

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo Farmacognóstico e *Screening* Biológico de
***Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae)**

Gilmarcio Zimmermann Martins

Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

ARARAQUARA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Estudo Farmacognóstico e *Screening* Biológico de
***Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae)**

Gilmarcio Zimmermann Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Martins, Gilmarcio Zimmermann
G381e Estudo Farmacognóstico e *Screening* Biológico de *Solanum lycocarpum*
St. Hill (Solanaceae) / Gilmarcio Zimmermann Martins. – Araraquara, 2013
172 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Cleopatra da Silva Planeta

Coorientador: Raquel Regina Duarte Moreira

1. *Solanum lycocarpum*. 2. *Giardia lamblia*. 3. *Leishmania infantum*. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. *Trypanosoma brucei*. 6. Antimicrobiano. 7. Antioxidante. 8. Citotoxicidade. I. Planeta, Cleopatra da Silva, orient. II. Moreira, Raquel Regina Duarte, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Gilmarcio Zimmermann Martins

**Estudo Farmacognóstico e *Screening* Biológico de
Solanum lycocarpum St. Hill (Solanaceae)**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista

Araraquara, 26 de Junho de 2013.

Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara
Presidente / Coorientadora

Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara

Profa. Dra. Fernanda Scarmato De Rosa

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, UNIFEB, Barretos

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins

Universidade de Franca, Unifran, Franca

Trabalho realizado no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araraquara, Laboratório de Farmacognosia.

À minha esposa Edenyse Cristhiane Bertucci Martins, aos meus pais Enilson Sanches Martins e Marcia Elisabeth Zimmermann Martins, aos meus irmãos Guilherme Zimmermann Martins, Miguel Zimmermann Martins e Milena Zimmermann Martins pelo apoio, confiança, cooperação e, principalmente, incentivo para a realização de mais este sonho.

À Profª. Dra. Raquel Regina Duarte
Moreira, minha gratidão pela orientação
paciente e apoio constante. Seus
conselhos e ensinamentos foram e serão
de grande importância na minha
formação pessoal e profissional.

Agradecimentos

Inicialmente a Deus por me amparar nos momentos difíceis e me proporcionar à transformação de um sonho em realidade.

À minha esposa, aos meus pais e aos meus irmãos, pelo incentivo e apoio nesta fase de realização de sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planta, meus sinceros agradecimentos por este período em que trabalhamos juntos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira, o meu maior agradecimento pela orientação, dedicação e auxílio no decorrer deste trabalho.

Aos professores Dra. Adélia Emília de Almeida, Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Dr. Jairo Kenupp Bastos, Dra. Maria do Céu Rodrigues de Souza, Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli e Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, e que colaboraram para a realização deste trabalho, disponibilizando seu tempo, conhecimento, carinho e laboratório.

Aos técnicos dos laboratórios que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Bianca, Carla, Clarispaula, Danilo, Flávia, Geisiany, Giovana, Juliana, Lis e Nathalia pela amizade, companheirismo e auxílio nesses anos de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, que através do programa Ciência Sem Fronteira, que concedeu uma Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior, processo número 244.285/2012-8.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara, ao Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da

Universidade de São Paulo e a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela infraestrutura e apoio oferecidos.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho de pesquisa fosse realizado, o meu MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de figuras.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Família Solanaceae.....	4
1.2 Atividades biológicas das plantas do gênero <i>Solanum</i>	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Gênero <i>Solanum</i> (Solanaceae).....	8
2.2 <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill.....	10
2.3 Solasodina, solamargina e solasonina.....	13
2.4 Antibacterianos e antifúngicos.....	16
2.5 Doenças tropicais negligenciadas.....	18
2.5.1. Giardíase – <i>Giardia lamblia</i>	19
2.5.2. Leishmaniose – <i>Leishmania infantum</i>	22
2.5.3 Doença de Chagas – <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.5.4 Doença do Sono – <i>Trypanosoma brucei</i>	29
2.6 Agentes antioxidantes.....	32
3. OBJETIVO.....	35
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Material vegetal.....	39
4.2 Preparo da droga vegetal.....	39
4.3 Controle de qualidade da droga vegetal.....	40
4.3.1 Perda por dessecação.....	40
4.3.2 Determinação de cinzas totais.....	40

