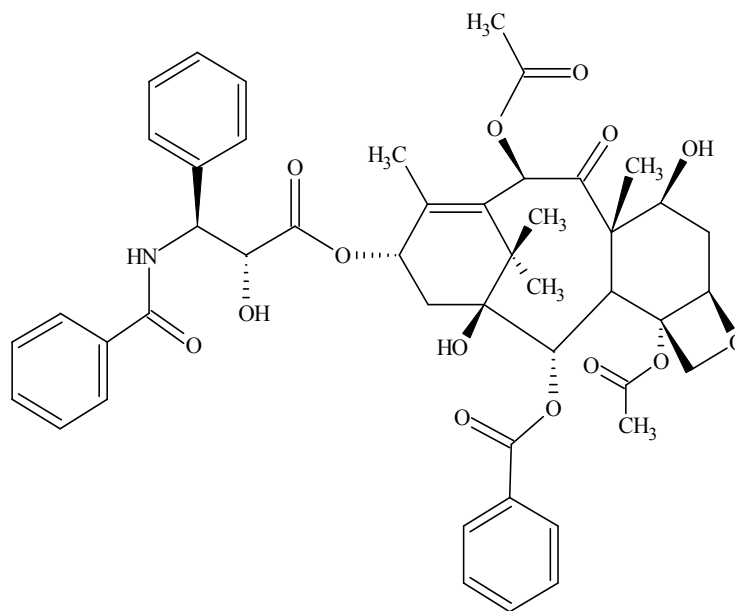
Na terapêutica da asma, os produtos naturais também se destacam. Os primeiros fármacos broncodilatadores usados contra esta patologia foram os alcaloides tropânicos atropina **11** e escopolamina **12**, extraídos das folhas de *Hyoscyamus muticus* (Solanaceae) (35).

Como estes compostos proporcionam efeitos colaterais pronunciados, estudos fitoquímicos com espécies vegetais têm sido conduzidos com o objetivo de encontrar novas substâncias terapêuticas que possam servir como candidatos a fármacos ou, então, como protótipos de novos medicamentos (35).

**11****12**

No que se referem aos antineoplásicos, vários compostos usados na prática médica foram obtidos de vegetais. Como exemplo pode-se citar: (a) vimblastina **13** e vincristina **14** extraídas de *Catharrantus roseus*; (b) etoposídeo **15** e teniposídeos **16** oriundos de derivados de *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*; (c) taxol **17** obtido de *Taxus brevifolia* (1).

**13****14****15****16**



## 17

Assim, na busca de substâncias ativas em plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações oriundas da medicina popular. A seleção de espécies vegetais para a pesquisa, baseada na alegação de um dado efeito terapêutico em humanos, pode se constituir num valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, já que seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré triagem quanto à utilidade terapêutica humana, mesmo que posteriormente por meio das pesquisas essa atividade não seja comprovada (35, 36).

Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se da medicina tradicional na atenção primária à saúde e desse total, aproximadamente 85% empregam o uso de plantas medicinais (37).

De acordo com Carvalho et al (37), plantas medicinais são aquelas usadas pela população com base no uso tradicional e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades.

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tem com função proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços (37).

Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro dos medicamentos, no qual os mesmos são avaliados em

relação a sua segurança, eficácia e qualidade, antes de serem expostos a venda (37). Assim a principal legislação que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, onde são estabelecidos todos os requisitos necessários para a sua concessão, além de prever diferentes formas de se comprovar a segurança e eficácia dos medicamentos. Entre elas, existe a possibilidade de se usar as informações disponíveis sobre a tradição de uso da planta de acordo com um levantamento bibliográfico e documentações técnico-científicas ou publicações aprofundados (37).

A partir de então, a ANVISA disponibiliza uma lista com 34 plantas para as quais são dispensáveis comprovações adicionais de eficácia e segurança, no ato de protocolo do registro de medicamento, devido à existência de dados clínicos e etnofarmacológicos satisfatórios que validam o emprego destas plantas. Como exemplos destas drogas vegetais, podem ser citados quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), cavalinha (*Equisetum arvense*), maracujá (*Passiflora incarnata*), melão de São Caetano (*Momordica charantia*), dentre outras (38).

Dessa forma, a busca de produtos naturais bioativos de origem vegetal ainda se constitui num caminho promissor para a descoberta e síntese de novos fármacos.

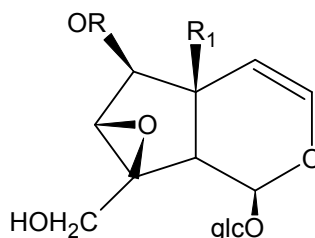
### 2.3 FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae, ordem Lamiales, consiste de aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies. Apresenta ampla distribuição em regiões de clima tropical, como na África e América do Sul, sendo algumas espécies cultivadas como plantas ornamentais (39).

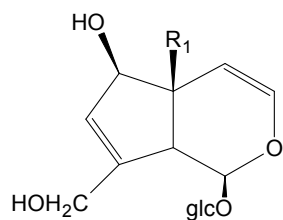
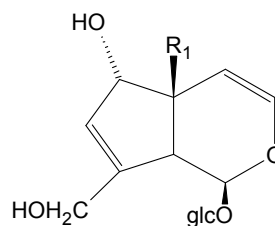
Dividi-se em 8 tribos: Tecomae, Bignoniae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Tourretieae, Oroxyleae, Coleeae e Schlegelieae. Somente as três primeiras tribos ocorrem no Brasil. São facilmente distinguidas pelo seu hábito e pelas estruturas dos seus frutos. Tecomeae apresenta frutos deiscentes, perpendiculares ao septo e hábito arbóreo; Bignoniae tem frutos indeiscentes, perpendiculares ao septo e todas as espécies são do tipo “parreiras”. Crescentieae tem frutos indeiscentes e as espécies têm hábito arbustivo e arbóreo (40).

Estudos recentes de algumas espécies da família Bignoniaceae têm demonstrado a presença de várias classes de substâncias químicas como: ácidos graxos, açúcares, antocianinas glicosiladas, terpenos, alcaloides, taninos, flavonoides, lignanas, compostos fenólicos e iridoides, os quais foram detectados em grandes quantidades (41).

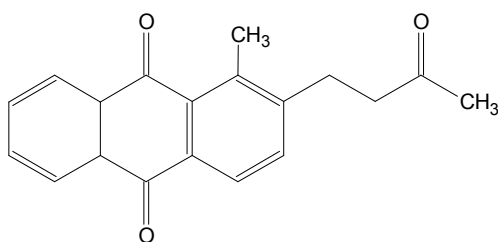
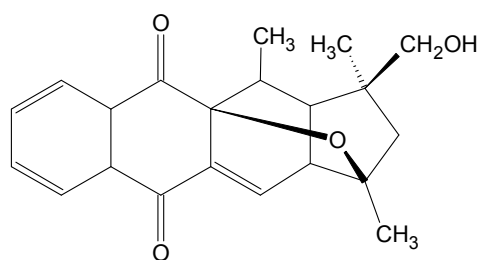
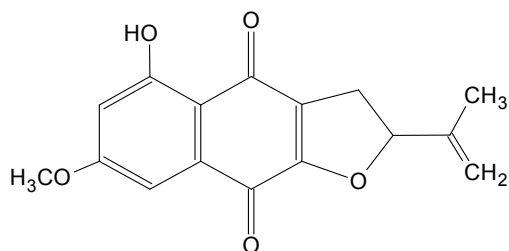
O estudo fitoquímico de *Catalpa bignonioides* Walt. levou à identificação dos iridoides catalpol **18** e catalposídeo **19**, enquanto que outros iridoides como aucubina **20** e 6-*epi*-aucubina **21** foram isolados de *Parmentiera* sp. e *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) Standley, respectivamente (42)



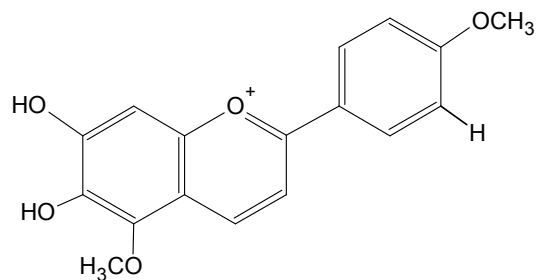
<b>18</b>	R= H	R <sub>1</sub> = H	(catalpol)
<b>19</b>	R= p-OH-benzoil	R <sub>1</sub> = H	(catalposídeo)

**20****21**

Quinonas também foram isoladas de espécies da família Bignoniaceae, a saber, estereoquinol A **22** e estereoquinol B **23** foram obtidas de *Stereospermum chelonoides* e 5-hidróxi-7-metóxi-desidro-iso- $\alpha$ -lapachona **24** de *Newbouldia laevis* (43, 44).

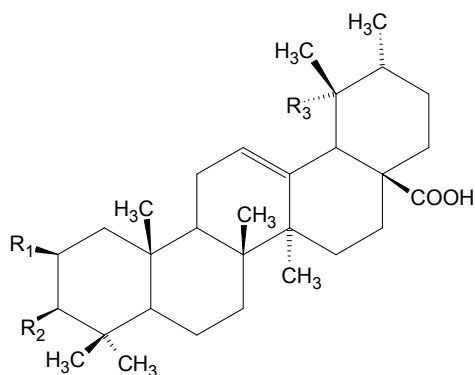
**22****23****24**

A 3-desóxi-antocianidina carajurina **25** foi obtida das flores vermelhas de *Arrabidaea chica* (45).

**25**

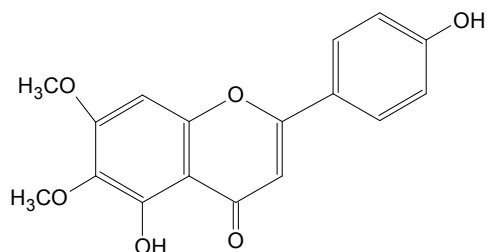
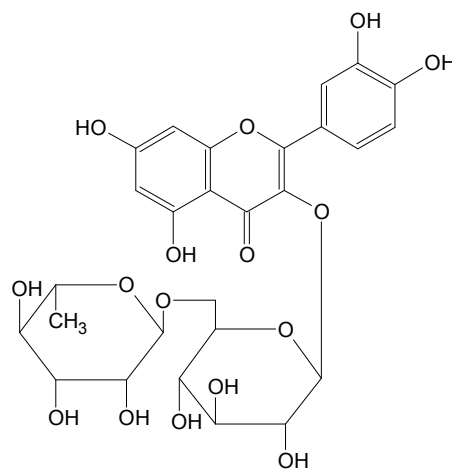
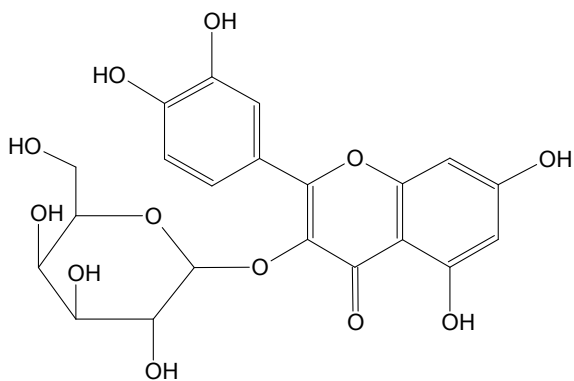


Triterpenos como ácido ursólico **26**, ácido pomólico **27** e ácido epi-tormêntico **28** foram isolados de *Markhamia obtusifolia* (Baker) Sprague. (46)

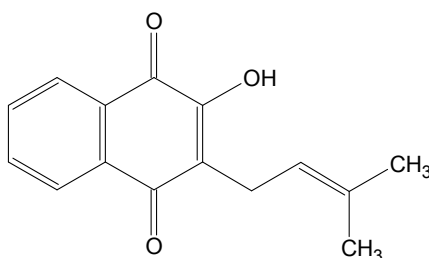


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>26</b>	H	OH	H
<b>27</b>	H	OH	OH
<b>28</b>	OH	OH	OH

Flavonas como cirsimaritin **29** e os flavonoides rutina **30** e quercetina-3-O-galactosídeo **31** foram obtidos de *Tecomella undulata* e de *Tabebuia caraiba*, respectivamente (47, 48).

**29****30****31**

Muitas destas substâncias têm atividade farmacêutica comprovada como o lapachol **32** isolado de *Tabebuia avellanedae*, usado como anti-inflamatório, antifúngico, antiviral, antiprotozoário, antibacteriano e anticancerígeno (12). Outros exemplos são os iridoides, triterpenos e esteroides obtidos dos extratos fluidos das espécies nativas *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae), *Remijia ferruginea* D.C. (Rubiaceae) e *Jacaranda caroba* D.C. (Bignoniaceae), presentes no fitoterápico Ierobina<sup>®</sup>, usado no tratamento de dispepsias (49).



### 32

Outras espécies da família Bignoniaceae também têm sido estudadas sob os pontos de vistas farmacológico e toxicológico. As suas principais ações biológicas encontram-se resumidas na Tabela 1.

Família Bignoniaceae	Ação Farmacológica	Referência
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Atividade adstringente, diurética e anticancerígena	(50)
		(51)
<i>Arrabidaea samydoides</i>	Atividade antioxidante	(52)
<i>Catalpa bignonioides</i>	Atividade anti-inflamatória	(41)
<i>Jacaranda decurrens</i>	Propriedades anti-infecciosas e depurativas do sangue	(53)
<i>Jacaranda caroba</i>	Usada como “amargo” no tratamento de dispepsias	(49)
<i>Kigella pinnata</i>	Atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i>	(54)
<i>Tabebuia avellanedae</i>	Adjuvante na terapia do câncer	(55)
<i>Pseudocalymma elegans</i>	Paralisia muscular	(56)
<i>Martinella obovata</i>	Atividades febrífuga e adstringente	(57)
<i>Jacaranda micrantha</i>	Atividade antireumática	(12)
<i>Jacaranda obtusifolia</i>	Antisifilítica	(12)
<i>Anemopaegma arvense</i>	Antidepressiva, anti-infecciosa e vasodilatadora.	(58)

Tabela 1 - Ações Biológicas de algumas espécies da família Bignoniaceae.

## 2.4 GÊNERO *JACARANDA*

O gênero *Jacaranda* contém aproximadamente 49 espécies de distribuição mundial, sendo nativas do Caribe, América Central e América do Sul. A maioria são árvores medindo de 1 a 45 metros de altura, mas também podem ser encontradas como arbustos e subarbustos. No Brasil, das 49 espécies encontradas, 39 são consideradas endêmicas no país (12).

Espécies de *Jacaranda* podem ser identificadas pela disposição das folhas, tipo de inflorescência e características dos frutos (Figura 1).

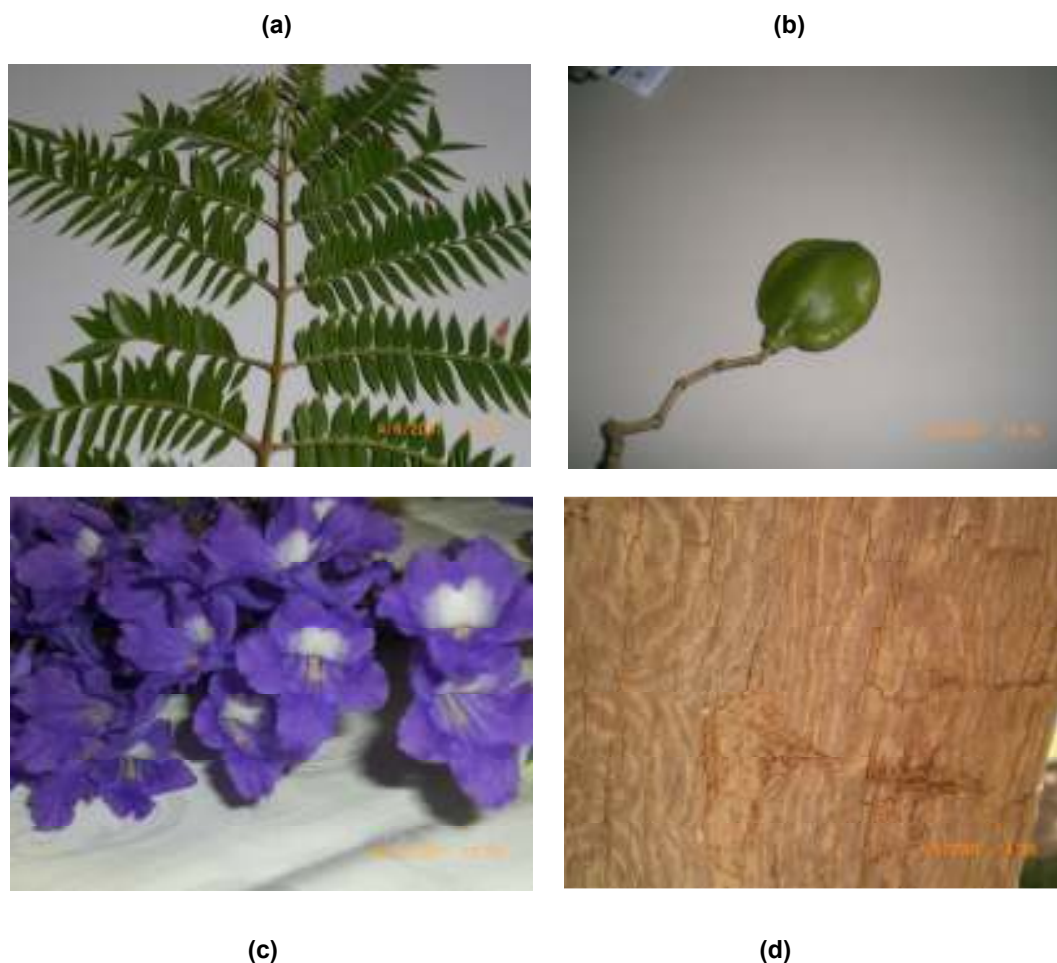


Figura 1 – Folhas (a), frutos (b), flores (c) e cascas (d) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Foto: Ana Lúcia Alves de Arruda)

As folhas são normalmente bipinadas, ocasionalmente pinadas e raramente simples. As inflorescências detêm poucas ou muitas flores terminais ou são panículas axilares, raramente racemosas (12).

As flores apresentam um cálice curto e estreitamente campanulado a cupulado, a corola é azul ou azul marinho e a margenta raramente branca. O fruto é uma cápsula oblonga com margens retas, medindo entre 6,2 e 12,7 cm de comprimento por 2,3 a 6 cm de largura. As sementes apresentam uma região embrionária com 3 a 5 mm de largura por 3 a 4 mm de comprimento. Esta região é circundada por uma asa suborbicular com 1 a 2 cm de comprimento e 1,7 a 2,8 cm de largura, a asa é hialina, membranácea com estrias radiais, em tons castanhos que partem da região embrionária (12).

O armazenamento e a germinação de espécies do gênero *Jacaranda* têm sido bastante estudados. O conhecimento da potencialidade do uso, da fisiologia, manejo e produção podem contribuir tanto para a manutenção das florestas como para o planejamento da recomposição, da forma mais próxima, da cobertura original da vegetação (59, 60).

Assim, algumas espécies de *Jacaranda*, como a *Jacaranda puberula* e a *Jacaranda cuspidifolia*, têm demonstrado sua utilização também na recomposição de áreas degradadas, pois apresenta crescimento rápido, boa adaptação a solos arenosos e argilosos degradados, além de enriquecer a serrapilheira com suas folhas. São indicadas, sobretudo, para plantio em encostas de Floresta Mista em estágio inicial a médio (59, 60).

No Brasil, foram identificadas, de acordo com a Flora neotropical, 39 espécies de *Jacaranda* (12) (Tabela 2). As atividades biológicas destas espécies ainda são muito pouco conhecidas e a sua utilização terapêutica encontra-se baseada em estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (Tabela 3).

Espécies	Nome científico
1	<i>Jacaranda bracteata</i> Bureau & Schumann
2	<i>Jacaranda brasiliana</i> (Lam.) Person
3	<i>Jacaranda bullata</i> A. Gentry
4	<i>Jacaranda campinae</i> A. Gentry & Morawetz
5	<i>Jacaranda corajasensis</i> A. Gentry
6	<i>Jacaranda caroba</i> (Vellozo) A.P. de Candolle
7	<i>Jacaranda copaia</i> (Aublet) D. Don subsp. <i>copaia</i>
8	<i>Jacaranda copaia</i> (Aublet) D. Don subsp. <i>spectabilis</i> (Mart. ex DC.)
9	<i>Jacaranda crassifolia</i> Morawetz
10	<i>Jacaranda cuspidifolia</i> Martins ex. DC. (Aublet)
11	<i>Jacaranda decurrens</i> Cham.
12	<i>Jacaranda duckey</i> Vattimo
13	<i>Jacaranda egléri</i> Sandw.
14	<i>Jacaranda glabra</i> (DC) Bureau & K. Schumann
15	<i>Jacaranda grandifoliolata</i> A. Gentry

Tabela 2 - Espécies de *Jacaranda* sp identificadas no Brasil – Adaptado de Gachet (12).

16	<i>Jacaranda intricata</i> A. Gentry & W. Morawetz
17	<i>Jacaranda irwinii</i> A. Gentry
18	<i>Jacaranda jasminoides</i> (Thumb.) Sandw.
19	<i>Jacaranda macrantha</i> Cham,
20	<i>Jacaranda macrocarpa</i> Bureau & K. Schumm.,
21	<i>Jacaranda micrantha</i> Cham.
22	<i>Jacaranda microcalyx</i> A. Gentry,
23	<i>Jacaranda montana</i> Morawetz
24	<i>Jacaranda morii</i> A. Gentry
25	<i>Jacaranda mutabilis</i> Hassler
26	<i>Jacaranda obovata</i> Cham
27	<i>Jacaranda obtusifolia</i> Humb & Bonpl. subsp. <i>obtusifolia</i>
28	<i>Jacaranda obtusifolia</i> Humb & Bonpl. subsp. <i>rhombifolia</i>
29	<i>Jacaranda oxyphylla</i> Cham.
30	<i>Jacaranda paucifoliolata</i> Martius ex DC.
31	<i>Jacaranda praetermissa</i> Sandw.
32	<i>Jacaranda puberulla</i> Cham.
33	<i>Jacaranda pulcherrima</i> Morawetz
34	<i>Jacaranda racemosa</i> Cham.
35	<i>Jacaranda rufa</i> Manso
36	<i>Jacaranda rugosa</i> A. Gentry
37	<i>Jacaranda simplicifolia</i> K. Schumann
38	<i>Jacaranda subalpina</i> Morawetz
39	<i>Jacaranda ulei</i> Bureau & K. Schumm

Continuação da Tabela 2

Tabela 2 - Espécies de *Jacaranda* sp identificadas no Brasil – Adaptado de Gachet (12).

Espécie	L	P	DR	DTG	Rit	NC	DI	ITU	DS	ADs	F	RM/PC	Rh	U
<i>J. acutifolia</i>		(X)				(X)	(X)	(X)	(X)	(X)			(X)	
<i>J. caerulea</i>		(X)												
<i>J. caroba</i>		(X)					(X)		(X)	(X)				
<i>J. caucana</i>		(X)	(X)				(X)		(X)				(X)	
<i>J. copaia</i>	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)		(X)					(X)	(X)	
<i>J. cuspidifolia</i>	(X)			(X)							(X)	(X)		
<i>J. decurrens</i>		(X)					(X)		(X)				(X)	
<i>J. glabra</i>	(X)	(X)					(X)							
<i>J. hesperia</i>	(X)													
<i>J. minosifolia</i>							(X)		(X)					
<i>J. obtusifolia</i>		(X)					(X)							
<i>J. puberula</i>											(X)			(X)

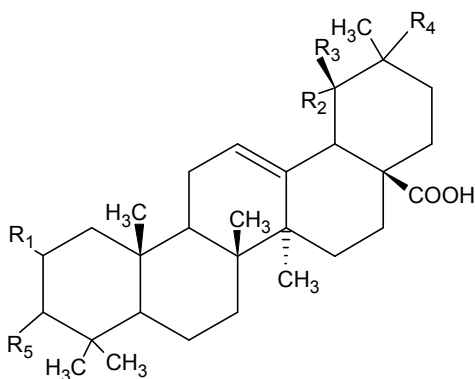
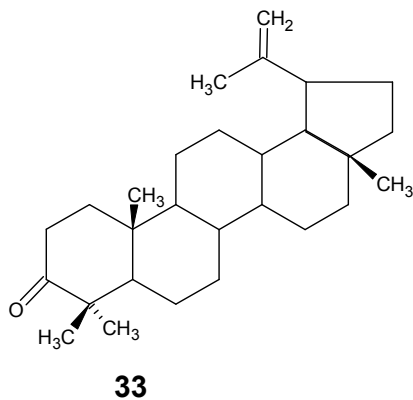
Tabela 3 – Uso Etnobotânico reconhecido de *Jacaranda* sp. Adaptado de Gachet (12).

L: leishmaniose; P: pele; DR: doenças respiratórias; DTG: distúrbios do trato gastrointestinal; Rit: rituais; NC: nervo ciático; DI: doenças infecciosas; ITU: infecções do trato urinário; DS: depurativo do sangue; ADs: adstringente; F: febre; RM: repelente de mosquito/picada de cobra; Rh: reumatismo; U: ulcerações.

Muitas das ações farmacológicas descritas para o gênero *Jacaranda* se devem à presença dos seus constituintes químicos.

De acordo com Gachet (12) apenas 6 espécies de *Jacaranda* tiveram seus constituintes químicos estudados: *Jacaranda caucana*, *Jacaranda copaia*, *Jacaranda decurrens*, *Jacaranda filicifolia*, *Jacaranda acutifolia* e *Jacaranda mimosifolia*.

O estudo fitoquímico de *Jacaranda mimosifolia* levou à identificação do triterpeno lupenona **33** enquanto, outros triterpenos, como ácido jacarândico **34** e ácido jacumárico **35** foram isolados de *Jacaranda caucana* (12).

**34****R<sub>1</sub>**

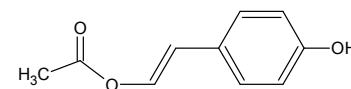
OH

**R<sub>2</sub>**

H

**R<sub>3</sub>**CH<sub>3</sub>**R<sub>4</sub>**

H

**R<sub>5</sub>****35****R<sub>1</sub>**

OH

**R<sub>2</sub>**

OH

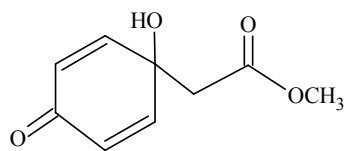
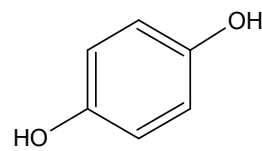
**R<sub>3</sub>**CH<sub>3</sub>**R<sub>4</sub>**

H

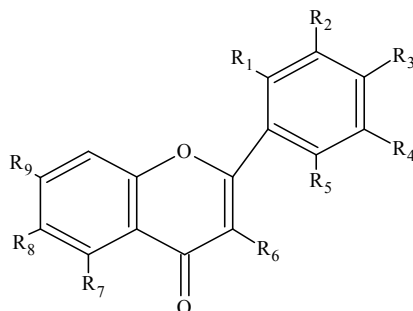
**R<sub>5</sub>**

OH

Quinonas também foram isoladas de espécies de *Jacaranda*, a saber, Jacaranona **36** de *Jacaranda caucana* e *Jacaranda copaia* e hidroquinona **37** de *Jacaranda mimosifolia* (12).

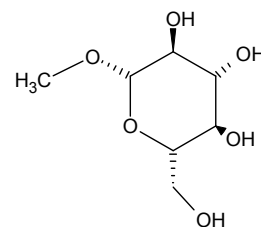
**36****37**

Flavonoides como luteolina **38**, 6-hidróxi-luteolina-7-O-glicosídeo **39**, quercetina-3-O-glicosídeo **40**, quercetina-3-O- $\beta$ -galactosídeo **41**, 7,2,3,4-tetraidróxi-flavona-3-O-neoesperidosídeo **42**, escutelareína **43**, escutelareína-7-glicuronídeo **44**, isoquercitrina **45**, isovitexina **46**, apigenina-7-O- $\beta$ -D-glicoronopiranosídeo **47**, luteolina-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo **48**, escutelareína-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-metil-éster **49**, apigenina-7-O- $\beta$ -D-glicuronopiranosídeo-metil-éster **50** e luteolin-7-O- $\beta$ -D-glicuronopiranosídeo-metil-éster **51** foram isolados de *Jacaranda decurrens*, *Jacaranda acutifolia* e *Jacaranda mimosifolia* (12, 61, 62, 63).

