

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Renata de Freitas Mendes**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE**  
***Xylopiá sericea* A. St.-Hil. (ANNONACEAE)**

Juiz de Fora

2014

**RENATA DE FREITAS MENDES**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE  
*Xylopia sericea* A. St.-Hil. (ANNONACEAE).**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes**

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes, Renata F.  
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE  
Xylopiá sericea A. St.-Hil. (ANNONACEAE) / Renata F Mendes. --  
2014.  
96 f.

Orientador: Elita S Fontes  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Xylopiá sericea. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade antiinflamatória. I. Fontes, Elita S , orient. II. Título.

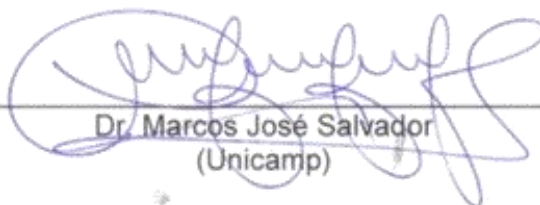
**Investigação do potencial químico e farmacológico de *Xylopia sericea*  
A.St.-Hil (Annonaceae)**

**Renata de Freitas Mendes**

**ORIENTADOR (A): Dr<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28/07/2014



---

Dr. Marcos José Salvador  
(Unicamp)



---

Dr<sup>a</sup>. Luciana Moreira Chedier  
(UFJF)



---

Dr<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes  
(UFJF)

À minha mãe, por ser meu orgulho, meu amparo e sempre me encorajar a vencer os desafios...

## **AGRADECIMENTOS**

Só tenho a agradecer...

Primeiramente a Deus por me guiar, me proteger e me dar sabedoria para fazer  
minhas escolhas;

À minha família maravilhosa, que me dá força, incentivo e amor em todos os  
momentos;

À minha mãe por me mostrar a preciosidade de ser simples e me fazer acreditar que

“O conhecimento é a única coisa que ninguém pode nos tirar...”

Ao meu namorado, Maurício por toda compreensão e carinho;

À Elita, por todas as oportunidades, por todo aprendizado e exemplo;

Aos meus colegas de laboratório pelo grupo que formamos;

À todos colaboradores pela contribuição;

Aos que fazem da Pesquisa uma “Ciência” e me motivam continuar!

**Obrigada a todos!**

***“O essencial é invisível aos olhos...”***

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

*Xylopia sericea*, Annonaceae, espécie nativa do Brasil, é conhecida popularmente como “embiriba”, “banana-de-macaco”, “pindaíba”, “pimenta-de-macaco”. Além do uso das sementes como condimento, a espécie é utilizada no paisagismo, na indústria caseira de cordoaria e para fins medicinais no tratamento da dor, inflamação e desordens gastrointestinais. Os objetivos desse trabalho foram contribuir com o estudo de alguns dos usos medicinais da espécie e ampliar o conhecimento acerca de seu potencial químico e biológico. Para isso, os frutos de *X. sericea* foram extraídos com metanol para obtenção do extrato metanólico (EBM), e também tiveram seu óleo essencial (OXS) extraído por hidrodestilação. A análise fitoquímica de EBM foi realizada para identificação das principais classes de metabólitos especiais e a determinação dos teores de fenóis totais e flavonoides. OXS foi caracterizado por CG-EM. *In vitro*, foram avaliadas para EBM e OXS as atividades: antioxidante frente aos métodos do sequestro de radicais livres (DPPH), sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e fosfomolibdênio; antibacteriana pela determinação da CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) para 10 cepas de importância clínica; leishmanicida para formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*; citotóxica para as linhagens de células tumorais Jurkat, HL-60, MCF-7, THP-1, MDA-231, HCT-116 e células não tumorais VERO. *In vivo*, foi avaliada a atividade anti-inflamatória pelo modelo do edema de orelha induzido por óleo de cróton, por via oral (EBM) e tópica (EBM e OXS). A toxicidade aguda de EBM, bem como sua dose letal média ( $DL_{50}$ ) foram determinadas. Fenóis, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, alcaloides e terpenoides/esteroides foram identificados em EBM, sendo o teor de fenóis totais  $358,2 \pm 33,1$  mg/g em equivalentes a ácido tânico e o teor de flavonoides  $28,8 \pm 8,2$  mg/g em equivalentes a quercetina. Foi possível identificar, por CG-EM, 63 substâncias que corresponderam a 80 % dos constituintes de OXS. Dentre elas, espatulenol (16,42 %), guaiol (13,93 %) e D - germacreno (8,11 %) foram as majoritárias. Quanto à atividade antioxidante, EBM e OXS apresentaram pelo método do DPPH,  $CI_{50}$  de 16,37 e 49,16  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente;  $CI_{50}$  de 49,16 e 6,92  $\mu\text{g/mL}$  pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico; 0,75 mg/mg de EBM e 2,30 mg/mg de OXS equivalentes à ácido ascórbico pelo método do fosfomolibdênio. Quanto à atividade antibacteriana, as cepas mais sensíveis à EBM foram *S. aureus*, *E. cloacae* e *B. cereus*, com CIM de 7,8; 7,8 e 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para OXS, *S. aureus*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *B. cereus* com CIM de 7,8; 7,8; 62,5 e 15,63  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Além disso, pode-se verificar que EBM e OXS apresentaram atividade bactericida para *E. faecalis* (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e para *B. cereus* (31,25  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. Em relação à atividade leishmanicida, EBM apresentou  $CI_{50} = 42,51$   $\mu\text{g/mL}$  para *L. amazonensis*, porém não apresentou atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*. OXS foi avaliada apenas para *L. amazonensis* e não apresentou atividade. EBM foi capaz de inibir a proliferação celular em 56 % para HL-60, não apresentando toxicidade significativa para as demais células tumorais, inclusive as células VERO. A aplicação de EBM por via tópica reduziu o edema de orelha nas doses de 1; 0,5 e 0,1 mg/orelha em 41,8 %, 99,1 % e 56,9 %. OXS foi capaz de reduzir o edema nas doses de 1 e 0,5 mg/orelha em 43,4 % e 54,2 %. Por via oral, EBM foi capaz de reduzir o edema nas doses de 300, 100 e 50 mg/kg em 36,3 %, 29,5 % e 32,0 %. Não foram observados sinais de toxicidade para EBM por via oral, sendo a  $DL_{50} > 2000$  mg/kg. Os resultados apresentados são relevantes uma vez que EBM e OXS apresentaram atividades biológicas promissoras o que justifica a continuação do estudo.



## ABSTRACT

*Xylopia sericea*, Annonaceae, is a species native from Brazil, popularly known as "embiriba", "banana-de-macaco", "pindaíba", "pimento-de-macaco". Besides being used as condiment, the species is used in landscaping, in home rope factory and for medicinal purposes in the treatment of pain, inflammation, and gastrointestinal disorders. The aims of this study was to corroborate some of *X. sericea* medicinal use and to expand the chemical and biological knowledge on this species. For this, the fruits of *X. sericea* were extracted with methanol to obtain the methanolic extract (EBM), and also had its essential oil (OXS) extracted by hydrodistillation. The phytochemical study of EBM was conducted to identify the main classes of special metabolites and to determine of the contents of total phenols and flavonoids. OXS was characterized by GC-MS. *In vitro*, EBM and OXS were evaluated for the following activities: antioxidant by DPPH scavenging,  $\beta$ -carotene bleaching, and phosphomolybdenum assays; antibacterial by determining the MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) for 10 strains of clinical importance; leishmanial for promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi*; cytotoxic against the tumor cell lines Jurkat, HL-60, MCF-7, THP-1, MDA-231, HCT-116 and no tumor Vero cells. The *in vivo* anti-inflammatory activity was evaluated by the croton oil-induced ear edema method, orally (EBM) and topically (EBM and OXS). The acute toxicity of EBM and the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) were determined. Phenols, flavonoids, coumarins, saponins, tannins, alkaloids and terpenoids/steroids were identified in EBM. The content of total phenols was 358.2  $\pm$  33.1 mg/g expressed as equivalent to tannic acid and of flavonoids was 28.8  $\pm$  8.2 mg/g expressed as equivalents to quercetin. Sixty three compounds were identified in OXS corresponding to 80 % of the oil constituents. Among them, spathulenol (16.42 %), guaiol (13.93 %) and germacrene D (8.11 %) were the major. Regarding the antioxidant activity, EBM and OXS presented by the DPPH method, IC<sub>50</sub> of 16.37 and 49.16  $\mu$ g/mL, respectively; IC<sub>50</sub> of 49.16 and 6.92  $\mu$ g/mL by  $\beta$ -caroten bleaching method; 0.75 mg/mg of EBM and 2.30 mg/mg of OXS equivalents to ascorbic acid by phosphomolybdenum method. Results for antibacterial activity showed that the most sensitive strains to EBM were *S. aureus*, *E. cloacae* and *B. cereus* with MIC of 7.8; 7.8 and 31.25  $\mu$ g/mL, respectively. To OXS, *S. aureus*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* and *B. cereus* showed the highest sensitivity with MIC of 7.8; 7.8; 62.5 and 15.63  $\mu$ g/mL, respectively. Furthermore, it was observed that EBM and OXS showed bactericidal activity for *E. faecalis* (1000  $\mu$ g/mL) and *B. cereus* (31.25  $\mu$ g/mL), respectively. Regarding leishmanicidal activity, EBM showed IC<sub>50</sub> of 42.51  $\mu$ g/mL for *L. amazonensis*, but showed no activity against *L. chagasi*. Moreover, OXS was evaluated only for *L. amazonensis* and showed no activity. EBM was able to inhibit cell proliferation by 56% for HL-60 and showed no significant toxicity to the other tumor cells, and also Vero cells. Topical application of EBM reduced the ear edema caused by croton oil by 41.8 %, 99.1 % and 56.9 % at doses of 1; 0.5 and 0.1 mg/ear. OXS was able to reduce the edema at the doses of 1 and 0.5 mg/ear by 43.4 % and 54.2 %. Orally, EBM was able to reduce the edema at doses of 300, 100 and 50 mg/kg by 36.3 %, 29.5 % and 32.0 %. No signs of toxicity were observed for EBM, with an LD<sub>50</sub> > 2000 mg/kg. The results are relevant since EBM and OXS showed promising biological activities which justifies the continuation of the study.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma da extração dos frutos de <i>X. sericea</i> .....	50
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição (%) do óleo essencial (OXS) obtido dos frutos de <i>Xylopi</i> <i>sericea</i> .....	52
<b>Tabela 2:</b> Atividade antioxidante do extrato metanólico (EBM) e óleo essencial (OXS) de <i>X. sericea</i> .....	55
<b>Tabela 3:</b> Atividade antimicrobiana do extrato metanólico e óleo essencial de <i>X.</i> <i>sericea</i> .....	56
<b>Tabela 4:</b> Atividade leishmanicida do extrato metanólico e óleo essencial de <i>X.</i> <i>sericea</i> .....	57
<b>Tabela 5:</b> Atividade citotóxica do extrato metanólico e óleo essencial de <i>X.</i> <i>sericea</i> .....	58
<b>Tabela 6:</b> Consumo de água e ração no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de <i>X. sericea</i> .....	61
<b>Tabela 7:</b> Massa relativa dos órgãos no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de <i>X. sericea</i> .....	67

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM) e indometacina via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos..... 59
- Gráfico 2:** Efeito do óleo essencial de *X. sericea* (OXS) e dexametasona via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos..... 59
- Gráfico 3:** Efeito do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM) e indometacina via oral sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos..... 60
- Gráfico 4:** Ganho de massa corporal dos animais no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM) ..... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PPPM:** Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais

**CG-EM:** Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

**DL<sub>50</sub>:** Dose letal média

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**ERO's:** Espécies reativas de oxigênio

**LTA:** Leishmaniose tegumentar americana

**LV:** Leishmaniose visceral

**INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**EBM:** Extrato bruto metanólico

**OXS:** Óleo essencial

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**CAT:** Capacidade antioxidante total

**CIM:** Concentração inibitória mínima

**CBM:** Concentração bactericida mínima

**IK:** Índice de Kovats

**CI<sub>50</sub>:** Concentração inibitória média

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**UFC:** Unidades formadoras de colônias

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico

**COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**LMA:** Leucemia mieloide aguda

**TPA:** Acetato de tetradecainol-forbol

**COX:** Ciclo-oxigenase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	Justificativa .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	A família Annonaceae .....	18
2.2	O gênero <i>Xylopia</i> L. ....	20
2.3	A espécie <i>Xylopia sericea</i> A. St.-Hil. ....	22
2.4	Radicais livres, estresse Oxidativo e antioxidantes .....	27
2.5	Resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos .....	29
2.6	Leishmanioses e tratamento .....	30
2.7	Câncer .....	32
2.8	Inflamação .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	Objetivo geral .....	35
3.2	Objetivos específicos .....	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	36
4.1	Material vegetal .....	36
4.2	Obtenção do extrato metanólico .....	36
4.2.1	Perfil fitoquímico .....	36
4.2.2	Determinação do conteúdo de fenóis totais .....	37
4.2.3	Determinação do conteúdo de flavonoides .....	37
4.3	Obtenção do óleo essencial .....	38
4.3.1	Caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) de OXS .....	38
4.4	Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	39

4.4.1	Atividade antioxidante .....	39
4.4.1.1	Método de sequestro de radicais livres – DPPH .....	39
4.4.1.2	Método $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	40
4.4.1.3	Método do fosfomolibdênio: capacidade antioxidante total (CAT) ...	41
4.4.2	Atividade antimicrobiana .....	42
4.4.2.1	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) .....	42
4.4.2.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) .....	43
4.4.3	Atividade leishmanicida .....	43
4.4.4	Atividade citotóxica .....	44
4.5	Atividades biológicas <i>in vivo</i> .....	46
4.5.1	Animais .....	46
4.5.1.1	Atividade anti-inflamatória .....	46
4.5.1.2	Toxicidade aguda .....	48
5	<b>RESULTADOS</b> .....	50
5.1	Extração vegetal .....	50
5.1.1	Perfil fitoquímico do extrato metanólico (EBM) .....	51
5.1.2	Conteúdo de fenóis totais e flavonoides de EBM .....	51
5.1.3	Caracterização química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) do óleo essencial (OXS) .....	51
5.2	Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	55
5.2.1	Atividade antioxidante .....	55
5.2.2	Atividade antimicrobiana .....	55
5.2.3	Atividade leishmanicida .....	57
5.2.4	Atividade citotóxica .....	57
5.3	Atividades biológicas <i>in vivo</i> .....	58

5.3.1	Atividade anti-inflamatória .....	58
5.3.2	Toxicidade aguda .....	60
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
6.1	Extração e perfil fitoquímico do extrato metanólico (EBM) .....	63
6.1.1	Conteúdo de fenóis totais e flavonoides de EBM .....	64
6.2	Extração e caracterização química do óleo essencial (OXS) .....	65
6.3	Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	66
6.3.1	Atividade antioxidante .....	66
6.3.2	Atividade antimicrobiana .....	69
6.3.3	Atividade leishmanicida .....	73
6.3.4	Atividade citotóxica .....	74
6.4	Atividades biológicas <i>in vivo</i> .....	75
6.4.1	Atividade anti-inflamatória .....	75
6.4.2	Toxicidade aguda .....	78
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	80
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81



## 1 INTRODUÇÃO

O homem busca na natureza, desde a antiguidade, recursos que melhorem sua condição de vida visando, assim, aumentar suas chances de sobrevivência. Assim o uso da medicina tradicional, valendo-se de tradições e crenças locais, e das plantas medicinais tem sido considerados como bases para o cuidado, manutenção e promoção da saúde (BARBOSA FILHO et al., 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008), 80% da população dependem da medicina tradicional para os cuidados de saúde primários, devido ao desenvolvimento econômico e às restrições geográficas, como acontece em muitas regiões do Brasil.

Além disso, as plantas medicinais, as preparações fitofarmacêuticas e os produtos naturais isolados representam um mercado que movimenta bilhões de dólares, tanto em países industrializados como aqueles em desenvolvimento. No Brasil, a renda gerada totalizou US\$ 160 milhões em 2007 (OMS, 2008).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Isso se deve ao fato de que as plantas apresentam em seus metabólitos especiais uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; VELLOSA, 2005). Dessa forma, elas têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de

vários fármacos amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina. A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol e a artemisinina (ROCHA; ROCHA, 2006).