	Página
4.3.3 Determinação de cinzas insolúveis em ácido.....	41
4.3.4 Teor de substâncias extraíveis por água.....	41
4.3.5 Determinação do pH.....	42
4.3.6 Análise granulométrica.....	42
4.3.7 Análises microbiológicas.....	43
4.3.7.1 Contagem do número total de micro-organismos.....	43
4.3.7.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Escherichia coli</i>	43
4.3.7.3 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
4.4 Obtenção do extrato etanólico 96 % bruto.....	44
4.5 Caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico 96 % bruto.....	45
4.6 Purificação por partição líquido-líquido.....	46
4.7 Fracionamento por cromatografia em coluna por adsorção.....	48
4.8 Isolamento da solamargina e solasonina.....	49
4.9 Identificação e quantificação dos glicoalcalóides.....	52
4.10 Testes de susceptibilidade da atividade antimicrobiana.....	53
4.10.1 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	53
4.10.2 Avaliação da atividade antiparasitária.....	55
4.10.2.1 <i>Giardia lamblia</i>	55
4.10.2.2 <i>Leishmania infantum</i>	56
4.10.3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	57
4.11 Avaliação da atividade antioxidante.....	59
4.12 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Controle de qualidade da droga vegetal.....	63
5.2 Obtenção e caracterização do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto.....	66
5.3 Purificação por partição líquido-líquido.....	69
5.4 Fracionamento por cromatografia em coluna por adsorção.....	70
5.5 Isolamento da solamargina e solasonina.....	72
5.6 Identificação e quantificação dos glicoalcalóides.....	73
5.7 Testes de susceptibilidade da atividade antimicrobiana.....	78
5.7.1 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	78

	Página
5.7.2 Avaliação da atividade antiparasitária.....	78
5.7.2.1 <i>Giardia lamblia</i>	78
5.7.2.2 <i>Leishmania infantum</i>	81
5.7.2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	84
5.8 Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres.....	86
5.9 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	89
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS.....	130

ABREVIATURAS

AMH	=	Ágar <i>Muller-Hinton</i> ;
AMHsupl	=	Ágar <i>Muller-Hinton</i> suplementado com glicose 2% e 0,5 µg/mL de azul de metileno;
ANVISA	=	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ATCC	=	<i>American Type Culture Collection</i> ;
BHA	=	Hidroxianisol de butila;
BHI	=	<i>Brain Heart Infusion</i> ;
BHT	=	Hidroxitolueno de butila;
CAS	=	<i>Chemical abstracts service</i> ;
CC	=	Cromatografia em coluna;
CCDC	=	Cromatografia em camada delgada comparativa;
CCDP	=	Cromatografia em camada delgada preparativa;
cepa 427	=	Linhagem de formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i> .
cepa Y	=	Linhagem de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> ;
C_{1A}	=	Cinzas insolúveis em ácido;
CLAE	=	Cromatografia líquida de alta eficiência;
CLSI	=	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ;
C_T	=	Teor de cinzas totais;
DMSO	=	Dimetilsulfóxido;
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico;
DPPH	=	2,2-difenil-1-picrilidrazila;
DTN	=	Doenças tropicais negligenciadas;
EB	=	Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto;
F₀	=	Fração 0;
F₁	=	Fração 1;
F₂	=	Fração 2;
F₃	=	Fração 3;
F₄	=	Fração 4;

F₅	=	Fração 5;
FE	=	Fração Etanólica 40 % (v/v);
FH	=	Fração Hexano:Acetato de Etila (9:1);
Gly C	=	Linhagem de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> ;
H441	=	Linhagem de células pulmonares tumorais H441;
H520	=	Linhagem de células pulmonares tumorais H520;
H661	=	Linhagem de células pulmonares tumorais H661;
H69	=	Linhagem de células pulmonares tumorais H69;
Hep3B	=	Células de hepatomas linhagem Hep3B;
IC₅₀	=	Inibição do crescimento em 50%;
J774	=	Linhagem de macrófagos humanos;
LIT	=	<i>Liver-infusion tryptose</i> ;
MTT	=	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio;
NCCLS	=	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standart</i> ;
PD	=	Perda por dessecação;
PMS	=	Metassulfato de fenazina;
RDC	=	Resolução da Diretoria Colegiada;
Rf	=	Fator de retenção;
RMN	=	Ressonância magnética nuclear;
RPMI 1640	=	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ;
SDS	=	Dodecil sulfato de sódio;
Sg	=	Solamargina;
Sn	=	Solasonina;
Sn+Sg	=	Mistura de solasonina e solamargina;
SPFR	=	Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FFCLRP/USP;
T_E	=	Teor de extrativos;
WBC6	=	Linhagem de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> ;
XLD	=	Ágar xilose-lisina-desoxicolato;

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 4.1 – Valores de Rf mínimos e máximos utilizados para a obtenção das sub-frações.....	51
TABELA 5.1 – Parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal obtida a partir de frutos de <i>S. lycocarpum</i>	64
TABELA 5.2 – Análise granulométrica do pó seco de frutos maduros de <i>S. lycocarpum</i>	65
TABELA 5.3 – Valores de Fator de Retenção (Rf) das substâncias identificadas no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, os padrões Solasonina, Solamargina e a mistura Sn + Sg.....	68
TABELA 5.4 – Correspondência das frações com as das frações eluídas na cromatografia em coluna.....	72
TABELA 5.5 – Concentração percentual de solasonina e solamargina no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), fração F ₂ , solasonina e solamargina extraídos de frutos maduros e secos de <i>Solanum lycocarpum</i>	77
TABELA 5.6 – Atividade giardicida <i>in vitro</i> do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.....	79
TABELA 5.7 – Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.....	82
TABELA 5.8 – Atividade tripanocida <i>in vitro</i> do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.....	85
TABELA 5.9 – Atividade antioxidante do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações e glicoalcalóides de <i>S. Solanum lycocarpum</i> St. Hill...	87
TABELA 5.10 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de fruto de <i>Solanum lycocarpum</i> , frações e substâncias isoladas.....	90