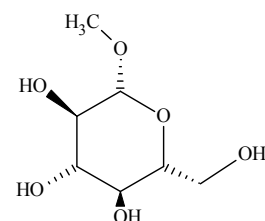


	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>	<b>R<sub>9</sub></b>
<b>38</b>	H	H	OH	OH	H	H	OH	H	OH

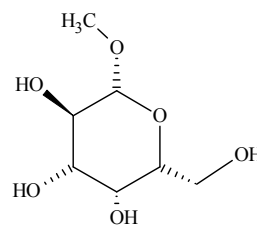
<b>39</b>	H	H	OH	OH	H	H	OH	OH	
-----------	---	---	----	----	---	---	----	----	--



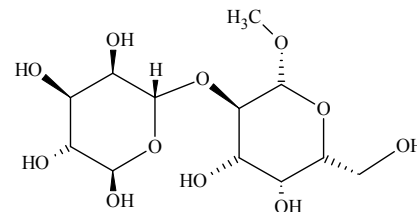
<b>40</b>	H	OH	OH	H	H	OH	H	OH	
-----------	---	----	----	---	---	----	---	----	--



41 H OH OH H H OH H OH



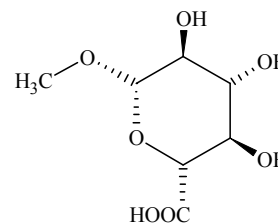
42 OH OH OH H H OH H OH



R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub> R<sub>7</sub> R<sub>8</sub>

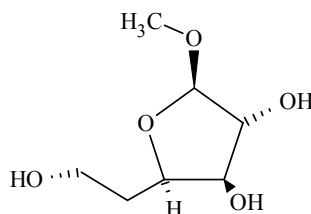
43 H H OH H H H OH OH OH

44 H H OH H H H OH OH



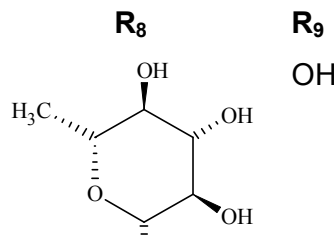
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub> R<sub>5</sub> R<sub>6</sub> R<sub>7</sub> R<sub>8</sub> R<sub>9</sub>

45 H OH OH H H

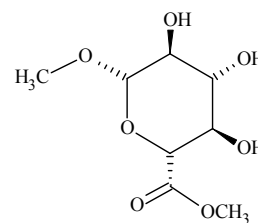


OH H OH

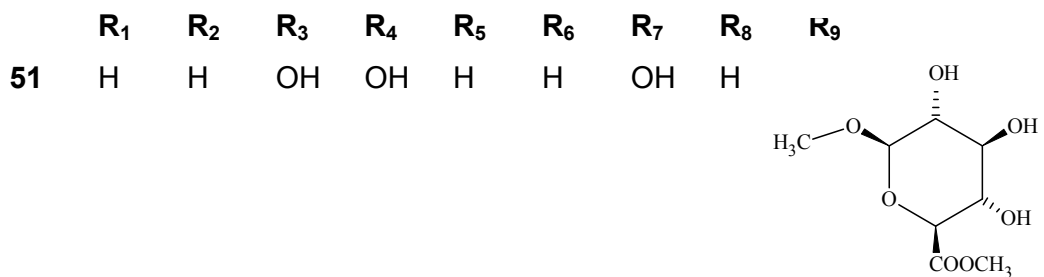
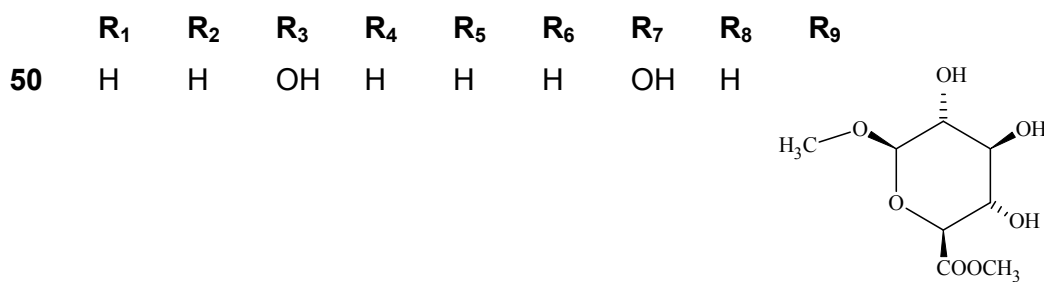
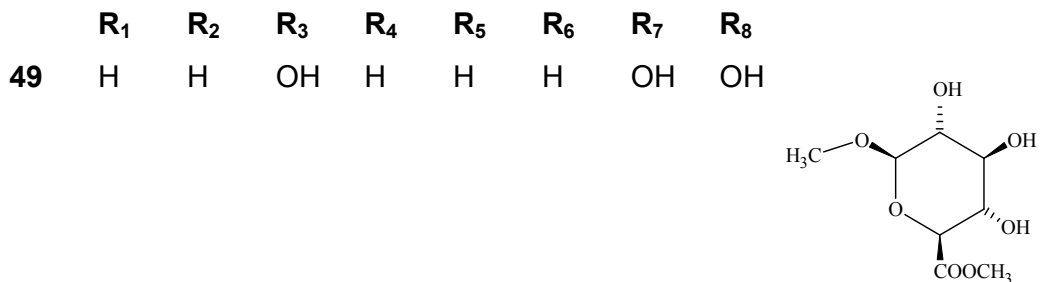
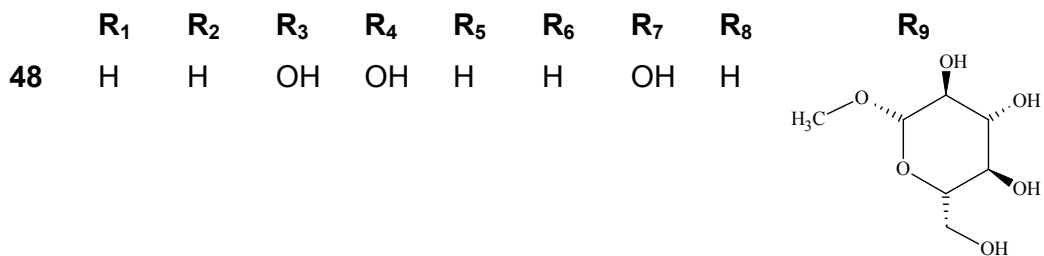
46 H OH H H H H OH



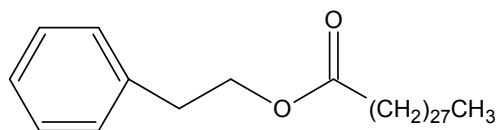
47 H H OH H H H OH

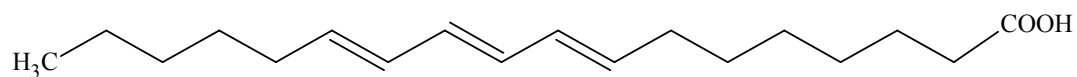






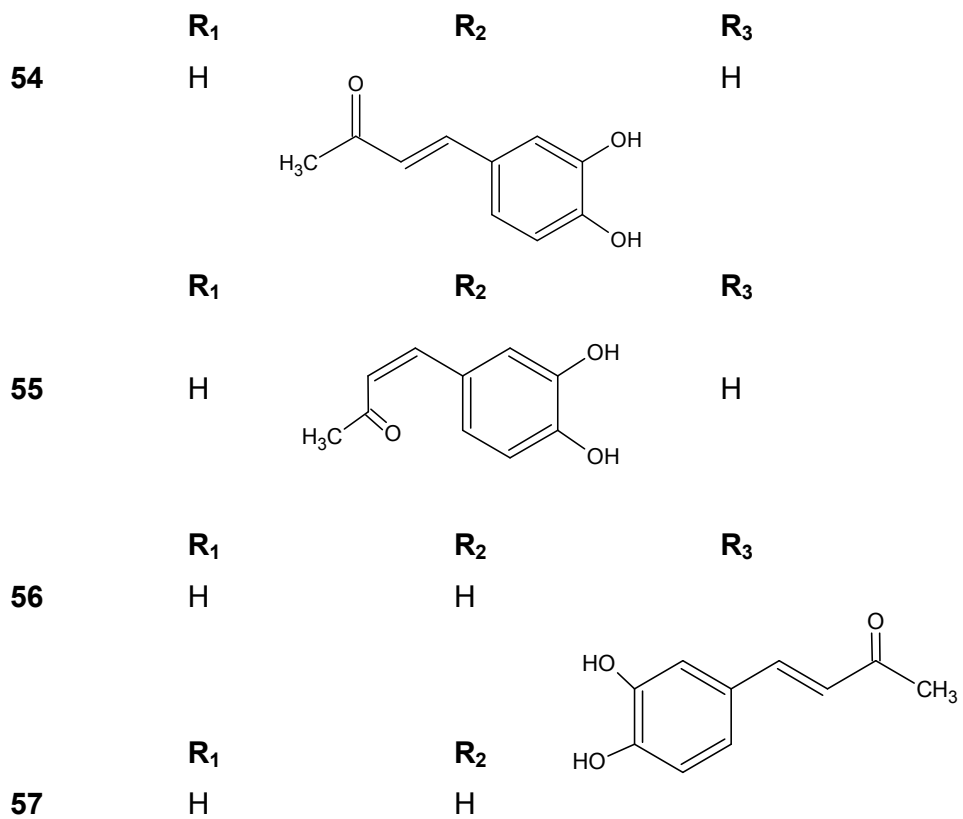
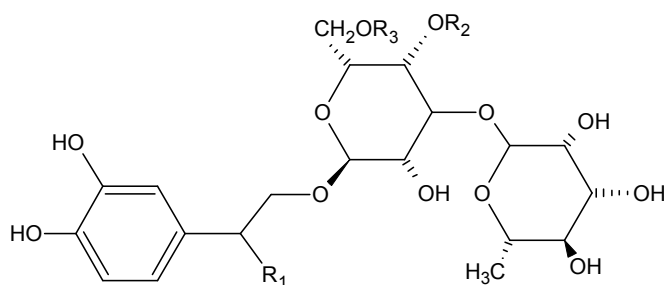
Ácidos graxos como o ácido 2-(4-hidroxifenil)etil-dodeciloctadecanoico **52** e 8(Z),10(E),12(Z) - ácido octadocatrienoico **53** foram obtidos de *Jacaranda filicifolia* e *Jacaranda mimosifolia*, respectivamente (12).

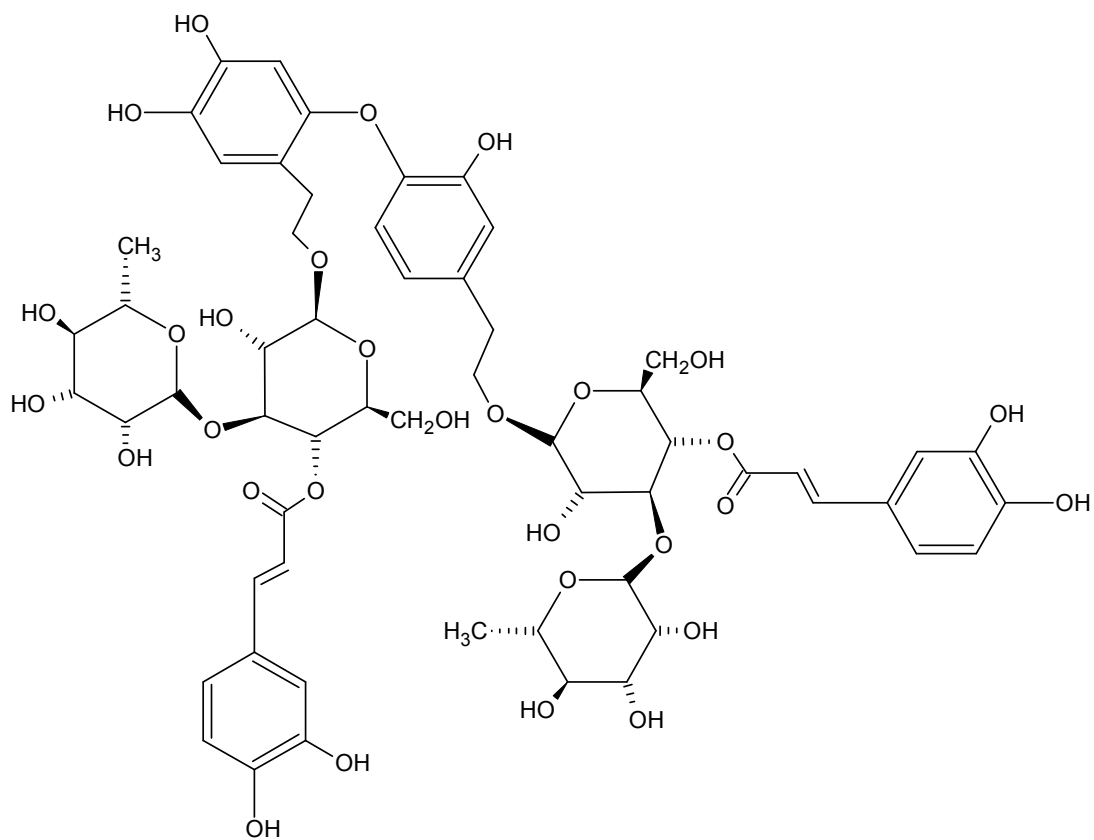
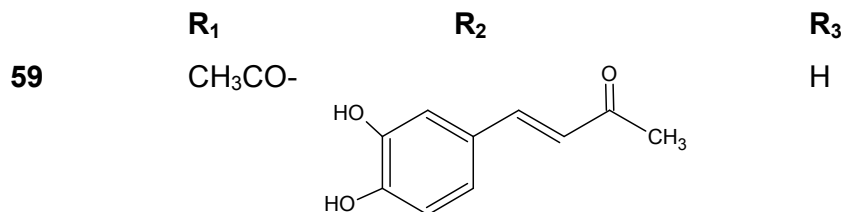
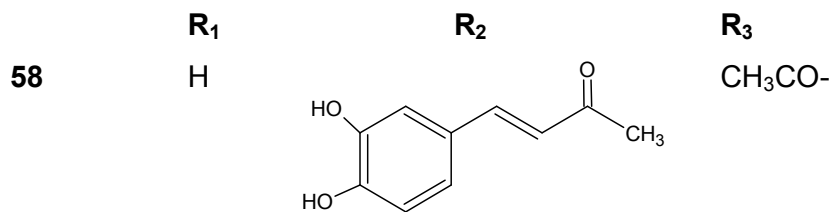
**52**



53

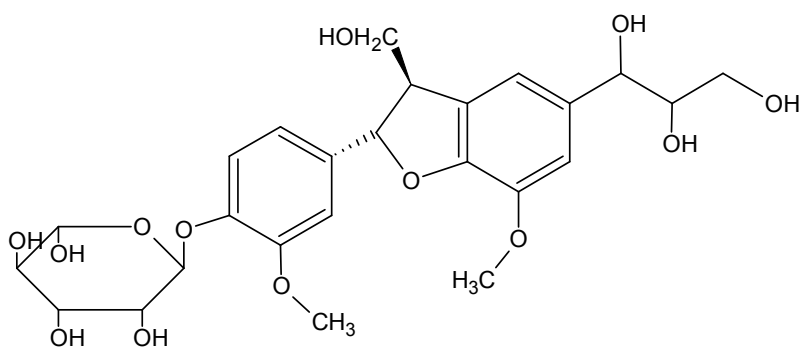
De *Jacaranda mimosifolia* foram obtidos (E)-acetosídeo **54**, (Z)-acetosídeo **55**, isoacetosídeo **56**, cistanosídeo **57**, 6'-acetilacetosídeo **58**, campneosídeo **59** e um dímero feniletanoide (Jacraninosídeo) **60** (12).





60

Recentemente foi isolado de *Jacaranda caucana* um novo glicosídeo de neolignana denominado de sissimbrifolina **61** (64).



61

*Jacaranda cuspidifolia* Mart., conhecido popularmente como caroba, jacarandá e bolacheira, pertencente à família Bignoniaceae, é uma árvore de médio porte com altura de 3-10 metros, apícola, utilizada na arborização e ornamentação das ruas, principalmente devido à beleza de suas flores arroxeadas (Figura 2).



Figura 2: Árvore *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Foto: Ana Lúcia Alves de Arruda).

A planta é decídua, heliófita, pioneira e xerófita, características de encostas rochosas da floresta latifoliada e de transição para o cerrado. Produz anualmente grandes quantidades de sementes viáveis, amplamente dispersas pelo vento, e

floresce durante os meses de setembro a dezembro com as plantas totalmente despidas de sua folhagem velha. Apresenta propriedades inseticidas, sendo a raiz usada para tratamento da sarna. É depurativa e excelente contra disenteria. A madeira, cascas e folhas são usadas no combate à febre (11).

Segundo dados da literatura, estudos químicos e farmacológicos que venham justificar o uso de *Jacaranda cuspidifolia* na medicina popular são praticamente inexistentes.

Desta forma, torna-se importante o estudo de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. de maneira a contribuir com o conhecimento científico desta espécie e também com a finalidade de comprovar as suas propriedades terapêuticas.

## **CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral é avaliar as atividades biológicas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae) relacionadas ao seu uso tradicional e realizar a prospecção fitoquímica preliminar, o fracionamento e o isolamento dos constituintes micromoleculares majoritários.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das cascas, folhas e caule de *J. cuspidifolia*;
- Realizar o fracionamento preliminar do extrato metanólico das cascas de *J. cuspidifolia*;
- Isolar os constituintes micromoleculares abundantes na fração clorofórmica do extrato metanólico das cascas de *J. cuspidifolia*;
- Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas utilizando métodos analíticos e espectrométricos (UV, IV, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , EM);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações obtidas das cascas, folhas e do caule de *Jacaranda cuspidifolia*.
- Avaliar a atividade antioxidante e determinar o conteúdo de flavonóides e de fenóis totais dos extratos brutos obtidos das cascas, folhas e do caule de *J. cuspidifolia*.
- Avaliar a atividade anticolinesterásica extratos brutos obtidos das cascas, folhas e do caule de *Jacaranda cuspidifolia*.
- Realizar ensaios de atividade anti-inflamatória dos extratos brutos das cascas e folhas de *J. cuspidifolia*.

## **CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS**



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

- Acetonitrila grau CLAE e metanol grau CLAE foram obtidos da Merck; Substâncias de referência: ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina, quercetina, catequina, ácido tânico, lapachol,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona, sitosterol, atropina, lupeol e kaempferol foram obtidas da Sigma Aldrich; DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazila), DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)], acetilcolinesterase (tipo VI-s, liofilizada, 426U/mg), iodeto de acetilcolina (ATCI), ácido gálico e carragenina também foram obtidas da Sigma – Aldrich; ácido ascórbico, cloreto férrico e sulfato cérico obtidos da empresa Merck; peróxido de hidrogênio da VETEC.

### 4.2 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

#### 4.2.1 Solução de Sulfato Cérico 0,1 M

Dissolvem-se 42 g de  $\text{CeSO}_4$  em 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  contendo 28 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, por aquecimento. Após resfriamento, dilui-se com água e completa-se o volume a 1L.

Reagente usado para a detecção de *terpenos* (manchas rosa e azuis) e *flavonoides* (manchas cinza e amarelas) (65).

A cromatoplaça foi borrifada com esta solução e aquecida até o aparecimento das manchas, características ou não destes compostos.

#### 4.2.2 Solução de Vanilina-Ácido Sulfúrico

**Solução A:** solução etanólica de ácido sulfúrico a 5%.

**Solução B:** solução etanólica de vanilina 1%.

Reagente usado para a detecção de componentes de óleos essenciais, como os *terpenos*, *fenóis* e *derivados fenilpropanoides* (manchas de coloração roxa) (65).

A cromatoplaça foi inicialmente borrifada com 10 mL da solução A, seguida imediatamente, do borrifamento com 10 mL da solução B. As cromatoplaças foram aquecidas por 5 a 10 min, à temperatura de 110 °C.

#### 4.2.3 Reagente de Dragendorff

**Solução A:** nitrato de bismuto (1,7g) foi dissolvido em 100 mL de solução de ácido acético:água (1:4).

**Solução B:** solução aquosa de iodeto de potássio a 40%.

Para a borrifação da cromatoplaça foi preparada uma solução composta de 5mL de A; 5 mL de B; 20 mL de ácido acético e 70 mL de água.

Reagente usado para a detecção de *alcaloides* (manchas de coloração marrom ou alaranjada).

#### 4.2.4 Solução Metanólica de Hidróxido de Potássio 5%

A cromatoplaça foi borrifada com uma solução metanólica de hidróxido de potássio 5% e aquecida por 5 min, à temperatura de 100 °C.

Reagente usado para a detecção de *antraquinonas* e *naftoquinonas* (manchas de coloração laranja a vermelho (vis) e fluorescências laranja e vermelho em câmara de UV<sub>254</sub>) e *antrons* e *antranóis* (manchas amarelas (vis) e fluorescências laranja e vermelho em câmara de UV<sub>254</sub>) (65).

#### 4.2.5 Solução Etanólica de Cloreto de Alumínio 2%

A cromatoplaça foi borrifada com uma solução etanólica de cloreto de alumínio 2% e aquecida por 5 min, à temperatura de 100 °C.

Reagente usado para a detecção de *flavonoides* (manchas de coloração amarela (vis) e fluorescências amarelo-esverdeadas em câmara de UV<sub>254</sub>) (65).

#### 4.2.6 Solução Aquosa de Ferricianeto de Potássio 1% e Cloreto Férrico 2%.

**Solução A:** solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%.

**Solução B:** solução aquosa de cloreto férrico 2%.

Para a borrifação da cromatoplaça foi preparada uma solução (1:1) de A e B.

Reagente usado para a detecção de *taninos* (manchas de coloração negra azulada ou negra esverdeada) (65).

#### 4.3 MICRORGANISMOS USADOS

- Cepas padrões de bactérias e fungos do American Type Culture Collection, da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello (CCT) e do Laboratório Bio-RJ.

##### 4.3.1 Bactérias

*Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus epidermidis* (LTAT 232), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Salmonella typhimurium* (ATCC 19430), *Salmonella typhi* (LTVE 987), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27736), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Serratia marcescens* (LTF 658), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterobacter cloacae* (LTKa 159) e *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 49226).

##### 4.3.2 Fungos

*Trichoderma aureoviridae* CCT 4567, *Candida parapsilosis* CCT 3438, *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus sp* CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium sp* CCT 2147, *Candida parapsilosis* CCT 3438, *Aspergillus fumigatus* CCT 1277, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum* (Hartz) Lang & Miloch URM 4799, *Trichophyton rubrum* ATCC 5202 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533.

## 4.4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.4.1 Estudo Fitoquímico de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

#### 4.4.1.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

As cascas, folhas e caule de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. foram coletadas em novembro de 2006, 2007 e 2008 numa área de cerrado, em Aquidauana (MS), entre as coordenadas 20°26'46s s e 55° 47' 14s w, com altitude de 149 m.

O material vegetal foi identificado pela botânica Dra. Ubirazilda Maria Resende e uma amostra foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HMS), sob o número 11923.

#### 4.4.1.2 Preparo do Material Vegetal e dos Extratos Hexânicos e Metanólicos

As cascas, folhas e caule de *Jacaranda cuspidifolia* Mart., separadamente, foram secos em estufa de circulação forçada de ar com temperatura aproximada de 40 °C, durante três dias. Posteriormente, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas.

Cerca de 2000 g de cascas, 1200 g de folhas e 740 g do caule foram macerados a frio, inicialmente com hexano e, depois, com metanol.

Os respectivos solventes foram renovados a cada três dias, durante um período de 2 meses, para cada solvente (Figura 3).

Os extratos hexânico e metanólico foram concentrados em evaporador rotatório, à temperatura de 60 °C, sob pressão reduzida.

Os extratos foram transferidos para frascos tarados e mantidos à temperatura ambiente, por no mínimo 72 horas, para evaporação total do solvente.

Os extratos secos foram pesados e os rendimentos em extrativos foram calculados (Tabela 4).

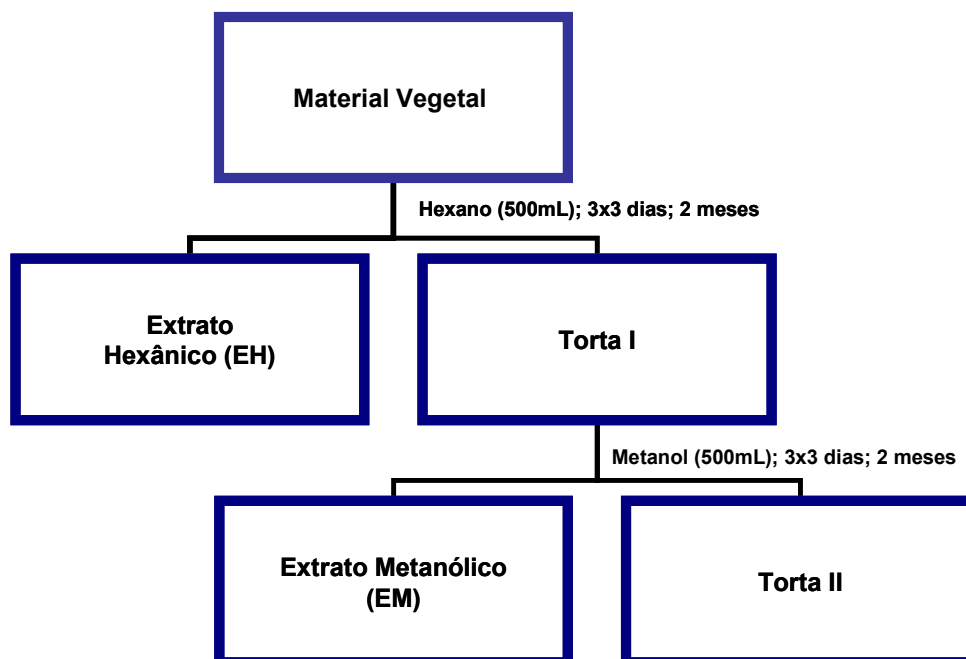


Figura 3 - Obtenção dos extratos hexânicos (EH) e metanólicos (EM) do material vegetal de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

Partes da Planta	Massa do Material Vegetal (g)	Rendimento (%)	
		EH	EM
Cascas	2000	0,18	7,65
Folhas	1200	0,83	11,30
Caule	740	0,12	13,40

Tabela 4 – Rendimento dos extratos hexânicos (EH) e metanólicos (EM) obtidos por maceração a frio de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

#### 4.4.1.3 Perfis Cromatográficos dos Extratos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

##### 4.4.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para os perfis cromatográficos em Cromatografia de Camada Delgada (CCD), aproximadamente 5-10 $\mu$ L de amostras do extrato metanólico das cascas, caule e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* foram aplicadas em cromatoplasmas. De acordo com a pesquisa da classe de metabólitos foram utilizados os sistemas de eluição propostos por Wagner et al. (65).

Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, antes da utilização dos reveladores químicos.

Foram obtidos os perfis cromatográficos para a avaliação de taninos, flavonoides, antraquinonas, naftoquinonas, antranas, antranóis, terpenos, esteroides, alcaloides e saponinas.

As condições cromatográficas e as características dos compostos a serem pesquisados encontram-se descritos abaixo.

- *Pesquisa de Taninos*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27).

Revelador: mistura das soluções de ferricianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2%, na proporção de 1:1.

Amostra de referência: catequina e ácido tânico.

*Taninos: manchas de coloração negro-azulada ou negro-esverdeada.*

- *Pesquisa de Geninas Flavônicas*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): clorofórmio:acetato de etila (60:40).

Revelador: solução etanólica de cloreto de alumínio a 2% e aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Amostra de referência: quercetina.

*Geninas flavônicas: manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada (UV<sub>254</sub>).*

- *Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27).

Revelador: solução etanólica de cloreto de alumínio a 2% e aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Amostra de referência: rotina.

*Flavonoides: manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada (UV<sub>254</sub>).*

- *Pesquisa de Geninas Antraquinônicas e Naftoquinonas*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): tolueno:acetona:clorofórmio (40:25:35).

Revelador: solução metanólica de hidróxido de potássio a 5% e aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Amostra de referência: lapachol,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona.

*Antraquinonas e naftoquinonas: manchas de coloração laranja a vermelho (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV<sub>254</sub>).*

*Antronas e Antróis: manchas de coloração amarela (visível) e fluorescências laranja a vermelho (UV<sub>254</sub>).*

- *Pesquisa de Terpenos e Esteroides*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): hexano:acetato de etila (1:1)

Revelador: solução de vanilina sulfúrica ou reagente de Liebermann – Burchard com aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Amostra de referência: ácido betulínico e sitosterol.

*Terpenos e esteroides: reveladas com vanilina, manchas de coloração rosa; com o reagente de Liebermann – Burchard, manchas marrons ou cinzas (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV<sub>254</sub>).*

- *Pesquisa de Saponinas*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): clorofórmio: ácido acético: metanol: água (15:8:3:2).

Revelador: sulfato cérico e aquecimento a 100 °C por 5 minutos.

Amostra de referência: aescina

*Saponinas: manchas de coloração amarela - acinzentada.*

- *Pesquisa de Alcaloides*

Fase estacionária (FE): sílica gel F<sub>254</sub>, sobre placa de alumínio.

Fase móvel (FM): acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água: butanol (50:7:3:10:30).

Revelador: Reagente de Dragendorff.

Amostra de referência: quinina e atropina.

*Alcaloides: manchas de cor marrom ou alaranjada.*

#### 4.4.1.3.2 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters®, composto de injetor automático, modelo 2695, com sistema operacional computadorizado com software Empower e detector de arranjos de diodos (DAD), modelo 2996, bomba modelo L-6200<sup>a</sup>, integrador modelo C-R4A. Coluna para CLAE ODS C-18 LiChrospher® (125 x 4,0 mm, 5µm), Merck e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm).

As amostras foram pesadas em frascos da marca Eppendorf e solubilizadas em metanol grau CLAE na concentração de 10 mg/mL para os extratos metanólicos da casca (EMC), da folha (EMF) e do caule (EMCa) e 1 mg/mL para as substâncias de referência.

As amostras foram filtradas em microfiltros com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos 0,45 µm, 13 mm. Alíquotas de 10 µL das amostras foram injetadas de modo automático a uma temperatura de 40 °C e uma velocidade de fluxo de 1 mL/min.

A detecção foi realizada em detector de arranjo de diodos a  $\lambda$  210 nm. Espectros de UV em comprimentos de onda de 210 a 400 nm foram obtidos *on line* para identificação de cada pico.

Em função da complexidade da matriz oriunda de extratos vegetais, empregou-se um sistema de eluição exploratório, compreendendo um período longo de eluição em gradiente linear. A fase móvel é composta de H<sub>2</sub>O (A): CH<sub>3</sub>CN (B) na proporção



inicial 95:5, com gradiente linear de 95 a 60% de A em 60 min., mantendo-se a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de CH<sub>3</sub>CN, 5 minutos). (Tabela 5).