A observação do potencial da medicina popular e a grande riqueza da flora brasileira desencadearam interesse pela pesquisa científica na busca de novas moléculas bioativas, tornando-se necessário o incentivo à realização de estudos voltados à bioprospecção de espécies nativas pouco estudadas (SOUZA; OLIVEIRA; SALES, 2013).

### **1.1 Justificativa**

Nesse contexto, *Xylopia sericea* A. St.-Hil, Annonaceae é uma espécie nativa do Brasil, de ampla distribuição geográfica e utilizada pela população para diferentes fins. Além do uso das sementes como condimento, a espécie é utilizada no paisagismo, na indústria caseira de cordoaria e no tratamento de algumas afecções que acometem a população (CORRÊA, 1987; LORENZI, 2002; BRASIL, 2006; MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2007; PONTES et al., 2007). Embora seu valor econômico e etnomedicinal sejam relatados em alguns trabalhos, a espécie apresenta poucos estudos no que se refere ao seu potencial biológico e químico frente às propriedades relatadas popularmente. Assim, é importante a realização de estudos que auxiliem na comprovação das atividades farmacológicas popularmente descritas e que ampliem o conhecimento acerca de seu potencial químico e biológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A família Annonaceae

A família Annonaceae Juss. pertence à ordem Magnoliales e compreende cerca de 130 gêneros com aproximadamente 2300 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais na África, Ásia, Austrália, América Central e do Sul (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2005; APG III, 2009). O grande centro de distribuição da família está, sem dúvida, nas regiões amazônica, Guianas e sudeste do Brasil (MIRALHA, 1995). Entre os gêneros existentes há 29 registrados no Brasil, compreendendo aproximadamente 260 espécies, sendo os gêneros mais comuns *Annona*, *Xylopia* e *Guatteria* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; GOTTSBERGER, 2014).

A família inclui árvores, arbustos e, mais raramente, lianas, sendo a maioria das espécies de plantas lenhosas. Vegetativamente, Annonaceae pode ser reconhecida por características particulares, tais como odor forte e característico que exala do tronco cortado ou dos ramos, presença de fibras longas e resistências na casca conhecidas popularmente como envira (RIBEIRO et al., 1999).

O principal valor econômico das espécies dessa família é o fornecimento de frutos comestíveis muito apreciados, além disso, inúmeras espécies têm importantes usos terapêuticos em diversas comunidades do país, sendo identificado o uso frequente de três espécies: *Annona muricata*, *Annona tenuiflora* e *Xylopia frutensis* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Estudos têm mostrado importantes atividades farmacológicas relacionadas aos metabólitos secundários presentes em espécies de Annonaceae: citotóxica (flavanonas, acetogeninas), antitumoral (diterpenos,

alcaloides e acetogeninas), bactericida (alcaloides) e antifúngica (terpenos) (COLMAN-SAIZABITORIA et al., 1994; MARTINS, 1996; MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2003; COSTA et al., 2009).

Dentre os principais metabólitos encontrados na família, a classe dos alcaloides aporfínicos, ou aporfinoídes, derivados do esqueleto isoquinolínico, é bastante destacada. Sabe-se que esses apresentam atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais, atividades anti-agregante plaquetária, antibacteriana, antifúngica e a antiplasmódica (SILVA et al., 2007).

As acetogeninas também presentes são derivadas de ácidos graxos com aproximadamente 34 carbonos e apresentam um número variável de anéis tetraidrofurânicos ou tetraidropirânicos ao longo da cadeia hidrocarbônica (ALALI et al., 1999). Acetogeninas biologicamente ativas tem sido relatadas para os gêneros *Asimina*, *Goniothalamus*, *Annona* e *Xylopia*, mostrando-se promissoras pelo potencial de atividade antimicrobiano, antiparasitário, antitumoral, citotóxico e pesticida que apresentam. Essa classe de substâncias já foi isolada das cascas, raízes, folhas e, especialmente, sementes de espécies dessa família (COLMAN-SAIZABITORIA et al., 1994).

## 2.2 O gênero *Xylopia* L.

O gênero *Xylopia* L. é constituído por aproximadamente 160 espécies tropicais. No Brasil são frequentes em matas do litoral e do cerrado, embora ocorram em ambientes com estratos arbustivos e arbóreos mais densos (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; PONTES, 2006).

Várias espécies são usadas na medicina popular, dentre elas *Xylopia aromatica*, utilizada como agente diurético e em edema de pele; *X. aethiopica* no tratamento de bronquite e disenteria; *X. cayennensis* para transtornos cardiovasculares; e *X. discreta* para afecções do trato digestivo e reumatismo (LIMA et al., 1988; MOREIRA, 1999; NASCIMENTO et al., 2006). Já foi relatado, na África, o uso de *Xylopia* sp. no tratamento de doenças oportunistas do vírus HIV, como malária (CHINSEMBU; HEDIMB, 2010).

As atividades antimicrobiana (TATSADJIEU et al., 2003; KONNING et al., 2004), citotóxica (ASEKUN; KUNLE, 2004) acaricida, inseticida e nematicida (HERNÁNDEZ, 2001) já foram estudadas e comprovadas para espécies do gênero.

Foi comprovada para *X. aethiopica* a ação contra cupins, ação inseticida do óleo contra pragas de grãos (PONTES et al., 2007) além de efeito diurético e hipotensor dessa espécie devido a presença de diterpenos caurenóicos (SO-MOVA et al., 2001). Do extrato etanólico das folhas de *X. discreta* foi caracterizada a atividade antimicrobiana (LIMA et al., 1988). Extratos de *X. frutescens* obtidos das cascas e do caule produziram efeito moluscicida e antiplasmódico (SANTOS et al., 1998).

O extrato hexânico das cascas das raízes, sementes e da madeira de *X. emarginata* e *X. aromatica* apresentaram atividade contra *Plasmodium falciparum*

(MESQUITA et al. 2007). Além disso, extratos das folhas e caules de *X. aromatica* se mostraram ativos contra *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e sobre *P. falciparum* (OSÓRIO et al., 2007). Tais atividades podem estar relacionadas com a presença de acetogeninas como: venezianina, xilopianina, xilopiácina, xilomaticina, anomontacina, gigantetronenina, gigantetrocina A e anonacina, que já foram isoladas das cascas de *X. aromatica* e apresentaram atividade citotóxica sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, bem como sobre diversas linhagens de células tumorais (COLMAN-SAIRZABITORIA et al., 1995).

Outras espécies do gênero *Xylopi*a também já tiveram sua composição química identificada. Terpenos foram isolados de *Xylopi*a *frutescens*, *X. aromatica*, *X. brasiliensis* (TAKAHASHI; HENRIETA; BOAVENTURA, 2001; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Como exemplo, os sesquiterpenos do extrato em hexano dos frutos de *X. emarginata*: óxido de cariofileno, espatulenol, 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diidroxí-4(15)-eudesmeno e 4-hidroxí-1,15-peroxieudesmano (MOREIRA ; LAGO; ROQUE, 2007).

De *X. frutescens* foram caracterizados diterpenos como o ácido caurenóico, o cauroil e os ácidos xilópico e acutiflórico que apresentaram atividade antimicrobiana e tripanossomicida (OLIVEIRA et al., 1996; SILVA, et al., 1998).

Das cascas de *X. aromatica* foi isolada a aterospermidina, uma acetogenina que apresenta atividade citotóxica, antifúngica e antitumoral (MARTINS, 1996). Anam (1994) citou o isolamento e identificação de diidrochalconas obtidas da raiz de *X. africana*.

Alcalóides também foram relatados no gênero dentre eles os do tipo benziltetraisoquinolínicos: coclaurina (ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981); reticulina (JOSSANG et al., 1991), parvinina, xilopinidina (NISHIYAMA et al., 2004); do tipo protoberberínicos: palmatina, berberina (ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981); do

tipo tetrahidroprotoberberínicos: discretamina (ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981), discretina, coripalmina xilopinina (SCHMUTZ, 1959); do tipo aporfínicos: anonaina, xilopina, laurolotsina (ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981), laurotetanina (CÂMARA, 1994), do tipo oxoaporfínicos: lanuginosina, oxoshinsunina (ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981), liriodenina (CÂMARA, 1994). Alcaloides oxaporfínicos foram isolados de *X. aethiopica* e avaliados como potentes inibidores de DNA topoisomerase (HARRIGAN et al., 1994).

Assim, as plantas do gênero *Xylopia* se destacam na busca de novas substâncias bioativas devido aos inúmeros metabólitos secundários presentes e suas respectivas bioatividades (PIMENTA et al., 2009).

### **2.3 A espécie *Xylopia sericea* A. St.- Hil.**

A espécie *Xylopia sericea* A. St.-Hil é uma planta aromática que apresenta os sinônimos botânicos *Xylopia intermedia* R.E.Fr., *Mayna sericea* Spreng., *Unona carminativa* Arruda, *Unona fluminensis* Vell., *Xylopia carminativa* (Arruda) R.E.Fr. e *Xylopicrum carminativum* (Arruda) Kuntze (TROPICOS, 2013). É conhecida popularmente como “embiriba”, especialmente na região Nordeste do Brasil (CORRÊA, 1987; PONTES et al., 2007), “banana de macaco”, “pindaíba”, “pimenta da costa”, “pimenteira”, “pimenta do sertão” (BORGES et al., 1987; RIBEIRO et al., 2001; PONTES et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; BARRETO et al., 2012), “chapéu de sol”, “embira”, “embira vermelha”, “pau de embira”, “pimenta de macaco”, “pimenta dos negros”, “pindaíba branca”, “pindaíba preta”, “semente de embira”, “tucaneiro” (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2014).

*X. sericea* é uma espécie nativa de ampla distribuição geográfica, encontrada nos domínios da Floresta Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica: Norte (Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima); Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí); Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro); Sul (Paraná) (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2014).

Trata-se de uma espécie florestal, arbórea, de tamanho que varia de 3,5 a 8 metros, coletada com flores em novembro e com frutos em junho e novembro. Caracteriza-se pelas folhas densamente seríceas na face abaxial, distinguindo-se claramente das outras espécies de *Xylopia*, e ainda por suas folhas de base aguda, pétalas alvas a creme. Flor axilar, caulinar ou em ramo flageliforme. Carpídios deiscentes, estaminódios presentes, botão estreitamente piramidal, anteras septadas transversalmente, lâminas foliares 7-10,5 x 1-2 cm, estreitamente elípticas, glabras na face adaxial, densamente cobertas por tricomas adpressos na face abaxial (LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005; PONTES; MELLO-SILVA, 2005; MATHEUS; FOLLI; LOPES, 2007). Os frutos deiscentes, do tipo “follicetum” (polifolículo), se abrem ao longo de uma única sutura ventral, sendo cada folículo longo-peciolado e, em geral, polispérmico (1 a 8 sementes por folículo). Esses quando imaturos são de coloração verde e quando maduros, apresentam endocarpo róseo avermelhado e epicarpo verde-avermelhado, que se mantêm relativamente carnosos, são glabros e fortemente aromáticos. Apesar de serem relativamente carnosos, os frutos dessa espécie apresentam deiscência, de modo a dificultar a sua classificação em carnosos ou secos (CASTELLANI; DAMIÃO-FILHO; AGUIAR, 2001).

As cascas da madeira de *X. sericea* são utilizadas na indústria caseira de cordoaria. As sementes aromáticas e carminativas são usadas como condimento, substituindo a pimenta do reino (CORRÊA, 1987; PONTES et al., 2007; OLIVEIRA et



al., 2012). A espécie pode ser usada em paisagismo devido ao porte e beleza da árvore, bem como em plantios de áreas degradadas por se tratar de uma planta adaptada a terrenos secos, de baixa fertilidade e produtoras de frutos comestíveis para pássaros (LORENZI, 2002).

Em 1986, no 2º Seminário do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (PPPM), *X. sericea* foi uma das espécies mencionadas devido ao seu uso popular, e incluída na lista composta por 74 plantas, no grupo de espécies com suposta atividade analgésica, antipirética, anti-inflamatória e/ou antiespasmódica para a realização dos estudos farmacológicos pré-clínicos, clínicos e toxicológicos (BRASIL, 2006).

A infusão dos frutos de *X. sericea* é usada popularmente no tratamento de perturbações gástricas (CORRÊA, 1987; PONTES et al., 2007), além de já ser relatado o uso etnomedicinal dessa espécie como anti-inflamatório (MOREIRA ; LAGO; ROQUE, 2007).

Estudos relacionados com a composição química da espécie mostraram no extrato hexânico das sementes o monoterpeneo  $3\beta,6\beta$ -dihidróxi-p-ment-1-eno, e os diterpenos do tipo beiereno: *ent*-beier-15-en-19-oato de metila, do tipo traquilobânicos: ácido *ent*-15 $\alpha$ -hidróxi-traquiloban-19-oico, *ent*-traquiloban-18-oato de metila, do tipo cauranos: ácido *ent*-16 $\beta$ -hidroxicauran-19-oico, *ent*-cauran-16 $\beta$ -ol, ácido *ent*-15 $\alpha$ -acetoxicaur-16-en-19-oico, ácido *ent*-(-)-caur-16-en-19-oico (ácido caurenico), do tipo artisanos: *ent*-atis-15-en-19-oato de metila (TAKAHASHI; HENRIETA; BOAVENTURA, 2001).

Outros estudos também relataram a presença de terpenoides na espécie, como o ácido *ent*-16 $\alpha$ -17-dihidróxi-cauran-19-oico, ácido *ent*-15 $\beta$ -hidróxi-caur-16-en-19-oico (MATOS; MATOS, 1984), ácido *ent*-16 $\alpha$ -metóxi-cauran-19-oico, cauran-16 $\alpha$ -

ol, ácido *ent*-traquilobano-19-oico (CÂMARA, 1994), ácido 16 $\alpha$ -hidróxi-cauran-19-oico, ácido *ent*-15 $\beta$ -acetóxi-caur-16-en-19-oico (ácido xilópico), ácido *ent*-caur-15-en-19-oico e o ácido *ent*-(-)-caur-16-en-19-oico (ácido caurenoico) (MATOS; MATOS, 1984; CÂMARA, 1994). Martins et al. (2012) identificaram no extrato etanólico das folhas os flavonoides rutina, hesperidina e quercetina.

O óleo essencial extraído dos frutos revelou a presença de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -tujeno, canfeno, fenchano, sabineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno, car-3-eno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, ocimeno,  $\gamma$ -terpineno, *p*-cirmeneno, terpinoleno, linalol, terpinen-4-ol, mirtenol, carveol, geraniol, dentre outros terpenos (CRAVEIRO; ALENCAR; VOSTROWSK, 1986). A caracterização por CG-EM realizada por Pontes (2006) mostrou  $\beta$ -pineno (45,59 %) e  $\alpha$ -pineno (17,18 %) como constituintes majoritários no óleo dos frutos.

Lemos et al. (1992) identificaram no óleo essencial das folhas e frutos sesquiterpenos e monoterpenos, com predominância de monoterpenos no óleo dos frutos (81,71 %) e sesquiterpenos nas folhas (94,94 %). O óleo de folhas foi majoritariamente constituído por cubenol (57,43 %), seguido por  $\alpha$ -*epi*-muurolol (26,09 %) (PONTES, 2006; PONTES et al., 2007). Os componentes majoritários do óleo essencial das cascas das raízes foram *p*-cimeno (22,8 %) e  $\alpha$ -gurjuneno (13,8 %) (FOURNIER et al., 1994). Câmara, Alencar e Silveira (1996) identificaram 39 diferentes constituintes da espécie por meio de CG-EM dos óleos hidrodestilados das raízes, tronco, folhas e frutos, sendo os constituintes principais no óleo das folhas: (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (22,78 %),  $\gamma$ -elemeno (16,67 %),  $\gamma$ -muuroleno (12,22 %),  $\beta$ -cariofileno (11,55 %) e  $\beta$ -elemeno (11,48 %); no óleo dos frutos: mirceno (21,68 %),  $\beta$ -pineno (13,01 %) e  $\beta$ -elemeno (10,32 %); no óleo da raiz:  $\beta$ -pineno (17,83 %) e no óleo do tronco:  $\beta$ -pineno (60,73 %) e  $\alpha$ -gurjuneno (19,22 %).

Além disso, foi avaliada a presença de ácidos graxos no óleo, por meio de CG-EM, como ácido láurico (1,4 %), lauroleico (0,9 %), laurinoleico (3,6 %), mirístico (0,7 %), miristoleico (1,6 %), miristinoleico (1,7 %), palmítico (30,3 %), esteárico (4,4 %) oleico (27,1 %) e linoleico (28,4 %) (CÂMARA, 1994).