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 2.1 – <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill. (A) Folhas e Fruto; (B) Folhas e Flor.....	11
FIGURA 2.2 – Estrutura química da solasodina.....	13
FIGURA 2.3 – Estrutura química dos glicoalcalóides esteroidais (A) solamargina e (B) solasonina.....	15
FIGURA 2.4 – Trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	20
FIGURA 2.5 – Forma promastigota de <i>Leishmania infantum</i>	23
FIGURA 2.6 – Distribuição de casos de infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i> no período de 2006 a 2009.....	26
FIGURA 2.7 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
FIGURA 2.8 – Frequência epidemiológica da Doença do Sono (<i>T. b. gambiense</i>) no ano de 2010 no mundo.....	30
FIGURA 2.9 – Frequência epidemiológica da Doença do Sono (<i>T. b. rhodesiense</i>) no ano de 2010 no mundo.....	30
FIGURA 2.10 – Esquema do ciclo biológico da transmissão da tripanossomíase africana.....	31
FIGURA 4.1 – Fluxograma de obtenção de extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos maduros de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill, através de técnica de refluxo.....	45
FIGURA 5.1 – Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB) de pó dos frutos secos de <i>Solanum lycocarpum</i>	66
FIGURA 5.2 – Perfil cromatográfico do Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de Frutos de <i>Solanum lycocarpum</i>	70
FIGURA 5.3 – Cromatograma do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto por CLAE, 200 nm, nas condições estabelecidas para análise ($S_n =_{tR} 10,5 \text{ min} / S_g =_{tR} 13,0 \text{ min}$).....	75

	Página
FIGURA 5.4 – Cromatograma da fração etanólica 40 % (v/v) por CLAE, 200 nm, nas condições estabelecidas para análise ($S_n = t_{R\ 10,0}$ min / $S_g = t_{R\ 12,0}$ min).....	75
FIGURA 5.5 – Cromatograma da solasonina (A) e solamargina (B) por CLAE, 200 nm, nas condições estabelecidas para análise ($S_n = t_{R\ 10,0}$ min / $S_g = t_{R\ 12,0}$ min).....	76

RESUMO

Devido ao negligenciamento e ao aumento de números de casos das doenças microbianas e parasitárias no Brasil, o aprimoramento da investigação científica e tecnológica na área de plantas medicinais faz-se indispensável para à busca de novos produtos antimicrobianos e antiparasitários. A *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada na forma de polvilho de lobeira como terapia complementar para o tratamento do *Diabetes Mellitus*, hipocolesterolêmico e na hipertensão. Os efeitos terapêuticos são atribuídos aos dois glicoalcalóides predominantes nas espécies do gênero *Solanum*, a solamargina e a solasonina. Em face ao exposto, o objetivo desta pesquisa foi o isolamento de solasonina e solamargina de frutos maduros de *S. lycocarpum* e o screening de atividades antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante e citotóxica do extrato etanólico 96 % bruto, frações e dos glicoalcalóides. O extrato etanólico 96 % bruto foi obtido por refluxo utilizando como solvente etanol 96 °GL e seco sobre pressão reduzida. O isolamento dos glicoalcalóides foi realizado por meio de sequência de técnicas cromatográficas. Foram analisadas as atividades, antimicrobiana (*E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *L. casei*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterican*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus* e *Fusarium* sp.), antiparasitária (*Giardia lamblia*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*), antioxidante e citotóxica. No processo de purificação foram obtidas 6 frações e nas sub-frações 2.5 e 2.7 foram isolados os glicoalcalóides solasonina (Rf = 0,46) e solamargina (Rf = 0,57), respectivamente. Apresentaram atividade parasitária para *Giardia lamblia* (extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁ e F₂), *Leishmania infantum* (extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁, F₂ e F₃), *Trypanosoma cruzi* (extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v) e fração F₂) e para *Trypanosoma brucei* (extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁ e F₂). Solamargina apresentou atividade antiparasitária para as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e a mistura de solasonina e solamargina (1:1) apresentou ação sinérgica para *Giardia lamblia* e *Leishmania infantum*, sendo promissores os estudos para o desenvolvimento destes glicoalcalóides. O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, as frações e os glicoalcalóides não apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica. A atividade antioxidante foi superior a 50 % da capacidade de reduzir o radical DPPH no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v) e fração F₅, contudo a solamargina e a solasonina não apresentaram atividade. O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto e a solasonina apresentaram alta toxicidade para macrófagos em baixa concentração ao inverso da solamargina, resultado semelhante quando da mistura das substâncias em proporções iguais. Demonstraram uma promissora ação antiparasitária para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos: o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto obtido de frutos de *Solanum lycocarpum*, a fração F₂, a solamargina e a mistura de solamargina e solasonina (1:1).