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	60	40
65	5	95

Tabela 5 - Sistema de Eluição Exploratório empregado na obtenção de perfis cromatográficos por CLAE.

Manteve-se um intervalo de 10 minutos, após cada corrida do programa de eluição, para retorno às condições iniciais do gradiente, antes da injeção de nova amostra.

Em todas as etapas foram empregados solventes grau CLAE e água pura.

#### 4.4.1.4 Fracionamento Preliminar do Extrato Bruto de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

Cerca de 10g de extrato metanólico da casca foram solubilizados em 100 mL de uma mistura metanol:água (1:1), seguida da adição, inicial, de 3x50mL de hexano, obtendo-se duas frações: a hidrometanólica e a fração hexânica.

A fração hidrometanólica foi, então, reduzida a 50% do volume inicial, em rotaevaporador, à temperatura de 65 °C, para a evaporação do metanol.

A fração aquosa resultante, foi então, particionada com clorofórmio (3x50 mL), obtendo-se as frações aquosa e clorofórmica.

O procedimento adotado na seqüência de partição encontra-se representado na Figura 4.

Os rendimentos das frações encontram-se representados na Tabela 6.

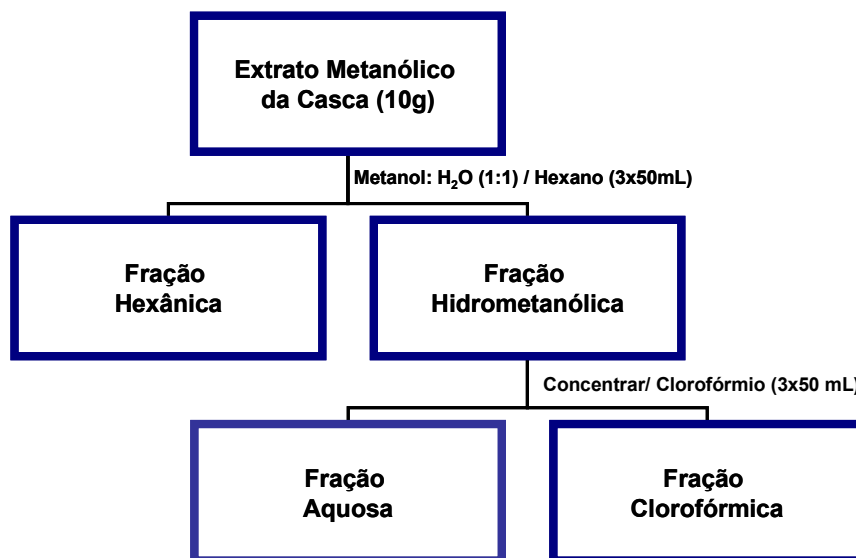


Figura 4 – Fracionamento preliminar do extrato metanólico das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

Parte da Planta	Fração Hexânica (%)	Fração Aquosa (%)	Fração Clorofórmica (%)
Casca	3,57	16,7	29,2

Tabela 6 – Rendimento das frações hexânica, aquosa e clorofórmica obtidas do extrato metanólico das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

#### 4.4.1.5 Purificação da Fração Clorofórmica da Casca por CLAE-FR em Escala Semi-Preparativa

A purificação e isolamento dos produtos majoritários foram realizados no Laboratório de Fitoquímica, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a purificação por CLAE-FR da fração clorofórmica da casca de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. foi usado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu®, em escala semi-preparativa, bombas mod. LC-8A, detector UV-VIS mod. SPD-6AV e integrador CR4A, coluna semi-preparativa para CLAE Zorbax SB C – 18 (250 x 9,4 mm d.i., 5µm) e uma Pré-coluna ODS 3263, do fabricante Shimadzu, empregando-se gradiente linear.

A fase móvel foi composta de H<sub>2</sub>O (A):CH<sub>3</sub>CN (B) na proporção inicial 90:10, com gradiente linear de 90 a 70% de A em 40 min., fluxo de 3 mL/min, à temperatura ambiente e detecção no UV  $\lambda$  220. Para as injeções foram pesados 25 mg da fração clorofórmica da casca e, após a adição de 0,5 mL de metanol, grau CLAE, a solução obtida foi transferida para os tubos de Eppendorf e submetida à sonicação durante 5 minutos, para uma melhor homogeneização das amostras. Em seguida, as frações foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos. Os sobrenadantes (0,5 mL) foram injetados de modo manual. Em todas as análises foi utilizada acetonitrila grau CLAE e água pura. O ar dos eluentes foi retirado por sonicação durante 30 minutos, com auxílio de vácuo.

Foram realizadas 15 injeções para obtenção de 36,6 mg da substância denominada de **62**, 42,8 mg da substância **63**, 28,1 mg da substância **64** e 45,8 mg da substância **65**. Essas substâncias foram secas em pistola de secagem por 24 h e armazenadas em dessecador com vácuo até sua caracterização. Posteriormente foram submetidas a CLAE-FR e análise espectrométrica por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, espectroscopia na região do UV e IV. O solvente utilizado para a RMN foi DMSO deuterado e o padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS).

Foi realizada a co-injeção da substância **62** com o padrão do verbascosídeo **66**, obtido do Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia da UFMG. 150  $\mu$ L da solução metanólica da substância **62** (5mg/mL) foi misturada a 50  $\mu$ L da solução metanólica do verbascosídeo **66** (1 mg/mL) e analisadas por CLAE-FR de acordo com o item 4.4.1.3.2.

#### 4.4.1.6 Fracionamento do Extrato Hexânico por Cromatografia em Coluna de Sílica Gel (CCS).

Inicialmente, 10 g do extrato hexânico da casca foram incorporados a 2,0 g de sílica gel 60, sendo depositados no topo de uma coluna, empacotada com 20 g de sílica gel. Procedeu-se, então, a eluição com solventes de polaridade crescente, iniciando com hexano puro, seguido de hexano:diclorometano (1:9) e diclorometano puro. Foram recolhidas frações de 10 mL para cada extrato.

As frações foram reunidas de acordo com os seus perfis por CCD, resultando em três grandes frações: fração hexânica (5-13), fração hexano:diclorometano (1:9) (14-30) e fração diclorometano (31-50).

A fração hexano: diclorometano da folha (1:9) apresentou-se como um sólido branco e um rendimento de 18,5% (22,5mg). As demais frações apresentaram rendimentos inferiores a 1%.

Esta fração foi submetida à análise espectrométrica por RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135.

O solvente usado foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e o padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS).

Esta mesma fração foi submetida também a Análise Espectrométrica por Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectroscopia de Massas (EM).

## **4.4.2 Ensaio Biológicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.**

### 4.4.2.1 Atividade Antioxidante

#### *4.4.2.1.1 Atividade Sequestradora de Radicais pelo Método do DPPH (66).*

##### - Preparo do Reagente DPPH 0,3mM

Pesou-se cerca de 6,0 mg de 2,2-difenil-1-picrilidrazila e dissolveu-se em 50 mL de metanol. A solução estoque de DPPH, então preparada, foi armazenada em frasco âmbar em ambiente escuro, à temperatura ambiente.

##### - *Preparo dos Extratos, Frações e do Padrão rutina*

Para o preparo dos extratos brutos das cascas, folhas e caule e da fração clorofórmica da casca e do padrão rutina, foi adicionado 100 mL de metanol a 25 mg de cada uma das amostras de maneira a se obter uma concentração final de 250 µg/mL. As soluções foram armazenadas em ambiente escuro, à temperatura ambiente.

Após o preparo destas soluções, procedeu-se a diluição das amostras e do padrão com metanol de modo a obter as concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125 µg/mL.

##### - *Realização do Ensaio de Seqüestro de Radicais DPPH, segundo Sies (66)*

Neste modelo, foram adicionados 1,0 mL de solução metanólica de DPPH 0,3mM a 2,5 mL das soluções metanolicas das amostras e do padrão rutina (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL). As amostras foram mantidas em ambiente escuro e aguardou-se o tempo de 30 minutos para a realização da leitura. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações das amostras e do padrão rutina.

A absorbância das amostras e do padrão foram lidas em comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro UV/Visível Thermo Spectronic (AQA095109).

A capacidade de reduzir o radical DPPH (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a equação 1.

$$\text{(\% Atividade Antioxidante)} = \frac{(\text{A}_{\text{controle}} - \text{A}_{\text{amostra}}) \times 100}{(\text{A}_{\text{controle}})} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$A_{\text{controle}}$ : absorvância da solução de DPPH sem a amostra e o padrão.

$A_{\text{amostra}}$ : absorvância da amostra e do padrão com DPPH.

As médias dos percentuais da atividade antioxidante (%AAO) das amostras e do padrão foram calculadas e o gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante *versus* concentração foi construído para se obter a concentração eficiente em 50% ( $CE_{50}$ ) por regressão linear.

#### 4.4.2.1.2 Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método do Fosfomolibdênio (67).

##### - Preparo da Solução Reagente de Fosfomolibdênio

Para o preparo da solução reagente de fosfomolibdênio foram dissolvidos 247 mg (4mM) de molibdato de amônio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ , 168mg (28mM) de diidrogenofosfafo de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e 1,6 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,6M em volumes iguais de 50 mL de água destilada.

##### - Preparo dos Extratos Brutos das Cascas e Folhas e do Padrão Ácido Ascórbico

Os extratos metanólicos das cascas e folhase do padrão ácido ascórbico foram preparados pela adição de 100 mL de metanol em cada uma das amostras ( $C=250 \mu\text{g/mL}$ ) e armazenadas em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Após o preparo, as amostras foram diluídas em metanol nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50 e 125  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

- *Preparo da Curva Analítica de Calibração de Ácido Ascórbico*

Para a obtenção desta curva analítica, preparou-se uma solução metanólica de ácido ascórbico na concentração de 300µg/mL. A partir desta solução estoque, procedeu-se a diluição com a adição de metanol para fornecer as concentrações de 7,5, 15, 60, 120, 180 e 240µg/mL (Figura 5).

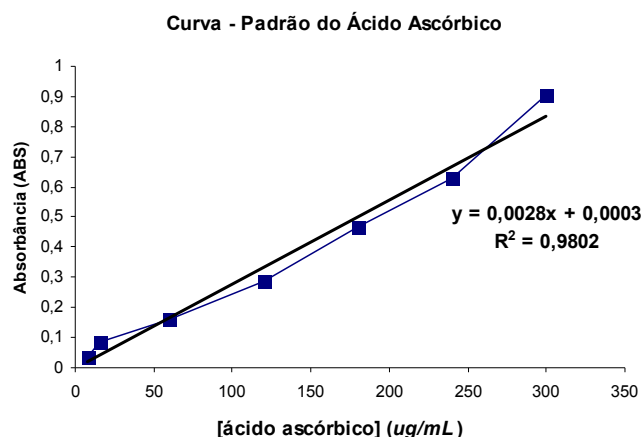


Figura 5 – Curva Analítica de Calibração do Ácido Ascórbico pelo Método do Fosfomolibdênio. (média das absorbâncias; n=3).

- *Realização do Ensaio pelo Método do Fosfomolibdênio, segundo Prieto et al (67)*

A uma alíquota de 0,3 mL da solução contendo os extratos metanólicos das cascas e folhas e o padrão ácido ascórbico, nas diferentes concentrações, foram adicionados 2,7 mL de solução reagente de fosfomolibdênio.

A mistura foi incubada a 95 °C por 90 minutos e, após resfriamento, a leitura da absorbância das amostras e do controle, em triplicata, foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível Thermo Spectronic (AQA095109), no comprimento de onda de 695 nm, em cubeta de quartzo, com 2 cm de caminho óptico.

A capacidade antioxidante total foi expressa em µg de ácido ascórbico/g de extrato.

#### 4.4.2.1.3 Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio (68).

##### - *Preparo da solução reagente de peróxido de hidrogênio 40 mM*

Para o preparo da solução de peróxido de hidrogênio 40 mM, foram dissolvidos 280 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,1 M e pH =7.4.

A solução tampão fosfato 0,1 M, pH=7,4 foi preparada pela mistura de 39,5 mL de diidrogenofosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,1 M com 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M.

##### - *Preparo dos Extratos Brutos das Cascas e Folhas*

Para o preparo dos extratos brutos das cascas, folhas e do ácido ascórbico foram preparadas soluções estoques em metanol na concentração de 250  $\mu$ g/mL (conservadas em ambiente escuro e à temperatura ambiente). A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho, também em metanol (5, 10, 25, 50, 125  $\mu$ g/mL), das amostras e do padrão ácido ascórbico.

##### - *Realização do Ensaio de Varredura do Peróxido de Hidrogênio, segundo Ruch et al (68).*

A uma alíquota de 1,0 mL da solução contendo os extratos brutos da casca e folha e o padrão, nas diferentes concentrações, foi adicionada 0,6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3.4 mL de solução tampão fosfato 0,1M.

As misturas foram incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente e, após este período foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro UV/Visível Thermo Spectronic (AQA095109) ( $\lambda$ = 230nm), em cubeta de quartzo, com 2 cm de caminho óptico. As análises foram feitas em triplicatas.

A capacidade de seqüestrar o radical peróxido de hidrogênio (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a equação 2.



$$(\% \text{ Atividade Antioxidante}) = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{(A_{\text{controle}})} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$A_{\text{controle}}$ : absorvância da solução tampão fosfato adicionado de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$A_{\text{amostra}}$ : absorvância da amostra e do padrão com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

As médias dos percentuais da atividade antioxidante (%AAO) das amostras e do padrão foram calculadas e o gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante *versus* concentração foi construído para se obter a concentração eficiente em 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) por regressão linear.

#### 4.4.2.1.4 Atividade Sequestradora de Radicais Hidroxila (69)

##### - *Preparo da Solução Reagente*

Para o preparo da solução reagente foram dissolvidos 23 mg (1,5 mM) de sulfato ferroso, 320 mg (20mM) de salicilato de sódio e 14  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (40mM) em volumes iguais de 100 mL de tampão fosfato 0,1 M e pH =7,4.

A solução tampão fosfato 0,1 M, pH=7,4 foi preparada pela mistura de 39,5 mL de diidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M com 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M.

##### - *Preparo dos Extratos Brutos das Cascas e Folhas e do Padrão Ácido Ascórbico*

Para o preparo dos extratos brutos das cascas, folhas e do ácido ascórbico foram preparadas soluções estoques em metanol na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  (conservadas em ambiente escuro e à temperatura ambiente). A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho, também em metanol (5, 10, 25, 50, 125  $\mu\text{g/mL}$ ), das amostras e do padrão ácido ascórbico.

- *Realização do Ensaio de Seqüestro de Radicais Hidroxila, segundo Smirnof et al (69).*

A uma alíquota de 1,0 mL da solução contendo os extratos brutos das cascas e folhas e do padrão, nas diferentes concentrações, foram adicionados 1,0 mL de  $\text{FeSO}_4$  (1,5 mM), 0,7 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6mM) e 0,3 mL de salicilato de sódio (20mM). As misturas foram incubadas por 1 hora, à temperatura de 37 °C. As absorvâncias de formação do complexo salicilato-hidroxilado foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível Aquamate (Thermo Spectronic AQA095109), ( $\lambda = 562$  nm). As análises foram feitas em triplicatas.

As médias dos percentuais da atividade antioxidante (%AAO) das amostras e do padrão foram calculadas e o gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante *versus* concentração foi construído para se obter a concentração eficiente em 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) por regressão linear.

#### 4.4.2.1.5 *Determinação do Conteúdo de Flavonoides (70)*

- *Preparo da Solução Reagente*

Preparou-se uma solução aquosa de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5%, cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) monoidratado 10% e hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

- *Preparo dos Extratos Brutos das Cascas e Folhas*

Para a realização do ensaio, foram preparadas soluções metanólicas das cascas (25mg) e folhas (25mg) nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ .

- *Preparo da Curva-Analítica de Calibração da Rutina*

Para a obtenção desta curva analítica, preparou-se uma solução metanólica de rutina na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ . A partir desta solução estoque, procedeu-

se a diluição com a adição de metanol para fornecer as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 6).

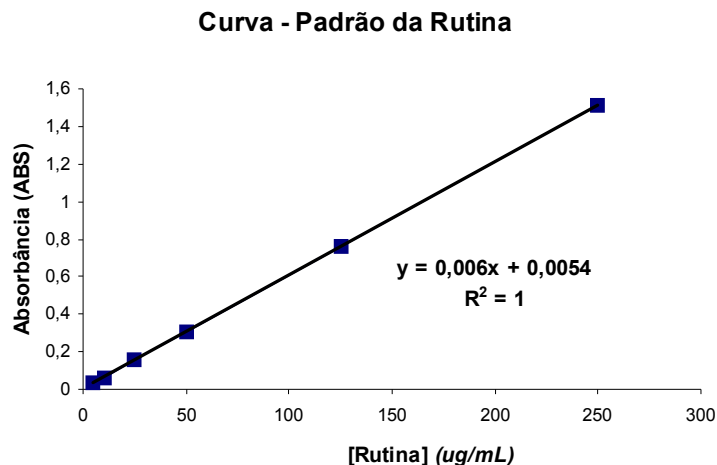


Figura 6 - Curva Analítica de Calibração da Rutina – Determinação do Conteúdo de Flavonoides

- *Realização do Ensaio de Determinação do Conteúdo de Flavonoides*, segundo Jia et al (70).

A uma alíquota de 10 mL dos extratos metanólicos das cascas e folhas foi adicionado 1,0 mL de nitrito de sódio 5%. Aguardou-se o tempo de 6 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de cloreto de alumínio 10% e 10 mL de hidróxido de sódio, de maneira a formar o complexo-flavonoide-alumínio em meio básico.

Aguardou-se o tempo de 15 minutos e a absorvância do complexo alumínio-flavonoide em meio básico foi medida em espectrofotômetro UV/Visível Thermo Spectronic (AQA095109), no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 510 nm. As análises foram feitas em triplicatas.

A partir da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida utilizando-se a equação da curva analítica, calculou-se a concentração em mg de rutina/mg da amostra. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg de rutina/mg da amostra.

#### 4.4.2.1.6 Determinação de Fenóis Totais (Método de Folin – Ciocalteu) (71).

O Ensaio de Determinação de Fenóis Totais (Método de Folin – Ciocalteu) foi realizado no laboratório de Análise Instrumental, da Universidade Católica Dom Bosco, pelo grupo da professora Dra. Simone Palma Fávaro.

##### - *Preparo da Curva-Analítica de Calibração do Ácido Gálico*

Para a obtenção da curva-padrão do ácido gálico, preparou-se uma solução aquosa de ácido gálico e, a partir desta, realizou-se as diluições de modo a fornecer as seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µg/mL (Figura 7).

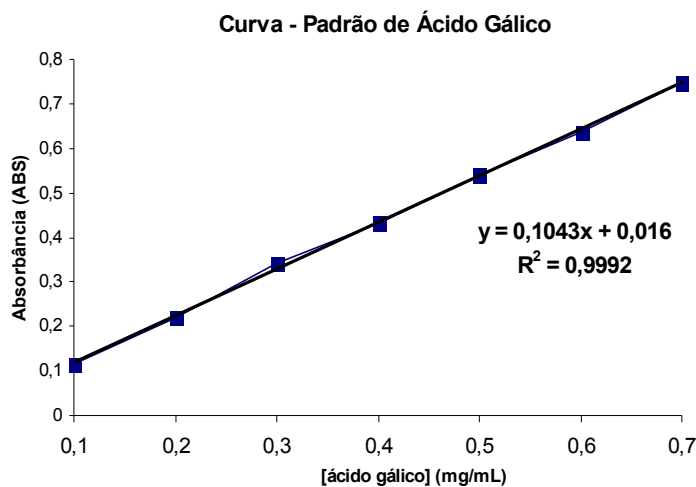


Figura 7 - Curva-Analítica Padrão do Ácido Gálico. Método de Folin-Ciocalteu.

##### - *Realização do Ensaio de Folin Ciocalteu (FC), segundo Slinkard et al (71)*

A uma alíquota de 5,0 mL dos extratos metanólicos das cascas e folhas foram adicionados 5,0 mL do reativo de Folin-Ciocalteu diluído (1:10). A mistura foi mantida em repouso por 8 minutos, em ambiente escuro.

Em seguida, foram acrescentados 4,0 mL de solução de carbonato de sódio 1% .

As amostras foram incubadas à temperatura de 50 °C, por 5 minutos.

As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV/Visível Aquamate (Thermo Spectronic AQA095109), no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 765 nm. As análises foram feitas em triplicatas.

O conteúdo de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico/mg da amostra.

#### *4.4.2.1.7 Análise Estatística dos Ensaios de Atividade Antioxidante*

Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das amostras e dos controles e foram comparados pelo Teste ANOVA pós-teste de Bonferroni, quando  $P < 0,05$ . O programa utilizado foi o BioEstat 5.0.

#### 4.4.2.2 Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada para a detecção de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.

##### *4.4.2.2.1 Preparo da Enzima Acetilcolinesterase (tipo VI-s, liofilizada, 426 U/mg)*

A enzima foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M, pH = 8,0 de maneira a ser obtida uma solução estoque 1000 U/mL.

Posteriormente, a solução estoque foi diluída com tampão fosfato para a obtenção de solução 5 U/mL, concentração definida anteriormente como adequada para o ensaio em CCD.

##### *4.4.2.2.2 Preparo da Solução Reagente de Iodeto de Acetilcolina (ATCI) e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).*

Foram preparadas, em tampão fosfato 0,1M pH=8, soluções de Iodeto de Acetilcolina (ATCI) 1mM e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 1mM. Esta solução foi armazenada até o momento do uso, à temperatura ambiente.

#### 4.4.2.2.3 Realização do Ensaio de Inibição de Acetilcolinesterase, segundo Ellman et al (72) e Ingkaninan et al (73).

Resumidamente, os extratos hexânicos e metanólicos das cascas, folhas e do caule, na concentração de 1 mg/mL, foram dissolvidos em metanol.

Aproximadamente 1,5-2 µL das amostras foram aplicadas nas cromatoplasas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) e eluídas com hexano:acetato de etila (9:1).

A revelação das placas foi feita com solução de DNTB: ATCI 1:1. Em seguida, as cromatoplasas foram pulverizadas com a solução de acetilcolinesterase.

As substâncias que apresentaram ação anticolinesterásica foram aquelas que forneceram, após 5 minutos, manchas brancas sobre fundo amarelado, comparáveis àquela do padrão fisostigmina.

#### 4.4.2.3 Atividade Antibacteriana

##### 4.4.2.3.1 Microrganismos

###### - Gram Positivos

*Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus epidermidis* (LTAT 232) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

###### - Gram Negativos

*Salmonella typhimurium* (ATCC 19430), *Salmonella typhi* (LTVE 987), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27736), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Serratia marcescens* (LTF 658), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterobacter cloacae* (LTKa 159) e *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 49226).

#### 4.4.2.3.2 *Preparo do Inóculo Inicial*

Suspensões bacterianas foram inoculadas em caldo Mueller – Hinton (Acumedia) até atingir uma densidade óptica de 0,5 na Escala de MacFarland.

Uma vez preparados, aguardou-se o tempo de 4 horas até o crescimento e realizou-se a semeadura das bactérias em Ágar Muller Hinton (Acumedia), preparado segundo padrões microbiológicos.

#### 4.4.2.3.3 *Realização do Ensaio de Atividade Antibacteriana, segundo Bauer et al (74).*

Os microrganismos foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton. Em cada placa foram utilizados três discos de papel Watmann nº 2, com diâmetro de 0,6 mm, previamente autoclavados, impregnados com 20 µL das amostras (Concentração = 100 mg/mL).

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C e, após 24 horas, foi avaliada a atividade antibacteriana pela medida do halo de inibição do crescimento bacteriano. Os ensaios foram feitos em triplicatas.

Os controles positivos usados foram discos padrões de tetraciclina (Chemco), cloranfenicol (Chemco), penicilina (Chemco), gentamicina (Chemco) e cefalotina (Chemco). Os veículos usados foram hexano, metanol e clorofórmio.

As medidas dos halos de inibição das amostras e dos controles positivos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e foram comparados pelo Teste ANOVA pós-teste de Bonferroni, quando  $P < 0,05$ . O programa utilizado foi o BioEstat 5.0.

#### 4.4.2.4 *Concentração Mínima Inibitória (CMI)*

Para as amostras que apresentaram atividade antibacteriana pelo Método de Difusão em Agar (75) foi determinada a Concentração Mínima Inibitória.

As amostras foram diluídas em caldo Muller – Hinton (faixa de concentração de 6 a 100 mg/mL) e inoculadas no meio contendo as suspensões padronizadas dos microrganismos, segundo a escala de Macfarland.

As amostras foram incubadas a 37 °C, em estufa bacteriológica, por 24 horas. Após este período, procedeu-se a determinação da CMI que representa a mais

baixa diluição da amostra em teste que conseguiu inibir o crescimento dos microrganismos (75).

As medidas de Concentração Mínima Inibitória foram expressas em média  $\pm$  desvio padrão e foram comparados pelo Teste t de Student. O programa utilizado foi o BioEstat 5.0.

#### 4.4.2.5 Atividade Antimicobacteriana “in vitro”

O Ensaio de Atividade Antimicobacteriana foi realizado na Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Araraquara) pelo grupo da professora Dra. Clarice Queico Leite Fujimura.

##### 4.4.2.5.1 *Microrganismo usado*

Foi usada para a realização da atividade antimicobacteriana, a cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294.

##### 4.4.2.5.2 *Preparo do Inóculo*

Cultura confluenta crescida no meio de Lowestein-Jensen (LJ) da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RvATCC 27294 foi mantida sob refrigeração até o momento do uso.

Para o ensaio foi retirada uma alçada que foi semeada no meio de Middlebrook 7H9 com incubação por 10 dias.

A cultura foi diluída até a turvação correspondente a turvação do tubo 1 da escala de MacFarland e a partir desta, realizada a diluição de 1:25 que foi empregada como suspensão inoculante.

##### 4.4.2.5.3 *Bioensaio de Atividade Antimicobacteriana, segundo Franzblau et al (76)*

Para determinar a atividade antimicobacteriana a partir da solução estoque, as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter concentrações de 4000 a 62,5  $\mu$ g/mL. A atividade foi determinada em triplicata utilizando microplacas



estéreis de 96 poços (Falcon 3072; Recton Dickinson, Lincoln Park, NJ) e o método do Alamar Blue (MABA), segundo Franzblau (78).

A Concentração Mínima Inibitória (CIM) foi definida como a menor concentração da droga capaz de prevenir a alteração de cor do reagente Alamar Blue (Accumed International, Westlake, Ohio) de azul para rosa.

A cor azul no poço foi interpretada como ausência de crescimento da micobactéria e a cor rosa como de viabilidade e multiplicação bacilar.

O Controle Positivo usado foi a Isoniazida (Merck), na concentração de 0,03µg/mL.

#### 4.4.2.6 Atividade Antifúngica

##### 4.4.2.6.1 *Microrganismos usados*

*Trichoderma aureoviridae* CCT 4567, *Candida parapsilosis* CCT 3438, *Mucor hiemalis* CCT 2235, *Rhizopus sp* CCT 3248, *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Penicillium sp* CCT 2147, *Candida parapsilosis* CCT 3438, *Aspergillus fumigatus* CCT 1277, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum* (Hartz) Lang & Miloch URM 4799, *Trichophyton rubrum* ATCC 5202 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533.

##### 4.4.2.6.2 *Preparo do Inóculo*

Suspensões dos microrganismos acima citados foram preparadas de modo a se obter um número aproximado de células iguais a  $5 \cdot 10^4$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias). A contagem de células foi feita nos 4 quadrantes superior esquerdo e direito; inferior esquerdo e direito na Câmara de Neubauer.

Os meios de cultura usados para a semeadura dos fungos foram o Ágar Sabouraud (VETEC) e Ágar Batata-Dextrose (BDA) (VETEC), preparados conforme procedimentos microbiológicos.

#### 4.4.2.6.3 *Ensaio de Atividade Antifúngica – Método de Difusão em Agar, segundo Smania et al (77)*

Os microrganismos foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud e Ágar Batata-Dextrose. Em cada placa foram utilizados três discos de papel Watmann nº2, com diâmetro de 0,6 mm, previamente autoclavados, impregnados com 20 µL das amostras (concentração 100 mg/mL).

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C e, após 24 horas, foi avaliada a atividade antifúngica pela medida do halo de inibição do crescimento bacteriano. Os ensaios foram feitos em triplicatas.

Os controles positivos usados foram os antifúngicos padrões Anfotericina B (CHEMCO), Clotrimazol (CHEMCO), Itraconazol (CHEMCO), Cetoconazol (CHEMCO), Miconazol(CHEMCO) e Nistatina (CHEMCO).

Os veículos usados foram o hexano, metanol e clorofórmio.

#### 4.4.2.7 Atividade Anti-inflamatória

O Ensaio de Atividade Antiinflamatória foi realizado no laboratório de Farmacologia, da Universidade Católica Dom Bosco, pelo grupo da professora Dra. Susana Elisa Moreno.

##### 4.4.2.7.1 *Animais Experimentais*

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6 machos pesando 18-22g, provenientes do biotério da UCDB.

Os animais foram mantidos sob condições de temperatura (23 – 25 °C) e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água.

Os protocolos utilizados para estes experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco (processo número 058/08) (Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética).

#### 4.4.2.7.2 *Pré-tratamentos dos animais com os extratos*

Os camundongos foram pré-tratados com diferentes concentrações dos extratos hexânicos e metanólicos das cascas e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (3%, 5% e 10%) por via subcutânea 15 minutos antes da injeção do estímulo inflamatório.

#### 4.4.2.7.3 *Modelo de Inflamação*

Para avaliar os efeitos antiinflamatórios das amostras foi utilizado o modelo experimental de inflamação de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (78).