Quanto às atividades biológicas, poucos estudos foram encontrados. O extrato hexânico dos frutos, o óleo essencial dos frutos e folhas e o ácido xilópico, diterpeno isolado da espécie, mostraram atividade tóxica sobre o ácaro *Tetranychus urticae* Koch, conhecido como ácaro-rajado que infesta uma grande variedade de culturas economicamente importantes em todo o mundo causando consideráveis perdas na produtividade (PONTES, 2006). Além disso, os extratos aquosos do fruto e das cascas apresentaram atividade analgésica (ALMEIDA et al., 1996) e o óleo das cascas das raízes exibiram atividades bacteriostáticas e fungistáticas moderadas (FOURNIER et al., 1994).

O extrato etanólico das folhas foi submetido à avaliação do potencial citotóxico frente à *Artemia salina* e antifúngico frente à *Colletotrichum musae*, fungo causador da antracnose. Os resultados foram promissores, uma vez que as amostras mostraram atividade antifúngica e não apresentaram atividade citotóxica frente à *Artemia salina* ( $DL_{50} > 1000$  ppm) (MARTINS et al., 2012).

As substâncias fenólicas extraídas das sementes de *X. sericea* foram avaliadas quanto à sua influência na inibição de semente de alface. Os resultados mostraram que as sementes de alface germinadas, tanto em água como em solução de ácido giberélico por três dias, paralisaram o crescimento do hipocótilo logo após o contato com o extrato, atuando, aparentemente, no mecanismo relacionado à atividade da giberelina, apresentando atividade alelopática (BORGES et al., 1987).

Nesse contexto, *X. sericea* torna-se uma espécie em potencial uma vez que é necessário a comprovação das atividades descritas popularmente, e a busca de novas atividades que caracterizam e reforçam a importância do gênero *Xylopi*.

#### **2.4 Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes**

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro, sendo essencial à vida aeróbica e ao metabolismo humano, uma vez que o oxigênio é o último aceptor no fluxo de elétrons, que produz energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto, problemas ocorrem quando o fluxo de elétrons é incompleto, gerando espécies químicas altamente reativas, denominadas radicais livres, dentre eles temos as espécies reativas de oxigênio (ERO's) (PIETTA, 2000).

As ERO's são potencialmente danosas e são produzidas continuamente nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbico normal (reações bioquímicas oxidativas) quanto por fatores externos (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). São formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos em concentrações fisiológicas necessárias ao funcionamento normal da célula (como sinalização intracelular e regulação redox), ou em quantidades excessivas, causando danos oxidativos à célula (danos ao DNA, a proteínas, incluindo a oxidação de importantes enzimas), contribuindo para o envelhecimento e muitas doenças humanas como câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes (MAIA, 2003).

Em decorrência da peroxidação lipídica, a membrana celular é um dos componentes celulares mais atingidos pelas ERO's, o que acarreta alterações em sua integridade estrutural e funcional, alterando sua fluidez e permeabilidade

causando inúmeros danos que podem culminar com a morte celular (SOARES, 2002). A lipoperoxidação leva a formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, 4- hidroxinonenal e isoprostanos. Tais produtos em excesso são lesivos para a célula, contudo estão envolvidos com a resposta inflamatória, participando da formação de prostaglandinas (cascata do ácido araquidônico) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS; DAVID, 2006). Segundo Halliwell, Clement e Long (2000), “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

No nosso organismo ocorre a produção de antioxidantes que podem agir enzimaticamente como a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, ou não enzimaticamente, como a glutathione, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipoico, dentre outros. O organismo também dispõe de antioxidantes provenientes da dieta como o  $\beta$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e substâncias fenólicas (PIETTA, 2000).

O desequilíbrio entre a geração de ERO's e o potencial antioxidante do organismo resulta no estresse oxidativo (ABDOLLAHI et al., 2004). O estresse oxidativo tem sido apontado como uma via comum relacionada a diversos mecanismos de patogênese de doenças cardiovasculares, nefropatia, neuropatia, retinopatia, disfunção erétil, diabetes e suas complicações (MORETONI, 2008).

Diversos estudos têm comprovado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo ajudando assim na prevenção

de várias patologias (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Na indústria são utilizados na proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS; DAVID, 2006). Assim, tendo em vista essas diversas aplicações e os inegáveis benefícios à saúde humana, muitas pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante (ALARCON; DENICOLA, 2013). Entre os principais fitoantioxidantes destacam-se o ácido ascórbico, flavonoides como a rutina e quercetina, derivados do ácido cinâmico e outras substâncias polifenólicas como o ácido elágico (GIL et al., 2005).

## **2.5 Resistência de microrganismos patogênicos aos antimicrobianos**

Os antimicrobianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos sendo assim primordiais na prevenção e tratamento de infecções. Podem ser de origem natural (bactérias, fungos, plantas) ou de origem sintética (BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013).

Os antimicrobianos são a segunda classe de drogas mais utilizadas inclusive pela medicina veterinária e na área agrícola (MAIA et al., 2009). Na terapêutica, essas drogas são muitas das vezes consumidas de forma inadequada devido a prescrições incorretas, administrações empíricas ou até mesmo da automedicação (SÁEZ-LLORENS, 2000). O uso na prática agrícola faz com que a presença de resíduos desses compostos nos alimentos comercializados comprometa a saúde dos consumidores e agrave ainda mais o quadro de resistência microbiana causando elevados índices de mortalidade (MAIA et al., 2009).

A resistência microbiana ocorre devido ao surgimento de estirpes não sensíveis aos antibióticos disponíveis, apresentando a capacidade de se multiplicarem mesmo quando expostas a altas concentrações desses agentes. Esse fenômeno ocorre em função da própria evolução natural dos microrganismos, mas tem sido maximizado devido ao uso irracional e abusivo de agentes antimicrobianos nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (WANNMACHER, 2004; SILVA et al., 2010). Além disso, outros desafios relacionados aos antimicrobianos disponíveis são a tolerância/toxicidade, o fato de serem bacteriostáticos ou bactericidas lentos e o custo para o indivíduo e para as instituições de saúde (QUEIROZ et al., 2012; BARROS; MACHADO; SPRINZ, 2013).

Uma das principais funções dos metabólitos especiais produzidos pelas espécies vegetais é conferir proteção contra os microrganismos (DEWICK, 2002). Tendo em vista o quadro preocupante da resistência adquirida por vários microrganismos, as pesquisas sobre investigação de produtos naturais ativos aumentaram significativamente visando à obtenção de novas drogas e, portanto, de novas alternativas (DUARTE, 2006).

## **2.6 Leishmanioses e tratamento**

As leishmanioses são antropozoonoses de origem infecciosa, porém, não contagiosa, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas com ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e insetos vetores (flebotomíneos) (BRASIL, 2007 a; BRASIL, 2007 b). Os parasitas vivem e se multiplicam no interior das células que fazem parte do sistema de defesa do indivíduo, chamadas macrófagos (ARRUDA, 2010).

Há dois tipos de leishmaniose: leishmaniose tegumentar americana ou cutânea e a leishmaniose visceral ou calazar. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) caracteriza-se por feridas na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo. Tardiamente, podem surgir feridas nas mucosas do nariz, da boca e da garganta. Essa forma de leishmaniose é conhecida como “ferida brava”. A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica grave que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e animais, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele. Calazar é uma doença sistêmica, pois, acomete vários órgãos internos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea (BRASIL, 2007 b).

No Brasil, as leishmanioses ocorrem em todo o território, sendo endêmicas nas regiões Norte e Nordeste (REIS et al., 2012). Já foram identificadas várias espécies do gênero *Leishmania*, dentre essas, *L. amazonensis*, agente etiológico da LTA e *L. chagasi* agente etiológico da LV nas Américas (ARRUDA, 2010).

Estima-se que as leishmanioses apresentam uma prevalência de 12 milhões de casos no mundo, distribuída em 88 países, em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) (BRASIL, 2007 a).

As medidas mais utilizadas para o combate da enfermidade se baseiam no controle de vetores e dos reservatórios, proteção individual, diagnóstico precoce e tratamento dos doentes, manejo ambiental e educação em saúde. O tratamento dessa parasitose é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (RATH et al., 2003; CROFT; COOMBS, 2003).

Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses seja por via oral, ou na aplicação tópica sobre as



lesões cutâneas (MOREIRA et al., 2002; REIS et al., 2012). Muitas espécies vegetais apresentam em sua composição substâncias com atividade leishmanicida, o que impulsiona a busca de novas drogas derivadas de plantas (BEZERRA et al., 2006).

## **2.7 Câncer**

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais (ACS, 2013). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2012 a).

O câncer pode ser causado por fatores externos, relacionados ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural (tabaco, organismos infecciosos, produtos químicos e radiação); ou por fatores internos, na maioria das vezes geneticamente pré-determinados, estando ligados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir do metabolismo). Esses fatores causais estão inter-relacionados e podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais e assim promover a carcinogênese (INCA, 1996; ACS, 2013).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A OMS estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, com aproximadamente 17 milhões de mortes, sendo a maior incidência em países de

baixa e média renda. Para 2012/2013, a estimativa do INCA era de aproximadamente 500 mil casos novos de câncer no Brasil (INCA, 2012 b).

Muitos tipos de câncer podem ser prevenidos evitando a exposição a fatores de risco como o consumo de tabaco, e uma grande porcentagem podem ser curados mediante a tratamentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia especialmente se diagnosticados precocemente (ACS, 2011).

Apesar dos avanços científicos na compreensão e no tratamento do câncer, a terapia ainda é dificultada por problemas como resistência, baixa seletividade, toxicidade e insolubilidade em água dos medicamentos disponíveis, causando edema e necrose (MESQUITA, 2009).

Dos medicamentos anticancerígenos utilizados atualmente, grande parte foi obtida a partir de produtos naturais ou desenvolvida a partir desses, como a vincristina e vimblastina (*Vinca rosea*), o paclitaxel e docetaxel (*Taxus brevifolia*) e etoposídeo e teniposídeo (*Podophyllum peltatum* e *P.emodi*) (MESQUITA, 2009). Portanto, espécies vegetais são uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais.

## **2.8 Inflamação**

O processo inflamatório faz parte da estratégia de sobrevivência dos organismos contra as injúrias decorrentes das infecções e traumas. A inflamação é desencadeada por vários fatores, incluindo o estresse oxidativo, poluentes ambientais, agentes microbianos, e danos físicos aos tecidos (STONER; WANG, 2013). A resposta inflamatória, em geral, tem como resultado o restabelecimento da

integridade orgânica contra as agressões, contudo, pode ocorrer uma resposta excessiva provocando aumento de morbidade e mortalidade (TRACEY, 2002).

As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório (GILROY et al., 2004). Tal resposta se manifesta pela presença de rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local), dor e a perda da função do tecido ou órgão lesado nas reações crônicas (KASSUYA, 2006; LAPA et al., 2007).

Dentre as múltiplas causas que levam à inflamação estão agentes biológicos (como bactérias, vírus e protozoários); agentes químicos (como ácidos, álcalis, formaldeído e carragenina); agentes físicos (como calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, traumatismos, fraturas, incisões); dentre outros (KASSUYA, 2006).

Devido aos expressivos efeitos colaterais apresentados pela maioria dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado farmacêutico, principalmente associados à terapia crônica, surge o grande interesse na descoberta de novos protótipos de fármacos provenientes de plantas da flora brasileira (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada. Dentre elas, destacam-se terpenos, flavonoides, lignanas, taninos, alcaloides, saponinas e cumarinas (KASSUYA, 2006; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento químico e farmacológico da espécie *Xylopia sericea*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato metanólico (EBM) e o óleo essencial (OXS) dos frutos de *X. sericea*;
- Determinar o perfil fitoquímico, o teor de fenóis totais e flavonoides de EBM;
- Caracterizar OXS por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas OXS;
- Avaliar *in vitro* as seguintes atividades de EBM e OXS:
  - antioxidante;
  - antimicrobiana pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a cepas bacterianas de importância clínica;
  - leishmanicida para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*;
  - citotóxica frente a linhagens de células tumorais de importância clínica e uma linhagem de célula não tumoral.
- Avaliar *in vivo*:
  - Atividade anti-inflamatória utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, por via oral para EBM e tópica para EBM e OXS;
  - Toxicidade aguda e determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) de EBM, por via oral.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Material vegetal**

Os frutos de *Xylopia sericea* foram coletados na Fazenda Serra da Boa Vista, Lima Duarte-MG, em setembro de 2011. A exsiccata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ 64645) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **4.2 Obtenção do extrato metanólico**

Após a coleta, os frutos foram limpos, selecionados e deixados ao sol para secagem durante aproximadamente oito dias. Posteriormente foram pesados (62,7 g) e pulverizados, com as sementes, em moinho de facas. O material foi submetido à extração com metanol por maceração estática, obtendo-se, após evaporação do solvente em evaporador rotatório, 14 g de extrato metanólico (EBM), que foi mantido sob refrigeração.

#### **4.2.1 Perfil fitoquímico**

EBM, ressuspenso em metanol, foi submetido às análises fitoquímicas preliminares para identificação das principais classes químicas de metabólitos especiais - alcaloides, triterpenoides, esteroides, saponinas, cumarinas, substâncias fenólicas, taninos, flavonoides e antraquinonas - de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações.

#### 4.2.2 Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de substâncias fenólicas totais de EBM foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH; YEN, 1997). Para a preparação da curva de calibração foram misturados 300; 400; 500; 600; 700; 800 e 900  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tânico (100 mg/L) com q.s.p. 1 mL etanol P.A. Em seguida, para cada solução, 1 mL do reagente de Folin-Denis e 8 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % em tampão NaOH 0,1N foram misturados e agitados. A absorbância foi mensurada, depois de 60 min em banho a 30 °C, a 730 nm e a curva de calibração foi construída. Para avaliar o teor de fenóis totais, 1 mL de EBM em etanol (0,5 mg/mL) foi misturado com 8 mL de tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % em NaOH 0,1N e 1 mL do reagente de Folin-Denis. O branco foi preparado a partir da adição de 1 mL de metanol aos mesmos reagentes como descrito acima. As amostras, preparadas em triplicata, foram incubadas por 60 min em banho a 30 °C, centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, e foi realizada a leitura do sobrenadante a 730 nm. O conteúdo de substâncias fenólicas foi expresso em mg/g de extrato  $\pm$  desvio padrão, em equivalentes de ácido tânico.

#### 4.2.3 Determinação do conteúdo de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado pelo método de complexação com cloreto de alumínio, descrito por Miliauskas, Venskutonis e Van-Beer (2004), com pequenas modificações, usando a quercetina como substância de referência. A curva de calibração da quercetina foi preparada por mistura de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,10 mL de uma solução etanólica de quercetina (0,5 mg/mL) com 1 gota de ácido acético glacial, 1 mL de cloreto de alumínio 2 % em etanol (20 g/L) e diluída com

etanol para 25 mL. Após incubação por 40 min a 20 °C, absorvância foi mensurada a 415 nm e a curva de calibração foi construída. Para avaliar o teor de flavonoides, 1 mL de EBM em etanol (0,5 mg/mL) foi adicionado com 1 gota de ácido acético glacial, 1 mL de cloreto de alumínio 2 % em etanol (20 g/L) e diluído com etanol para 25 mL. O branco foi preparado com 1 mL da amostra e 1 mL de cloreto de alumínio 2 % e diluído para 25 mL. A determinação foi realizada em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato  $\pm$  desvio padrão, em equivalente de quercetina.

#### **4.3 Obtenção do óleo essencial**

O óleo dos frutos de *X. sericea* (OXS) foi extraído por hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger. Para isso, 160 g foram colocadas em um balão volumétrico contendo 1000 mL de água destilada, sobre uma manta com controle de temperatura. Após a fervura, a temperatura da manta foi diminuída e esperou-se aproximadamente 2 h. Devido à diferença de densidade, o óleo foi separado da água, uma pequena porção de clorofórmio foi adicionada para esgotar qualquer resíduo aquoso e posteriormente esse solvente foi esgotado com nitrogênio. O óleo foi armazenado em freezer em recipiente protegido da luz. O rendimento foi calculado a partir do peso do material fresco (% p/p).