Palavras chaves: *Solanum lycocarpum*; *Giardia lamblia*; *Leishmania infantum*; *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma brucei*; antimicrobiano; antioxidante; citotoxicidade.

ABSTRACT

The neglect and increased of the numbers of cases of microbial and parasitic diseases in Brazil and the improvement of scientific and technological research in the medicinal plants has contributed for the search of new antimicrobials and antiparasitic. The *Solanum lycocarpum* St. Hill. (Solanaceae) is a medicinal plant traditionally used as complementary therapy for the treatment of Diabetes Mellitus, hypocholesterolemic and hypertension. The therapeutic effects are attributed to the two predominant glycoalkaloids in *Solanum* species, the solamargine and the solasonina. In view of the above, the objective of this research was to isolate solasonina and solamargine of ripe fruits of *S. lycocarpum* and screening of antimicrobial, antiparasitic, antioxidant and cytotoxicity activities of crude extract 96% ethanol, fractions and glycoalkaloids. The crude extract 96% ethanol was obtained by reflux with as solvent ethanol 96 ° GL and reduced pressure dried. The isolation of glycoalkaloids was performed by chromatographic techniques. We analyzed the activity, antimicrobial (*E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *L. casei*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterican*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus* and *Fusarium* sp.), antiparasitic (*Giardia lamblia*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*), antioxidant and cytotoxicity. In the purification process were obtained six fractions and the in the sub-fractions 2.5 and 2.7 were isolated the glycoalkaloids, solasonina (Rf = 0.46) and solamargine (Rf = 0.57). Showed activity for parasite *Giardia lamblia* (crude extract 96% ethanol, ethanol fraction 40%, fractions F₁ and F₂), *Leishmania infantum* (crude extract 96% ethanol, ethanol fraction 40%, fractions F₁, F₂ and F₃), *Trypanosoma cruzi* (crude extract 96% ethanol, ethanol fraction 40% and fraction F₂) and *Trypanosoma brucei* (crude extract 96% ethanol, ethanol fraction 40%, fractions F₁ and F₂). Solamargine showed antiparasitic activity for epimastigote of *Trypanosoma cruzi* and solasonina and solamargine mixture (1:1) showed a synergistic action for *Giardia lamblia* and *Leishmania infantum*, and must be realized studies for the development these. The crude extract 96% ethanol, fractions and glycoalkaloids not showed antibacterial and antifungal activity. The antioxidant activity was higher than 50% of the ability to reduce DPPH in crude extract 96% ethanol, ethanol fraction 40% and fraction F₅, yet solamargine and solasonina not showed this activity. The crude extract 96% ethanol and solasonina showed high toxicity to macrophages at low concentrations to the inverse of solamargine, similar result when the mixture of substances in equal proportions. Antiparasitic action showed a promising for the development of new therapeutic agents: crude extract 96% ethanol obtained by fruit of *Solanum lycocarpum*, the F₂ fraction, the mixture of solamargine and solamargine and solasonina (1:1).

Key words: *Solanum lycocarpum*; *Giardia lamblia*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma brucei*; antiparasitic drug; antimicrobial drug; antioxidant; cytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas com a finalidade de tratar enfermidades faz parte da vida do homem desde as primeiras civilizações, que sempre procuraram na natureza diferentes soluções para os diversos males que o afetam (ALVIM et al., 2006).

A importância das plantas nos diversos estágios do desenvolvimento humano é inegável. Até meados do século XIX, os recursos terapêuticos utilizados eram predominantemente plantas e seus derivados. Com o advento da Revolução Industrial e o aprimoramento da química moderna, em meados do século XX, iniciou-se o desenvolvimento e utilização dos fármacos de origem sintética, que aos poucos desencadearam a redução do uso das plantas (BELO et al., 2002).

Contudo a partir da 2ª Guerra Mundial, incentivos públicos na área de plantas medicinais vêm sendo realizados no intuito de resgatar o uso de plantas e seus derivados no tratamento de doenças.

Na área farmacêutica, as plantas e os extrativos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais denominados medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

No segmento industrial, é nítido o ressurgimento do interesse em produtos naturais como fonte de modelos para síntese de fármacos (BARBOSA et al., 2005; HALL

et al., 2006) e como matéria-prima para desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al. 2001).

Os medicamentos fitoterápicos sempre apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor farmacêutico movimenta no Brasil cerca de R\$ 43 bilhões por ano em toda a cadeia produtiva e o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1,1 bilhão segundo a agência IMS Health, 2011.

Atualmente as agências reguladoras são bastante rigorosas quanto aos parâmetros relacionados à segurança, eficácia e padrão de qualidade para o registro e posterior fiscalização de produtos fitoterápicos. Esses padrões estão diretamente relacionados com a obtenção de matérias-primas controladas, extratos vegetais padronizados e, especialmente, com a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos que comprovem as ações terapêuticas (SIMÕES e SCHENKEL, 2002), assim torna-se urgente o desenvolvimento de pesquisas na área de tecnologia de fitoterápicos.