#### 4.4.2.7.4 *Modelo de Migração de Neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por Carragenina*

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré - tratados com o veículo ou com as amostras foram avaliadas em intervalos de 6 horas, após a injeção intraperitoneal de 500µg de carragenina.

Os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com 3 mL de PBS/ EDTA K<sub>3</sub> (15%).

A partir do exsudato foram feitas as contagens total e diferencial das células presentes no lavado.

#### 4.4.2.7.5 *Contagem Total de Neutrófilos*

A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como n° de células x 10<sup>6</sup>/ mL.

#### 4.4.2.7.6 *Contagem Diferencial de Neutrófilos*

A contagem diferencial de leucócitos a partir dos exudatos foi feita através do esfregaço em lâminas coradas em corante panótico rápido (Diff Quik).

As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), onde foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares.

A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtida na contagem total.

Os resultados foram expressos como nº de cada tipo celular x  $10^6$ / mL.

#### *4.4.2.7.7 Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão das amostras e dos controles e foram comparados pelo Teste ANOVA pós-teste de Bonferroni, quando  $P < 0,05$ . O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5.0.

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

#### 5.1.1 Análise Qualitativa Preliminar dos Extratos Brutos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. por CLAE – FR

O perfil cromatográfico dos extratos metanólicos das cascas, folhas e caule foram obtidos por CLAE – FR. Esse perfil é denominado de “impressão digital” e tem por objetivo registrar a composição química analítica qualitativa de uma determinada espécie.

Para esta análise foi usada uma eluição exploratória, empregando gradiente de acetonitrila/água como eluente (item 4.4.1.3.2; pág. 41).

Observou-se que, nos cromatogramas, os extratos metanólicos das cascas (Figura 8A), folhas (Figura 8B) e caule (Figura 8C) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. apresentaram perfis cromatográfico semelhantes com o predomínio de picos com tempos de retenção entre 20-30 minutos, correspondentes a substâncias de média polaridade. Os picos, denominados de **62**, **63**, **64** e **65** são comuns aos três extratos.

Os tempos de retenção dos compostos **62**, **63**, **64** e **65** e os espectros de UV obtidos *on line* encontram-se resumidos na Tabela 7 e na Figura 9, respectivamente. 217,8, 250, 290 e 330,4 nm para os picos 1, 3 e 4 e 217,8, 250, 290 e 325,7 para o pico 2.

Compostos	Tempo de Retenção (min)	Dados de UV ( $\lambda$ nm)
<b>62</b>	21,02	217,8, 250, 290 e 330,4
<b>63</b>	23,10	217,8, 250, 290 e 325,7
<b>64</b>	27,14	217,8, 250, 290 e 330,4
<b>65</b>	30,82	217,8, 250, 290 e 330,4

Tabela 7 – Tempos de retenção (em minutos) e máximos de absorção no espectro de UV dos compostos 1, 2, 3 e 4. Condições Cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.1.3.2; pág. 41).

Os espectros no UV obtidos *on line* para os picos majoritários dos cromatogramas, **62**, **63**, **64** e **65** utilizando detector de DAD, sugerem a presença de substâncias fenólicas compatíveis com os derivados fenilpropanoides (Figura 9).

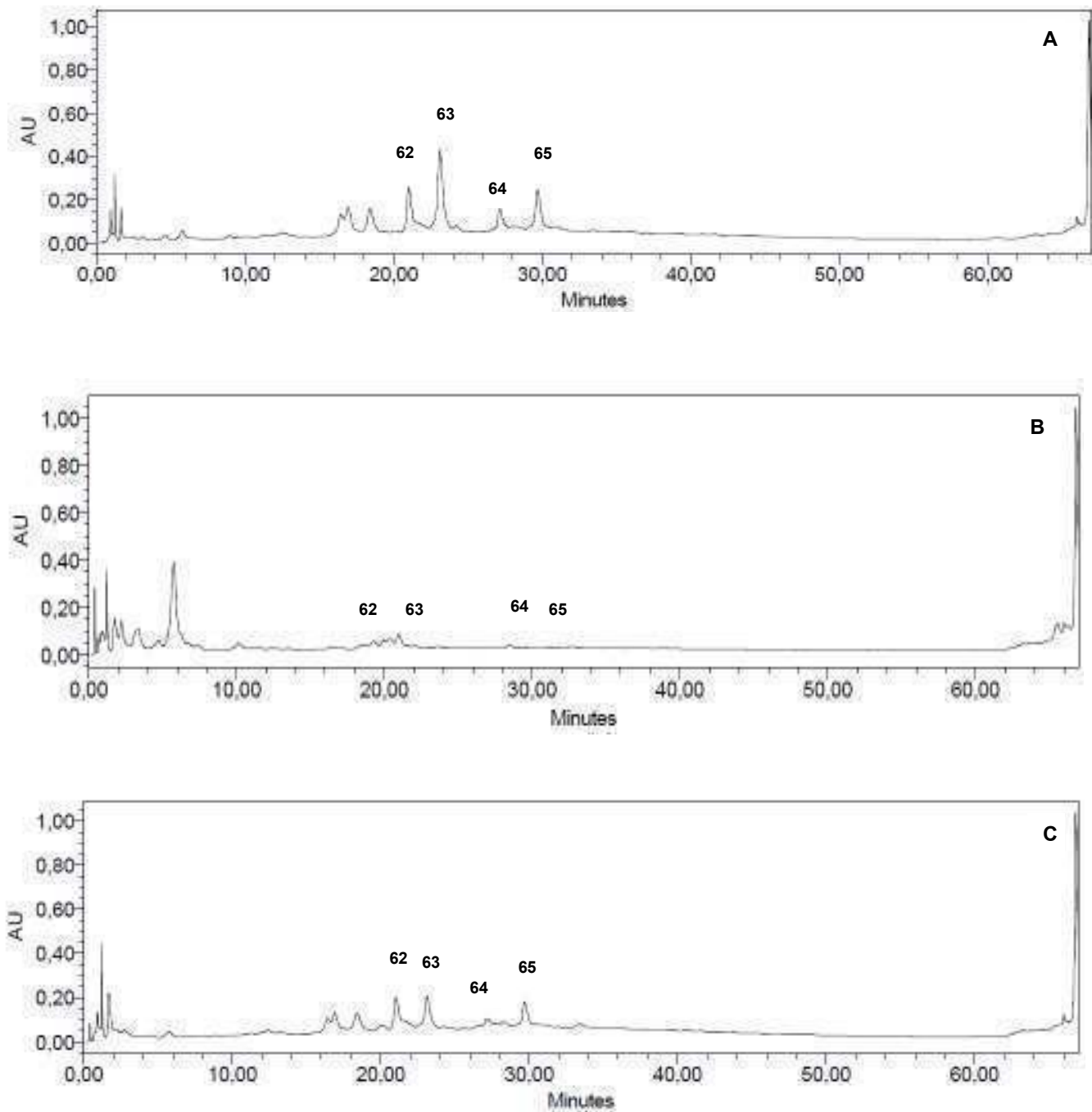


Figura 8 - Cromatogramas dos extratos metanólicos das cascas (A), das folhas (B) e do caule (C), obtido por CLAE-FR. ( $\lambda=210$  nm). Condições Cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.1.3.2; pág. 41).

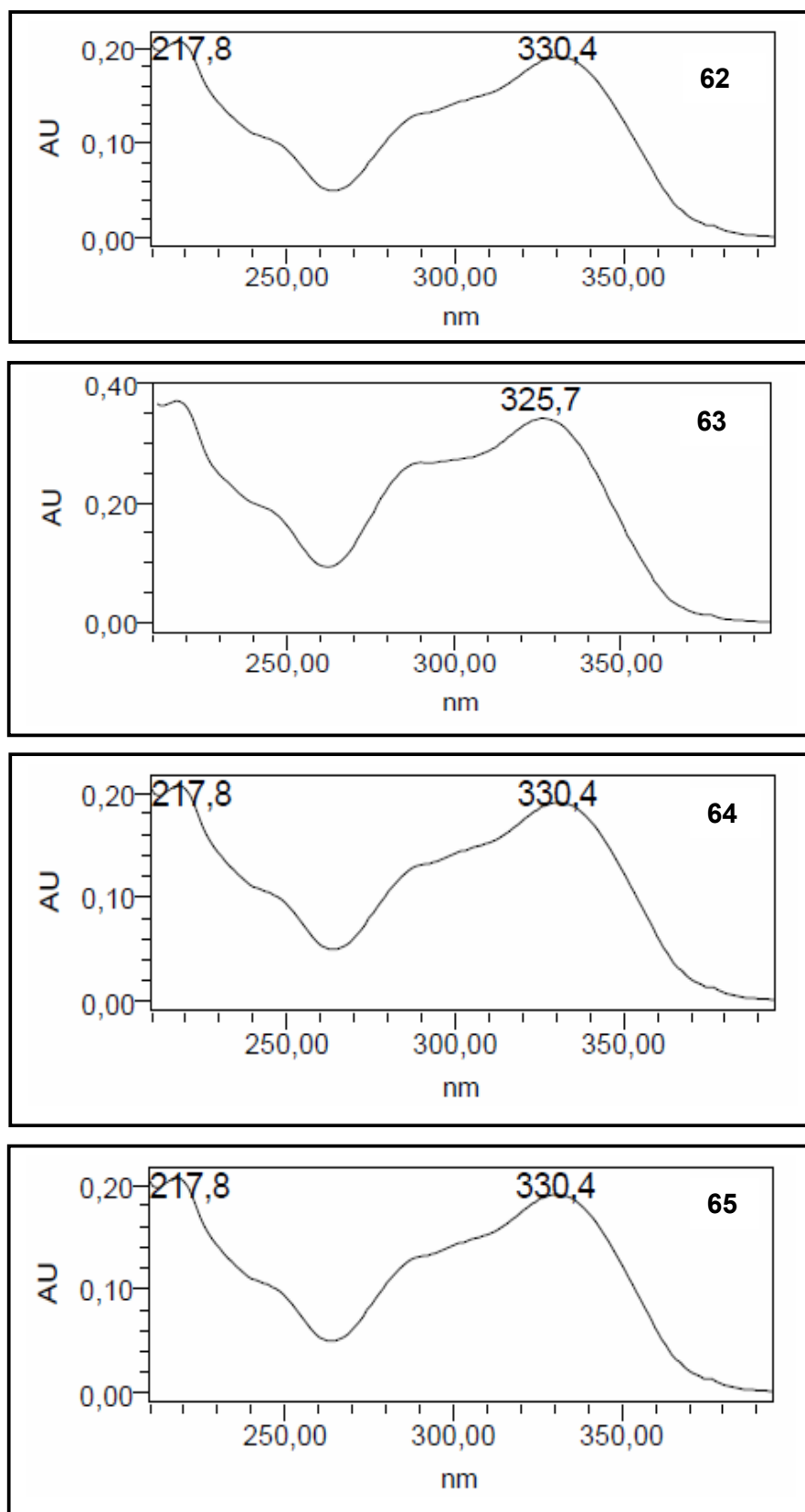


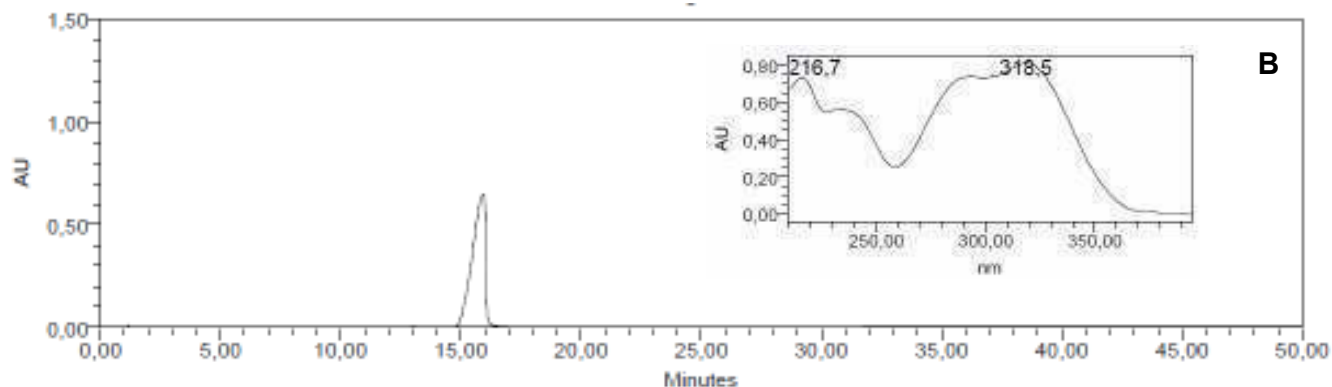
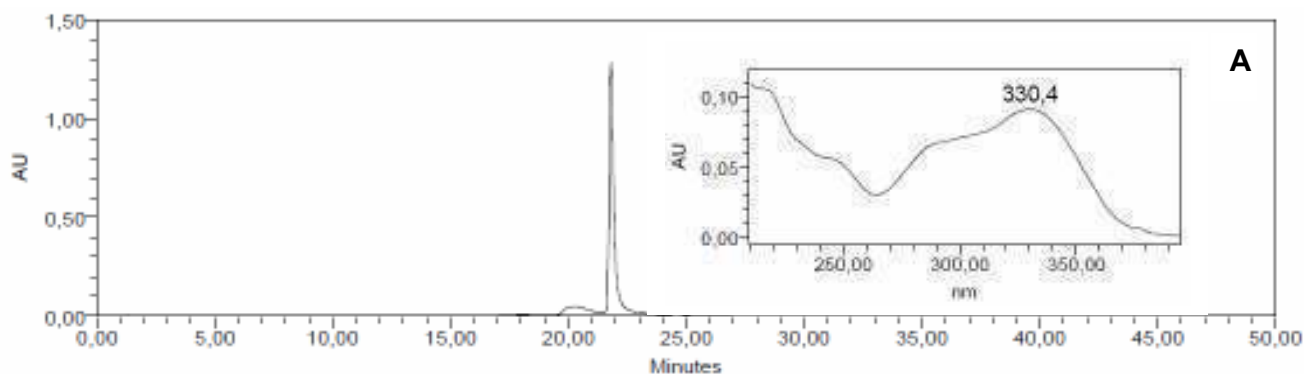
Figura 9 – Espectro de varredura no UV pelo detector de DAD para os picos majoritários (62, 63, 64 e 65) dos cromatogramas dos extratos metanólicos de *J. cuspidifolia* Mart.

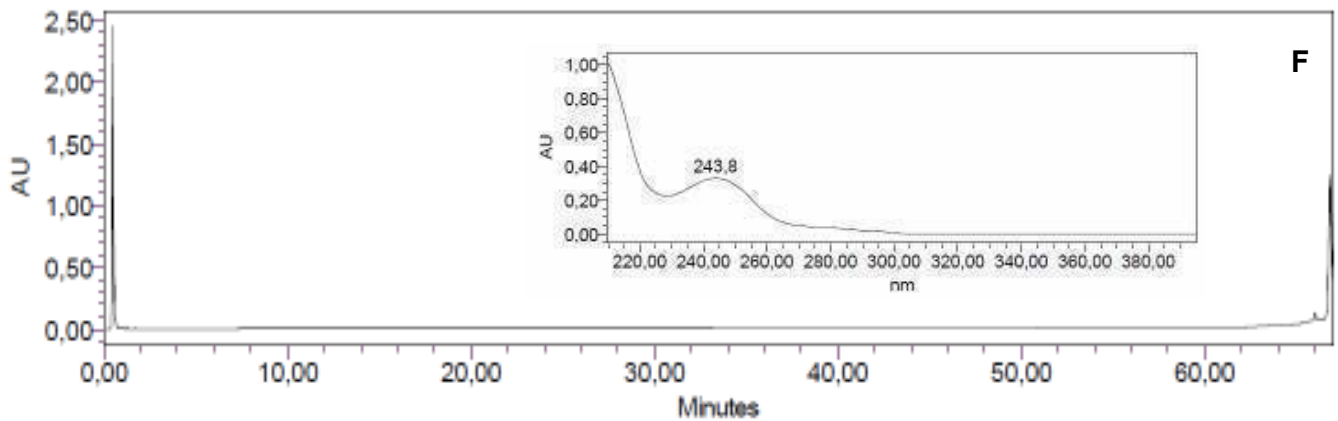
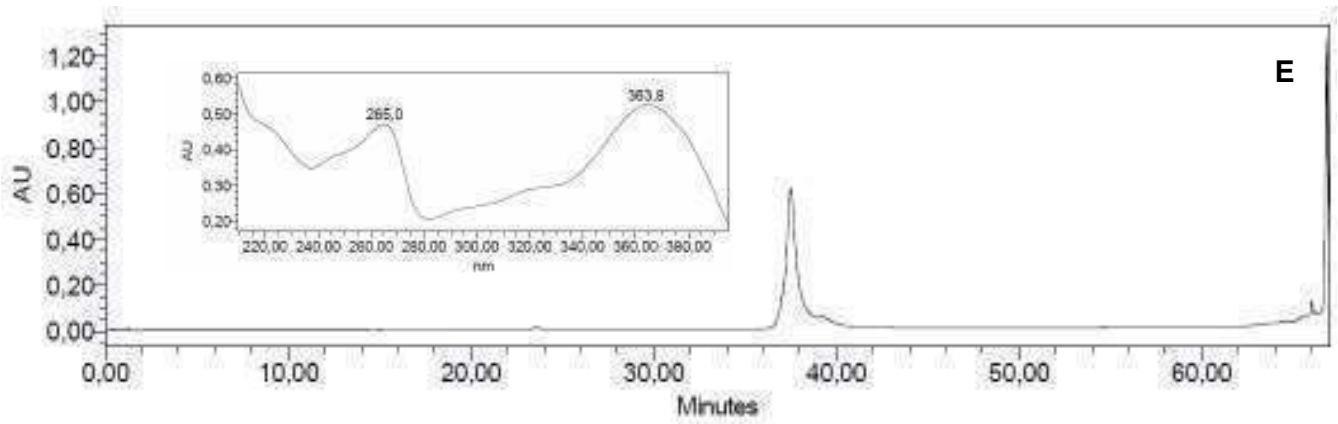
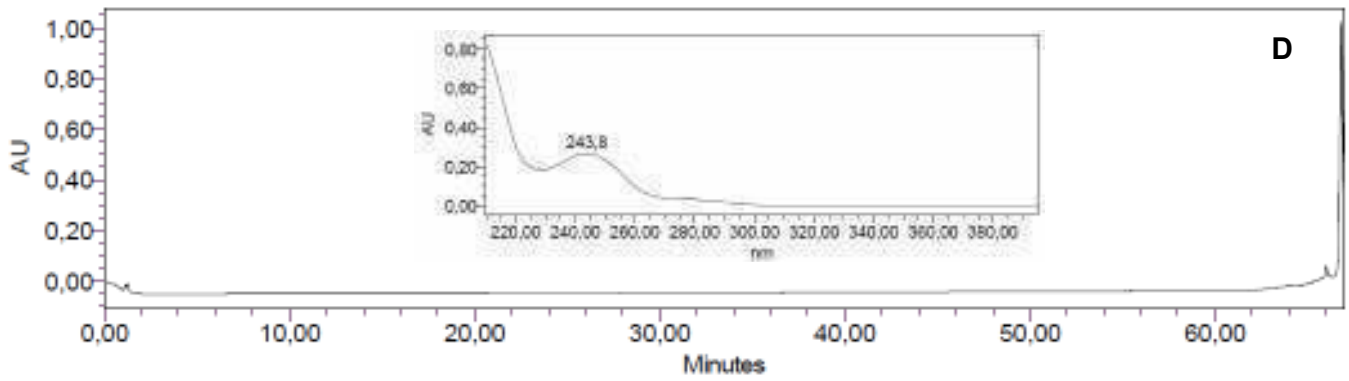
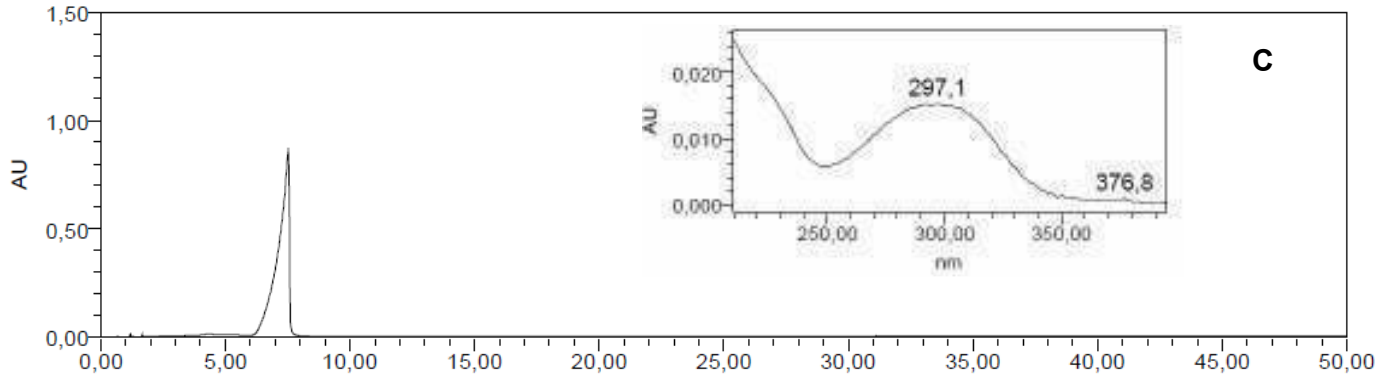


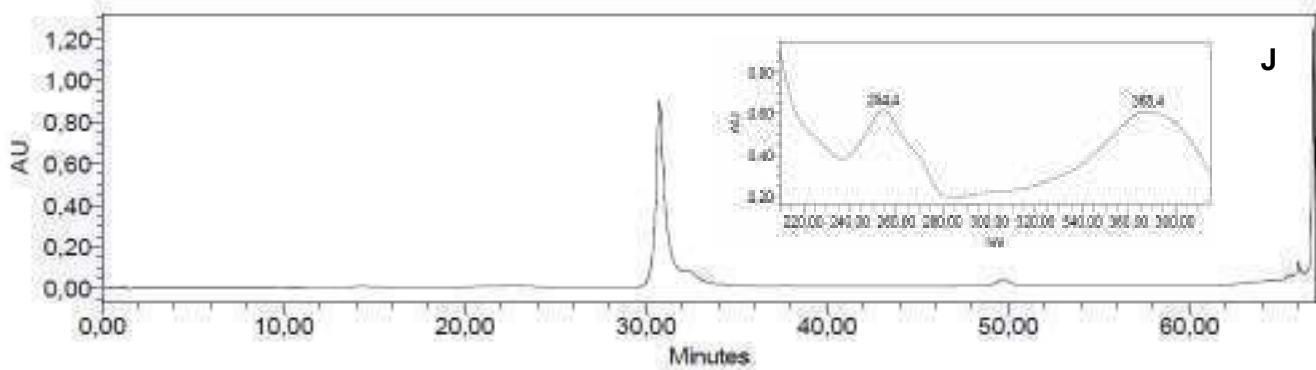
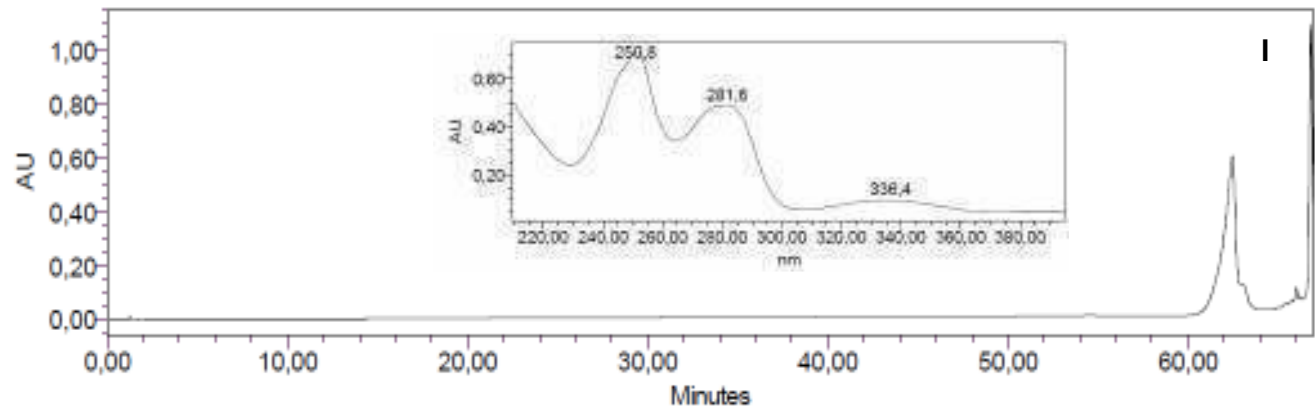
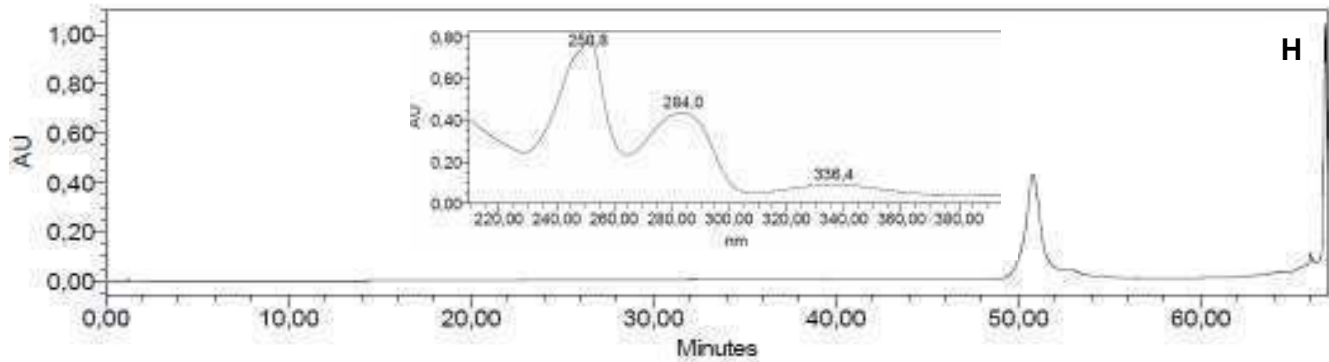
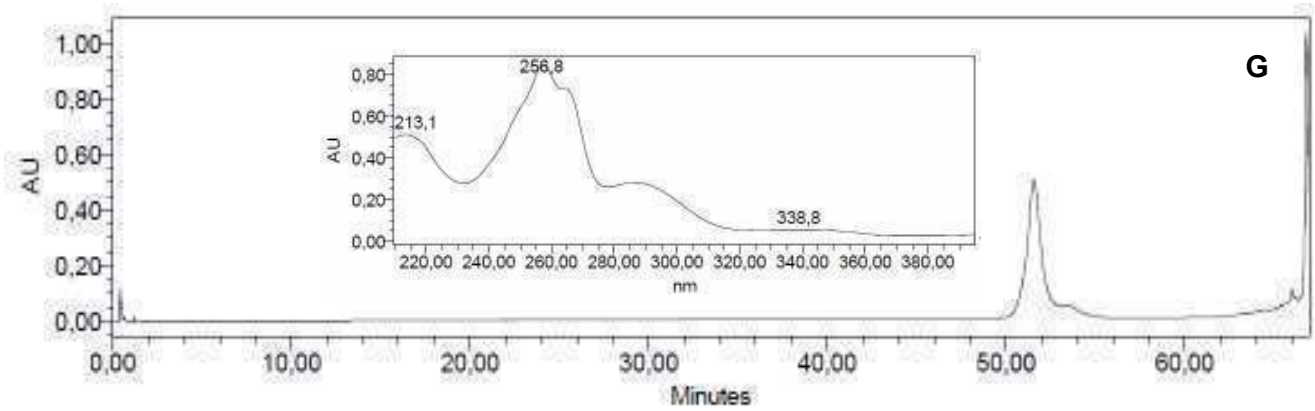
Visando tentar identificar as prováveis substâncias presentes nos extratos brutos foram obtidos perfis cromatográficos, utilizando as mesmas condições cromatográficas dos extratos brutos, com as seguintes substâncias de referência: verbascosídeo, ácido cafeico, ácido ferúlico, kaempferol, quercetina, rutina,  $\beta$ -sitosterol, lupeol,  $\alpha$ -lapachona,  $\beta$ -lapachona e lapachol (Figura 10 A-K).

É importante ressaltar que o pico **62** foi registrado na mesma região do pico padrão do verbascosídeo **66**, com tempo de retenção igual a 21,08 minutos, indicando novamente a possível presença de fenilpropanoides glicosilados derivados do verbascosídeo **66** (Figura 10A).

Os cromatogramas dos extratos metanólicos das cascas, folhas, caule e da fração clorofórmica de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. indicaram ausência de picos correspondentes ao ácido ferúlico (B), ácido cafeico (C),  $\beta$ -sitosterol (D), kaempferol (E), lupeol (F),  $\alpha$ -lapachona (G),  $\beta$ -lapachona (H), lapachol (I), quercetina (J) e rutina (K) (Figura 10 A-K).