### **4.3.1 Caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) de OXS**

As substâncias presentes em OXS foram identificadas por CG-EM em cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5972 equipado com uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 m); hélio como gás de arraste com razão de fluxo de 2,0 mL/min; temperatura programada de 70 °C a 290 °C (2 °C/min); injetor com temperatura de 270 °C e detector com temperatura de 300 °C e energia de ionização de 70 eV. O índice de retenção de Kovats (IK) das substâncias observadas foi calculado levando-se em conta os tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos obtidos nas mesmas condições da amostra. Os constituintes do óleo foram identificados por comparação do seu IK e perfil de fragmentação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca Wiley 275.1, NIST, Pherobase (ADAMS, 1995; NIST, 2014; PHEROBASE, 2014).

## **4.4 Atividades biológicas *in vitro***

### **4.4.1 Atividade antioxidante**

#### **4.4.1.1 Método de sequestro de radicais livres – DPPH**

A atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi determinada pelo método descrito por Govindarajan et al. (2003). Foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, 100 µL de uma solução 1 mg/mL das amostras, EBM e OXS, em metanol. A partir destes, foram realizadas 10 diluições



sucessivas 1:2 em metanol, até a concentração de 0,98 µg/mL. Às amostras e às diluições foram adicionados 150 µL de solução de DPPH 20 µg/mL em metanol. A placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e a absorbância foi medida em 517 nm. As medidas foram realizadas em triplicata. Metanol foi usado como branco e ácido ascórbico, quercetina e  $\alpha$ -tocoferol como controles positivos. Foi calculada a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ), que é a concentração de amostra requerida para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 %, com auxílio do programa GraFit 5.

#### **4.4.1.2 Método $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

A avaliação da atividade antioxidante pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo o método descrito por Melo e Mancini Filho (1989) com algumas modificações. Foi utilizado como substrato uma emulsão de  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico. Para o preparo da emulsão adicionou-se em um balão redondo 20 µL de ácido linoleico, 265 µL de Tween 40, 50 µL da solução  $\beta$ -caroteno (10 mg/mL) e 1 mL de clorofórmio, logo após homogeneização o clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório à 50 °C. Posteriormente, foram adicionados aproximadamente 40 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio (durante 30 min). A absorbância da emulsão foi medida em 470 nm e ajustada entre 0,6 e 0,7. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 250 µL da emulsão e 10 µL das amostras, EBM e OXS, em 6 concentrações variando de 38,4 a 1,2 µg/ mL em metanol. O teste foi realizado em triplicata. Quercetina foi utilizada como substância de referência e metanol como controle (100 % de oxidação). Em leitor de microplacas, foram realizadas leituras sequenciais a 45 °C, 470 nm, durante 120 min, com intervalos de

15 min. A queda da absorbância das amostras ( $A_m$ ) foi correlacionada com a queda da absorbância do controle ( $A_c$ ), obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) por meio da equação:  $A_c = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$

$$A_m = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$\% I = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} \times 100$$

$A_c$

Posteriormente foi calculada a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico com auxílio do programa GraFit 5.

#### **4.4.1.3 Método do fosfomolibdênio: capacidade antioxidante total (CAT)**

Para avaliar a CAT utilizou-se o método descrito por Prieto, Pineda, Aguilar (1999) com algumas modificações. O complexo fosfomolibdênico, solução reagente, é formado pela reação da solução de fosfato de sódio [ $Na_3PO_4$ ] (28 mL, 0,1 mol/L) com a solução de molibdato de amônio [ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ] (12 mL, 0,03 mol/L) e a solução de ácido sulfúrico [ $H_2SO_4$ ] (20 mL, 3 mol/L) em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com  $H_2O$  destilada para 100 mL. Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL da solução reagente e 300  $\mu$ L das amostras, EBM e OXS (200  $\mu$ g/mL em metanol). Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95 °C por 90 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura a 695 nm, em espectrofotômetro. Rutina foi utilizada como substância de referência. O teste foi realizado em triplicata. Para a avaliação dos resultados, foi feita uma curva de calibração, com diferentes concentrações de ácido ascórbico entre 500  $\mu$ g/mL a 25  $\mu$ g/mL. A atividade redutora foi calculada e expressa em equivalente à ácido ascórbico  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.4.2 Atividade antimicrobiana

##### 4.4.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4552), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o método descrito pela CLSI (2010). Cepas de bactérias foram cultivadas “overnight” à 37 °C por 24 h em ágar Mueller Hinton. Diluições sucessivas de 1000 a 7,8 µg/mL das amostras, EBM e OXS em dimetilsulfóxido (DMSO) 1 %, foram adicionadas em microplacas de 96 poços, e caldo Mueller Hinton foi adicionado para completar o volume de 180 µL. Após, foram adicionados 20 µL de inóculo [ $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL), de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland]. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Cloranfenicol e ciprofloxacino foram usados como substâncias de referência. Após o período de incubação foi realizada a leitura visual das placas. A CIM foi calculada como a menor diluição que apresenta completa inibição do crescimento da cepa testada. Os testes foram realizados em duplicatas.

#### 4.4.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada pelo método descrito por Spencer e Spencer (2004), com algumas modificações. Assim, 10 µL dos poços com nenhum crescimento visível no ensaio de CIM foram transferidos e subcultivados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, e depois incubadas a 37° C durante 24 h. A CBM foi calculada como a concentração da amostra que não apresentou qualquer crescimento.

#### 4.4.3 Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida foi determinada de acordo com o método descrito por M'Bongo et al. (1997). No ensaio da atividade antipromastigota, as formas promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, os parasitas foram lançados à razão de  $2 \times 10^6$  células/mL de meio Warren com 10 % de soro bovino fetal para *Leishmania amazonensis* e  $3 \times 10^6$  células/mL de meio 199 com 10 % de soro bovino fetal para *Leishmania chagasi*, em uma microplaca de 96 poços. Após 1 h as amostras EBM e OXS, nas concentrações de 100 a 6,25 µg/mL, foram adicionadas em triplicata. Após 72 h de incubação em estufa a 25 °C, a motilidade e morfologia dos promastigotas foram avaliadas sob microscópio ótico invertido e, na sequência, adicionou-se 10 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT) a 5mg/mL em cada poço e a placa permaneceu incubada por mais 4 h sob as mesmas condições (MOSSMAN, 1983). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de uma solução contendo isopropanol e ácido clorídrico (100 mL de isopropanol / 0,4 mL de HCl 10 N) e lida em um espectrofotômetro à 570 nm. Foi

determinada a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) de cada amostra, que representa a concentração molecular que inibe 50 % do crescimento das formas promastigotas. Anfotericina B foi usada como substância de referência. Os valores de  $CI_{50}$  foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos independentes, realizados em duplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa GraFit 5.

#### **4.4.4 Atividade citotóxica**

A determinação da atividade citotóxica das amostras sobre linhagens celulares tumorais foi avaliada pela inibição da viabilidade celular por meio do método de metabolização do MTT (MOSSMAN, 1983). Foram selecionadas as seguintes linhagens: HL-60 (leucemia promielocítica humana); Jurkat (leucemia linfoblástica de células T humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); MDA-231 (células de câncer de mama); THP-1 (células mieloides leucêmicas); HCT-116 (células de carcinoma colorretal); VERO (células renais de macaco), utilizadas como parâmetro de célula não tumoral. Estas linhagens foram mantidas na fase logarítmica de crescimento em RPMI 1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina enriquecido com 2 mM de L-glutamina e 10 % de soro bovino fetal. Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5 %  $CO_2$  e 95 % de ar. As suspensões celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo  $5 \times 10^4$  células / poço. As placas foram pré-incubadas por 24 h a 37 °C para permitir a adaptação das células antes da adição das amostras. Posteriormente, foram adicionadas as amostras, EBM ou OXS, na concentração de 50  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em uma atmosfera de 5 % de  $CO_2$  e 100 % de umidade relativa e a viabilidade celular foi

determinada pelo método MTT. Após período de incubação 20  $\mu$ L de solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h. Ao final deste período, o sobrenadante foi removido e 200  $\mu$ L de 0,04 M de HCl em álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. Os grupos controle incluíram o tratamento com 0,1 % de DMSO (controle negativo) e um controle de células (CC) em que há apenas meio e células, sem DMSO. Para comparação, a citotoxicidade do etoposídeo (5,8  $\mu$ g/mL, controle positivo), foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Todas as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), antes da diluição. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média de dois experimentos independentes. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da proliferação celular, em comparação com 0,1 % de DMSO. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5.0.

## 4.5 Atividades biológicas *in vivo*

### 4.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos machos Swiss pesando entre 25 e 30 g. Os animais, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, foram alojados em gaiolas e mantidos sob condições controladas de temperatura (22 °C) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12 h) com livre acesso à água e ração. Antes da realização dos testes os animais foram submetidos a jejum de sólidos de acordo com cada protocolo, e acesso à água "*ad libitum*". Os grupos foram constituídos de 5-8 animais. Os protocolos experimentais e procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF (n° 096/2012).

#### 4.5.1.1 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória de EBM e OXS foi avaliada pelo modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, por meio da capacidade de inibição da formação do edema induzido por óleo de cróton na orelha de camundongos. Para avaliação da atividade por **via tópica**, foi realizada a aplicação de 20 µL de uma solução de óleo de cróton (2,5 %, v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha direita dos animais, segundo Romay et al. (1998). Após 15 min, foram aplicadas 20 µL das amostras sobre a superfície interna da orelha direita dos animais.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n = 8):

**Grupo controle negativo:** acetona

**Grupo controle positivo:** dexametasona 0,1 mg/orelha em acetona.

**Grupos teste:** EBM (1; 0,5 e 0,1 mg/orelha em acetona) e OXS (1; 0,5 e 0,1 mg/orelha em acetona)

A mesma região da orelha esquerda foi tratada com 20 µL de acetona. Após 6 h da aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados e com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram removidos de cada orelha e pesados. A atividade antiedematogênica foi expressa como a média das diferenças de peso entre as orelhas dos animais (BOLLER, 2007).

Para avaliação da atividade por **via oral** os animais foram deixados previamente em jejum de sólidos por 12 h e divididos nos respectivos grupos (n = 8):

**Grupo controle negativo:** salina 12 % de Tween 40.

**Grupo controle positivo:** indometacina 10 mg/kg em salina 12 % de Tween 40.

**Grupos teste:** EBM (300, 100 e 50 mg/ kg) em salina 12 % de Tween 40.

Os tratamentos foram administrados por gavagem (10 mL/kg), e após 1 h, 20 µL de uma solução de óleo de cróton (2,5 %, v/v em acetona) foram aplicados sobre a superfície interna da orelha direita dos animais, enquanto a mesma região da orelha esquerda foi tratada com o mesmo volume de acetona. Após 4 h da aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados e com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram removidos de cada orelha e pesados. A atividade antiedematogênica foi expressa como a média das diferenças de peso entre as orelhas dos animais, sendo que, quanto menor a diferença de peso, maior o potencial de inibição.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (e.p.m) e foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Newman-Keuls e as diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5 % ( $p < 0,05$ ) comparadas ao controle negativo, foram consideradas significativas. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

#### **4.5.1.2 Toxicidade aguda**

A toxicidade aguda foi avaliada após exposição a uma dose única de EBM, via oral, segundo o metodologia descrita por Costa-Silva et al. (2008) com algumas modificações.

Os animais foram divididos nos respectivos grupos (n=5):

**Grupo controle:** salina 12 % de Tween 40.

**Grupos teste:** EBM (2000, 1000, 500, 100 mg/kg) em salina 12 % de Tween 40 foram administrados por gavagem (10 mL/kg) em dose única.

Posteriormente aos tratamentos, os animais foram observados nas primeiras 24 h, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 min e a cada 4 h e diariamente durante 14 dias após administração. Desde a 24<sup>a</sup> h até 14 dias após administração, foram observados o consumo de água e ração e a variação de massa corporal. Durante o experimento, foram observados parâmetros como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, alteração do tônus muscular, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais. Ao fim do período de observação todos os animais foram eutanasiados e os rins direito e esquerdo, o fígado, o coração e os pulmões foram retirados observados e pesados. O cálculo da massa relativa dos órgãos de cada animal foi realizado dividindo-se a

massa de cada órgão (g) pela massa corporal de cada animal, e multiplicando-se o resultado por 100.

Os resultados do ganho de massa corporal foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (e.p.m) e foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguido pelo teste Bonferroni. As massas relativas dos órgãos foram expressas como média dos animais em g/100 g de peso vivo  $\pm$  desvio padrão e o consumo de água e ração foram expressos em média por animal  $\pm$  desvio padrão, posteriormente esses valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Foram consideradas como significativas as diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5 % ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle negativo. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Extração vegetal

O fluxograma de extração dos metabólitos dos frutos de *Xylopiá sericea* encontra-se esquematizado na Figura 1. O extrato metanólico (EBM) obtido por maceração estática em metanol apresentou uma coloração marrom esverdeada e aspecto oleoso, com rendimento de aproximadamente 22,32 %. O óleo essencial (OXS) obtido por hidrodestilação apresentou uma coloração amarelada e rendimento de aproximadamente 0,93 % (p/p).

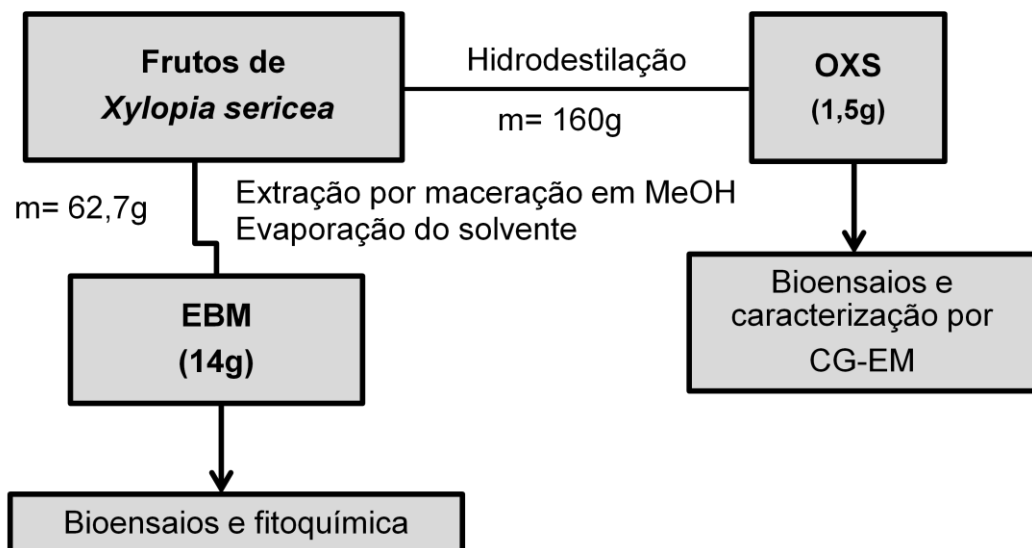


Figura 1: Fluxograma da extração dos frutos de *X. sericea*. EBM: extrato metanólico; OXS: óleo essencial; CG-EM: Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.

### **5.1.1 Perfil fitoquímico do extrato metanólico (EBM)**

As classes dos principais metabolitos especiais encontrados em EBM foram fenóis, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, alcaloides e terpenoides/esteroides. Antraquinonas não foram identificadas.

### **5.1.2 Conteúdo de fenóis totais e flavonoides de EBM**

EBM apresentou  $358,2 \pm 33,1$  mg/g de fenóis totais expressos como equivalentes de ácido tânico, e  $28,8 \pm 8,2$  mg/g de flavonoides expressos como equivalentes de quercetina.