O Brasil é um dos países que apresenta maior biodiversidade do mundo, estima-se que entre 10 e 12 % de todas as espécies descritas mundialmente, são encontradas nesse país e aproximadamente 19 % da flora mundial estão distribuídas nos seis biomas do Brasil, sendo eles o Cerrado, os Campos Sulinos, a Floresta Atlântica, a Caatinga, a Floresta Amazônica e o Pantanal (MITERMEIER et al., 2004; RIBEIRO & WALTER, 2008; PASSOS & RIBEIRO, 2009).

Apesar da enorme biodiversidade, no Brasil poucos grupos de pesquisa investigam a validação do uso de plantas nativas e as práticas populares relacionadas com seu uso, por isso, as informações científicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir a qualidade, segurança e eficácia.

1.1 Família Solanaceae

A família Solanaceae é constituída por cerca de 3000 espécies distribuídas em 106 gêneros, com distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros endêmicos e de diversidade (AGRA et al., 2009). É uma família de grande importância econômica, com diversas espécies utilizadas para alimentação, como a *Solanum tuberosum* (batata), *Capsicum frutescens* (pimenta malageta), *Solanum lycopersicum* (tomate), além de algumas ornamentais (*Brunfelsia sp.* e *Petunia sp.*) e medicinais, como a *Atropa beladonna* e a *Mandragora officinailis* (SILVA et al., 2005; MORAES et al., 2009).

O gênero *Solanum* é o maior da família Solanaceae, com aproximadamente 1400 espécies e 5000 epítetos descritos (AGRA et al., 2009), sendo que, aproximadamente, 20 espécies são endêmicas da região Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2005).

O gênero *Solanum* é conhecido pela prevalência de alcalóides em sua composição, contudo diferentes metabólitos secundários com importância terapêutica e comercial são produzidos por esse gênero, dentre eles, destacam-se os glicoalcalóides e compostos polifenólicos, aos quais são atribuídas diferentes ações farmacológicas e de proteção do vegetal contra fitopatógenos (BLANKEMEYER et al., 1998).

A solamargina e solasonina são glicoalcalóides predominantes nas espécies de *Solanum*, aos quais são atribuídos os efeitos terapêuticos. Além disso, apresentam grande importância econômica, uma vez que a parte esteroideal, aglicônica, a solasodina, é amplamente utilizada como matéria-prima inicial para a síntese de fármacos esteroideais (SOARES-MOTA et al., 2009).

Solanum lycocarpum St. Hill. (do grego “lycos” = lobo e “karpos” = fruto), da família das Solanaceae é um arbusto comum no bioma do Cerrado, na parte central do

Brasil (CORREA, 1984; SCHWARTZ et al., 2007; PINTO et al., 2007; NAKAMURA et al., 2008). Popularmente conhecida como “lobeira”, “fruta-do-lobo”, “jorubebão”, “baba-de-boi”, “berinjela-do-campo” e “maçã-do-cerrado” (MIRANDA & BASTOS, 2010), seus frutos são utilizados tradicionalmente no tratamento do diabetes, obesidade, inflamações, hipertensão e para diminuir as concentrações de colesterol sanguíneo (CRUZ, 1982; VIEIRA et al., 2003).

Estudos atribuem os efeitos terapêuticos dos frutos de *S. lycocarpum* à presença dos glicoalcalóides: solamargina e solasonina (MOTIDOME et al., 1970; VIEIRA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2007; MAURYA et al., 2009; SOARES-MOTA et al., 2009).

1.2 Atividades biológicas das plantas do gênero *Solanum*

Nos últimos anos, altos índices de morbidades e mortalidades são evidenciados nas zonas tropicais para as diferentes doenças tropicais negligenciadas (dengue, doença de Chagas, doença do sono, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras) e infecções microbianas. Isso se deve, principalmente, à emergência de parasitas e microrganismos resistentes à terapêutica instituída, a perda de eficácia, os efeitos secundários graves e o elevado custo do tratamento atualmente utilizado (MACHADO et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Embora existam financiamentos para pesquisa de novos fármacos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, o conhecimento produzido não é revertido como avanços terapêuticos em virtude, principalmente, da falta de interesse da indústria farmacêutica nessa área.

A redução da sensibilidade dos agentes antimicrobianos frente aos microrganismos é considerada, atualmente, um problema de saúde mundial (SILVA et

al. 2007). As buscas por novas fontes terapêuticas mais eficazes para o tratamento de infecções são uma alternativa mais econômica para o controle das infecções por bactérias multi resistentes.

As plantas são fonte inesgotável e alternativa viável para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Diversos grupos de princípios ativos vegetais apresentam propriedades antimicrobianas, entre os quais terpenos, polifenóis, polipeptídeos, heterosídeos, taninos e alcalóides (GONÇALVES, et al., 2005).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento, no número e na qualidade, das pesquisas que buscam novos fármacos e alternativas para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, antibióticos e antioxidantes, resultando no aumento da descoberta de potenciais agentes terapêuticos a partir de fontes naturais como as plantas medicinais e seus extratos (MACHADO et al., 2009).