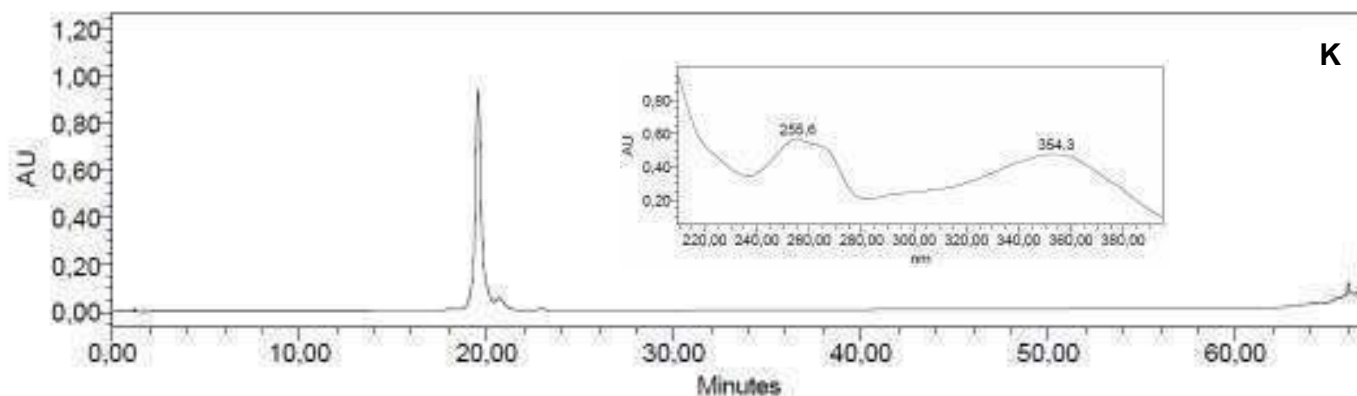


Figura 10- Cromatograma do verbascosídeo (A), ácido ferúlico (B), ácido cafeico (C),  $\beta$ -sitosterol (D), kaempferol (E), lupeol (F),  $\alpha$ -lapachona (G),  $\beta$ -lapachona (H), lapachol (I), quercetina (J), rutina (K) e seus respectivos espectros de UV obtidos *on line* por detector DAD, ( $\lambda=210$  nm). Condições Cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.1.3.2; pág.41).

### 5.1.2. Prospecção Fitoquímica dos Extratos

Os extratos metanólicos brutos das cascas, folhas e caule foram analisados quanto à presença de taninos, flavonoides, antraquinonas, naftoquinonas, antronas, antranóis, terpenos, esteróides, alcalóides e saponinas.

A prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das cascas, caule e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* detectou a presença de taninos, flavonoides, naftoquinonas, antronas, terpenos, esteroides, alcaloides, saponinas, mas não detectou a presença de compostos da classe das antraquinonas (Tabela 8).

Várias classes de substâncias químicas têm sido isoladas de espécies pertencentes à família Bignoniaceae, tais como: ácidos graxos, açúcares, antocianinas, terpenos, alcalóides, taninos, flavonoides, lignanas, compostos fenólicos e iridoides (41).

Assim, os resultados da prospecção fitoquímica obtidos para os extratos metanólicos das cascas, caule e folhas de *J. cuspidifolia* vêm corroborar os dados já descritos na literatura para a família Bignoniaceae.

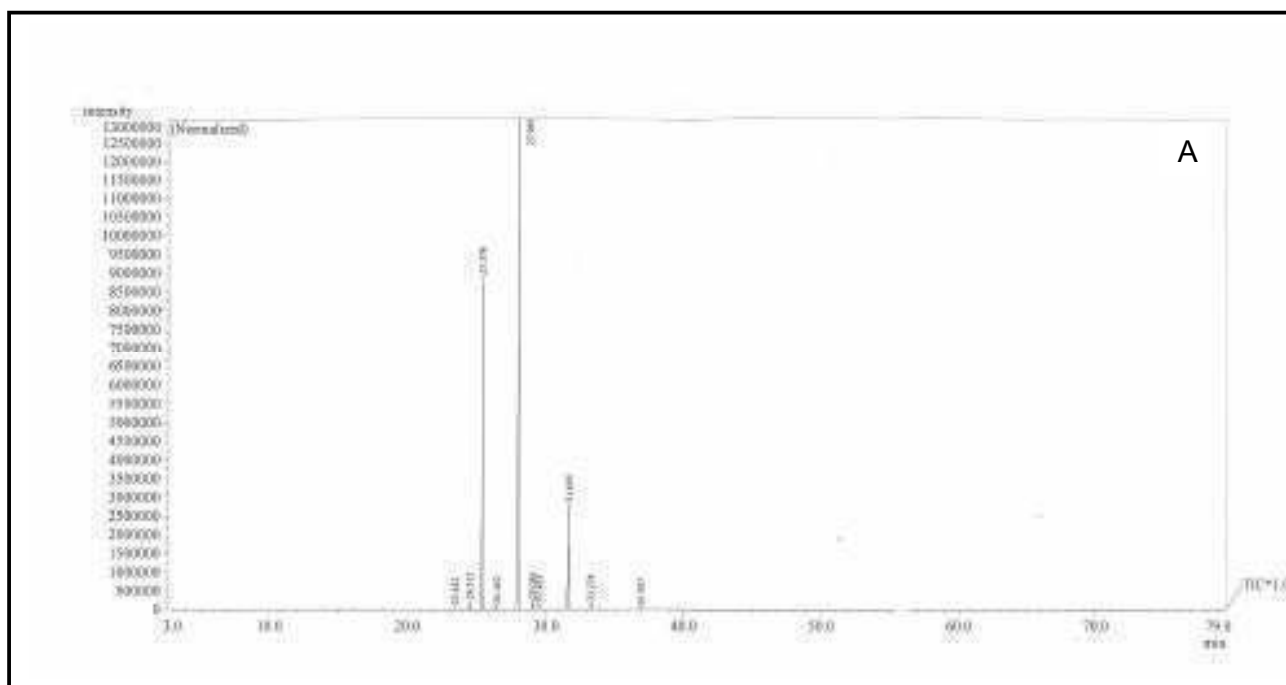
Classes de Substâncias	Extrato Metanólico da Casca	Extrato Metanólico da Folha	Extrato Metanólico do Caule
Taninos	+	+	+
Flavonóides	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-
Naftoquinonas	+	+	+
Antronas	+	+	+
Terpenos	+	+	+
Esteróides	+	+	+
Alcalóides	+	+	+
Saponinas	+	+	+

Tabela 8 – Prospecção Fitoquímica dos Extratos Metanólicos das cascas, folhas e caule de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (+) presença; (-) ausência

### 5.1.3 Identificação de substâncias presentes no extrato hexânico das folhas (EHF) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

A partir do fracionamento do extrato hexânico da folha por cromatografia em coluna de sílica gel, obteve-se uma mistura de hidrocarbonetos, que se apresentou como um sólido branco e oleoso (16 mg) solúvel em hexano e diclorometano puro.

A análise da fração hexano-diclorometano do extrato hexânico das folhas de *J. cuspidifolia* por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas permitiu a identificação de uma série homóloga de hidrocarbonetos saturados, com 15, 17 e 20 átomos de carbono em diferentes proporções (Tabela 9, Figuras 11 A e B).



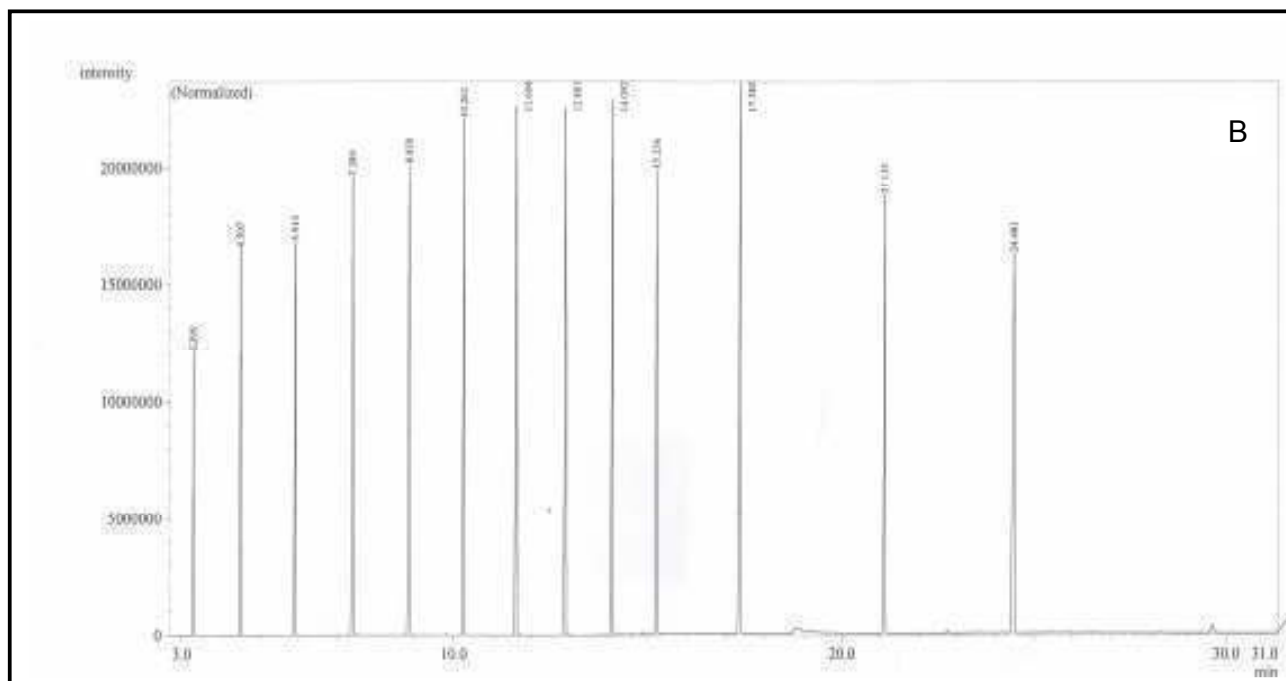


Figura 11 – Cromatograma da mistura de hidrocarbonetos isolados do extrato hexânico das folhas *J. cuspidifolia* (A) e da mistura de hidrocarbonetos utilizados para a construção da curva analítica de calibração (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.1.6, pág.44).

A identificação das substâncias foi realizada pela análise do padrão de fragmentação dos espectros de massas de cada substância da mistura de hidrocarbonetos. Caracteristicamente esses espectros mostraram fragmentações com decréscimo de 14 u.m.a. (Figuras 12 A, B e C).

Além disso, a identificação foi realizada pela comparação dos respectivos espectros de massas com o banco de dados do CG/MS (Computer databank of National Institute for Standard Technology–NIST–62,235 compounds) e com dados da literatura científica (79).

Como não foi possível a obtenção do pico do íon molecular, para a confirmação da identidade dos hidrocarbonetos presentes na mistura, construiu-se uma curva analítica de calibração com uma série homóloga de hidrocarbonetos de C-9 a C-26, (Tr x nº de átomos de carbono), nas mesmas condições da análise da mistura de hidrocarboneto, cuja equação da reta é  $y = 1,2216x - 7,1854$  e o  $R^2 = 0,99$  (Figura 11A e B).

Nº de átomos de carbono	TR	Porcentagem (%)	<i>m/z</i> Sinal base	M <sup>+</sup>
15	25,37	19,26	43	-
17	27,98	55,74	43	-
20	31,69	19,30	43	-

Tabela 9 – Hidrocarbonetos da fração hexano-diclorometano do Extrato Hexânico das folhas de *J. cuspidifolia*.

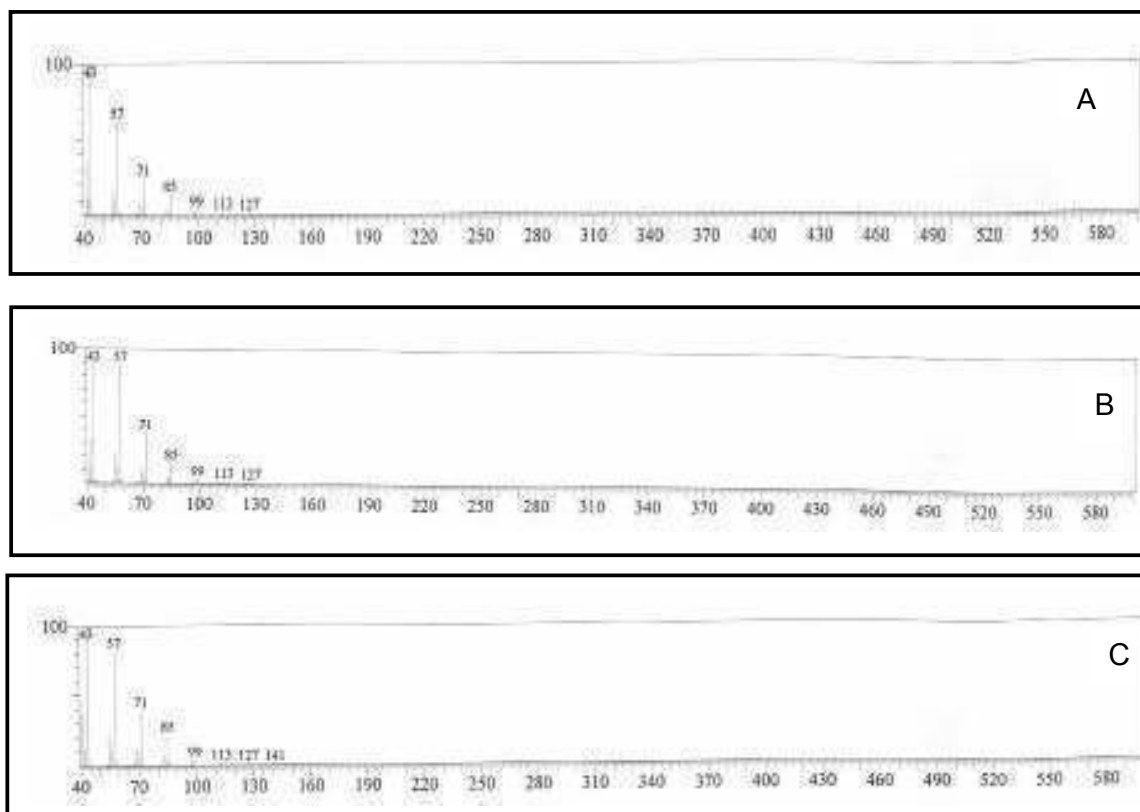


Figura 12 – Espectros de massa da mistura de hidrocarbonetos de 15C (A), 17C (B) e 20C (C).

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> – 200MHz) do sólido mostrou na região de  $\delta_H$  0,60 a 2,3 uma grande quantidade de sinais atribuídos aos hidrogênios metílicos e metilênicos da cadeia alifática dos hidrocarbonetos (Figura 13).

No espectro de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> – 75MHz) foram observados os seguintes sinais: em  $\delta$ 14,05 atribuídos aos carbonos metílicos e em  $\delta$  31,88, 29,65, 29,32 e 22,64 atribuídos aos carbonos metilênicos (Figura 14).

No espectro de DEPT 135 foram observados sinais característicos em  $\delta$  14,54 equivalentes aos carbonos metílicos e em  $\delta$  23,12, 29,80, 30,14 e 32,36 atribuídos aos carbonos metilênicos (Figura 15).

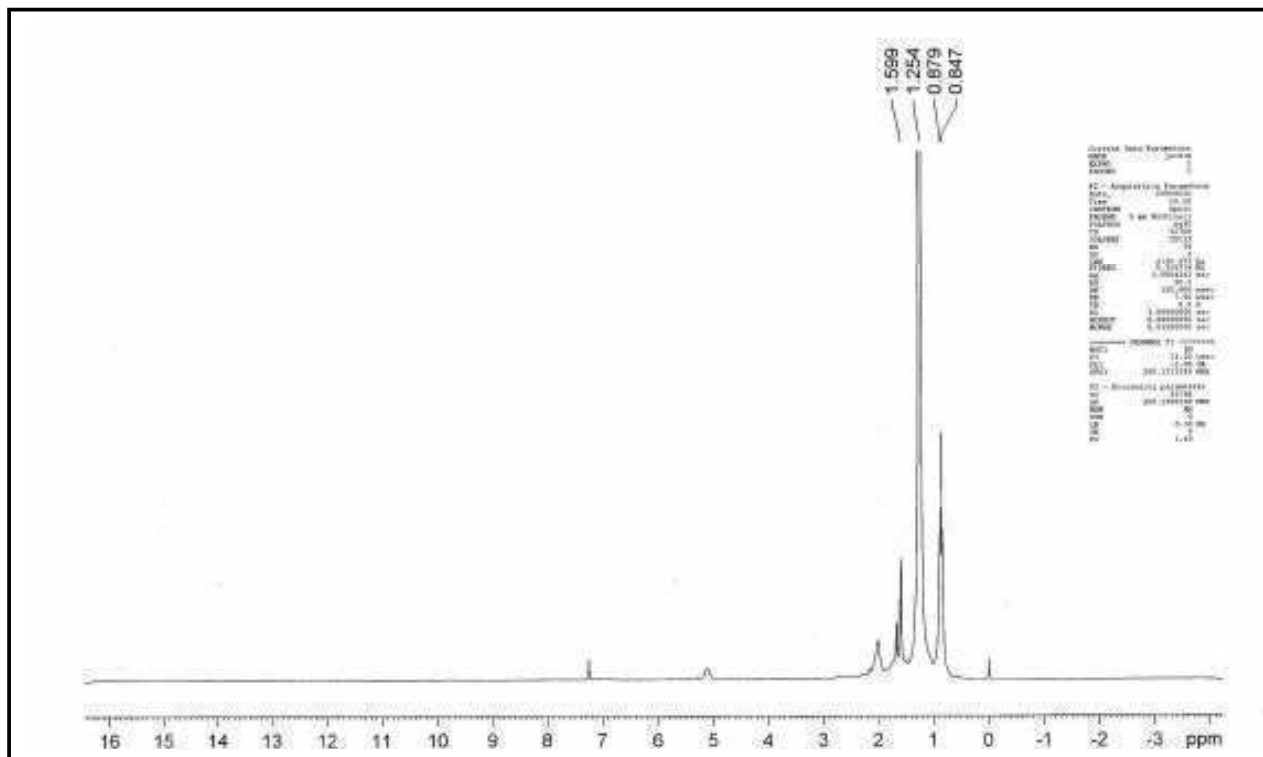


Figura 13 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H da mistura de hidrocarbonetos (CDCl<sub>3</sub> – 200MHz).

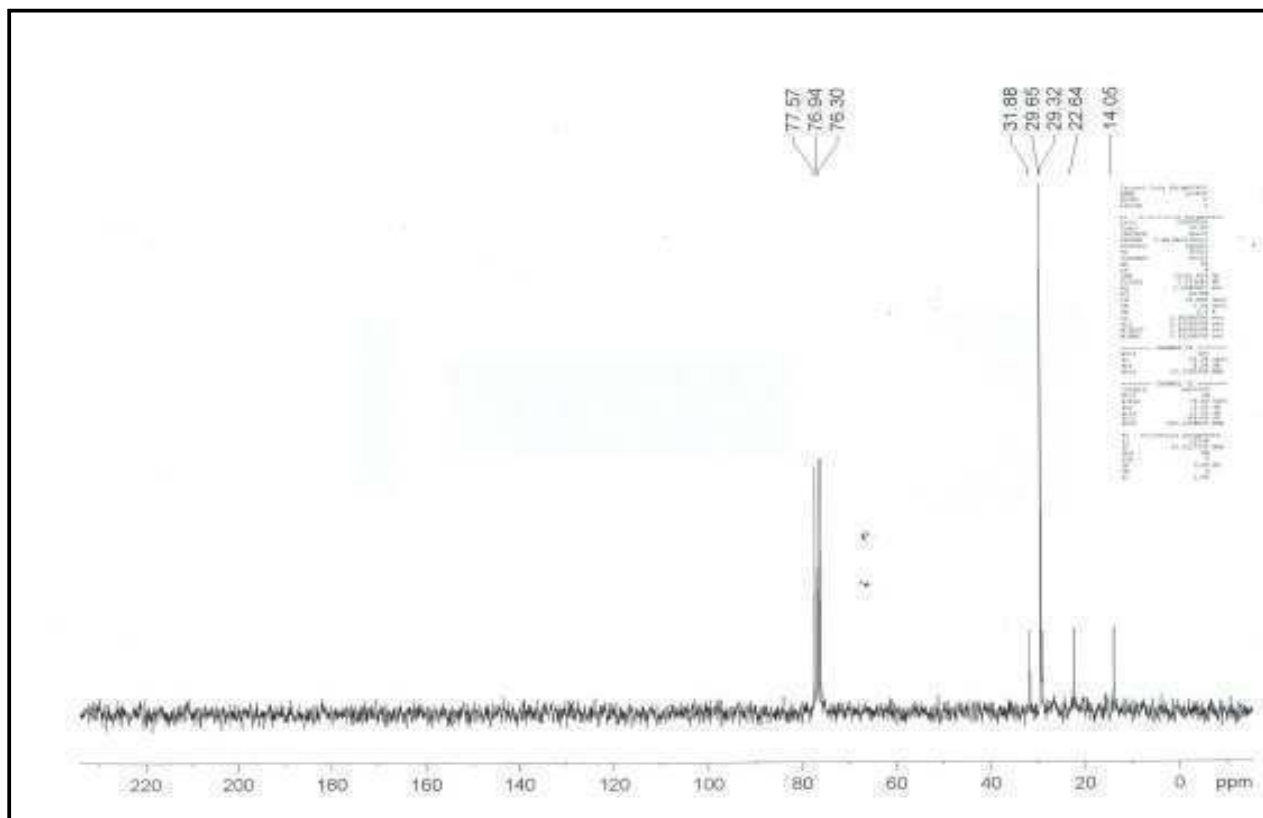


Figura 14 - Espectro de RMN<sup>13</sup>C da mistura de hidrocarbonetos (CDCl<sub>3</sub> – 200MHz).



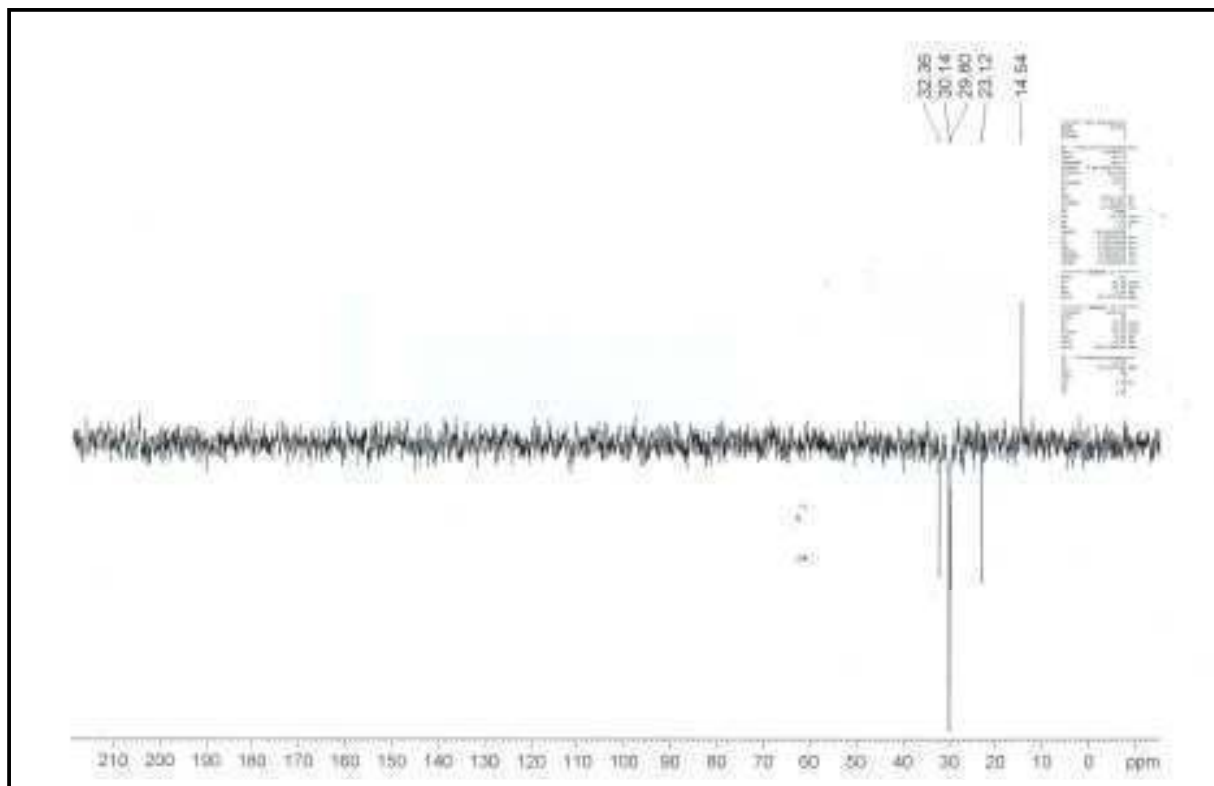


Figura 15 – DEPT 135 da mistura de hidrocarbonetos ( $\text{CDCl}_3$  – 200MHz).

Os hidrocarbonetos com número ímpar de átomos de carbonos foram identificados em maior concentração na fração hexano-diclorometano do extrato hexano das folhas de *Jacaranda cuspidifolia* (75%), sendo o heptadecano a substância majoritária (55,74%).

## 5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO OBTIDA DO EXTRATO DA CASCA DE *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

### 5.2.1 Análise da Fração Clorofórmica da Casca de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. por CLAE - FR Semi-Preparativa

A partir das análises obtidas por CLAE-FR dos extratos brutos observou-se que os picos, denominados **62**, **63**, **64** e **65** são majoritários e comuns aos extratos metanólicos da casca, do caule e das folhas de *J. cuspidifolia* (Figura 8 A-C, p.64) e que no extrato metanólico da casca esses picos apresentam uma maior área. Portanto, optou-se por isolar essas substâncias desse órgão vegetal.

Na análise por CLAE, a quantidade de substâncias presente nos extratos é diretamente proporcional área dos picos nos cromatogramas. Assim, observou-se que as substâncias **62**, **63**, **64** e **65**, consideradas polares, no extrato metanólico da folha, apresentou menor área quando comparado ao extrato metanólico do caule e da casca.

Com o objetivo de pré purificar o extrato metanólico da casca, o mesmo foi dissolvido em uma mistura de metanol:água (1:1) e, em seguida, foi fracionado com hexano, seguido de clorofórmio, resultando nas frações hexânica, clorofórmica e aquosa.

O perfil da fração clorofórmica das cascas mostrou a predominância de 4 picos, com tempos de retenção de 21,02 (**62**), 23,10 (**63**), 27,14 (**64**), 30,82 (**65**) min. (Figura 16). Os espectros de ultravioleta obtidos *on line* para esses picos indicaram absorção em comprimento de onda similar e na faixa de 217,8, 250, 290 e 330,4 nm para os picos (**62**), (**64**) e (**65**) e na faixa de 217,8, 250, 290 e 325,7 nm para o pico (**63**) (Figura 17).

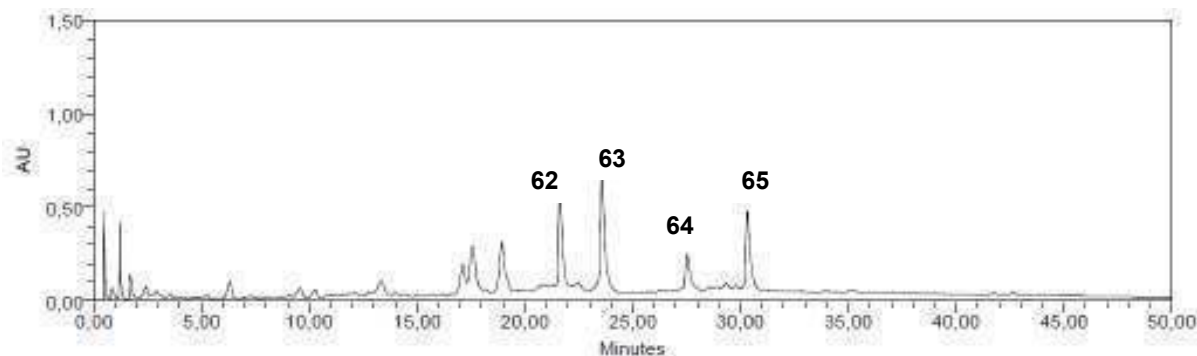


Figura 16 - Cromatogramas da fração clorofórmica das cascas de *J. cuspidifolia* Mart. obtidos por CLAE-FR, ( $\lambda=210$  nm). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.1.5; p.43).