### **5.1.3 Caracterização química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) do óleo essencial (OXS)**

Foi possível identificar 63 substâncias que correspondem a 80 % dos constituintes de OXS. As substâncias identificadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Composição (%) do óleo essencial (OXS) obtido dos frutos de *Xylopiá sericea*

<b>Compostos</b>	<b>MM (g/mol)</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>IK calculado</b>	<b>IK literatura</b>	<b>% de área no cromatograma</b>
$\alpha$ -Felandreno	136,20	9,748	1010	1005	0,22
<i>o</i> -Cimeno	134,20	10,267	1028	1020	0,30
Limoneno	136,20	10,394	1032	1039	0,07
Sabineno	136,20	10,468	1035	976	0,01
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	154,20	11,596	1074	1068	0,14
Linalol	154,10	12,375	1101	1098	1,11
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	154,20	12,502	1105	1097	0,14
<i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	154,20	13,192	1129	1121	0,20
<i>trans</i> -Verbenol	142,20	13,630	1145	1144	0,19
1-Terpineol	154,20	13,711	1147	1144	0,26
Óxido de $\beta$ -pineno	152,20	13,808	1151	1156	0,16
Tujanol	154,20	13,912	1154	1149	0,10
Neoisomentol	156,20	14,632	1179	1188	0,15
4-Terpineol	154,20	14,832	1186	1181	0,54
Cuminol	150,20	14,995	1192	1278	0,16
Criptone	138,21	15,055	1194	1188	0,14
$\alpha$ -Terpineol	154,20	15,240	1200	1147	1,20
<i>trans</i> -1,5- <i>p</i> -Mentadien-2-ol	152,20	15,493	1209	1185	1,83
<i>trans</i> -Piperitol	154,00	15,619	1214	1205	0,21
<i>trans</i> -Carveol	152,20	15,894	1224	1217	0,13
Timol metil éter	164,20	16,109	1231	1235	0,17

$\alpha$ -Felandreno epóxido	152,20	16,524	1246	1192	0,25
Carvotanacetona	152,20	16,777	1255	1246	0,10
Bornil acetato	196,20	17,719	1289	1285	0,12
Timol	150,20	17,816	1292	1290	0,12
Carvacrol	150,20	18,061	1301	1298	1,73
Bicicloelemene	204,30	19,018	1337	1345	0,21
$\alpha$ -Cubebeno	204,30	19,419	1352	1352	0,62
Cicloisositivene	204,30	20,087	1377	1370	0,21
$\alpha$ -Copaeno	204,30	20,228	1382	1377	1,19
<i>trans</i> -Cariofileno	204,30	21,416	1428	1420	0,41
$\gamma$ -Elemeno	204,30	21,572	1435	1434	0,13
$\beta$ -Cubebeno	204,30	21,661	1438	1391	0,20
$\alpha$ -Guaieno	204,30	21,742	1441	1440	0,21
Aromadrendreno VI	204,30	22,143	1457	-	0,10
$\alpha$ -Humuleno	204,30	22,336	1465	1455	0,15
Alloaromadendreno	204,30	22,447	1469	1462	0,13
$\alpha$ -Amorfeno	204,30	22,767	1482	1485	0,41
D- Germacreno	204,30	22,982	1490	1485	8,11
Aromadendreno	204,30	23,182	1498	1438	0,32
Biciclogermancreno	204,30	23,323	1504	1494	1,59
Eremofileno	204,30	23,442	1509	1489	0,29
$\delta$ -Cadineno	204,30	23,798	1524	1524	1,95
Cariofila-3,8(13)-dien-5-alfa-ol	220,30	23,976	1531	-	1,17
$\gamma$ -Cadineno	204,30	24,169	1539	1513	0,20

Elemol	222,37	24,563	1556	1547	1,02
Álcool <i>cis</i> -arteannuico	220,30	24,763	1564	1593	2,60
Dehidroaromadendreno	204,30	24,897	1570	1463	0,27
5-Cedranona	220,30	24,993	1574	1638	0,27
Espatuleno	220,30	25,364	1589	1576	16,42
Óxido de cariofileno	220,30	25,483	1594	1583	2,49
Guaiol	222,30	25,765	1606	1597	13,93
$\beta$ -Biotol	220,30	26,010	1617	1609	0,79
1- <i>epi</i> -Cubeno	222,30	26,114	1622	1616	1,73
$\alpha$ -Copaeno-8-ol	220,30	26,218	1626	-	2,63
Isoespatuleno	220,30	26,589	1642	1625	0,75
Guai-1(10)-en-11-ol	222,30	27,339	1675	1668	4,00
Aristol-9-en-3-ol	220,30	27,940	1702	-	2,01
Rimueno	272,40	33,046	1947	1930	0,14
Ent-pimara-8(14),15-dieno	272,40	33,365	1963	1966	1,10
Traquilobano	272,40	34,249	2009	2022	2,51
Óxido de manoil	290,40	34,679	2032	1989	0,11
Kaura-16-eno	272,40	35,347	2067	2043	0,20

\* MM: massa molecular; Tr: tempo de retenção; IK calculado: índice de kovats calculado; IK literatura: índice de kovats da literatura, onde (-) significa valor não encontrado.

## 5.2 Atividades biológicas *in vitro*

### 5.2.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de EBM, OXS e substâncias de referência encontra-se representada na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade antioxidante do extrato metanólico (EBM) e óleo essencial (OXS) de *X. sericea*

Amostras	Atividade antioxidante		
	DPPH CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	β-caroteno/ácido linoleico CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	CAT (mg/mg de amostra) <sup>b</sup>
EBM	16,37 ± 1,33	49,16 ± 6,36	0,75 ± 0,01
OXS	49,16 ± 12,88	6,92 ± 3,97	2,30 ± 0,01
α-tocoferol	0,72 ± 0,50	---	---
Ácido ascórbico	0,41 ± 0,27	---	---
Quercetina	1,04 ± 0,02	1,18 ± 0,62	---
Rutina	---	---	0,85 ± 0,02

<sup>a</sup> Valores expressos com média ± desvio padrão; <sup>b</sup> valores expressos em equivalentes de ácido ascórbico. CAT: capacidade antioxidante total; (---) amostra não avaliada.

### 5.2.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana de EBM, OXS e substâncias de referência frente às cepas avaliadas encontram-se na Tabela 3.



Tabela 3: Atividade antimicrobiana do extrato metanólico (EBM e óleo essencial (OXS) de *X. sericea*

Cepas	Atividade antimicrobiana ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>					
	EBM		OXS		Cloranfenicol	Ciprofloxacino
	CIM <sup>b</sup>	CBM <sup>c</sup>	CIM	CBM	CIM	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	7,8	>31,25	7,8	>31,25	12,5	0,39
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	1000	>1000	1000	>1000	25,0	0,20
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 23355)	7,8	>31,25	7,8	>31,25	12,5	0,20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4552)	500	>1000	62,5	>250	12,5	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	500	>1000	1000	>1000	25	3,13
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	31,25	>125	15,63	31,25	3,13	0,20
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	1000	1000	1000	>1000	6,25	1,56
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	1000	>1000	1000	>1000	3,13	0,20
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	500	>1000	500	>1000	1,56	0,20
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 10708)	1000	>1000	1000	>1000	3,13	0,39

<sup>a</sup> Valores expressos em  $\mu\text{g/mL}$  de amostra. <sup>b</sup> CIM: concentração inibitória mínima; <sup>c</sup>CBM: concentração bactericida mínima.

### 5.2.3 Atividade leishmanicida

Os resultados da atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* de EBM, OXS e substância de referência encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade leishmanicida do extrato metanólico (EBM) e óleo essencial (OXS) de *X. sericea*

Amostras	Atividade leishmanicida (CI <sub>50</sub> µg/mL) <sup>a</sup>	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
EBM	42,51 ± 2,59	>100
OXS	>100	---
Anfotericina B <sup>b</sup>	0,9 ± 0,73	1,9 ± 0,25

<sup>a</sup> Valores expressos com média ± desvio padrão; <sup>b</sup> Controle positivo; (---) amostra não avaliada.

### 5.2.4 Atividade citotóxica

Os resultados da atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais e normais testadas encontram-se representados na Tabela 5.

Tabela 5: Atividade citotóxica do extrato metanólico (EBM) e óleo essencial (OXS) de *X. sericea*

Linhagens celulares	Atividade citotóxica (% de inibição da proliferação celular) <sup>a</sup>		
	EBM	OXS	Etoposídeo
HL60	56,0	15,5	89
Jurkat	9,5	11,5	27
MCF-7	In <sup>b</sup>	In	23
MDA-231	In	In	1
THP-1	In	In	69
HCT-116	14,5	11,5	6
VERO	9,3	19	17

<sup>a</sup> Valores de porcentagem (%) de inibição da proliferação celular comparados ao controle (DMSO 0,1%). <sup>b</sup> Amostras inativas. Linhagens: HL60 (leucemia promielocítica humana); Jurkat (leucemia linfoblástica de células T humana); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); MDA-231 (células de câncer de mama); THP-1 (células mieloides leucêmicas); HCT-116 (células de carcinoma colorretal); VERO (células renais de macaco parâmetro de célula não tumoral).

### 5.3 Atividades biológicas *in vivo*

#### 5.3.1 Atividade anti-inflamatória

Os resultados da atividade anti-inflamatória de EBM e OXS, via tópica, e de EBM via oral, observadas no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, encontram-se representados nos Gráficos 1, 2 e 3, respectivamente.

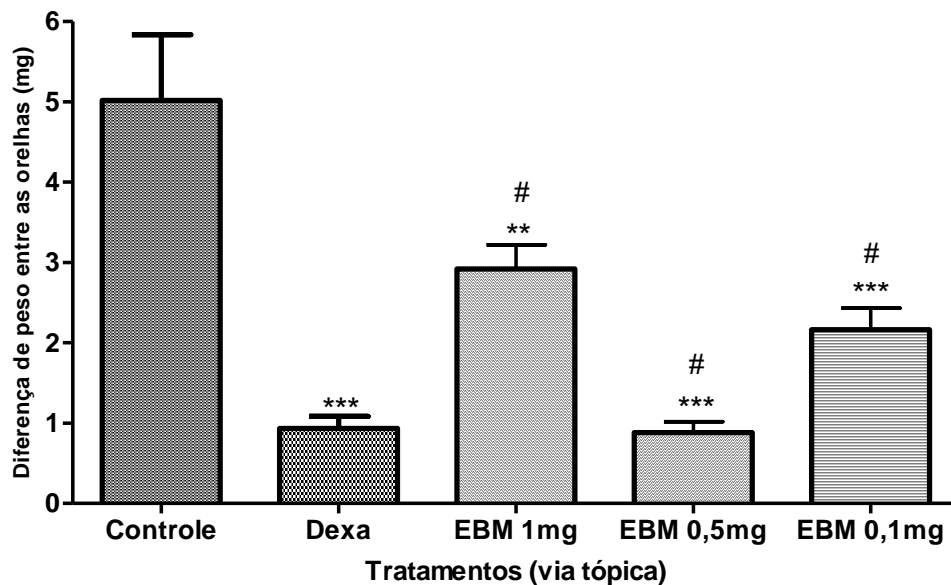


Gráfico 1: Efeito do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM) e dexametasona via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Foram administrados via tópica, 20  $\mu$ L de controle (acetona), dexametasona (0,1 mg/orelha) e EBM (1; 0,5; 0,1 mg/orelha) 15 min após a aplicação de óleo de cróton 2,5 %. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. da diferença de peso entre as orelhas (mg). Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Valores significativos:  $p^{**} < 0,01$  vs controle;  $p^{***} < 0,001$  vs controle, (#)  $p > 0,05$  vs Dexa.

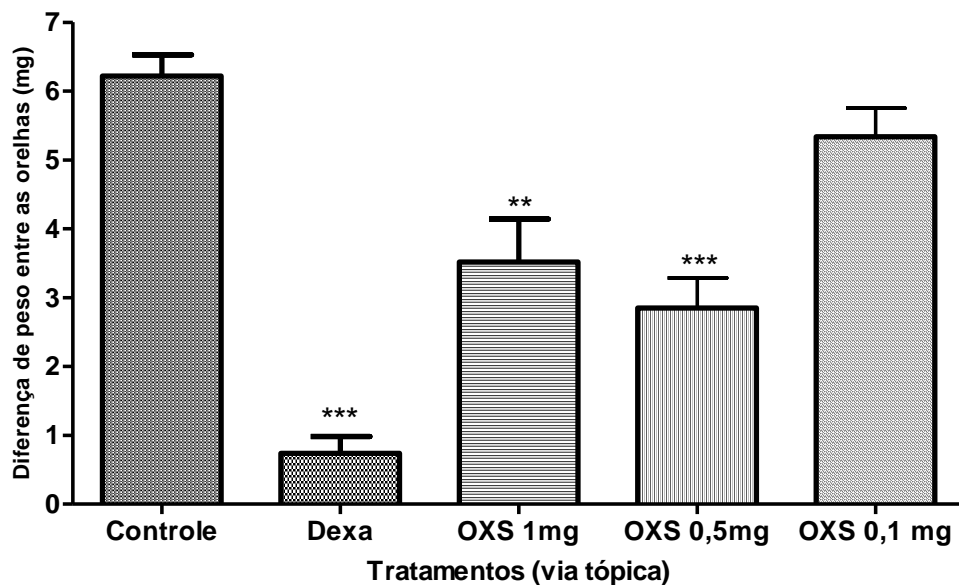


Gráfico 2: Efeito do óleo essencial de *X. sericea* (OXS) e dexametasona via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Foram administrados via tópica, 20  $\mu$ L de controle (acetona), dexametasona (0,1 mg/orelha) e OXS (1; 0,5; 0,1 mg/orelha) foram administrados 15 min após a aplicação tópica de óleo de cróton 2,5 %. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. da diferença de peso entre as orelhas (mg). Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Valores significativos:  $p^{**} < 0,01$  vs controle;  $p^{***} < 0,001$  vs controle.

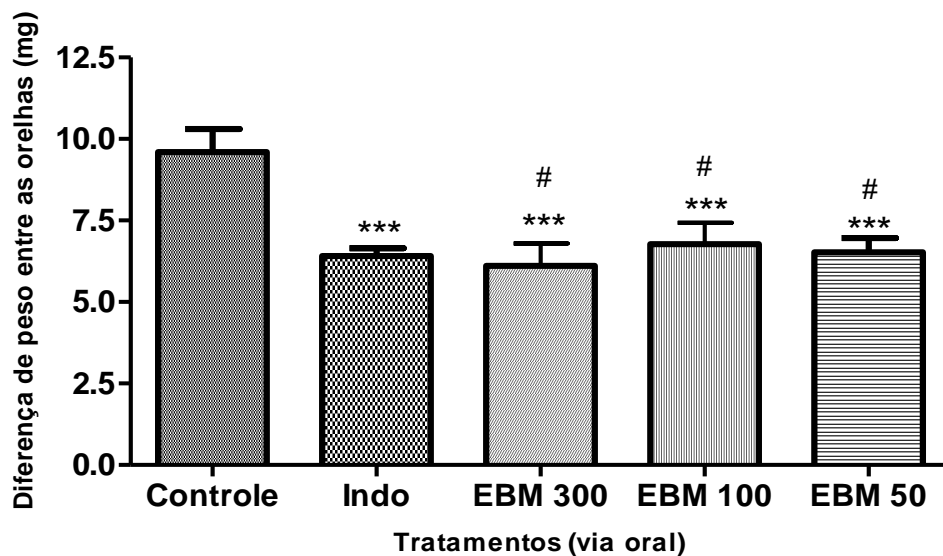


Gráfico 3: Efeito do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM) e indometacina via oral sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Foram administrados por gavagem (10 mL/kg) controle (salina 12 % Tween), indometacina (10 mg/kg) e EBM (300; 100; 50 mg/kg), 1h antes da aplicação tópica de óleo de cróton 2,5 %. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. da diferença de peso entre as orelhas (mg). Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Valores significativos:  $p^{***} < 0,001$  vs controle, (#)  $p > 0,05$  vs Indo.

### 5.3.2 Toxicidade aguda

Os parâmetros observados para determinação da dose letal mínima ( $DL_{50}$ ) de EBM via oral e avaliação da toxicidade aguda - consumo de água e ração, massa relativa dos órgãos e ganho de massa corporal - encontram-se representados nas Tabelas 6 e 7 e no Gráfico 4, respectivamente. Não houve morte nem qualquer outro sinal de toxicidade nos animais do grupo controle ou tratados com EBM em todas as doses. Não foi observada nenhuma alteração comportamental, motora e/ou sensorial entre os grupos. Os órgãos analisados (rins, fígado, coração e pulmões) se mostraram inalterados macroscopicamente. Foi possível verificar que o consumo de água se manteve igual entre os grupos, exceto no grupo tratado com EBM 2000 mg/kg, no qual diminuiu aproximadamente 33 %. O consumo de ração se manteve o

mesmo ( $p > 0,05$ ) para todos os grupos avaliados (Tabela 6), assim como a massa relativa das vísceras ( $p > 0,05$ ) avaliadas (Tabela 7). Todos os animais exibiram um ganho de massa corporal significativamente igual ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 4). Após a avaliação dos resultados foi possível concluir que a  $DL_{50}$  de EBM para camundongos *Swiss* machos é maior que 2000 mg/kg.