Portanto, faz-se indispensável o incremento de investimentos na busca de plantas medicinais, fitofármacos e produtos fitoterápicos para o combate de doenças microbianas, além do aprimoramento na formação de recursos humanos para transformar os conhecimentos produzidos em produtos para a população acometida por estas doenças.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Solanum* (Solanaceae)

A família Solanaceae é constituída de cerca de 3000 espécies distribuídas em 106 gêneros, considerada uma das maiores dentre as Angiospermas com distribuição cosmopolita (AGRA et al., 2009).

Na América do Sul, as Solanáceas apresentam ampla distribuição geográfica, existindo aproximadamente 50 gêneros endêmicos dessa família e no Brasil 27 gêneros já foram identificados (VAZ & MAIA, 2010).

Diversas Solanáceas apresentam extraordinária importância econômica mundial como fontes de fármacos e narcóticos, tais como as espécies *Nicotiana tabacum* (fumo), *Datura stramonium* (estramônio) e *Atropa beladonna* (beladona); outra parte como fonte de alimento, tais como: *Solanum tuberosum* (batata), *Solanum melongena* L. (berinjela), *Solanum lycopersicon* (tomate), *Solanum palinacantum* (jorubeba), *Capsicum frutescens* (pimenta-malageta) e *Capsicum* spp. (pimentão). Além de ser uma família que apresenta grandes interesses em virtude da utilização abundante na medicina popular (ROCHA & POTIGUARA, 2009).

O gênero *Solanum* é considerado um dos maiores dentre as Solanáceas, sendo composto de mais de 1400 espécies, considerado um dos mais complexos entre as Angiospermas. Nesse gênero, aproximadamente, 30 espécies são endêmicas, sendo 20 espécies encontradas na região nordeste do Brasil (SILVA et al., 2005; VAZ & MAIA,

2010).

Diferentes metabólitos secundários com importância terapêutica e comercial são produzidos por esse gênero, dentre eles, destacam-se os glicoalcaloides e compostos polifenólicos, aos quais são atribuídas diferentes ações farmacológicas e de proteção do vegetal contra fitopatógenos (BLANKEMEYER et al., 1998).

Os glicoalcaloides são compostos que apresentam duas partes unidas sendo, uma glicônica, a qual corresponde a um ou mais carboidratos ligados por ligação glicosídica, e outra aglicônica, que apresenta em sua estrutura um átomo de nitrogênio heterocíclico derivado do metabolismo dos aminoácidos (SIMÕES et al., 2002). Essas substâncias são amplamente distribuídas em vegetais das famílias *Solanaceae* e *Liliaceae*. Diversos estudos foram realizados com mais de 350 espécies do gênero *Solanum* (SUN et al., 2010) sendo identificados mais de 100 glicoalcaloides diferentes, entre esses quatro são mais abundantes: a chaconina, a solanina, a solamargina e a solasonina.

O uso popular apresentou para algumas das espécies do gênero *Solanum* efeitos anti-inflamatório, anti-hepatotóxico, narcóticos, estimulantes centrais, midriáticos, mióticos, hipertensores e hipotensores (ROBBER, 1997; VIEIRA et al., 2003; HALL et al., 2006; SOARES-MOTA et al., 2009; SUN et al., 2010).

Já em animais apresentam efeito laxante e causam constipação em aves. Além disso, são capazes de inibir a germinação em plantas (CIPOLLINI, 2000).

Estudos demonstraram que a solamargina apresenta atividade antineoplásica para células de hepatomas (Hep3B) e atividade citotóxica para células pulmonares tumorais das linhagens, H441, H520, H661 e H69 (MAURYA et al., 2009). A mistura proporcional de solamargina e solasonina demonstrou efeito citotóxico sinérgico nos tumores celulares e como agente antifúngico (HALL et al., 2006).

2.2 *Solanum lycocarpum* St. Hill.

Solanum lycocarpum St. Hill (FIGURA 2.1) é um arbusto ou árvore pequena, de até 4 m de altura, com um sistema radicular profundo, muito ramosa, revestida por densos pelos estrelados, ramos cilíndricos, lenhosos, fistulosos e tortuosos, apresentam folhas anfiestomáticas e pecioladas. Os seus frutos são uma baga globosa, verde, atingindo 8 a 12 cm, podendo apresentar de 40 a 100 frutos anualmente, cuja massa varia entre 400 e 900 g, sua época de colheita é de julho a janeiro (CORREA, 1984; SILVA et al., 1994; ELIAS et al., 2003; PINTO et al., 2007).