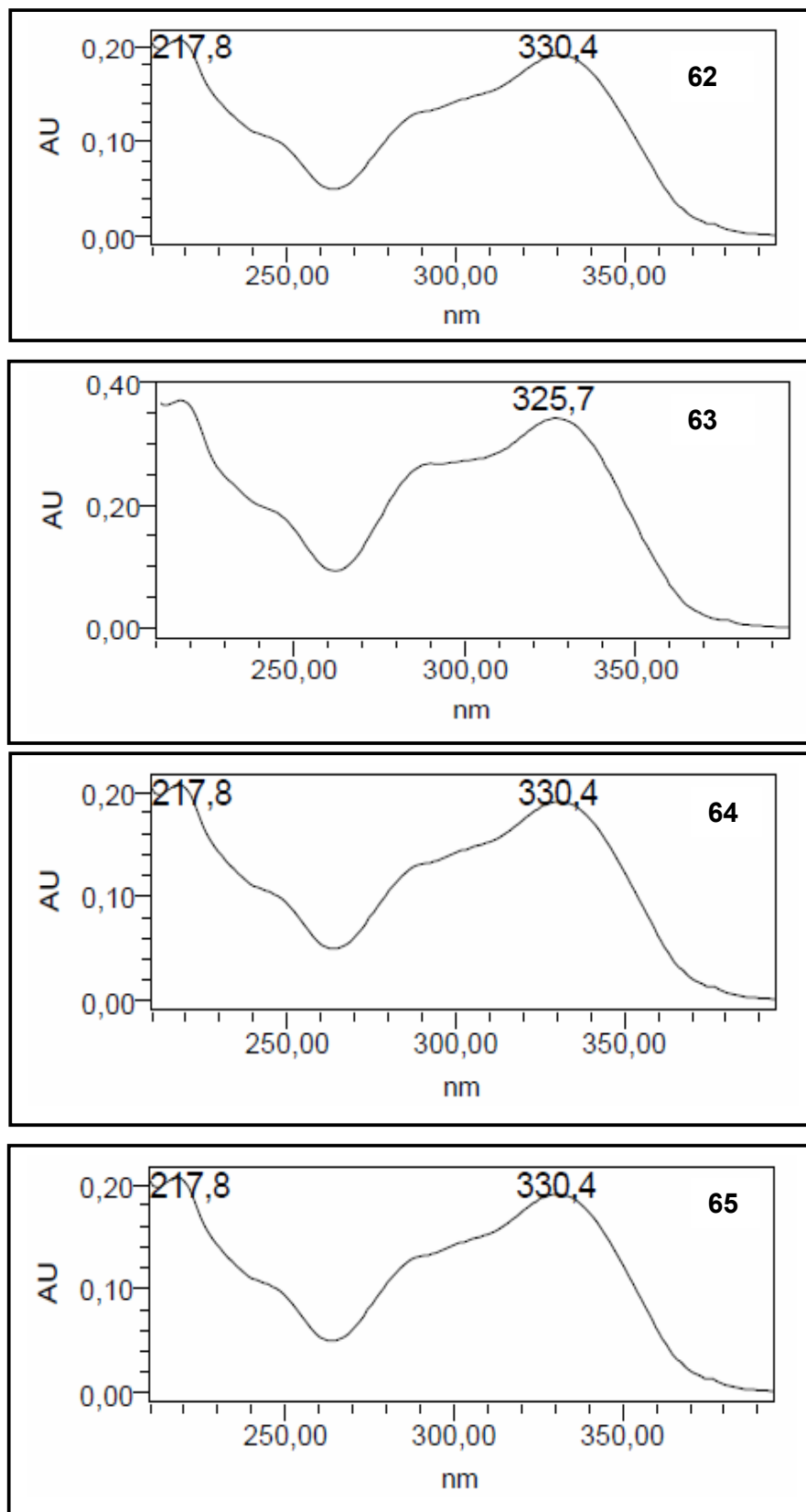


Figura 17 – Espectro de varredura no UV pelo detector de DAD para os picos majoritários (62, 63, 64 e 65) dos cromatogramas da fração clorofórmica da casca de *J cuspidifolia* Mart.

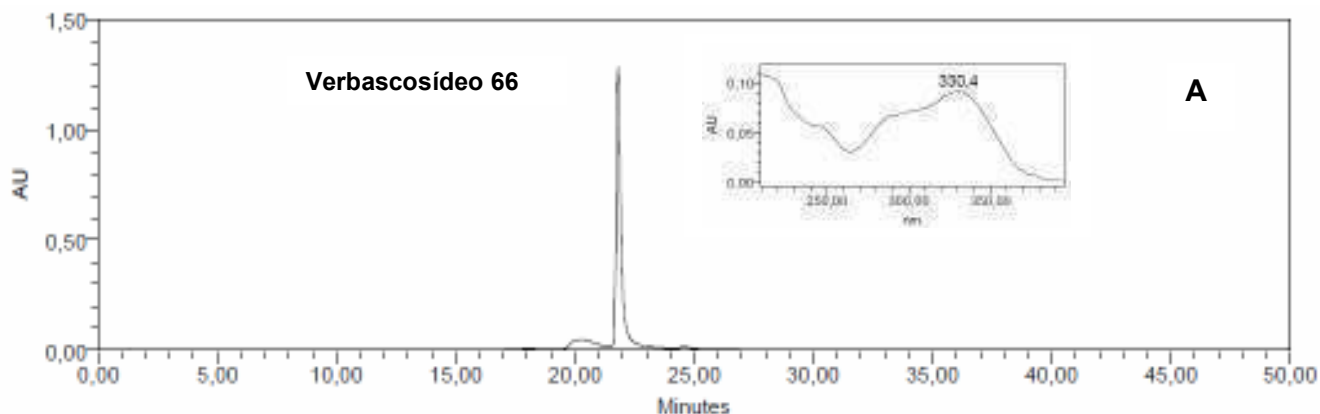
Estes comprimentos de onda são compatíveis com fenilpropanoides glicosilados. O Verbascosídeo **66** foi analisado como composto de referência nas mesmas condições dos extratos (Figura 10A; pág.66).

Seu cromatograma apresentou pico com tempo de retenção de 21,80 min e espectro no ultravioleta com comprimento de onda máximo de 217,8, 250, 290 e 330,4 nm, levando à conclusão que as principais substâncias presentes na fração clorofórmica das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* pertencem a essa classe.

### 5.2.2 Identificação da fração referente ao pico 62 por co-injeção com padrão de verbascosídeo 66 em CLAE-FR.

A co-injeção confirmou que a substância **62** é o verbascosídeo **66**, pois como pode ser observado no cromatograma mostrado na Figura 16, registrou-se um pico majoritário com tempo de retenção aproximado de 23,871 min (área aproximada de 72% do cromatograma). Além disso, os espectros no UV obtidos *on line* também são iguais, apresentando os mesmos máximos de absorção (Figura 18).

O sistema de eluição utilizado foi água e acetonitrila adicionados de ácido fosfórico a 1%. Por esta razão, os tempos de retenção obtidos das substâncias isoladas foram diferentes dos tempos de retenção dos extratos.



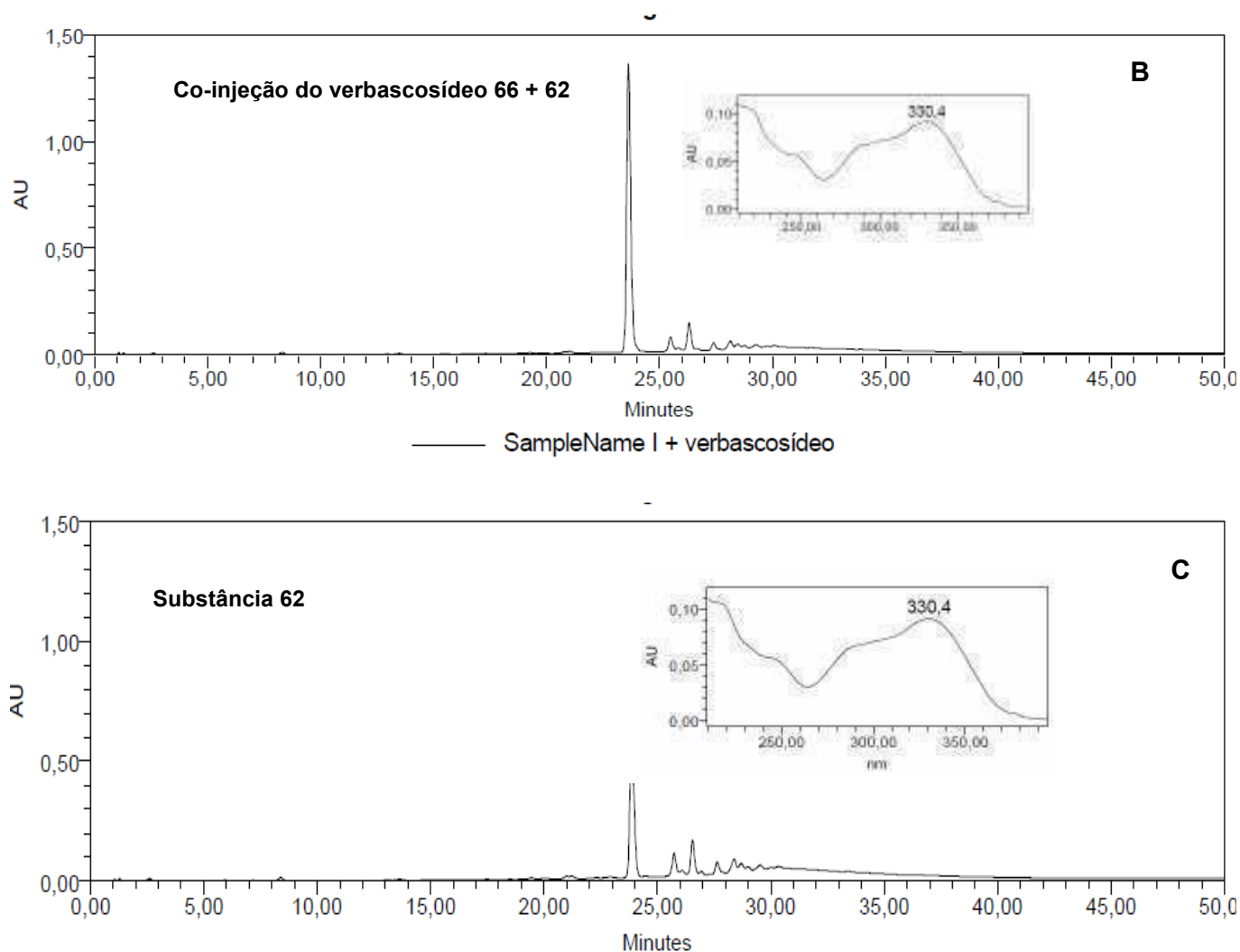


Figura 18 – Cromatograma do verbascosídeo 66 (A), da co-injeção substância 62 e verbascosídeo (B) e da substância 62 (C), ( $\lambda=210$  nm). Condições Cromatográficas: Sistemas de eluição: água/acetonitrila adicionada de ácido fosfórico 1%. Espectros no UV obtidos *on line*. Vide parte experimental (4.4.1.5; p.43).

Contudo, os dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC, HMQC e IV obtidos para a substância **62** não foram conclusivos, tornando difícil a caracterização deste composto. A confirmação da substância **62** ser o verbascosídeo foi feita pela co-injeção com o padrão do verbascosídeo **66**. (Figura 18, p.77).

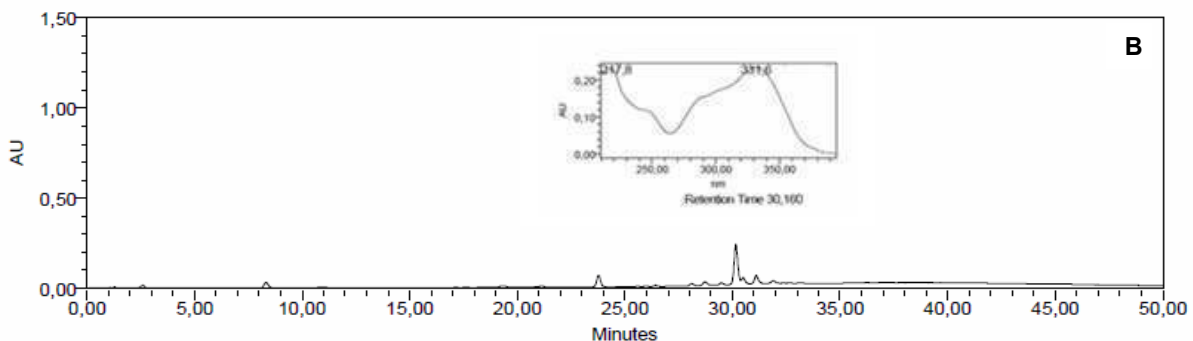
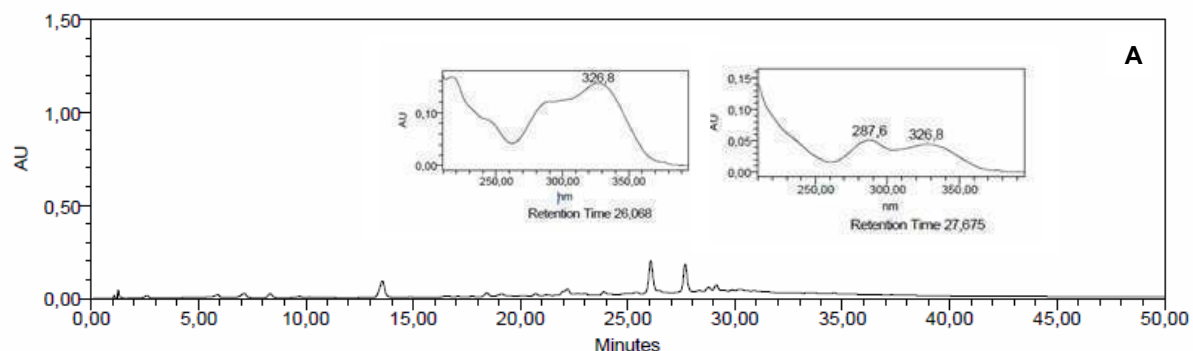
### 5.2.3 Análise Cromatográfica das Frações referentes aos picos 63, 64 e 65

A análise do cromatograma das substâncias isoladas denominadas **63**, **64** e **65**, referentes aos picos **63**, **64** e **65** da fração clorofórmica das cascas de *J. cuspidifolia* mostrou que não houve o isolamento da substância **63**, pois o cromatograma apresentou dois picos principais com tempo de retenção de 26,068 min e 27,675 min (área aproximada dos dois picos com 80 % do cromatograma) (Figura 19 A).

Já o cromatograma da substância **64** mostrou um pico predominante com tempo de retenção de 30,160 min com área aproximada de 13% do cromatograma (Figura 19B).

O cromatograma da substância **65** apresentou quatro picos com tempo de retenção de 23,556, 25,385, 26,184 e 32,968 min (Figura 19C).

Os cromatogramas obtidos *on line* mostram que todas as substâncias são derivadas de fenilpropanóides glicosilados, como o verbascosídeo (Figura 10A).



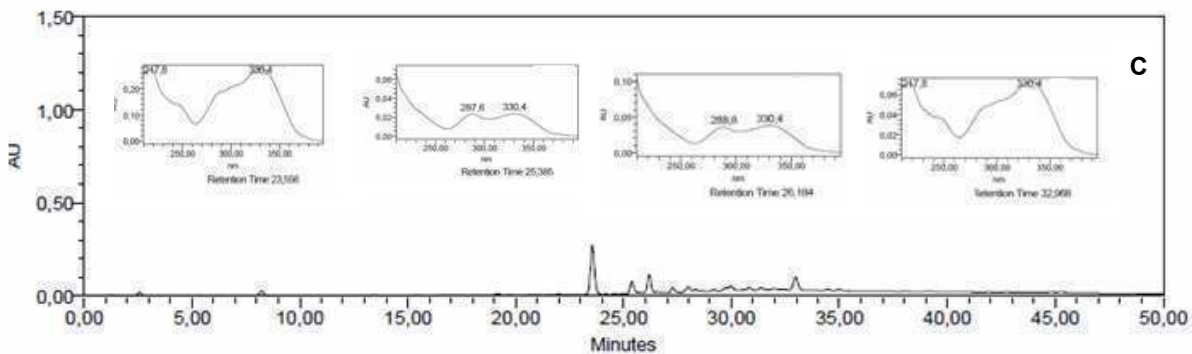


Figura 19 - Cromatogramas das substâncias 2 (A), 3 (B) e 4 (C) da fração clorofórmica da casca de *J. cuspidifolia*, obtido por CLAE-FR, ( $\lambda=210$  nm). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.4.4.5; p.43). Espectros no UV obtidos *on line*.

Não foi possível a elucidação estrutural das substâncias referentes às frações 63, 64 e 65 devido à baixa concentração das amostras e ao baixo grau de pureza.

### 5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 5.3.1 Atividade Antioxidante

Radicais livres referem-se aos átomos ou moléculas altamente reativos que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. São formados em um cenário de reações de oxidação-redução, isto é, ou cedem elétrons solitários, oxidando-se, ou recebem outros, reduzindo-se (80). Fisiologicamente, estas espécies são originadas na produção de adenosina trifosfato (ATP), considerada a maior fonte de energia química de bactérias, plantas e animais (81, 82).

As reações dos processos metabólicos, muitas vezes, geram substâncias químicas ERO (espécies reativas de oxigênio). Frequentemente, este termo é usado não somente para designar radicais livres derivados do oxigênio molecular, como, por exemplo, o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), radical peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ) e o radical alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ) como também serve para designar outras espécies derivadas do oxigênio que não são radicais livres, como é o caso do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), do ozônio ( $O_3$ ) e do oxigênio singleto.

Uma outra forma popular usada para designar estas espécies reativas é o termo oxidante (81) (Quadro 1).

Radicais	Não – radicais
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ),	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ),	HClO (Ácido hipocloroso)
Hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ),	HBrO (Ácido hipobromoso)
Peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Alcoxila ( $RO^{\cdot}$ )	Oxigênio singleto

Quadro 1 – Principais espécies reativas do oxigênio (ERO) citadas na literatura. Adaptado de Seifriz (81).

Nos organismos aeróbicos, a geração de ERO e as prováveis modificações oxidativas de biomoléculas (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos) são inevitáveis. Geralmente em pequenas quantidades, estas espécies estão envolvidas em importantes funções fisiológicas, porém, quando produzidas em excesso podem



estar relacionadas a uma série de patologias como inflamações, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes melitus, dentre outras (81-85).

O termo estresse oxidativo é usado em circunstâncias nas quais os radicais livres ocasionam um dano tecidual ou produzem compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Neste caso, pode-se dizer que um organismo encontra-se em estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes. Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lípídica da membrana celular. Além disso, os radicais podem gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (86).

As reações de eliminação de radicais livres não são favorecidas em condições fisiológicas normais, devido às suas baixas concentrações. Assim, a principal forma de eliminação destas espécies reativas depende da ação de compostos denominados antioxidantes (87).

Antioxidantes podem ser definidos como uma família heterogênea de moléculas naturais que, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegem, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (88).

Os antioxidantes enzimáticos considerados como linha de frente da defesa antioxidante são as superóxidos dismutases, as catalases e as glutationas peroxidases. Além destes, devem ser incluídas as vitaminas A, C e E, os produtos naturais (flavonoides, carotenoides e outros polifenóis) e os produtos sintéticos Trolox e N-acetilcisteína (88).

No organismo, os antioxidantes agem por diversos mecanismos. Dentre estes podem ser citados: a complexação com íons metálicos, a captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares (88).

Os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes e atribui-se esta característica ao processo evolutivo destas espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação UV necessária à fotossíntese (89). Assim, os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais,

sendo a maioria de seus efeitos biologicamente ativos derivados de suas funções antioxidantes (90, 91).

Existem vários modelos experimentais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de determinado composto ou mistura, por meio dos diferentes mecanismos que podem, por sua vez e resguardadas as suas limitações, serem extrapolados para o meio biológico. Não existe um único ensaio que possa avaliar a capacidade oxidante total de uma determinada amostra (92).

Dessa forma, os extratos brutos e frações de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. foram avaliados por 4 métodos diferentes: (i) atividade sequestradora de radicais DPPH; (ii) capacidade total antioxidante pelo método do fosfomolibdênio; (iii) Ensaio de Varredura do Peróxido de Hidrogênio e (iv) Atividade Sequestradora de Radicais Hidroxila.

#### 5.3.1.1 Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante de produtos naturais consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) **61**, de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), o DPPH<sup>•</sup> é reduzido formando o 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPH - H), de coloração amarela (Figura 20), com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (88,93).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de remanescente no meio reacional (88,93).

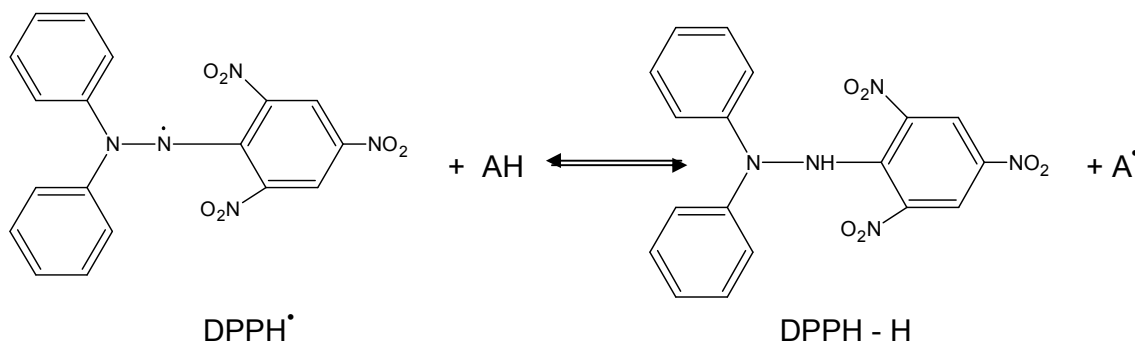


Figura 20 – Reação química entre a substância antioxidante (AH) e o radical DPPH<sup>•</sup> (93).

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (% AAO) dos extratos brutos e da fração CH<sub>3</sub>Cl de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. e do controle rotina, em concentrações que variaram de 5 a 250 µg/mL determinadas pelo método do DPPH, estão apresentados no gráfico 1.

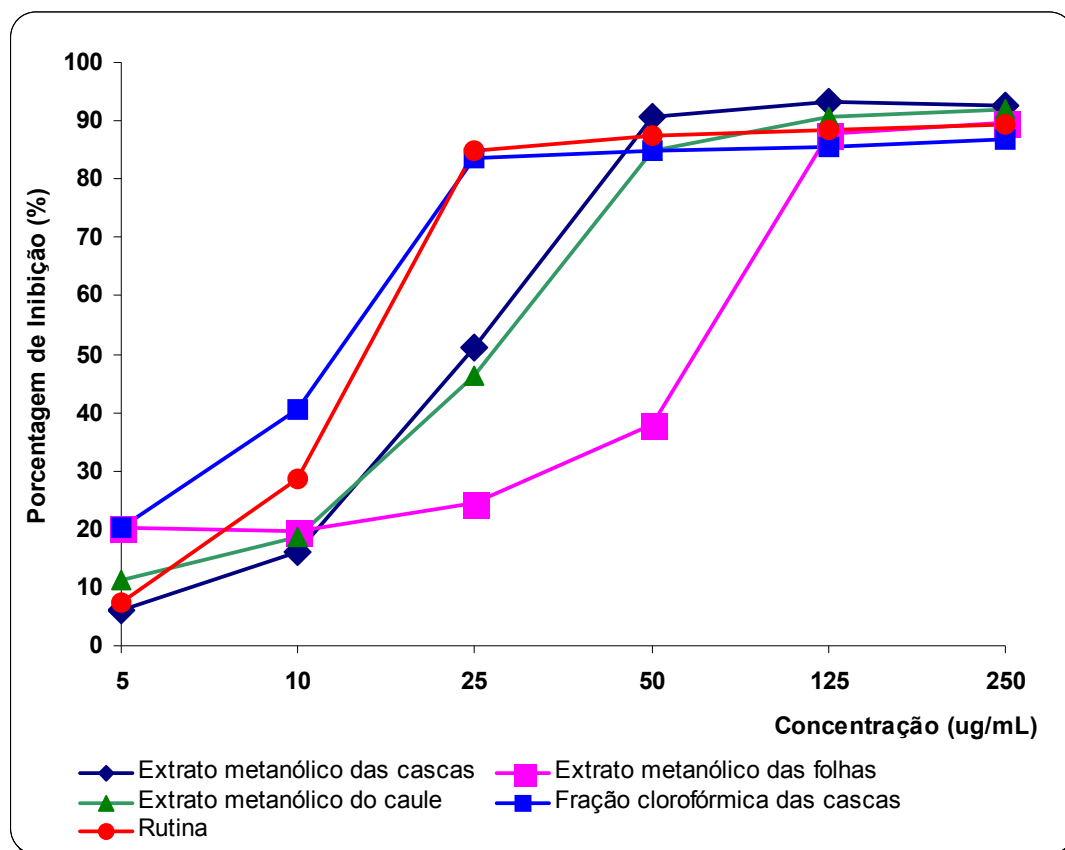


Gráfico 1 - Porcentagem de atividade antioxidante do extrato metanólico das cascas em comparação com o controle rotina. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n=3; P<0,05).

De acordo com o gráfico 1 (Tabela 10), verificou-se uma relação entre a porcentagem de inibição do radical livre DPPH<sup>•</sup> dos extratos metanólicos e da fração *versus* a sua concentração em µg/mL. Pode-se observar que houve uma diferença significativa em termos percentuais de inibição radicalar dos extratos e da fração entre a concentração de 5 a 250 µg/mL em relação à rotina (P<0,05).

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	5	10	25	50	125	250
EMC	6,08 $\pm$ 0,06*	15,96 $\pm$ 0,06*	51,24 $\pm$ 0,33*	90,79 $\pm$ 0,13*	93,19 $\pm$ 0,17*	92,69 $\pm$ 0,33*
EMF	20,41 $\pm$ 0,08*	19,52 $\pm$ 0,49*	24,52 $\pm$ 0,02*	38,09 $\pm$ 0,34*	87,92 $\pm$ 0,35*	89,81 $\pm$ 0,09*
EMCa	11,25 $\pm$ 0,16*	18,65 $\pm$ 0,04*	46,46 $\pm$ 0,22*	84,89 $\pm$ 0,06*	90,73 $\pm$ 0,25*	91,98 $\pm$ 0,12*
FClorC	20,10 $\pm$ 0,12*	40,62 $\pm$ 0,02*	83,59 $\pm$ 0,08*	84,73 $\pm$ 0,02*	85,40 $\pm$ 0,10*	86,73 $\pm$ 0,26*
Rutina	7,53 $\pm$ 0,01	28,68 $\pm$ 0,08	84,85 $\pm$ 0,33	87,50 $\pm$ 0,10	88,50 $\pm$ 0,10	89,48 $\pm$ 0,16

Tabela 10 – Porcentagem de inibição (%) radicalar pelo Método do DPPH do extrato metanólico das cascas (EMC), das folhas (EMF), dos caules (EMCa), da fração clorofórmica das cascas (FClorC) em comparação com o padrão rutina. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n=3; \*P<0,05).

Também foi observado um aumento da atividade antioxidante à medida que as concentrações foram aumentadas, sendo considerada dose-dependente. Portanto, todos os extratos brutos e a fração clorofórmica da casca foram capazes de sequestrar os radicais livres DPPH•, indicado pelo grau de descoloração (cor amarela) do extrato.

Um extrato que apresentar alto potencial em sequestrar radicais livres é aquele que possui baixo valor de concentração eficaz ( $CE_{50}$ ), que pode ser definida como a quantidade de antioxidante capaz de diminuir a concentração inicial do DPPH em 50% (94).

Assim, os menores valores de  $CE_{50}$  foram obtidos para a fração clorofórmica seguida do extrato metanólico da casca, do caule e, por último das folhas (Figura 21) (Tabela 11).

Os valores em triplicatas de  $CE_{50}$  da fração e dos extratos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e com pós-teste de Bonferroni. Com esta análise observou-se que as médias de  $CE_{50}$  foram estatisticamente diferentes do padrão rutina (P<0,05).

Amostras	$CE_{50}$ (M $\pm$ DP)
FClorC	14,1 $\pm$ 0,1
EMC	50,1 $\pm$ 0,1
EMCa	58,3 $\pm$ 0,1
EMF	87,5 $\pm$ 0,3
Rutina	82,4 $\pm$ 0,1

Tabela 11 – Valores de  $CE_{50}$  para a fração clorofórmica das cascas (FClorC), extratos metanólicos das cascas (EMC), caules (EMCa), folhas (EMF) e rutina (padrão). Os resultados de  $CE_{50}$  foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

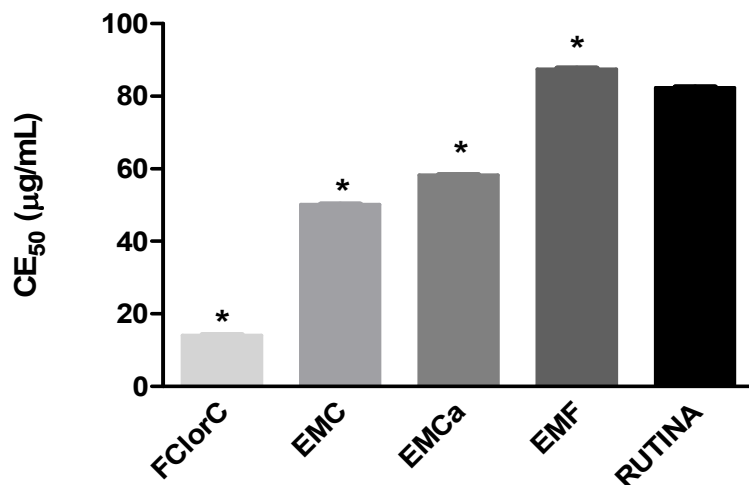


Figura 21 – Valores de CE<sub>50</sub> referentes à fração clorofórmica das cascas (FClorC) e aos extratos metanólicos das cascas (EMC), dos caules (EMCa) e das folhas (EMF) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. comparados à rutina (padrão) obtidos pelo método do DPPH. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (n=3, \*P<0.05 vs rutina).

Os extratos hexânicos das cascas, caules e folhas não apresentaram atividade antioxidante, nas concentrações testadas.

#### 5.3.1.2 Atividade Antioxidante pelo Método do Fosfomolibdênio.

A capacidade antioxidante de uma substância pode ser determinada pelo Método do Fosfomolibdênio, segundo Prieto (67).

O Fundamento deste método reside na redução em meio ácido, do molibdênio VI (Mo)<sup>6+</sup> de cor amarelada em solução, formando um complexo de cor azul, cuja intensidade é diretamente proporcional à extensão da redução do molibdato (95, 96).

O molibdênio VI (Mo)<sup>6+</sup> não existe em solução; ocorre como íon molibdato [MoO<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>. O mecanismo proposto por Shukor (95, 96) envolve a formação de fosfomolibdato como uma espécie intermediária entre molibdato e o complexo (azul de molibdênio). A formação do intermediário é favorecida pelo pH baixo da solução e a presença de íons fosfato. Sob tais condições (meio ácido), os íons molibdato podem combinar entre si formando poliíons, tais como, [Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>]<sup>6-</sup>, [Mo<sub>8</sub>O<sub>26</sub>]<sup>4-</sup> e

$[\text{Mo}_{12}\text{O}_{37}]^{2-}$ . Esses íons então, na presença de agentes redutores, podem ser reduzidos formando o complexo azul de isopolimolibdênio.