Tabela 6: Consumo de água e ração no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de *X. sericea*

<b>Grupos</b>	<b>Consumo de água (mL/dia/animal)<sup>a</sup></b>	<b>Consumo de ração (g/dia/animal)<sup>a</sup></b>
<b>Controle</b>	12,25 ± 1,75	6,57 ± 1,14
<b>EBM 2000</b>	8,27 ± 3,03 <sup>b</sup>	7,31 ± 1,20
<b>EBM 1000</b>	10,76 ± 1,50	6,82 ± 1,05
<b>EBM 500</b>	13,63 ± 2,66	7,58 ± 1,30
<b>EBM 100</b>	11,51 ± 2,14	6,98 ± 1,22

<sup>a</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. <sup>b</sup> Valores significativos:  $p < 0,001$  vs controle, os demais valores  $p > 0,05$ . Grupos EBM: extrato metanólico nas doses de 2000; 1000; 500; 100 mg/ kg.

Tabela 7: Massa relativa dos órgãos no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de *X. sericea*

Grupos	Massa relativa dos órgãos (g/100g p.v.) <sup>a</sup>				
	Rim esquerdo	Rim direito	Fígado	Coração	Pulmões
<b>Controle</b>	0,70 ± 0,07	0,66 ± 0,03	5,32 ± 0,87	0,82 ± 0,08	0,66 ± 0,04
<b>EBM 2000</b>	0,75 ± 0,01	0,79 ± 0,07	5,60 ± 0,31	0,77 ± 0,14	0,53 ± 0,05
<b>EBM 1000</b>	0,67 ± 0,03	0,70 ± 0,07	5,32 ± 0,35	0,76 ± 0,16	0,60 ± 0,04
<b>EBM 500</b>	0,83 ± 0,01	0,80 ± 0,06	5,88 ± 0,30	0,74 ± 0,13	0,61 ± 0,09
<b>EBM 100</b>	0,73 ± 0,04	0,72 ± 0,07	5,16 ± 0,56	0,65 ± 0,10	0,67 ± 0,08

<sup>a</sup> Valores expressos como média dos animais em g/100 g de peso vivo ± desvio padrão. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Todos os valores apresentaram  $p > 0,05$ . Grupos EBM: extrato metanólico nas doses de 2000; 1000; 500; 100 mg/ kg.

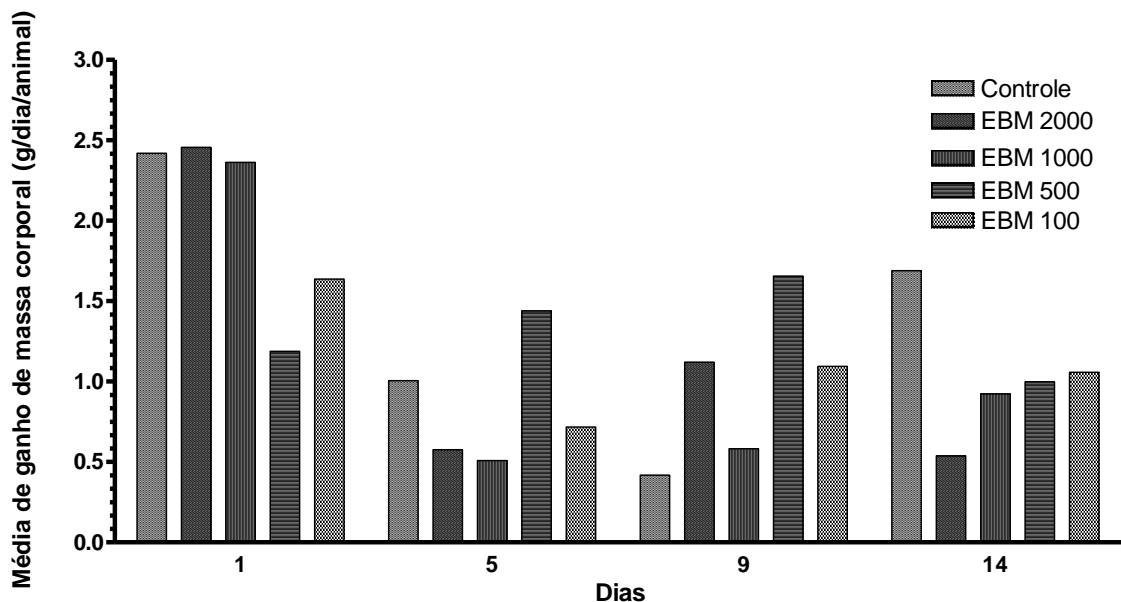


Gráfico 4: Ganho de massa corporal dos animais no modelo de toxicidade aguda do extrato metanólico de *X. sericea* (EBM). Os animais foram tratados via oral, dose única, com EBM (2000; 1000; 500; 100 mg/ kg ) e controle (salina 12 % em Tween 40), e foram avaliados durante 14 dias. Os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m de ganho de massa corporal, nos dias 1, 5, 9 e 14. Foi realizado o teste ANOVA, seguido pelo teste Bonferroni. Todos os valores apresentaram  $p > 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Extração e perfil fitoquímico do extrato metanólico (EBM)

A extração com metanol, solvente orgânico polar, busca extrair o maior número possível de substâncias, com base na capacidade desse solvente em aumentar a permeabilidade da parede celular, facilitando a extração e a eficiência da mesma na obtenção de substâncias de alta, média e baixa polaridade (SARKER; LATIF; GRAY, 2006). Assim, ao escolher esse solvente para a extração buscou-se obter uma amostra representativa de todas as classes de metabólitos presentes na espécie *Xylopiá sericea*.

Pela triagem fitoquímica de EBM (pág. 51) foi possível verificar a presença de fenóis, cumarinas, saponinas, taninos, alcaloides, terpenoides/esteroides, além de flavonoides. A esses metabólitos especiais é atribuída uma grande variedade de atividades biológicas.

Os alcaloides são considerados um dos mais importantes metabólitos responsáveis pelas atividades farmacológicas de extratos de *Xylopiá* sp. (SCHMUTZ, 1959; ROCHA; BOLZANI; PANIZZA, 1981; JOSSANG et al., 1991; CÂMARA, 1994; NISHIYAMA et al., 2004). A presença de terpenoides também constatada já era esperada uma vez que já foram isolados na espécie (MATOS; MATOS, 1984; CRAVEIRO; ALENCA; VOSTROWSK, 1986; CÂMARA, 1994; TAKAHASHI; HENRIETA; BOAVENTURA, 2001).



### 6.1.1 Conteúdo de fenóis totais e flavonoides de EBM

EBM apresentou um alto teor de fenóis totais (pág. 51), visto que em 1 g de EBM são encontrados  $358,2 \pm 33,1$  mg de fenóis. Sabe-se que as substâncias fenólicas são amplamente distribuídas nas espécies vegetais uma vez que enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Quanto aos flavonoides (pág. 51), EBM apresentou um teor de  $28,8 \pm 8,2$  mg de flavonoides em 1g, sendo esses um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES et al., 1999). Alguns flavonoides já foram identificados no gênero: (+)-catequina, (-)-*epi*-catequina, quercetina, 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-quercetina, rutina, 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)-arabinofuranosil-quercetina, 3-O-rutinosil-canferol e 3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-diidrocanferol (engelitina) (MARTINS; ROQUE, 1993; MARTINS, 1996), além de já terem sido identificados na espécie rutina, hesperidina e quercetina (MARTINS et al., 2012).

Substâncias fenólicas, inclusive os flavonoides, apresentam uma gama de atividades, dentre elas a atividade anti-inflamatória, antioxidante, efeito vasodilatador, ação antialérgica, atividade antitumoral, hepatoprotetora, antiúlcero-gênica, ações anti-plaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2000; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

## 6.2 Extração e caracterização química do óleo essencial (OXS)

Sabe-se que as plantas aromáticas, dentre as quais se inclui a espécie *X. sericea*, são importantes recursos naturais cujos metabólitos produzidos geram inúmeros produtos de interesse econômico destacando-se, pela ampla aplicação industrial, os óleos essenciais (PAULETTI, 2006). A família Annonaceae é reconhecida por apresentar várias espécies produtoras de óleos essenciais que são encontrados nas partes aéreas (folhas e ramos finos), cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas (ZOGHBI et al. 1998).

A hidrodestilação, método empregado na extração do óleo essencial dos frutos de *X. sericea* (OXS), é o método mais utilizado e viável economicamente, tanto em escala laboratorial quanto em escala comercial (SANTOS et al., 2004). O rendimento de 0,93 % obtido na extração de OXS está em conformidade com os rendimentos encontrados na literatura que variam de 0,22 a 1,3 % (CRAVEIRO; ALENCAR; VOSTROWSK, 1986; PONTES, 2006; PONTES et al., 2007). Os constituintes majoritários de OXS foram os sesquiterpenos espatulenol (16,42 %), guaiol (13,93 %) e D - germacreno (8,11 %), além disso, vários outros terpenoides foram identificados em menores concentrações (Tabela 1, pág. 52).

Entre estes componentes identificados, o espatulenol sesquiterpeno oxigenado é considerado como um marcador quimiotaxonômico de espécies de Annonaceae, uma vez que já foi identificado em várias espécies desta família incluindo o gênero *Xylopi*a (COSTA et al., 2009).

OXS apresentou um perfil químico diferente daqueles encontrados na literatura (CRAVEIRO; ALENCAR; VOSTROWSK, 1986; LEMOS et al. 1992, FOURNIER et al. 1994, CÂMARA; ALENCAR; SILVEIRA, 1996; PONTES, 2006; PONTES et al.,

2007). Essa diferença pode ser explicada pela distribuição geográfica das populações estudadas, que crescem sob influência de distintas condições de solo e clima. Os resultados obtidos foram provenientes de uma simples amostra de um sítio de coleta, o que não levou em consideração as possíveis interações intraespecíficas.

### **6.3 Atividades biológicas *in vitro***

#### **6.3.1 Atividade antioxidante**

O método DPPH baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por substâncias antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 517 nm. Trata-se de um teste simples e amplamente empregado. O DPPH é um radical livre, estável, não natural, que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (RUFINO et al., 2007; YAMASAKI et al., 1994).

Substâncias polifenólicas apresentam capacidade de deslocar elétrons, o que lhes conferem propriedades oxidáveis. Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante e pode ser empregado para triagem de compostos químicos sintéticos e produtos naturais (YAMASAKI et al., 1994).

O método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, portanto determina a atividade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação, e faz correlação com a peroxidação lipídica que ocorre no organismo. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -

caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método fosfomolibdênio é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) de uma mistura complexa de compostos. Esse método possui a grande vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (ADELMANN, 2005), e baseia-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. A coloração verde é mais intensa quanto maior for a atividade antioxidante da amostra (BORA et al., 2005).

De maneira geral, durante a avaliação da atividade antioxidante, dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é a eficiência do sequestro do radical, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante, mas também pela sua concentração. O segundo fator está relacionado com o espectro de ação do antioxidante, por sua vez modulado pela solubilidade, assim faz-se necessário a realização de vários modelos de ensaios *in vitro* para predizer o potencial antioxidante real da amostra frente às diferentes condições (FERRONATTO et al., 2006).

A atividade antioxidante das amostras de *X. sericea* foi comparada às substâncias de referência quercetina, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e rutina. A quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) é um flavonoide que apresenta a capacidade de sequestrar radicais de oxigênio, inibir a xantina oxidase e a peroxidação lipídica e é conhecida também por suas propriedades quelante e estabilizadora do ferro (BEHLING et al., 2004). O ácido ascórbico (vitamina C) por

suas inúmeras propriedades protetoras do organismo é amplamente, utilizado como antioxidante, nutracêutico e cosmeceutico (GIL *et al.*, 2005). A vitamina E é um componente dos óleos vegetais encontrado na natureza em quatro formas, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma sendo empregada pela capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide empregado como antioxidante, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar (VELASCO *et al.*, 2008).

Assim, pode ser observado na Tabela 2 (pág. 55), que, pelo método do DPPH, EBM e OXS apresentaram uma atividade antioxidante interessante, principalmente EBM, quando comparados às substâncias de referência. No método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico as amostras apresentaram potencial antioxidante promissor quando comparados ao flavonoide quercetina, principalmente OXS, indicando atuação preferencial dessa amostra na inibição da peroxidação lipídica. E no método do fosfomolibdênio, EBM e OXS confirmaram o seu potencial antioxidante, sendo que OXS apresentou CAT maior que o ácido ascórbico (2,30  $\pm$  0,01 mg de ácido ascórbico equivalem a 1mg de OXS) e a rutina (0,85  $\pm$  0,02 mg de ácido ascórbico equivalem a 1 mg de rutina), o que mostra a sua eficiência em inibir a oxidação.

A análise fitoquímica preliminar mostrou a presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas em EBM. Esses derivados fenólicos estão diretamente relacionados ao potencial antioxidante das amostras avaliadas, uma vez que são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o anion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ou radical peróxido, atuando também por

sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E, além de se ligarem a íons metálicos impedindo-os de atuarem como catalisadores da produção de radicais livres, podendo interferir nas reações de propagação e formação de ERO's (SIMÕES et al., 1999), auxiliando na diminuição do processo oxidativo no organismo cuja atividade antioxidante pode ser correlacionada com os valores encontrados *in vitro*.

### **6.3.2 Atividade antimicrobiana**

O teste de microdiluição em caldo foi empregado a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que corresponde à menor concentração da amostra testada capaz de inibir o crescimento microbiano após um período de incubação, enquanto a concentração bactericida mínima (CBM) corresponde àquela concentração capaz de impedir o crescimento de um microrganismo em sub-culturas livres de substâncias antimicrobianas, o que prediz a morte do mesmo e a ação bactericida da amostra (ANDREWS, 2001).

A atividade antibacteriana de EBM e OXS foi valida frente a dez cepas de bactérias de importância clínica que estão envolvidas em diversos processos infecciosos. Os fármacos antimicrobianos utilizados como controle positivo na determinação da CIM foram o cloranfenicol e o ciprofloxacino, esses não foram avaliados quanto a CBM uma vez que já apresentam mecanismos de ação estabelecidos.

O cloranfenicol é um antimicrobiano da classe dos anfenicóis, de amplo espectro, incluindo microrganismos gram-negativos e gram-positivos. Apresenta ação bacteriostática, se liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese

proteica da bactéria. Porém, pode ser bactericida contra algumas espécies como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis*, através de mecanismo não bem elucidado. Já o ciprofloxacino pertence à classe das fluoroquinolonas, é um fármaco de largo espectro efetivo sobre microrganismos gram-positivos e gram-negativos e também sobre as Enterobacteriaceae, incluindo muitos microrganismos resistentes. Apresenta ação bactericida uma vez que inibe a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (AMATO NETO; NICODEMO; LOPES, 2007; RANG et al., 2011 ).

As amostras EBM e OXS foram ativas para todas as cepas (Tabela 3, pág. 56). De acordo com Rios e Recio (2005) e Cos et al. (2006), atividades biológicas em testes *in vitro* em concentrações abaixo de 100 µg/mL são relevantes para amostras vegetais. Assim as cepas mais sensíveis à EBM foram *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* e *Bacillus cereus* com CIM de 7,8; 7,8 e 31,25 µg/mL respectivamente, sendo essa amostra mais eficaz que o cloranfenicol para *S. aureus* e *E. cloacae*. Já em relação à OXS, as cepas mais sensíveis foram *S. aureus*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *B. cereus* com CIM de 7,8; 7,8; 62,5 e 15,63 µg/mL respectivamente.

Quanto à CBM, as amostras apresentaram efeito bacteriostático para a maioria das cepas avaliadas, apenas EBM para *E. faecalis* na concentração de 1000 µg/mL e OXS para *B. cereus* na concentração de 31,25 µg/mL apresentaram atividade bactericida.

Dentre as bactérias mais sensíveis está o *S. aureus*, bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, porém pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras. Os *Staphylococcus* também são capazes de produzir infecções alimentares devido à produção de enterotoxinas termo-estáveis durante o crescimento em alimentos contaminados (SANTOS et al., 2007).

*E. cloacae* é uma bactéria gram-negativa encontrada na natureza, porém pode estar envolvida em processos infecciosos principalmente em pacientes imunocomprometidos. As vias urinárias e respiratórias são os locais mais comuns de infecção. Apresentam mecanismos de resistência a diversos antibióticos, o que destaca a virulência e a importância clínica da espécie (ISASTI et al., 2009).

*B. cereus* é uma bactéria gram-positiva que está relacionada com casos de deterioração dos alimentos, além de ter sua ação conhecida como invasor primário ou como agente de infecções secundárias em inúmeras doenças (TURNBULL et al., 1991). Cepas resistentes de microrganismos encontradas no solo de agricultura como no caso de *B. cereus* chegam à comunidade e conseqüentemente aos hospitais através dos alimentos (GUVEN; MUTLU; AVCI, 2005).