O fruto de *S. lycocarpum* constitui-se em importante fonte alimentar durante o ano para diversas espécies de animais, dentre elas *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará), *Tapirus terrestris* (anta), *Cerdocyon thous* (cachorro do mato ou guaraxain), *Lycalopex vetulus* (raposa do campo), *Tupinambis merianae* (tiú, teiú ou teju), do cerrado brasileiro, especialmente durante a estação de seca, quando outras fontes de alimento tornam-se escassas (MOTTA et al., 2002; OLIVEIRA JR. et al., 2004; PINTO et al., 2007).

Os frutos de *S. lycocarpum* são utilizados tradicionalmente no tratamento do diabetes, obesidade, inflamações, hipertensão e para diminuir as concentrações de colesterol sanguíneo (CRUZ, 1982; VIEIRA et al., 2003).



FIGURA 2.1 – *Solanum lycocarpum* St. Hill. (A) Folhas e Fruto; (B) Folhas e Flor.

Em algumas regiões as pessoas consomem o fruto fresco ou cozido (SOARES-MOTA, et al., 2009), contudo a preparação medicinal mais difundida é a utilização do polvilho de lobeira (DALL'AGNOL et al., 2000).

O polvilho de lobeira consiste em um fino granulado obtido do sedimento da polpa dos frutos de *S. lycocarpum* em solução aquosa, o qual pode ser obtido de forma doméstica ou adquirido em farmácias sob a forma de cápsulas (FERREIRA, 2005; OLIVEIRA, et al., 2010).

Em estudos realizados com o polvilho de lobeira em ratos portadores de diabetes induzido por estreptozotocina não foi possível evidenciar o efeito hipoglicemiante quando administradas doses entre 1 e 2 g/Kg durante 7 dias (OLIVEIRA et al., 2003); contudo em outro estudo, conduzido por FARINA et al. (2010), foram observadas reduções na glicemia e alterações de parâmetros fisiológicos (volume de urina e volemia) em ratos diabéticos, sugerindo seu potencial uso como adjuvante no tratamento do Diabetes.

PETERS et al. (2002) e MARUO et al. (2003) demonstraram que a administração de polvilho de lobeira durante o período prévio à implantação do

blastocisto não interferiram no transporte, implantação no útero, número de blastocistos e no desenvolvimento do embrião em ratas adultas.

Entretanto, CHANG et al. (2002) observou que o uso de polvilho de lobeira durante o período de fetogênese, em ratos, desencadeou o retardo no crescimento da placenta e do feto, principalmente, do fígado e do pulmão. GUERRA et al. (1997) evidenciou a alteração do desenvolvimento de fetos do sexo masculino (menor peso corporal e do fígado e maior peso da placenta) quando administrado o polvilho de lobeira durante o período de organogênese, embora não tenha interferido na capacidade da condução da gestação a termo e não apresentar nenhum efeito tóxico sobre o organismo materno.

Estudos com *S. lycocarpum* envolvendo análises farmacognósticas tem sido realizados visando estabelecer parâmetros de qualidade e padronização dessa espécie vegetal, atestando a sua pureza e autenticidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; SIMÕES et al., 1999; ALBERTON et al., 2001; FRANCO, 2001); contudo, não existe monografia oficial sobre a droga vegetal e produtos obtidos a partir de *S. lycocarpum*.

Dentre os estudos fitoquímicos, foi possível evidenciar a presença de 1,85 % de alcaloides totais em frutos de *S. lycocarpum*, sendo atribuídos os efeitos terapêuticos à presença dos glicoalcaloides majoritários: solamargina (0,06 %) e solasonina (0,09 %) (MOTIDOME et al., 1970; VIEIRA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2007; MAURYA et al., 2009; SOARES-MOTA et al., 2009).

Outros metabólitos secundários foram isolados de frutos de *S. lycocarpum*, como liconosídeos Ia, Ib, II, III, IV (saponinas esteroidais), lobo-frutosídeo (pseudoalcaloide esteroide oligoglicosídico), rebeneosídeo A, rebeneosídeo B, 12-hidroxisolasonina, polissacarídeos (MOTIDOME et al., 1970; YOSHIKAWA et al., 2007; NAKAMURA et al., 2008).

2.3 Solasodina, solamargina e solasonina

A solasodina (FIGURA 2.2) é a porção aglicona da solamargina e da solasonina, caracteriza-se por ser um alcaloide esteroidal presente em diversas espécies do gênero *Solanum*, apresenta um importante potencial econômico, uma vez que é utilizada como matéria prima para a síntese de hormônios esteroidais (SILVA et al, 2005). Outros interesses são evidenciados para a solasodina, em decorrência de diversos estudos que estão sendo realizados com esse composto, podendo ser destacado estudos referentes à fitoquímica, as ações farmacológicas, de quimiotaxonomia, na síntese de outros produtos esteroidais, além da proteção do vegetal contra fitopatógenos (FUKUHARA et al., 1991; BARBOSA FILHO et al., 2005; AGRA et al., 1999; SILVA et al., 2005; MAURYA et al., 2009; EANES et al., 2008).