Assim, os extratos metanólicos das cascas e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. foram capazes de reduzir os poliíons  $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}]$ ,  $[\text{Mo}_8\text{O}_{26}^{4-}]$  e  $[\text{Mo}_{12}\text{O}_{37}^{2-}]$ , formando o complexo azul de isopolimolibdênio, com valores de absorvância lidas em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 695 nm.

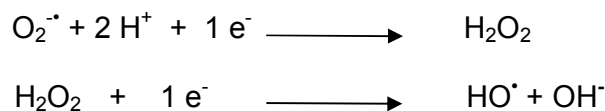
O ácido ascórbico (substância de referência) foi usado para se calcular a capacidade antioxidante em  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico/g de amostra.

O valor encontrado para o extrato metanólico das cascas em  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico/g de extrato foi de  $32262,7 \pm 612,18$  e o valor para o extrato metanólico das folhas foi de  $120347,2 \pm 114,31$ .

Os extratos hexânicos das cascas e folhas não apresentaram atividade antioxidante, enquanto que os extratos hexânicos e metanólicos do caule e a fração clorofórmica da casca não foram testados.

### 5.3.1.3 Atividade Antioxidante pelo Método de Varredura pelo Peróxido de Hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é uma molécula biologicamente importante, produzida pela reação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) por meio da reação de dismutação. Apesar de não ser considerado um radical livre, trata-se de um metabólito derivado do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que forma o radical hidroxila (81) (Quadro 2).



Quadro 2 – Reação de formação do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (81).

Esta molécula possui vida longa, sendo capaz de atravessar as membranas lipídicas, podendo reagir com a membrana de eritrócitos e com proteínas ligadas ao

ferro. Desta maneira, é altamente tóxico para as células, sendo a toxicidade aumentada cerca de dez mil vezes quando em presença de íons ferro (81).

A propriedade redox do peróxido de hidrogênio e sua capacidade de formar radicais livres extremamente reativos, principalmente em presença de íons metálicos faz com que o organismo desenvolva mecanismo de defesa contra o excesso do mesmo. Então, esta espécie não radicalar é removida das células por ação de enzimas como a catalase, glutaciona peroxidase, dentre outras.

O ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel capaz de atuar em inúmeras reações de hidroxilação. É capaz de reagir diretamente com os radicais peróxidos e regenerar a vitamina E da membrana oxidada, o tocoferoxil em tocoferol, oxidando-se e formando a molécula de diidroascorbato (89).

Um dos antioxidantes mais efetivos que a vitamina C e E são os polifenóis e, em particular, os flavonoides (97).

A prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos da cascas e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* permitiu detectar a presença destes compostos. Sendo assim, optou-se por avaliar as propriedades antioxidantes destes extratos usando um ensaio *in vitro* que fosse similar ao que acontece *in vivo*.

Os extratos brutos das cascas e folhas foram avaliados quanto à capacidade em inibir ou sequestrar os radicais livres derivados do peróxido de hidrogênio. A concentração eficaz ( $CE_{50}$ ) necessária para diminuir a concentração de radicais livres derivados do peróxido de hidrogênio foi obtida para os extratos brutos comparados com o controle ácido ascórbico (Tabela 12) (Figura 22).

Amostras	$CE_{50}$ (M $\pm$ DP)
EMC	28,1 $\pm$ 0,2
EMF	95,6 $\pm$ 0,3
Ácido ascórbico	86,3 $\pm$ 0,4

Tabela 12 – Valores de  $CE_{50}$  para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e ácido ascórbico (padrão). Os resultados de  $CE_{50}$  foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

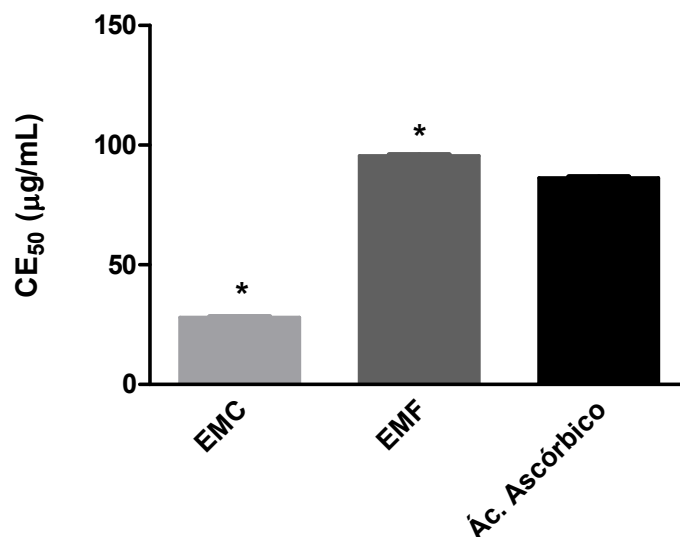


Figura 22 - Valores de CE<sub>50</sub> referentes aos extratos metanólicos das cascas (EMC) e das folhas (EMF) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. comparados ao ácido ascórbico (controle) obtidos pelo Método de Varredura de Peróxido de Hidrogênio. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n=3; \*P<0,05 vs ácido ascórbico)

O extrato metanólico da casca apresentou atividade antioxidante superior ao extrato metanólico das folhas, sendo ainda considerado mais eficaz do que o controle ácido ascórbico (P<0,05).

Assim, os resultados obtidos demonstram uma provável relação dos flavonoides e outros fenólicos, detectados nos extratos por prospecção fitoquímica, com a atividade antioxidante.

Os extratos hexânicos brutos das cascas e folhas não apresentaram atividade sequestradora de radicais derivados do peróxido de hidrogênio, nas concentrações testadas. Já os extratos brutos do caule e da fração clorofórmica das cascas não foram testados.

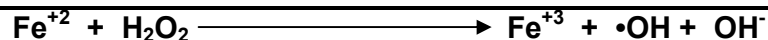
#### 5.3.1.4 Atividade Antioxidante pelo Método de Sequestro de Radicais Hidroxila

O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares, principalmente a que compõe o núcleo da célula. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical hidroxila ( $\bullet$ OH) em seu interior.



No organismo, um dos metais mais importantes para a ocorrência desta reação é o ferro, devido principalmente à sua maior biodisponibilidade e pelo fato de estar complexado com proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (hemossiderina e ferritina) (97).

A reação do ferro com peróxido de hidrogênio é denominada reação de Fenton e pode ser representada da seguinte forma:



Quadro 3 – Reação de formação do radical hidroxila em presença de íons ferro (100).

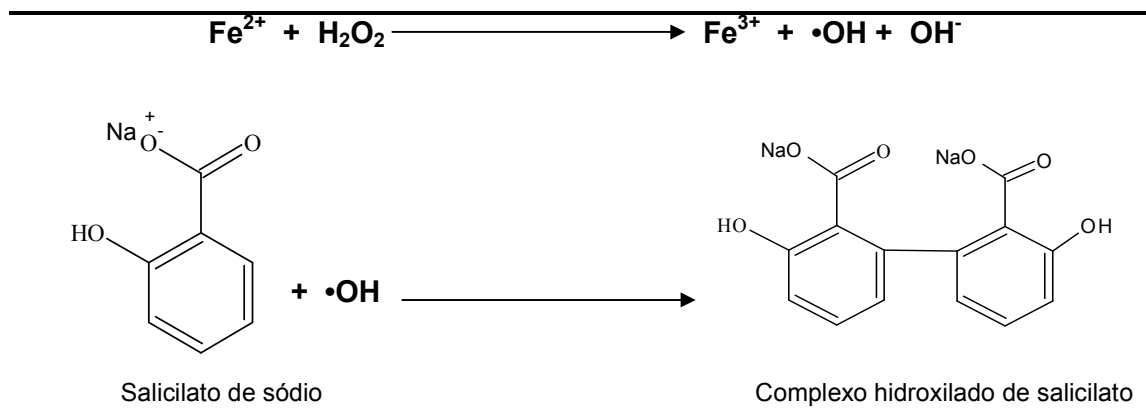
A reação de Fenton é um exemplo clássico de reação radicalar catalisada por metais de transição. Uma mistura reacional de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de oxidar diferentes moléculas do organismo, causando sérios prejuízos ao DNA, RNA, proteínas e lipídeos (97).

O ácido ascórbico atua como antioxidante de forma eficiente sobre o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Apresenta a capacidade de doar um hidrogênio ou um elétron para estas espécies reativas, resultando na formação do ânion radical ascorbilo pouco reativo (98).

Além disso, esta vitamina hidrossolúvel atua de forma direta nas membranas celulares, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou indireta, regenerando a vitamina E que atua como agente antioxidante na face lipofílica da membrana (98).

Assim, optou-se por usar um modelo de teste *in vitro* de sequestro de radicais hidroxilas que simulasse a reação de Fenton, usando como antioxidante controle o ácido ascórbico.

Os extratos metanólicos das cascas e folhas foram capazes de sequestrar os radicais hidroxila, formados a partir da reação do peróxido de hidrogênio com sulfato ferroso e salicilato de sódio, diminuindo a formação do complexo hidroxilado de salicilato, sendo esta reação visualizada pela diminuição da intensidade de cor das amostras, nas diferentes concentrações testadas (Quadro 4).



Quadro 4: Reação de formação do complexo hidroxilado de salicilato.

Foi calculada a concentração eficaz ( $CE_{50}$ ) para os extratos metanólicos das cascas e folhas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. e do controle ácido ascórbico (Tabela 13) (Figura 23).

Amostras	$CE_{50}$ (M $\pm$ DP)
EMC	3,92 $\pm$ 0,03
EMF	10,06 $\pm$ 0,51
Ácido ascórbico	1,29 $\pm$ 0,04

Tabela 13 – Valores de  $CE_{50}$  para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e ácido ascórbico (padrão). Os resultados de  $CE_{50}$  foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

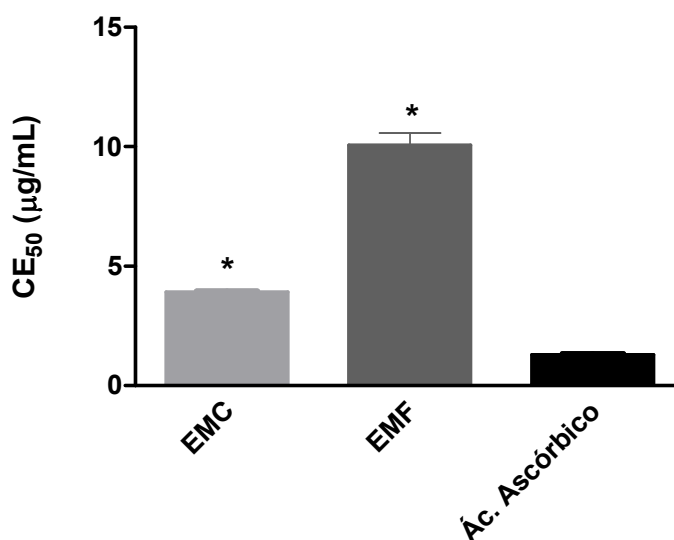


Figura 23 - Valores de  $CE_{50}$  referentes aos extratos metanólicos das cascas (EMC) e das folhas (EMF) de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. comparados ao ácido ascórbico (controle) obtidos pelo Método de Sequestro de Radicais Livres. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (n=3; \*P<0,05 vs ácido ascórbico).

### 5.3.1.5 Determinação do Conteúdo Total de Flavonoides.

Compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de compostos que atuam como antioxidantes. Dentre os compostos fenólicos que apresentam esta propriedade, merece destaque o grupo dos flavonoides. Estes compostos possuem diversas propriedades biológicas descritas na literatura, sendo considerada a atividade sequestradora de radicais livres, a principal e a mais importante desta classe de compostos (99,100).

Por meio da prospecção fitoquímica dos extratos brutos das cascas, folhas e do caule de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. observou-se a presença de flavonoides.

A partir destes resultados, optou-se por determinar, quantitativamente, o conteúdo de flavonoides. Os valores encontrados estão representados na Tabela 14.

Amostras	Conteúdo de Flavonoides (M ± DP)
EMC	0,533 ± 0,015
EMF	0,336 ± 0,015
EMCaule	0,071 ± 0,010

Tabela 14 – Valores de conteúdo de flavonoides (mg de rutina/mg da amostra) para os extratos metanólicos das cascas (EMC), folhas (EMF) e do caule (EMCa).

O conteúdo total de flavonoides pode ser facilmente visualizado pela formação de um complexo flavonoide-alumínio, em meio básico, de coloração rosa (Figura 24). Pode-se observar que o extrato metanólico das cascas apresentou maior conteúdo de flavonóides em relação ao extrato metanólico das folhas.

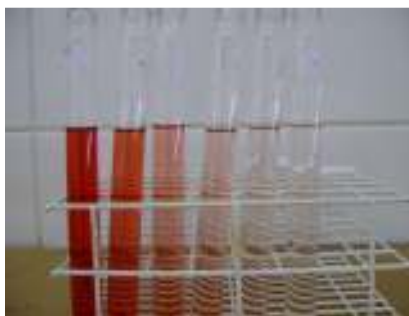


Figura 24 – Reação de formação do complexo flavonoide-alumínio, em meio básico, dos extratos metanólicos das cascas e das folhas de *J. cuspidifolia* Mart.

## 5.3.1.6 Determinação de Fenóis Totais (Método de Folin – Ciocalteau)

O método mais empregado na determinação de compostos fenólicos é aquele que emprega o reagente de Folin – Ciocalteau. O reagente de Folin-Ciocalteau consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, no qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (coloração amarela). Porém em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexo molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{-4}]$ , nos quais a média dos estados de oxidação dos metais está entre (V) e (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (99).

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais pelo Método do Folin-Ciocalteau, expressos em mg de ácido gálico por mg do extrato bruto de material vegetal seco, são apresentados na Tabela 15.

Amostras	Fenóis Totais (M ± DP)
EMC	2,183 ± 0,065
EMF	1,876 ± 0,015

Tabela 15 – Valores de conteúdo de Fenóis Totais (mg de ácido gálico /mg da amostra) para os extratos metanólicos das cascas (EMC) e das folhas (EMF).

Os valores encontrados para o extrato metanólico da casca foi considerado superior ao da folha. Estes dados estão de acordo com as análises dos resultados obtidos por CLAE-FR que indicou uma menor concentração destes compostos no extrato metanólico da folha e mais alta no extrato metanólico da casca e também com a prospecção fitoquímica positiva para os fenólicos nestes extratos.

Os dados obtidos de atividade antioxidante, quantificação de fenólicos e flavonoides dos extratos brutos e da fração clorofórmica das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos das classes dos fenilpropanoides glicosilados, como os derivados do verbascosídeo, detectados como majoritário por análise CLAE-FR.

Vários estudos têm demonstrado que os derivados do verbascosídeo são capazes de inibir a peroxidação lipídica, a auto-oxidação do ácido linoléico e a hemólise de eritrócitos induzidas pelos radicais. Essa classe de substância tem a

função de diminuir a peroxidação lipídica funcionando como agente quelante de íons ferro e sequestrador de radicais hidroxila (100).

Portanto, a presença destes compostos nos extratos sugere a provável hipótese que essas substâncias sejam uma das responsáveis pela ação antioxidante desses extratos e da fração clorofórmica da cascas.

### **5.3.2 Ensaio em cromatografia de camada delgada para a detecção de inibição da enzima Acetilcolinesterase**

O método para a determinação da inibição da acetilcolinesterase foi baseado no ensaio enzimático descrito por Ellman (72,73).

O método de Ellman (72) é um procedimento fidedigno para a atividade de colinesterase e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória de compostos conhecidos.

Tradicionalmente várias plantas têm sido usadas para tratar distúrbios cognitivos, incluindo doenças degenerativas e diferentes transtornos neurofarmacológicos.

A abordagem etnofarmacológica e os ensaios bioguiados têm proporcionado a identificação de potenciais inibidores de acetilcolinesterase a partir de fontes vegetais, incluindo aqueles distúrbios de memória (101).

Diversos métodos de “screening”, baseados nos métodos de Ellman, para atividade inibitória da acetilcolinesterase de recursos naturais têm sido descritos.

A atividade da enzima é medida pela observação do aumento da cor amarela produzida a partir do iodeto de acetilcolina (ATCI) quando reage com ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB) (102).

Os extratos hexânicos das cascas, folhas e dos caules foram capazes de inibir a acetilcolinesterase, sendo esta atividade detectada pela presença de manchas amareladas e brancas presentes nas cromatoplasmas, comparada com o controle fisostigmina, sugerindo uma provável ação anticolinesterásica.

Os extratos metanólicos das cascas, folhas e do caule não apresentaram atividade inibidora de acetilcolinesterase.

### 5.3.3 Atividade Antibacteriana

Ao longo dos últimos anos, desde a descoberta da penicilina, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição aos antimicrobianos desencadeou a resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (103).

A resistência a agentes antimicrobianos é grave e preocupante e requer não somente a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas (103).

Logo a busca de propriedades antibacterianas de extratos de plantas e de substâncias mais específicas tem sido incentivada e intensificada (106, 107).

Sendo assim, optou-se por investigar as propriedades antimicrobianas dos extratos e frações de *Jacaranda cuspidifolia* Mart., usada na medicina popular no tratamento da sífilis e da gonorreia (11).

O Ensaio de difusão em ágar do extrato metanólico da casca apresentou atividade antibacteriana contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Já o extrato metanólico das folhas foi ativo contra *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterobacter aerogenes*.

Os extratos hexânicos das cascas e folhas e os extratos metanólicos do caule não foram ativos contra os microrganismos avaliados, nas concentrações testadas.

A fração clorofórmica das cascas apresentou ação antibacteriana contra *Streptococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia rubidae*, *Enterobacter aerogenes* e *Streptococcus pyogenes* (Tabelas 16 e 17).

Microrganismos	EH Cascas (halo mm)	EH folhas (halo mm)	EH Caule (halo mm)	EM Cascas (halo mm)	EM Folhas (halo mm)	EM Caule (halo mm)	Fração Clorof. (halo mm)
<i>S. aureus</i>	Na	na	na	10,7±0,9	na	na	10,7 ±0,9
<i>S. pyogenes</i>	Na	na	na	14,7 ± 0,5	na	na	14,8±0,4
<i>S. epidermidis</i>	Na	na	na	na	na	na	5,3±1,5
<i>S. mutans</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>S. typhimurium</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>S. typhi</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>K. pneumoniae</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>E. coli</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>P. aeruginosa</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>E. faecalis</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>P. mirabilis</i>	Na	na	na	na	na	na	10,5 ±0,3
<i>Serratia rubidae</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>E. cloacae</i>	Na	na	na	na	na	na	Na
<i>E. aerogenes</i>	Na	na	na	na	na	na	14,7 ±0,4
<i>N. gonhorreae</i>	Na	na	na	15,2 ± 0,3	na	na	15,2±0,3
<i>S. marcencens</i>	Na	na	na	na	na	na	13,8±0,7

Tabela 16 – Atividade antibacteriana dos extratos e frações de *Jacaranda cuspidifolia* Mart, segundo o método de difusão em ágar. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. (na=não ativo).

Microrganismos	Tetraciclina	Cloranfenicol	Penicilina	Gentamicina	Cefalotina
<i>S. aureus</i>	20,1 ± 0,1	27,1 ± 0,1	27,5 ± 0,1	15,2 ± 0,3	30,2 ± 0,1
<i>S. pyogenes</i>	21,3 ± 0,3	22,1 ± 0,2	30,2 ± 0,1	15,2 ± 0,1	15,2 ± 0,1
<i>S. epidermidis</i>	19,2 ± 0,2	25,5 ± 0,1	23,2 ± 0,1	25,2 ± 0,2	30,2 ± 0,1
<i>S. mutans</i>	20,5 ± 0,3	20,1 ± 0,1	na	Na	10,2 ± 0,1
<i>S. typhimurium</i>	20,2 ± 0,2	20,1 ± 0,3	na	Na	Na
<i>S. typhi</i>	20,3 ± 0,3	20,1 ± 0,2	na	Na	11,2 ± 0,1
<i>K. pneumoniae</i>	19,2 ± 0,2	23,5 ± 0,3	na	Na	Na
<i>E. coli</i>	21,3 ± 0,3	20,5 ± 0,1	na	Na	30,2 ± 0,2
<i>P. aeruginosa</i>	21,3 ± 0,3	19,5 ± 0,1	na	Na	Na
<i>E. faecalis</i>	21,3 ± 0,3	13,5 ± 0,3	na	Na	25,2 ± 0,1
<i>P. mirabilis</i>	21,3 ± 0,3	12,5 ± 0,11	na	Na	Na
<i>Serratia rubidae</i>	21,3 ± 0,3	21,5 ± 0,1	na	Na	10,2 ± 0,1
<i>E. cloacae</i>	Na	9,5 ± 0,1	na	Na	Na
<i>E. aerogenes</i>	Na	11,5 ± 0,2	na	Na	Na
<i>N. gonhorreae</i>	23,5 ± 0,3	16,5 ± 0,2	27,5 ± 0,1	35,2 ± 0,1	21,2 ± 0,1
<i>S. marcencens</i>	22,4±0,3	21,5 ± 0,01	na	Na	10,20 ± 0,1

Tabela 17 – Atividade antibacteriana dos controles segundo o Método de Difusão em Agar. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. (na=não ativo).

Os extratos e as frações que apresentaram atividade antibacteriana, pelo Método de Difusão em Agar, foram submetidos ao ensaio de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

### 5.3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória representa a mais alta diluição de uma substância capaz de inibir o crescimento de microrganismos (75).

Os valores de concentração mínima inibitória para os extratos metanólicos da casca e da fração clorofórmica da casca encontram-se apresentadas na Tabela 18.

Microrganismos	CMI do Extrato Metanólico das Cascas (mg/mL)	Fração Clorofórmica das cascas (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	9,1± 0,1	9,3± 0,2
<i>S. pyogenes</i>	16,3± 0,2	9,2± 0,3
<i>S. epidermidis</i>	na	18,3± 0,1
<i>K. pneumoniae</i>	na	na
<i>P. mirabilis</i>	na	6,3± 0,2
<i>E. aerogenes</i>	na	6,2± 0,3
<i>N. gonhorraeae</i>	25,2 ± 0,2	25,2± 0,2
<i>S. marcencens</i>	na	6,1 ± 0,1

Tabela 18 – Valores de concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos e frações de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão (n=3). (na=não ativo)

Estudos realizados com os extratos de algumas espécies de *Jacaranda* têm mostrado ação antibacteriana e antifúngica (105-09).

O extrato de *Jacaranda mimosaeifolia* mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* (110; 111) e foi ativo também contra *Mycobacterium phlei* (107); os extratos de *Jacaranda mimosoides* mostrou atividade contra *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* (112); extratos de *Jacaranda acutifolia* foi capaz de inibir o crescimento de *Xanthomonas campestris*. (113).

A presença de derivados fenilpropanóides, como os derivados do verbascosídeo, nos extratos metanólicos da casca e na fração clorofórmica da cascas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. sugere uma provável ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Em estudos realizados por Arciniegas (114), o verbascosídeo apresentou ação inibitória no crescimento de *Staphylococcus aureus*. O mecanismo de ação proposto foi a inibição da síntese de proteínas da parede celular deste microrganismo (115).

Assim, os resultados da ação antibacteriana dos extratos metanólicos da casca e da sua fração clorofórmica não somente estão de acordo com dados obtidos



por Arciniegas (114) como também justifica o uso popular dos extratos de *Jacaranda cuspidifolia* no tratamento da gonorréia.

### 5.3.5 Atividade Antimicobacteriana

A tuberculose é considerada um grave problema de saúde pública, voltando a ocupar um lugar de destaque entre as principais doenças infectocontagiosas. O aparecimento cada vez mais comum de bacilos resistentes ou multi-resistentes e o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tem contribuído para o surgimento, cada vez maior, de novos casos da doença (116).

A descoberta de novos fármacos para o tratamento da tuberculose constitui um grande desafio, pois as micobactérias são consideradas organismos de crescimento lento, patogênicas e sua parede, rica em lipídeos, representam uma verdadeira proteção contra os agentes agressores (117,118).

Plantas constituem uma das principais fontes de metabólitos ativos com ação antimicobacteriana (119,120). Diversas substâncias já têm a atividade antimicobacteriana estabelecida, como é o caso dos terpenos (117, 121, 122); alcaloides (123-126); flavonoides (127-130); esteroides e saponinas (130, 121), fenóis e polifenóis (131,132).

Estudo da atividade antimicobacteriana realizados com extratos obtidos da espécie *Jacaranda mimosaeifolia* contra *Micobacterium phlei* mostraram inibição (107).

Neste sentido, procurou-se também avaliar a atividade antimicobacteriana dos extratos obtidos de *Jacaranda cuspidifolia*.

A avaliação da atividade antimicobacteriana para os extratos metanólicos das cascas e folhas de *J. cuspidifolia*, mostrou uma concentração inibitória mínima de 250 µg/mL para as cascas e para as folhas. Esse valor foi considerado superior ao da isoniazida (0,03 µg/mL) e ao da pirazinamida, um agente antimicobacteriano de primeira linha, que apresenta um valor de CIM de 100 µg/mL para o *M. tuberculosis* (133).

Fluorquinolonas tem apresentado uma alta eficácia no tratamento da tuberculose, principalmente, aquelas causadas por cepas de micobactérias multi-resistentes. Os valores de concentração inibitória mínima para o ciprofloxacino e

ofloxacina foi de 1 mg/mL, enquanto que para o levofloxacino e moxifloxacino foram encontrados valores de CIM iguais a 0,5 mg/mL (134,135).

A prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de *Jacaranda cuspidifolia* levou à detecção de taninos, flavonoides, terpenos, cumarinas e esteroides.

De acordo com Copp (136), os metabólitos secundários considerados como a principal classe promissora de atividade antimicrobiana são os terpenoides.

Segundo estudos realizados por Higuchi (133), os principais terpenoides isolados e que apresentaram atividade inibitória do crescimento do *Micobacterium* foram o lupeol, ácido ursólico e ácido oleanólico. Ácido ursólico e o ácido oleanólico também foram isolados de algumas espécies de *Jacaranda* (12).

A presença desta classe de metabólitos nos extratos metanólicos das cascas e das folhas de *Jacaranda cuspidifolia* sugerem a provável hipótese que essas substâncias sejam uma das responsáveis pela ação antimicrobiana desses extratos.

### 5.3.6 Atividade Antifúngica

Atualmente tem sido verificado um aumento acentuado no número de infecções causadas por fungos, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A procura por novos agentes antifúngicos no reino vegetal, especialmente em plantas, vem se intensificando a cada dia, pois a maioria dos antifúngicos utilizados na prática médica é de alto custo e elevada toxicidade, além de muitos microrganismos já apresentarem mecanismos de resistência frente aos antifúngicos convencionais (137,138).

Realizou-se a avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos metanólicos da cascas, folhas e do caule de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. de maneira a avaliar a presença ou ausência desta atividade, comparando-a com os antifúngicos controles (Tabela 19).

Nenhum dos extratos avaliados foi eficaz na inibição dos microrganismos, nas concentrações testadas.

Microrganismos	NIST	ANFOT	ICZ	MCZ	CTR	KET
<i>T. aureoviridae</i>	10mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>C. parapsilosis</i>	10mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	7mm <sup>(a)</sup>	9mm <sup>(a)</sup>	8mm <sup>(a)</sup>	7mm <sup>(a)</sup>
<i>Mucor hiemalis</i>	9 mm <sup>(a)</sup>	15mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>Rhizopus sp</i>	15mm <sup>(a)</sup>	8mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>G. candidum</i>	10mm <sup>(a)</sup>	8mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>Penicillium sp</i>	8mm <sup>(a)</sup>	7mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>A. fumigatus</i>	6mm <sup>(a)</sup>	13mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>C. albicans</i>	9mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	R	R	R	R
<i>C. neoformans</i>	13mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	24mm <sup>(a)</sup>	16mm <sup>(a)</sup>	9mm <sup>(a)</sup>	9mm <sup>(a)</sup>
<i>E. floccosum</i>	9mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>T. rubrum</i>	9mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT
<i>T. mentagrophytes</i>	9mm <sup>(a)</sup>	12mm <sup>(a)</sup>	NT	NT	NT	NT

Tabela 19 - Perfil de Sensibilidade dos Antifúngicos Comerciais frente às cepas padrões de fungos filamentosos e leveduriformes. <sup>(a)</sup> Diâmetro médio do halo de inibição em milímetros pelo Método de Difusão em Agar (79); NIST: nistatina; ANFOT: anfotericina B; ICZ: itraconazol; MCZ: miconazol; CTR: clotrimazol; KET: cetoconazol; NT: não testado.

### 5.3.7 Atividade Anti-inflamatória

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular (toxinas e microrganismos) e das consequências dessa lesão (células e tecidos necróticos) (140).

A resposta inflamatória ocorre por ação local, tanto na fase precoce (edema, dilatação, migração de leucócitos, atividade fagocitária), quanto na fase tardia do processo inflamatório (proliferação capilar e de fibroblastos, deposição de colágeno e cicatrização) (140).

Os glicocorticoides podem suprimir a inflamação pelo aumento da síntese de várias proteínas, entre elas a lipocortina -1 que tem um efeito inibitório na fosfolipase A2 inibindo a produção de mediadores lipídicos como leucotrienos prostaglandinas e fator ativador de plaquetas. Porém devido a suas numerosas ações metabólicas, os glicocorticoides apresentam muitos e variados efeitos colaterais (140).