*K. pneumoniae* é um bacilo gram-negativo que pode ser encontrada colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, e pode estar envolvida em vários processos infecciosos graves, principalmente em pacientes imunodeprimidos e/ou com dispositivos invasivos como cateter, sonda, pulsão venosa periférica ou em outra situação que possa favorecer a infecção bacteriana (MOREIRA; FREIRE, 2011).



Em geral, a ação antimicrobiana de extratos e óleos vegetais é o resultado de efeitos combinados (COX et al., 2000). Assim, diferentes mecanismos estão envolvidos na ação dessas amostras sobre os microrganismos. As inibições mais frequentes envolvem componentes fenólicos, que sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular e alteram a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais. Também podem ocorrer danos ao sistema enzimático do microrganismo envolvido na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, bem como a destruição ou inativação de material genético. Os grupos hidroxilas fenólicos são bastante reativos e formam ligações de hidrogênio com sítios ativos de enzimas-alvo, inativando-as (PORTE; GODOY, 2001).

A atividade antibacteriana encontrada para as amostras pode ser atribuída a algumas substâncias já relatadas na espécie. O ácido caurenico e ácido xilópico, diterpenos isolados de *X. sericea*, apresentaram atividade antimicrobiana comprovadas, principalmente contra bactérias gram-positivas (BOAKYE; FIAGBE; AYIM, 1977; WILKENS et al., 2002). Além disso, os sesquiterpenos, em geral, identificados em OXS por CG-EM apresentaram funções protetoras contra fungos e bactérias (TOSCAN, 2010). O espatulenol, majoritário de OXS apresenta propriedades antibacterianas contra bactérias gram-positivas e negativas, inclusive contra o *S. aureus* (CHINOUE; BOUGATSOS; PERDETZOUGLOU, 2004). Há indícios que os produtos de metabolização do guaiol possam estar envolvidos com a atividade antimicrobiana (CHOUDHARY et al., 2007).

De acordo com Cordell e Hamburguer (1987), a complexidade dos extratos de plantas limita a condução de isolamento de agentes antibacterianos de origem vegetal. Nesse sentido, a utilização do extrato ou óleo essencial que apresenta

atividade antimicrobiana relevante e baixa toxicidade se torna uma possibilidade no combate a microrganismos patogênicos em alimentos, animais e até mesmo no homem.

Assim, diante de suas propriedades antibacterinas, a espécie *X. sericea* surge como um potencial aditivo natural que pode ser combinado a outras técnicas de conservação de alimentos para contribuir com a prevenção de doenças veiculadas por esses.

### 6.3.3 Atividade leishmanicida

As amostras foram avaliadas contra duas espécies de *Leishmania* uma vez que há relatos na literatura de constituintes já isolados na espécie com atividade frente a alguns protozoários, inclusive *Leishmania* (OSÓRIO et al., 2007). O ácido xilópico apresentou atividade profilática e curativa contra o protozoário *Plasmodium berghei* parasita intracelular de roedores (WOODE et al., 2012; BOAMPONG et al., 2013), assim como o ácido caurenico que apresentou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (GUIMARÃES; FARIA, 2007).

Como pode ser observado na Tabela 4 (pág. 57) EBM apresentou atividade interessante contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com  $CI_{50} = 42,51 \mu\text{g/mL}$ , porém não apresentou atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*. Para OXS, a atividade foi avaliada apenas para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e não apresentou atividade representativa, porém estudos futuros ainda são necessários contra as formas amastigotas e outras espécies de *Leishmania* ainda não avaliadas.

#### 6.3.4 Atividade citotóxica

Apesar de não se ter relatado o uso popular da espécie contra o câncer, algumas espécies do gênero *Xylopi*a e várias espécies da família Annonaceae apresentam o uso descrito e atividade citotóxica comprovada. Nesse sentido buscou-se avaliar a citotoxicidade da espécie *X. sericea* frente a algumas linhagens tumorais. EBM apresentou atividade promissora para a linhagem leucêmica HL-60, inibindo 56% da proliferação celular, sendo que o fármaco de referência, etoposídeo inibiu 89 %. É importante ressaltar o resultado encontrado para EBM uma vez que trata-se de um extrato que quando comparado com o etoposídeo, composto puro, apresentou atividade interessante. Além disso, essa amostra não apresentou citotoxicidade para as células Vero, células não tumorais, assim como OXS, o que pode ser correlacionado a indício de baixa toxicidade (Tabela 5, pág. 58). O etoposídeo apresentou porcentagem de inibição das células não tumorais maior que EBM, ou seja, o fármaco se mostrou mais tóxico frente a estirpe avaliada.

O etoposídeo é um derivado semissintético da podofilotoxina, de grande aplicação na terapia do câncer. Esse quimioterápico induz o bloqueio pré-mitótico no final da fase S ou no início da fase G2, devido à ligação com a topoisomerase II, inibindo essa enzima e impedindo a replicação e conseqüentemente proliferação celular. Entretanto, esse fármaco está relacionado a inúmeros efeitos adversos como supressão de medula óssea, náusea, vômitos e alopecia, hepatotoxicidade, febre, ardor, reações de hipersensibilidade e até mesmo desenvolvimento de neoplasias (BRANDÃO et al., 2010).

As leucemias representam um grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela expansão clonal de células hematopoiéticas, desregulação da

proliferação, diminuição da apoptose e/ou bloqueio da diferenciação celular. A leucemia mieloide aguda (LMA) é um dos tipos mais comuns entre as neoplasias hematológicas, afetando indivíduos de todas as idades. São caracterizadas pela proliferação e acumulação de células hematopoiéticas imaturas (blastos) da linha mieloide (mieloblastos), na medula óssea e sangue periférico. HL-60 é uma linhagem celular tumoral humana proveniente de leucemia promielocítica aguda, um subtipo da leucemia mieloide aguda e corresponde a aproximadamente 8 % dos casos de LMA (FONSECA, 2011).

O ácido caurenico já relatado na espécie apresentou atividade anti-neoplásica em hepatócitos. Estudos sugerem que os diterpenos cauranos são capazes de inibir o fator nuclear Kappa B (NFkB) e também de induzir expressão de proteases envolvidas na apoptose como por exemplo a caspase-8, mostrando-se um eficiente quimioterápico, já que além de apresentar efeitos pró-apoptóticos, também inibe a transcrição do gene do NFkB. Esse fator nuclear controla a transcrição de genes que conferem resistência à morte celular, como por exemplo os inibidores das caspases (RODRIGUES et al., 2009).

O espatulenol, componente majoritário de OXS, apresentou atividade citotóxica moderada (CHINO; BOUGATSOS; PERDETZOUGLOU, 2004). A presença de alcaloides comuns à família Annonaceae, cuja presença foi confirmada no perfil fitoquímico de EBM, podem estar envolvidos na diminuição da proliferação celular de HL-60 para essa amostra.

## 6.4 Atividades biológicas *in vivo*

### 6.4.1 Atividade anti-inflamatória *in vivo*

O modelo de edema de orelha para a avaliação da atividade anti-inflamatória utiliza o óleo de cróton como agente flogístico e visa a descoberta de agentes anti-inflamatórios de uso tópico, mas também é possível avaliar a atividade de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais de administração sistêmica (SCHIANTARELLI et al, 1982). O principal agente irritante que compõe o óleo de cróton é o acetato de tetradecainol-forbol (TPA), cuja ação é exercida por produtos da ciclo-oxigenase (COX), histamina e serotonina, dentre outros mediadores (LAPA et al, 2007). Há indução da inflamação cutânea e hiperproliferação celular em animais. Dessa maneira, o modelo tem importância na descoberta de novos produtos farmacêuticos para serem utilizados no tratamento de doenças de pele (BOLLER, 2007).

Neste modelo, a aplicação de EBM por via tópica (Gráfico 1, pág. 59) apresentou uma redução do edema comparado ao grupo controle de 41,8 %, 82,4 % e 56,9 % para as doses de 1, 0,5 e 0,1 mg/orelha respectivamente, sendo que a dose de 0,5 mg/orelha apresentou maior porcentagem de inibição e, portanto, uma maior atividade anti-inflamatória do que a dexametasona, fármaco corticosteroide com ação anti-inflamatória e imunossupressora comprovadas, que apresentou redução do edema de 81,4 % (RANG et al., 2011).

A aplicação de OXS por via tópica (Gráfico 2, pág. 59) apresentou uma redução do edema comparado ao grupo controle de 43,4 %, 54,2 % e 14,2 % para as doses de 1, 0,5 e 0,1 mg/orelha respectivamente e a dexametasona 88,1 %.

Assim como foi verificado para EBM, a melhor dose de OXS com atividade anti-inflamatória foi a de 0,5 mg/orelha, se mostrando no primeiro caso estatisticamente igual a substância de referência, dexametasona.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória de EBM por via oral (Gráfico 3, pág. 60), a substância de referência utilizada foi a indometacina, fármaco anti-inflamatório não esteroide que inibe a atividade da enzima COX e assim diminui a formação de precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico, envolvidos no processo inflamatório (RANG et al., 2011). A administração por via oral de EBM apresentou uma redução do edema comparado ao controle de 36,3 %, 29,5 % e 32,0 % para as doses de 300, 100 e 50 mg/kg respectivamente e a indometacina 33,2 %. Em relação à porcentagem de inibição, a dose de 300 mg/kg se mostrou mais potente do que a indometacina.

A atividade anti-inflamatória de EBM e OXS pode ser atribuída em parte à atividade antioxidante, entretanto, sabe-se que diversas substâncias presentes nos óleos essenciais apresentam a capacidade de interagir com as cascatas de sinalização envolvendo citocinas e regulando fatores de transcrição e expressão de genes pró-inflamatórios. Há indícios que o espatulenol, composto majoritário identificado em OXS, apresente a capacidade de inibir IL-1 $\beta$  e IL-6, interleucinas mediadoras do processo inflamatório (MIGUEL, 2010). O ácido caurenico já isolado da espécie apresenta várias atividades já comprovadas, dentre elas, a atividade anti-inflamatória (PAIVA et al., 2002) e antinociceptiva (BLOCK et al., 1998).

No entanto, é possível que a atividade dos componentes majoritários seja modulada por componentes em menores concentrações, assim várias substâncias mesmo que em menores concentrações podem estar contribuindo para a atividade, como o  $\alpha$ -humuleno, substância também presente no fitoterápico Acheflan (5,0 mg

do óleo essencial de erva-baleeira padronizado em 2,3 a 2,9 % de  $\alpha$ -humuleno), indicado no tratamento local de processos inflamatórios, sendo encontrado nas formas farmacêuticas aerosol e creme (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Em geral, os terpenoides apresentam propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução (CALIXTO, 2000). Estudos sugerem que os diterpenos possam impedir a liberação da substância P, substância que apresenta efeitos pró-inflamatórios sendo responsável pela inflamação neurogênica, e reduzir o aumento da permeabilidade capilar por uma alteração do influxo e efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  (MELO, 2006).

#### **6.4.2 Toxicidade aguda**

A avaliação de toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anatomo-patológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança (CUNHA et al., 2013).

A  $\text{DL}_{50}$  encontrada (maior que 2000 mg/kg) caracteriza EBM como sendo de baixa toxicidade, uma vez que na avaliação da toxicidade oral de uma amostra essa é considerada como extremamente tóxica quando apresenta  $\text{DL}_{50}$  inferior a 25 mg/kg, altamente tóxica  $\text{DL}_{50}$  entre 100 e 500 mg/kg, moderadamente tóxica com  $\text{DL}_{50}$  entre 500 e 2000 mg/kg e de baixa toxicidade quando apresenta  $\text{DL}_{50}$  superior a 2000 mg/kg (LARINI, 1987).

Os resultados demonstraram que a administração de EBM não produziu efeitos tóxicos em camundongos machos Swiss, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. Apesar de o consumo de água ter sido diminuído no grupo tratado com EBM 2000 mg/kg, observou-se que para os outros parâmetros avaliados o grupo em questão se manteve normal, quando comparado ao controle (Tabela 6, pág. 61; Tabela 7, pág. 62 e Gráfico 4, pág. 62). Além disso, segundo Barros e Davino (2003), alterações no consumo de alimentos representam um efeito adverso de menor gravidade.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância, uma vez que esse parâmetro está indiretamente ligado à alimentação do animal, ao consumo de água e ração, e aos possíveis danos que poderiam ser também perceptíveis na visualização dos principais órgãos (JAHN; GÜNZEL, 1997).

Apesar de o resultado encontrado predizer a ação não tóxica de EBM recomendam-se estudos complementares, inclusive toxicidade subaguda para avaliações mais detalhadas, incluindo análise histopatológica e avaliação dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos, para melhor entendimento da toxicidade em doses repetidas.



## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho contribui de forma significativa com o conhecimento científico da espécie nativa *Xylopiá sericea*. Tal conhecimento permite que a biodiversidade brasileira seja cada vez mais reconhecida no âmbito da fitoterapia, além de agregar valor à espécie em questão, o que justifica, muitas vezes, sua conservação e até mesmo, a conservação de áreas circunvizinhas.

Tanto EBM quanto OXS apresentaram atividades biológicas promissoras o que corrobora com a avaliação do uso popular da espécie e justifica a continuação do estudo.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v.10, n.6, p.144-147, 2004.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995. 469 p.

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 176 f. Dissertação de mestrado (Programa Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-40, 1999.

ALARCÓN, L.C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v.763, p.1-10, 2013.

ALMEIDA, R.N.; HIRUMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. Analgesic effect of rotundifolona in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 334-338, 1996.

AMATO NETO V.; NICODEMO, A.C.; LOPES, H.V. **Antibióticos na prática clínica**. 6ª ed. São Paulo: Sarvier Editora; 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Global Cancer Facts & Figures. 2** Ed. Atlanta: American Cancer Society, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013.

ANAM, E. M. 7-O-Methylbenzylflavanones and 4'-O-methylbenzylidihydrochalcone from *Xylopia africana*. **Indian Journal Chemistry**, v. 33, p. 870-873, 1994.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2009.

ARRUDA, M.M. **Manual de zoonoses: Leishmaniose**. Programa de zoonoses região sul, v.1, 2ª ed, 2010.

ASEKUN, O.T.; KUNLE, O. The chemical constituents of the fruit essential oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich from Nigeria. **Journal Essential Oil-Bearing Plant**, v. 7, p.186-189, 2004.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; FILHO, P. F. A.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; JÚNIOR, L. J. Q. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 258-285, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARRETO, R. W.; JOHNSTON, P. R.; CROUS, P.W.; EVANS, H.C. A new species of the lenticel fungal genus *Claviradulomyces* (*Ostropales*) from the Brazilian Atlantic forest tree *Xylopia sericea* (*Annonaceae*). **International Mycological Association Fungus**, v. 3, n.2, p-135–141, 2012.

BARROS, E.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. **Avaliação da Toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; FLÁVIA M.M. AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; ROSANE N.M. GUERRA, R.N.M; RIBEIRO, M.N.S; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 631-637, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.

BLOCK, L.C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N.L.M.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paudosa* D.C. (*Compositae*). **Pharmazie**, v.53, n.10, p. 716-718, 1998.

BOAKYE, Y.K.; FIAGBE, N.I., AYIM, J.S. Antimicrobial properties of some West African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopia aethiopica* (*Annonaceae*). **Lloydia**, v. 40, n.6, p. 543-545, 1977.

BOAMPONG, J.N.; AMEYAW, E.O.; ABOAGYE, B.; ASARE, K.; KYEI, S.; DONFACK, J.H.; WOOD, E. The curative and prophylactic effects of xylopic acid on *Plasmodium berghei* infection in mice. **Journal of Parasitology Research**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

BOLLER, S. **Atividade antiinflamatória tópica do extrato e compostos isolados da *Baccharis illinita* DC, (*Asteraceae*) em camundongos**. 2007. 97 f. Dissertação

de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, 2007.

BORA, K.; MIGUEL, O.G.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, A.O.T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (presl.) hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v.6, n.2, p.6-15, 2005.

BORGES, E.E.L.; BRUNE, W.; BORGES, R.C.G.; OLIVEIRA, J.S. Avaliação de substância inibidora em sementes de pimenteira (*Xylopiá sericea* st. Hill.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 9, n. 3, p. 87-90, 1987.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília : Ministério da Saúde, ISBN 85-334-1187-1, 2006, 148p.