Assim, a busca de novos agentes com propriedade anti-inflamatória tem sido incentivada e investigada, principalmente, no reino vegetal, como uma fonte alternativa de tratamento destas afecções. Estudos fitoquímicos indicam que o gênero *Jacaranda* constitui uma fonte de vários metabólitos secundários, incluindo os glicosídeos fenilpropanoides (141). Estes metabólitos foram isolados de

*Jacaranda mimosaeifolia* (63), *Jacaranda mimosifolia* (142) and *Jacaranda caucana* (141).

Neste contexto, procurou-se avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart., uma planta nativa do cerrado, usada na medicinal popular no tratamento de reumatismo.

Os resultados obtidos para os extratos metanólicos das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart mostraram uma redução significativa da contagem de leucócitos totais, nas concentrações de 3, 5 e 10% (Figura 25 A) com a mesma eficácia que a dexametasona ( $P < 0,05$ ) (Figura 25B). Já os extratos hexânicos da casca e folha e os extratos metanólicos das folhas não apresentaram atividade anti-inflamatória, nas concentrações avaliadas.

A prospecção fitoquímica do extrato metanólico da casa demonstrou a presença de compostos fenólicos e o perfil HPLC dos mesmos mostrou a presença de picos compatíveis com os derivados do verbascosídeo.

Glicosídeos fenilpropanoides, como é o caso dos derivados do verbascosídeo, são capazes de inibir as enzimas da cascata do ácido araquidônico, preferencialmente, a cicloxigenase-1, porém alguns derivados do verbascosídeo são também capazes de inibir seletivamente a cicloxigenase-2 (143). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, provavelmente os glicosídeos fenilpropanoides presentes no extrato metanólico da casca contribuem com a inibição da COX-1 e COX-2.

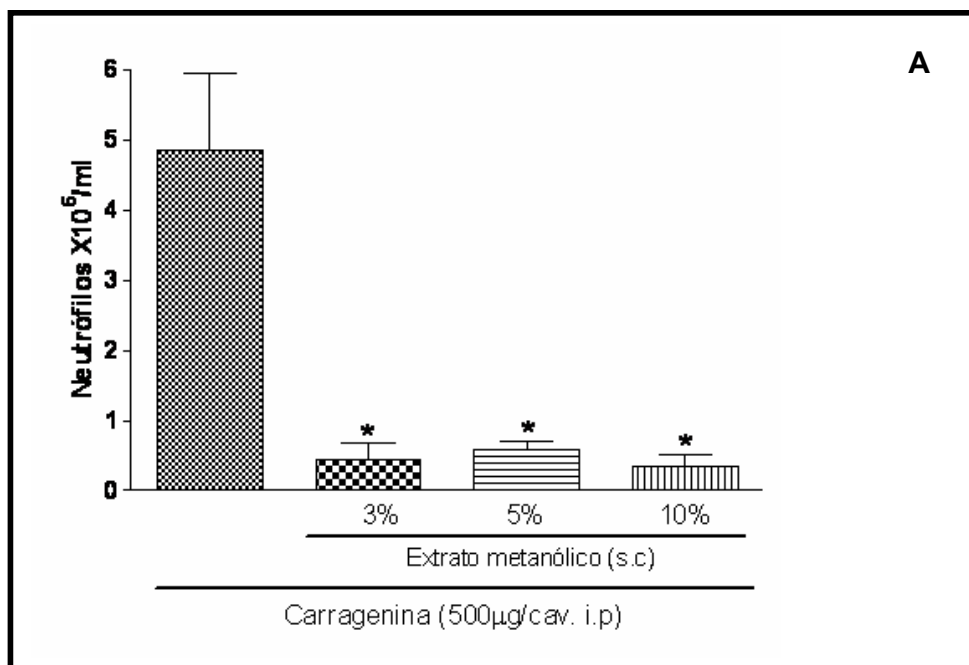


Figura 25 A - Atividade anti-inflamatória do extrato metanólico da casca em diferentes concentrações. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos por mL. \* $P < 0,05$  vs Dexametasona.

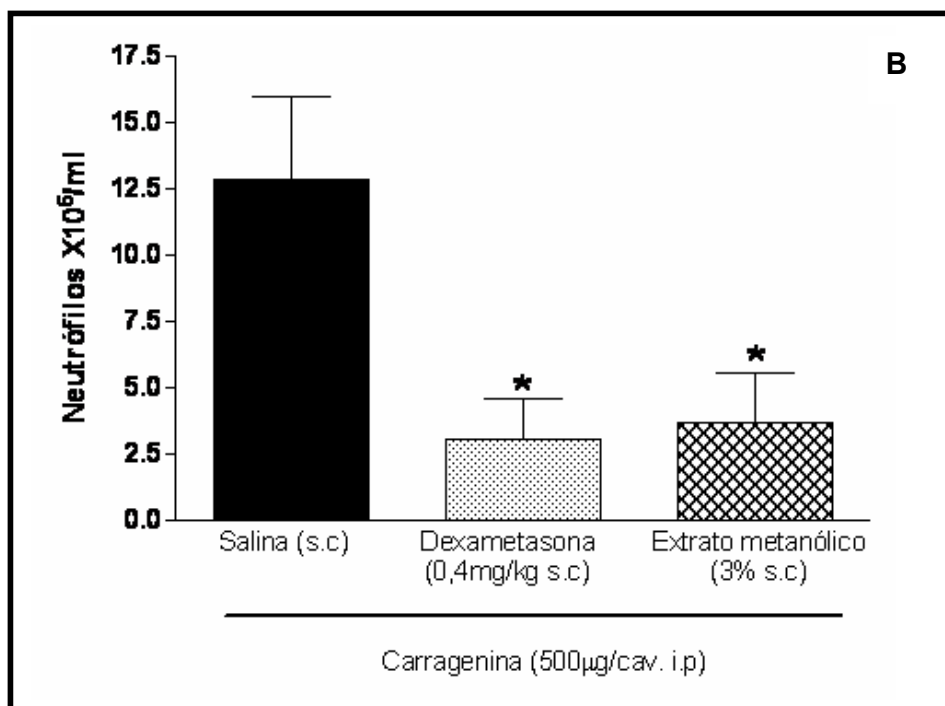


Figura 25B - Atividade anti-inflamatória do extrato metanólico da casca comparado com o padrão dexametasona. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos por mL. \* $P < 0,05$ .vs dexametasona

## **CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

- A prospecção fitoquímica dos extratos detectou a presença de taninos, flavonoides, naftoquinonas, antronas, antróis, terpenos, esteróides, alcalóides e saponinas e ausência apenas de antraquinonas.
- Análises cromatográficas por CLAE-FR dos extratos metanólicos das cascas, folhas e do caule indicaram a presença de fenilpropanóides glicosilados como substâncias majoritárias em diferentes concentrações de acordo com o órgão vegetal.
- Da fração clorofórmica das cascas foi isolado o verbascosídeo, um fenilpropanóide glicosilado inédito na espécie, o que corrobora com os dados químicos da literatura científica para espécies da família Bignoniaceae.
- Do extrato hexânico das folhas foi isolado uma mistura de hidrocarbonetos de 15 carbonos (pentadecano), 17 carbonos (heptadecano) e 20 carbonos (icosano).
- Os extratos hexânicos das cascas, folhas e do caule apresentaram ação anticolinesterásica significativa, apresentando padrão cromatográfico similar ao fármaco fisostigmina. Os extratos metanólicos não foram eficientes.
- Os extratos metanólicos e a fração clorofórmica das cascas inibiram o crescimento de *N. gonorrhoeae* sugerindo atividade antigonorreica importante, o que vem a corroborar com o seu uso popular.
- O extrato metanólico das cascas de *Jacaranda cuspidifolia* apresentou a mesma atividade que a dexametasona o que vem a corroborar com os dados fornecidos pela medicina popular. Os demais extratos avaliados neste trabalho não foram eficientes.
- Tanto os extratos metanólicos das cascas quanto das folhas foram eficazes na inibição ou seqüestro de radicais livres, sugerindo uma provável ação antioxidante.
- Nenhuma atividade antifúngica foi detectada nos extratos brutos nas concentrações avaliadas neste trabalho.
- Os extratos metanólicos das cascas foram eficientes na inibição do crescimento dos Gram Positivos: *S.aureus* e *S. pyogenes*. Já a fração clorofórmica das cascas foi eficiente contra esses microrganismos e contra as bactérias Gram Negativas: *Proteus mirabilis*, *E. aerogenes* e *S. marcencens*.

É a primeira vez que a espécie *Jacaranda cuspidifolia* Mart. é investigada cientificamente quanto à sua composição química micromolecular e atividades biológicas. Além disso, é o primeiro relato da presença do verbascosídeo nesta espécie. Isto vem a contribuir com os conhecimentos químico e farmacológico de mais uma espécie do gênero *Jacaranda*.



## REFERÊNCIAS

- (1) Viegas Jr C, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. 2006; 29 (2):326-37.
- (2) Corrêa MFP, de Melo GO, Costa SS. Substâncias de origem vegetal potencialmente útil na terapia da asma. *Rev. Bras. Farmacog.* 2008; suppl 18: S785-97.
- (3) Bin MC, Silva M, Yuzuri A, Franco M, Basso S. Conhecimento sobre utilização de plantas medicinais por pacientes do Sistema Único de Saúde de Fátima do Sul - MS. *Interbio*. 2007; 1 (2): 4-12.
- (4) Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacog.* 2003; 13 (2): 83-2.
- (5) OMS – Organización Mundial de la Salud – Situación reglamentaria de los medicamentos herbários. *Resenã Mundial* 2000. 52 p.
- (6) Barreiro EJ, Bolzani VS. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*. 2009; 32 (3): 679-88.
- (7) Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Júnior A, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2000; 95 (3): 367-73.
- (8) de Franca IS, de Souza JA, Baptista RS, Britto VR. Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008; 61(2): 201-8.
- (9) Pereira ZV, Gomes CF, Lobtchenko G, Gomes MES, Simões PDA, Saruwatari RPS, et al. Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado Sensu Stricto da Fazenda Paraíso - Dourados, MS. *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5(1): 249-51.
- (10) Vieira MC, Heredia Z, Bottega SP, Padilha NS, Pessoa SM. Análise de crescimento de *Jacaranda decurrens* Cham. spp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença em função de espaçamentos entre plantas. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 2008; 3: 103 – 06.
- (11) Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal*. Corumbá: Embrapa 1994. 320 p.
- (12) Gachet MS, Schühly W. *Jacaranda* - An ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009:14-27.

- (13) de Franca IS, de Souza JA, Baptista RS, Britto VR. Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008; 61(2): 201-8.
- (14) Parky DC. *Great moments in pharmacy*. Detroit: Northwood Institute Press; 1966.
- (15) Teixeira PC. *Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach*. São José do Rio Preto: São José; 1994.
- (16) Miguel MD, Miguel OG. *Desenvolvimento de Fitoterápicos*. São Paulo: Probe Editorial; 1999.
- (17) Devienne KF, Raddi MSG, Pozetti GL. Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2004; 6(3): 11-24.
- (18) Tavares W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: Tavares W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 1996.
- (19) Vale NB. Is there still a place for Pharmacobotany in Modern Anesthesiology? *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2002; 52(3): 368-80.
- (20) Yamada CSB. Fitoterapia: sua história e importância. *Revista Racine*. 1998; 43: 50-1.
- (21) Pinto AC, Silva DHS, da Silva Bolzani V, Lopes NP, de Almeida Epifanio R. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 2002; Suppl 1: S45-61.
- (22) de Faria LR. Primeiros Tempos da Saúde Pública em São Paulo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 1997; 4 (2): 380-4.
- (23) Santos NP. Theodoro Peckolt: the Scientific Work of a Pioneer in Phytochemistry in Brazil. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 2005; 12 (2): 515-33.
- (24) Alves EO, Mota JH, Soares TS, Vieira MC, Silva CB. Levantamento Etnobotânico e Caracterização de Plantas Mediciniais em Fragmentos Florestais de Dourados - MS. *Cienc. Agrotec*. 2008; 32 (2): 651-58.
- (25) Braz-Filho R. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. *A Peregrinação de um Pacatubano*. *Química Nova*. 1994; 17 (5): 405-44.
- (26) Dewick PM. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.

- (27) Santos RI. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ªed. Florianópolis: Editora UFSC; 2004. 403-34.
- (28) Harborne JB. Introduction to Ecological Biochemistry. In: Santos RI. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ªed. Florianópolis: Editora UFSC; 2004. 403-34.
- (29) Rhodes MJC. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. In: Santos RI. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ªed. Florianópolis: Editora UFSC; 2004. 403-34.
- (30) Gilani AH, Rahman AU. Trends in Ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 100 (1-2): 43-9.
- (31) Bounds DG, Pope GS. Light-absorption and chemical properties of miroestrol, the estrogenic substance of *Pueraria mirifica*. J. Chem. Soc.1960; 3696-705.
- (32) Nair MS, Basile DV. Bioconversion of arteannuin B to artemisinin. J. Nat. Prod.1993; 53:1559-66.
- (33) Taniguchi M, Kubo I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of east African plants for antimicrobial activity II. J. Nat. Prod. 1993; 1539-46.
- (34) Braz-Filho R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. Química Nova. 1994; 405.
- (35) Corrêa MFP, Melo GO, Costa SS. Substância de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. Rev. Bras. Farmacogn. 2008; 18: 785-97.
- (36) Elisabetsky E, Souza GC. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativa. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGs e UFSC; 2004.
- (37) Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Mahmud NS, Shuqaia SAQ, Netto EM. Aspectos da Legislação no Controle dos Medicamentos Fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007; 11: 26-32.
- (38) ANVISA: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução RDC, n. 48, 16 de março de 2004.

- (39) Pauletti PM, Bolzani VS, Young MCM. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). *Química Nova*. 2003; 64:1-3.
- (40) Von Poser GL, Schripsema J, Henriques AT, Jensen SR. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2000; 28: 351-6.
- (41) Mingarro MD, Acer N, Llinares F, Pozuelo JM, Mera AG, Vicenten JA, Morales L, Alguacil LF, Perez C. Biological Activity of Extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 87:163-67.
- (42) von Poser GL, Schripsema J, Henriques AT, Jensen SR. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2000; 28:351-66.
- (43) Haque MR, Rahman KM, Iskander MN, Hasan CM, Rashid MA. Stereochenols A and B, two quinones from *Stereospermum chelonoides*. *Phytochemistry*. 2006; 67: 2663-65.
- (44) Gafner S, Wolfender JL, Nianga M, Hostettman K. A naphthoquinone from *Newboldia laevis* roots. *Phytochemistry*. 1998; 48 (1): 215-16.
- (45) Zorn B, Garcia – Piñeres AJ, Castro V, Murillo R, Mora G, Merfort I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*. 2001; 56: 831-835.
- (46) Nchu F, Aderogba MA, Mdee LK, Eloff JN. Isolation of anti-Candida albicans compounds from *Markhamia obtusifolia* (Baker) Sprague (Bignoniaceae). *South African Journal of Botany*. *Article in press*.
- (47) Blatt CTT, Salatino A, Salatino MLF. Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 1996; 24 (1): 89.
- (48) Mohibb e Azam M, Ghanim A. Flavones from leaves of *Tecomella undulata* (Bignoniaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2000; 28: 803-4.
- (49) Braga FC, Valadares YM, Costa MA, Lombardi JA, Oliveira AB. Estudo Fitoquímico de *Erythrae centarium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003;13: Supl 2: S28-31.
- (50) Warashina T, Nagatani Y, Noro, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*. 2004; 65: 2003-11.
- (51) Di Chenna PH, Doctorovich VB, Baggio RF, Garland MT, Burton G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivates of  $\beta$ -Lapachone. *Journal Medical Chemistry*. 2001; 15 (44): 2400-04.

- (52) Pauletti PM, Camboa IC, Silva DHS, Young MCM, Tomazwla MD, Eberlin MN, Bolzani VS. New antioxidant C-Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. *Journal Natural Product*. 2003; 10 (66): 1305-09.
- (53) Oliveira TB, Neto BHJC, Xavier MA, Garrote CFD, Asquieri ER, Rezende MH, Ferreira HD, Paula JR. Estudo Farmacognóstico das Raízes de *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003; 13 Suppl.1: S54-5.
- (54) Weiss CR, Moideen SVK, Croft SL, Houghton PJ. Activity of Extracts and Isolated naphthoquinones from *Kigella pinnata* against *Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Products*. 2000; 9 (63):1306-09.
- (55) Steinert J, Khalaf H, Rimpler M. HPLC separation and determination of naphthol[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). *Journal of Chromatography A*. 1995; 693: 281-7.
- (56) Ali MS, Uzair SU, Krebs HCJ, Habermehl GG. Eleganoside - A, B and C from *Pseudocalymma elegans*, a native of Brazil. *Phytochemistry*. 2000; 55: 359–62.
- (57) Gentry A, Cook K. *Martinella obovata* (Bignoniaceae): A Widely Used Eye Medicine of South America. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 11: 337-43.
- (58) Vila Verde GM, Paula JR, Carneiro DM. Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais do Cerrado Utilizadas pela População de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003; 13:64-6.
- (59) Gurgel ESC, Santos JUM, Carvalho ACM, Bastos MNC. *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. subsp. *spectabilis* (Mart. ex A. DC) Gentry (Bignoniaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação, plântula. *Bol. Mus. Para. Emili Goeldi. Ciências Naturais*. 2006; 1(2):113-20.
- (60) Almeida LS, Maia N, Ortega AR, Angelo AC. Crescimento de Mudanças de *Jacaranda puberula* Cham. em viveiro submetidas a diferentes níveis de luminosidade. *Ciência Florestal*. 2005; 15 (3):323-29.
- (61) Sankara-Subramanian S, Nagarajan S, Sulochana N. Flavonoids of eight bignoniaceous plants. *Phytochemistry* 1972; 11:1499.
- (62) Sankara-Subramanian S, Nagarajan S, Sulochana N. Hydroquinone from the leaves of *Jacaranda mimosaefolia*. *Phytochemistry*. 1973; 12: 220–21.
- (63) Moharram FA, Marzouk MSA. A novel phenylethanoid dimer and flavonoids from *Jacaranda mimosaefolia*. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 2007; 62:1213–20.

- (64) Martin F, Hay AE, Condorety VRQ, Cressend D, Reist M, Gupta MP et al. Antioxidant Phenylethanoid Glycoside and a Neolignan from *Jacaranda caucana*. J. Nat. Prod. 2009; 72: 852-56.
- (65) Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug analysis. Berlin: Springer 1984.
- (66) Sies H. Strategies of antioxidant defense. European Journal of Biochemistry. 1993; 215 (2): 213-9.
- (67) Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry. 1999; 269(2):337-41.
- (68) Ruch KJ, Cheng SJ, Klaining JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis. 1989; 10:1003-08.
- (69) Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry. 1989; 28 (4): 1057-60.
- (70) Jia Z, Mengcheng T, Wu J. The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 1999; 64(4): 555-59.
- (71) Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. Soc. Enol. Viticulture. 1977: 49.
- (72) Ellman GI, Courtney DK, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 1961; 7:88-5.
- (73) Ingkaninan K, Hazekamp A, Hoek AC, Balconi S, Verpooorte R. Application of Centrifugal Partition Chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts. J. Liq. Chromatogr & Rel. Technol. 2000; 23:2195-08.
- (74) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45: 493-96.
- (75) Antunes RMP, Lima EO, Pereira MSV, Camara CA, Arruda TA, Catão RMR, et al. "Atividade antimicrobiana" in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2006; 16(4):517-24.
- (76) Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium*

*tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. Am. Soc. Microbiol. 1998:362-6.

(77) Smânia A, Monache FD, Smânia EFA, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Journal of Ethnopharmacology. 1995:177-81.

(78) Moreno SE, Alves-Filho JC, Rios-Santos F, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, Teixeira MM. 2006. Signaling via Platelet-Activating Factor Receptors Accounts the Impairment of Neutrophil Migration in Polymicrobial Sepsis. The Journal of Immunology. 2006; 177:1264-71.

(79) McLafferty FW, Stauffer DB. Wiley/NBS Registry of mass spectral data. New York: Willey-Interscience Pub; 1989.

(80) Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil 1997; 43 (1):61-8.

(81) Seifriz I. Propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal: proteção da ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio sobre membranas lipídicas e ação como seqüestradoras de radicais livres. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis: Editora UFSC; 2008.

(82) Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2006.

(83) Takahashi M, Shibata M, Niki E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. Free radical Biology & Medicine. 2001; 31(2): 164-74.

(84) Steghens JP, Kappel AL, Denis I, Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde In human plasma or serum. Free Radical Biology & Medicine. 2001; 31 (2): 242-49.

(85) Moraes SM, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia 2009; 19 Suppl 1B : S315-20.

(86) Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med Esporte. 2004; 10 (4): 308-13.

(87) Cerqueira FM, Medeiros MHG e Augusto O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. Química Nova. 2007; 30(2):441-9.

- (88) Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJ, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*. 2009; 32 (3):689-92.
- (89) Scotti I, Scotti MT, Cardoso C, Pauletti P, Castro-Gamboa I, Bolzani WS et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43 (2):153-66.
- (90) Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and development stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48 (2); 140-06.
- (91) Cataneo CB, Caliari V, Gonzaga LV, Kuskoski EM, Fett R. Antioxidant activity and phenolic content of agricultural by products from wine production. *Semina: Ciências Agrárias*. 2008; 29 (1): 93-102.
- (92) Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53 (10):4290-302.
- (93) Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric Food Chem*. 2005; 53(6):1841-56.
- (94) Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2007; 27 (11): 53-60.
- (95) Shukor Y, Adam H, Ithnin K, Yunus I, Shamaan N, Syed M. Molybdate Reduction to Molybdenum Blue in Microbe Proceeds via a Phosphomolybdate Intermediate. *Journal of Biological Sciences*. 2007; 7(8)1448-52.
- (96) Shukor Y, Shamsuddin B, Mohamad O, Ithnin K, Shaman N, Syed M. A method to study the effects of Chemical and Biological Reduction of Molybdate to Molybdenum Blue in Bacteria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2008; 11(4):672-5.
- (97) Barreiros ALBS, David JM, David J. Estresse oxidativo: relação entre a geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006; 29 (1): 113-23.
- (98) Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação. *Química Nova*. 2007; 30 (5):1323-38.



- (99) Sousa CMM, Silva HR, Vieira – Júnior GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007; 30(2):351-55.
- (100) Zhao C, Dodin G, Yuan C, Chen H, Zheng R, Jia Z, Fan BT. In vitro protection of DNA from Fenton Reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1723: 114-23.
- (101) Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007; 14: 289-300.
- (102) Eldeen JMS, Elgorashi EE, Van Staden J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 102(3): 457-64.
- (103) Cunico MM, Carvalho JL, Kerber VA, Higashino CEK, Cruz-Almeida SC, Miguel MD, Miguel OG. Atividade Antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2004; 14 (2): 97-03.
- (104) Miguel MD, Miguel OG. Desenvolvimento de Fitoterápicos. São Paulo: Robe 1999.
- (105) Silva MCM, Silva GAAB, Siqueira NCS, Bacha CTM, Sant'Ana BMS. 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-acetato de etila em *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don-Bignoniaceae. *Ciência e Natura*. 1981; 3:41-4.
- (106) Silva MCM, Bauer L. *Jacaranda micrantha* cham.: Isolamento e Identificação de 1-hidróxi-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-acetato de etila, ensaios antineoplásicos, antibacterianos e antifúngicos. *Ciência e Natura*. 1983; 5:7-18.
- (107) Mahran GH, El-Fishawy AM, Hosny AMS, Hilal AM. Phytochemical and antimicrobial study of *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don grown in Egypt. *Herba Hungarica*. 1991; 30: 98-104.
- (108) Binutu O, Lajubutu B. Antimicrobial potentials of some plant species of the Bignoniaceae family. *Afr. J. Med. Med. Sci*. 1994; 23(3):269-73.
- (109) Ali RM, Houghton PJ, Hoo TS. Antifungal Activity of Some Bignoniaceae Found in Malaysia. *Phytoterapy Research*. 1998; 12:331-34.
- (110) Pranke PHL, Bittencourt C, Silva MCM, Teixeira HF, Frizzo SMB, Cardoso SG, Bessa LS. Atividade Antimicrobiana de *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. *Caderno de Farmácia*. 1993; 9(2):81-4.

- (111) Rojas JJ, Ochoa VJ, Muñoz JF. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombia folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 6 (2):1-6.
- (112) Dada JD, Alade PI, Ahmad AA, Yadock LH. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Soba-Zaria, Nigeria. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*. 2002; 12 (1):55-6.
- (113) Mora DAL, Rodriguez MML, Segura Miranda A 1996. Active ingredients with bactericide properties extracted from *Jacaranda acutifolia* Humb. *Ruta chapelensis* L. and *Aloe vera* L. *Serie Proteccion Vegetal*. 1996; 3(1):15-9.
- (114) Arciniegas A, Avendaño A, Pérez-Castorena AL, Romo de Vivar A. 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1997; 25 (2):185-6.
- (115) Avila JG, de Liverant JG, Martinez A, Munoz JL, Arciniegas, A. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 66 (1):75-8.
- (116) Souza MVN, Vasconcelos TRA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Química Nova*. 2005; 28 (4): 678-82.
- (117) Arantes VP, Sato DN, Vilegas W, Santos LC, Leite CQF. Plantas do Cerrado Brasileiro com Atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada* 2005; 26 (3):195-98.
- (118) Rando DG, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQF, Amaral AT et al. Potential Tuberculostatic Agents, Topical Application on Benzoic Acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002; 10 (3) 557-60.
- (119) McGaw LJ, Hlokwé TM, Michel AL, Meyer JJM, Eloff JN. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008; 31:1429-33.
- (120) Okunade AL, Elvin-Lewis PF, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 2004; 65 (8) 1017-32.
- (121) Januário AH, Filho ER, Pietro RCL, Kashima S, Sato DN, França SC. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytoterapy Research*. 2002; 16 (5): 445-48.

- (122) Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer N.H. Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Médica*. 2001; 67:1-10.
- (123) Sunthitikainsakul A, Kongkathip N, Kongkathip B, Phonnakhu S, Daly JW, Spande TF. Coumarins and carbazoles from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities. *Planta Médica*. 2003; 69:155-57.
- (124) Gibbons S, Fallah F, Wright CW. Cryptolepine hydrochloride: a potent antimycobacterial alkaloid derived from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytoterapy Research*. 2003;17(4):434-36.
- (125) Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Phonkerd N, Soyong K, Kongsaree P, Suksamrarn, A. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid form the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Medica*. 2002; 68:834-36.
- (126) Newton SM, Lau C, Gurcha SS, Besra GS, Wright CW. The evaluation of forty-three plant species antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 70 (1):57-7.
- (127) Murillo FI, Encarnacion-Dimayuga R, Malmstrom J, Christophersen C, Franzblau SG. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia* 2003; 74:226-30.
- (128) Schinkovitz A, Gibbons S, Stavri M, Cocksedge MJ, Bucar F. Ostruthin: An antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Medica* 2003; 69:369-71.
- (129) Fris-Moler A, Chen M, Fursted K, Chrisensen SB, Kharazmi A. *In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. *Planta Medica*. 2002; 68:416-19.
- (130) Schi YP, Rodríguez AD, Barnes CL, Sánchez JA, Raptis RG, Baran P. New terpenoid constituents from *Eunicea pinta*. *Journal Natural of Products*. 2002; 65(9):1232-41.
- (131) Seephonaki P, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Tanticharoen M et al. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp. BCC 3050. *Planta Medica*. 2002; 68: 45-8.

- (132) Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Kartnig T, Hö G, Thie, W. Investigations on antimicrobial activity of some Ethiopian Medicinal Plants. *Phytoterapy Research*. 2001; 15 (4):323-26.
- (133) Higuchi CT, Pavan FR, Fujimura CQL, Sannomiya M, Vilegas W, Leite, SRA et al. Triterpenes and Antitubercular Activity of *Byrsonima crassa*. *Química Nova*. 2008; 31 (7):1719-21.
- (134) Rodríguez JC, Ruiz M, Climent A, Royo G. *In vitro* activity of four fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; 17: 229-31.
- (135) Díaz JCR, Ruiz M, López M, Royo G. Synergic activity of fluoroquinolones and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003; 21 (5): 354-56.
- (136) Copp, BR. Antimicrobial Natural Products. *Natural Products Report* 2003; 20 (6):535-57.
- (137) Amaral MFZJ, Bara MTF. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2005; 2(2), 5-8.
- (138) Passos XS, Santos SC, Ferri PH. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35 (6): 623-27.
- (139) Cotran RS, Vinay-Kumar MD, Collin T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000.
- (140) Damiani D, Kuperman H, Dichtchekian V, Manna TD, Setian N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. *Pediatria*. 2001; 1: 71-82.
- (141) Martin F, Hay AE, Condorety VRQ, Cressend D, Reist M, Gupta MP, Carrupt PA, Hostettmann K. Antioxidant Phnylethanoid Glycosides and a Neolignan from *Jacaranda caucana*. *Journal of Natural Products*. 2009; 72: 852-56.
- (142) Gambaro V, Garbarino JA, Galeffi C, Nicoletti M, Messana I, Marini-Bettolo, GB. Constituents of *Jacaranda mimosaeifolia*. *Revista Latina Química*. 1988; 19: 17–9.
- (143) Díaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Silvan AM, de Santos J, Bernejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. *Life Sciences*. 2004; 74:2515-526.

Campo Grande, 06 de outubro de 2008.

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins de direito, que o projeto **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA 5,5-DIMETILHIDANTOÍNA”** sob a responsabilidade de **Diego Loureiro Ribas e Fernanda Lidvina Gaedicke**, orientação de Susana Elisa Moreno, tendo sido protocolado sob o nº **058/2008B**, após análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica Dom Bosco, foi considerado aprovado sem restrições.



**Susana Elisa Moreno**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Católica Dom Bosco

*Diego Loureiro Ribas*  
*09/10/08*



**ANEXO – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA**

**ANEXO B – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