BRASIL a. **O que são leishmanioses?** Fundação Nacional de Saúde, 2007.

BRASIL b. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2 ed., Brasília : Ministério da Saúde, ISBN 978-85-334-1270-5, 2007, 180 p.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CÂMARA, C. G. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Xylopiá sericea* St Hill (Annonaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 1994.

CÂMARA, A.G.C.; ALENCAR, J.W.; SILVEIRA, E.R. Volatile constituents of *Xylopiá sericea* st. Hill. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 75-78, 1996.

CASTELLANI, E.D.; DAMIÃO-FILHO, C.F.; AGUIAR, I.B. Caracterização morfológica de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Xylopiá* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.205-211, 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p.99-105, 1998.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p. 412-4437, 2013.

CHINO, J. B.; BOUGATSOS, C.; PERDEZOU, D. Chemical composition and antimicrobial activities of *Helichrysum amorginum* cultivated in Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p. 243-245, 2004.

CHINSEMBU, K.C.; HEDIMBI, M. An ethnobotanical survey of plants used to manage HIV/AIDS opportunistic infections in Katima Mulilo, Caprivi region, Namibia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.6, n. 25, p. 2-9, 2010.

CHOUHARY, M.I.; BATOOL, I.; ATIF, M.; HUSSAIN, S.; HUSSAIN S. Microbial transformation of (-)-guaiol and antibacterial activity of its transformed products. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p. 849-852, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 2010.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N.; GU, Z.M.; NG, J.H.; SMITH, D.L.; MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive Annonaceous Acetogenins from the Bark of *Xylopi aromatic*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 486-493,1994.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T; GU, Z.M.; NG, J.H.; ZHAO, G.X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J.F.; MCLAUGHLIN, J.L. Venezenin: A New Bioactive Annonaceous Acetogenin from the Bark of *Xylopi aromatic*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 532- 539, 1995.

CORDELL, G. A.; HAMBURGUER, M. Direct Bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 50, n.1, p.20-22, 1987.

CORREIA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas Cultivadas**, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, v. 5, p. 82, 1987.

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

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; MAIA, B.H.L.N.S.; DUARTE, M.C.T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida*(Annonaceae). **Química Nova**, v.32, n.1, pp. 78-81, 2009.

COSTA-SILVA, J.H.; LIMA, C.R.; SILVA, E.J.R.; ARAÚJO, A.V.; FRAGA, M.C.C.A.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; LAFAYETTE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal Ethnopharmacology**, v. 116, p. 495–500, 2008.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

- COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTN, J.R.; WYLLIC, S.G. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; VOSTROWSK, O. Essential Oil of *Xylopiá sericea*. A comparative analysis. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 1146-1148, 1986.
- CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.
- CUNHA, L.C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.C.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-362, 2013.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2 ed, John Wiley & Son, ISBN 0 471496413, 2002, 507 p.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica** . 2 ed., São Paulo: Editora UNESP, ISBN 85-7139-411-3, 2002, 604 p.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, pp. 446-452, 2006.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v.7, 2006.
- DUH, P.D.; YEN, G.C. Antioxidative activity of three water extracts. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 639-645, 1997.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica**, Brasil, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

FONSECA, A.R.M.F. **Potencial terapêutico de siRNA anti-FLT3 em Neoplasias Hematológicas**. Dissertação de Mestrado. 2011, 120f. Universidade de Coimbra.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J. Volatile constituents of *Xylopiya frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: Chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 166-169, 1994.

GIL, E. S.; SERRANO, S. H. P.; SOARES, L. A.; REZENDE, K. R. Atividade antioxidante do extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*Byrsonima orbygniana*). Doseamento de rutina, quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 85-88, 2005.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-16, 2004.

GOTTSBERGER, G. Evolutionary steps in the reproductive biology of Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n. 1, p. 32-43, 2014.

GOVIDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, AKS.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1424-1427, 2003.

GUIMARÃES, D.A.S.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

GUVEN, K.; MUTLU, M.B.; AVCI, O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety**, v. 26, p. 30-40, 2005.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett.**, v. 486, p. 10-13, 2000.

HARRIGAN, G.G., GUNATILAKA, A.A., KINGSTON, D.G., CHAN, G.W., JOHNSON, R.K. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceous plants, *Xylopiya aethiopica* and *Miliusa cf. banacea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.1, p. 68-73, 1994.

HERNÁNDEZ, C. R. **Plantas contra Plagas** – potencial práctico de *ajo*, *anona*, *nim*, *chile* y tabaco. RAPAM: Estado de México, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP. "**Falando sobre câncer e seus fatores de risco**". Rio de Janeiro, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) a. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. 2 ed, Rio de Janeiro : Inca, ISBN 978-85-7318-202-6, 2012, 129 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) b. **Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2012**. Estatísticas do câncer, 2012.

ISASTI, G.; MORA, L.; GARCÍA, V.; SANTOS, J.; PALACIOS, R. Community-acquired bacteremia and acute cholecystitis due to *Enterobacter cloacae*: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 3, 2009.

JAHN, A.I.; GUNZEL, P.K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v.11, n. 2, p. 171-178, 1997.

JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J.J.; SCHRAM, K.H.; COLE, J.R. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 3151, 1982.

JOSSANG, A.; LEBEOUF, M.; CAVE, A.; PUSSET, J. Alkaloids of the Annonaceae. 96. Dehydroxylophine and dehydrocorytenchine, novel isoquinoline alkaloids from *Xylopia vieillardii*. **Journal Natural Products**, v. 54, p. 466–472, 1991.

KASSUYA, C.A.L. **Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de extratos e lignanas isolados de *Phyllanthus amarus***. Florianópolis, 2006. 108f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

KONNING, G. H.; AGYANE, C.; ENNISON, B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. **Fitoterapia**, v. 75, p. 65-67, 2004.

LAPA, J.A.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo, Setor de produtos naturais, departamento de farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007, 144p.

LARINI, L. **Toxicologia**. 2ª ed., São Paulo: Manole, 315p, 1987.

LEMONS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIROA.A.; BARBOSA, R.G.B.S.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.

LIMA, E. O. et al. **Anais do X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 7/9, 32, 1988

LOBÃO, A.Q.; ARAÚJO, D.S.D.; KURTZ, B.C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, p. 85-96, 2005.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides. **Biociência**, v. 17, p. 18-22, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, 4ª ed., 2002.



M'BONGO, N.; LOISEAU, P.M.; LAWRENCE, F.; BORIES, C.; CRACIUNESCU, D.G.; ROBERT-GERO, M. In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitology Research**, v.83, n. 5, p. 515-517, 1997.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110583>. Acesso em: Junho de 2014.

MAIA, M.S. **Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio, Antioxidantes e Função Espermiática**. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Seminário de Reprodução I, Botucatu, 2003, 22 p.

MAIA, P.P.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Antimicrobianos em Alimentos de origem vegetal - uma revisão. **Revista de Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 49-64, 2009.

MARTINS, D. **Alcalóides, flavonóides e terpenóides de *Xylopiá aromática***. 1996. 134f. São Paulo, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1996.

MARTINS, D.; ROQUE, N. F. Terpenóides e flavonóides das folhas de *Xylopiá aromática* (Annonaceae). Sociedade Brasileira de Química, **Anais da 16ª Reunião Anual**, 1993.

MARTINS, F.M.M.; SILVA, M.B.; SILVEIRA, D.; COSTA, A.S.V.; JAMAL, C.M. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial citotóxico e antifúngico de *Xylopiá sericea* frente à *Colletotrichum musae*. **Biofar**, v. 7, n. 2, 2012.

MATHEUS, M.T.; FOLLI, M.S.; LOPES, J.C. Biometria de frutos e sementes de pimenteira (*Xylopiá sericea*). **X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba, p. 593-595, 2007.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: EUFC Editora, 1997. 141p.

MATOS, F. J. A.; MATOS, M. E. O. Constituintes químicos de *Xylopiá sericea*, **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 473, 1984.

MELO, C. M. **Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva da lactona do ácido hawtriwaico, diterpenos de *Egletes viscosa* Less, em camundongos: possíveis mecanismos**. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). 2006. 104 f. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

MELO, M.S.O.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.25, n.2, p.147-157, 1989.

MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro**: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica. 2009. 223 f. Tese de Doutorado em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, p. 165-170, 2007.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN-BEER, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MIRALHA, J.M.S. **As Annonaceae da Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM**. 1995. 165p. Tese de Doutorado. INPA/UFAM, 1995.

MOREIRA, I.C. **Estudo químico de *Xylopiá emarginata* e *Xylopiá brasiliensis***.1999. 203 f. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1999.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopiá emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 535- 537, 2003.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopiá brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 9, p. 948-95, 2005.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiá emarginata* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 55-58, 2007.

MOREIRA, R.C.R; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 187-195, 2002.

MOREIRA, V.C; FREIRE, D. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. In: **Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Latu-Sensu da Puc de Goiás**, 2011.

MORETONI, C.B. **Avaliação fitoquímica e das atividades antioxidante, citotóxica e hipoglicemiante dos frutos de *Cucumi sanguria* L. (*Cucurbitaceae*)**. 2008. 91f.

Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation in cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, A.A.; RIBEIRO, E.A.N.; OLIVEIRA J.M.; MEDEIROS, F.A, SILVA, M.S.; MEDEIROS, I.A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopiya cayennensis* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 17-21, 2006.

NASCIMENTO, A.A.; VIEIRA, A.F.; SILVA, A.P.; VILLELA, D.M.; NASCIMENTO, M.T. Herbivoria foliar de *Xylopiya sericea* St. Hil. (Annonaceae) em sub-bosque de plantio de Eucalipto e de Mata Atlântica. **Scientia Forestali**, Piracicaba, v. 39, n. 89, p. 77-86, 2011.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopiya parviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 939-944, 2004.

NIST (National Institute of Standards and Technology). Disponível em: [webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov), acesso em julho de 2014.

OLIVEIRA, A.B. et al. **Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p. 123, 1996.

OLIVEIRA, V.B.; YAMADA, L.T.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M.G.L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Traditional medicine**. Fact Sheet. 2008.

OSÓRIO, E.; ARANGO, G.J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630-635, 2007.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOMÉ, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RA, V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid a diterpene from *Copaifera langsdorffi* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PAULETTI, G. F. **Plantas produtoras de óleos essenciais, com ênfase em *Cunila galioides* Benth. e suas perspectivas econômicas no Rio Grande do Sul**. In.: MARIATH, J. E. A & SANTOS, R. P. (orgs.). Os Avanços da Botânica no Início do

Século XXI: Morfologia, Fisiologia, Taxonomia, Ecologia e Genética. Conferências, Plenárias e Simpósio do 57º Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre. 752p. 2006.

PHEROBASE (Database of Pheromones and Semiochemicals). Disponível em: [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com), acesso em julho de 2014.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1035 -1042, 2000.

PIMENTA, L. P. S.; TAKAHASHI, J.A.; MENDONÇA, D.D.; SILVA, M.X. N-trans- e N-cis-feruloiltiramina isoladas da madeira de *Xylopia benthamii* R.E. Fries. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

PONTES, W.J.T. **Efeito de extratos vegetais e óleos essenciais de espécies nativas de Pernambuco sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)**. Dissertação de Mestrado (Entomologia Agrícola), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE, 2006.

PONTES, A.F.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 71-84, 2005.

PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.S.; CÂMARA, C.A.G.; JUNIOR, M.G.C.G.; OLIVEIRA, J.V.; SHARTZ, M.O.E. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutas de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v.30, p. 838-841, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

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**, v. 269, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, G.M; SILVA, L.M.; PIETRO, R.C.L.R; SALGADO, H.R.N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p-132-138, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Pharmacology**. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 7ª ed, ISBN: 978-85-352-4172-3, 768p, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-553, 2003.

REIS, A.S.; RIOS, C.E.P.; MELO, L.P.; COSTA, G.C.; SILVA, L.A.; PATRÍCIO, F.J.B.; AMARAL, F.M.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Atividade Leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciência Saúde**, v.14 n.2, p. 119-126, 2012.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus, INPA, 1999, 816 p.

RIBEIRO, J.F.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; MENDONÇA, R.C.; FILGUEIRAS, T.S.; SILVA, M.R. **Características florísticas e potencial de uso de espécies vasculares ocorrentes na fazenda Trijunção, BA**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001, 48 p.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROCHA, A. B.; BOLZANI, V. S.; PANIZZA, S. Anatomy and essential oil of *Xylopi frutescens* Aublet Fruit. **Revista Ciências Farmaceuticas**, v. 2, p. 101-107, 1980.

ROCHA, G.M.; ROCHA, M.E.N. Uso popular de plantas medicinais. **Revista Saúde & Ambiente**, v.1, n.2, p.76-85, 2006.

RODRIGUES, A. R.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R. Estudo da atividade antineoplásica do diterpeno ácido caurenóico em hepatócitos (HEP-G2). **17º Simpósio Internacional de iniciação científica da USP**, 2009.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico online**, Fortaleza, 2007.

ROMAY, C.; LEDON, N.; GONZALEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334-338,1998.

RUSSO, A., LONGO, R. E.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acidphenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p. 21-29, 2002.

SÁEZ-LLORENS, X.; CASTREJÓN-DE WONG, M.; CASTAÑO, E.; DE SUMAN, O.; MORÓS, D.; DE ATENCIO, I. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 19, p. 200-206, 2000.

SANTOS, A. F. et al. **Anais do XV Simpósio de Planta Mediciniais do Brasil**, 118,1998.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.L.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NETO, O.G.R. **Comunicado técnico**: Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. ISSN 1517-2244, 2004.

SARKER, S.D.; LATIF, N.; GRAY, A.L. **Natural Products Isolation**. 2<sup>a</sup>ed. ISBN: 978-1-61779-623-4, 2006.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antinflammatory activity and bioavailability of prcutaneous piroxican. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SCHMUTZ, J. The alkaloids of *Xylopia discreta*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 42, p. 335-343, 1959.

SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; C.A. CAROLLO; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, p.1809-1812, 2007.

SILVA, M. V. et al. **Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 129, 1998.

SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1<sup>a</sup> ed., Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SO-MOVA, L.I.; SHODE, F.O.; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopia aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p. 165-74, 2001.

SOUZA, T.A.; OLIVEIRA, D.D.; SALES, E.M. Prospecção tecnológica: moléculas bioativas derivadas de produtos naturais. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 5, p. 148-154, 2013.

SPENCER, A.L.R.; SPENCER, J.F.T. **Public health microbiology: methods and protocols**. Human Press Inc, New Jersey, 2004.

STONER, G.; WANG, L. Natural products as anti-inflammatory agents. Obesity, Inflammation and Cancer. **Energy Balance and Cancer**, v. 7, p. 341-361, 2013.

TAKAHASHI, J.A.; HENRIETA, S.V.; BOAVENTURA, M.A.D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopi*a *sericea*. **Química Nova**, v. 24, p. 616-618, 2001.  
TATSADJIEU, L.N.; ESSIA-NGANG, J.J.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi*a *aethi*o*pica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-472, 2003.

TOSCAN, C.M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, 2010.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

TROPICOS®. *Xylopi*a *sericea*. Disponível em <http://www.tropicos.org/Name/1600524>. Acesso em: maio de 2013.

TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.M. BACILLUS. IN: BARLOWS, A.; HAUSLER JR., W.J.; HERMANN, K.L. **Manuals of Clinical Microbiology**, 5ª ed. American Society of Microbiology, p. 345-355, 1991.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.1, p. 23-27, 2008.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase**. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas, Araraquara, SP, 2005.

WANNMACHER, L. O uso indiscriminado de antibióticos e a resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso Racional de medicamentos: temas selecionados**, Organização Pan-Americana da Saúde/ OMS, v. 1, n. 4, 2004.

WILKENS, M.; ALARCON, C.; URZUA, A.; MENDOZA, L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 452-454, 2002.

WOODE, E.; AMEYAW, E.O.; BOAKYE-GYASI, E.; ABOTSI, W.K.M. Analgesic effects of an ethanol extract of the fruits of *Xylopi*a *aethi*o*pica* (*Dunal*) A. Rich, (Annonaceae) and the major constituent, xylopic acid in murine models. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 291–301, 2012.

YAMASAKI, K.; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y.; MIYAMOTO, T.; SATO, T.  
Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts  
of crude drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p.1663-1165, 1994.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S.  
Volatile constituents of the resins from *Protium subserratum* (Engl.) Engl. And  
*Tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntz. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p.  
325-326, 1998.