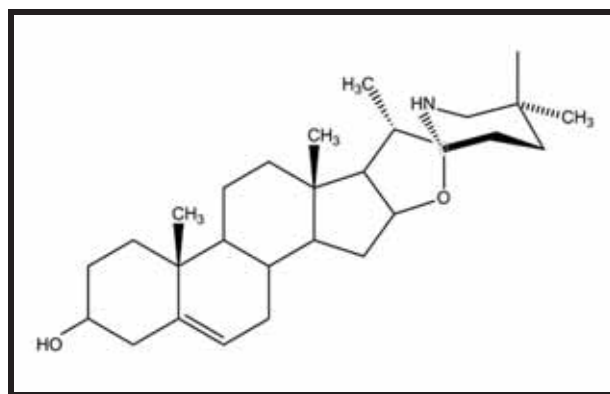


FIGURA 2.2 – Estrutura química da solasodina.

FONTE: (glicomix.co.uk)

A solasodina é um análogo nitrogenado da diosgenina, que pode ser convertido em acetato de 16-deshidropregnenolona, que é matéria-prima para a síntese dos derivados de progesterona (MOLA et al., 1997; SOARES-MOTA et al., 2009).

Estruturalmente a solasodina é a porção aglicônica de diversos glicoalcaloides esteroidais, presentes em mais de 100 espécies do gênero *Solanum*, sendo a solamargina e a solasonina os dois principais glicoalcaloides esteroidais derivados da solasodina (BLANKEMEYER et al., 1998).

A solamargina e a solasonina (FIGURA 2.3) apresentam estruturas semelhantes; ambos os glicoalcaloides apresentam a mesma estrutura esteroidal com 27 carbonos (aglicona) que é a solasodina, porém diferem na porção glicônica, ambas as moléculas apresentam três monossacarídeos ligados. Contudo a solamargina é composta por duas moléculas de raminose ligadas nos carbonos 2' e 4' de uma molécula central de D-glicose e a solasonina é composta por uma molécula de raminose e uma de glicose ligadas, respectivamente, nos carbonos 2' e 3' de uma molécula central de galactose (BLANKEMEYER et al., 1998; HALL et al., 2006; SUN et al., 2010).

A solamargina, (22R, 25R)-spiro-5-en-3β-il-α-L-rhamnopyranosil-(1-2_{glu})-O-α-L-rhamnopyranosil-(1-4_{glu})-β-D-glucopyranose, número de registro CAS 20311-51-7, apresenta fórmula molecular C₄₅H₇₃NO₁₆, com peso molecular 884,05, o ponto de fusão superior a 300 °C e solúvel em metanol e etanol.

A solasonina, solanid-5-en-3-il 6-deoxi-β -L-mannopyranosil-(1->2)-[β-D-glucopyranosil-(1->3)]-β-D-galactopyranoside, número de registro CAS 20562-02-1, apresenta fórmula molecular C₄₅H₇₃NO₁₅, com peso molecular 868,06, o ponto de fusão na faixa de 271 - 273 °C e solúvel em metanol, etanol e clorofórmio.

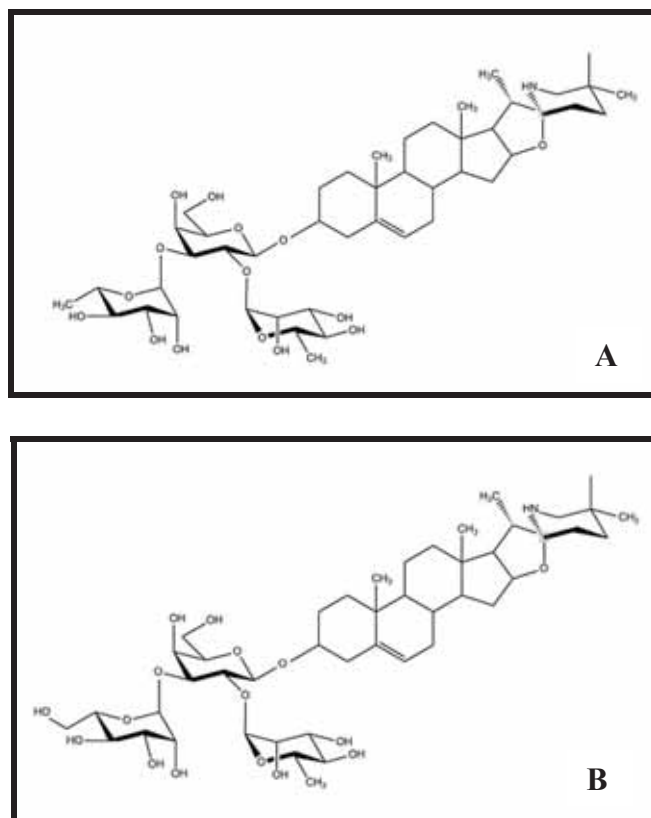


FIGURA 2.3 – Estrutura química dos glicoalcaloides esteroidais (A) solamargina e (B) solasonina.

FONTE: (glicomix.co.uk)

Estudos demonstram que as ações farmacológicas evidenciadas para a solamargina e a solasonina são iguais, porém a diferença terapêutica está ligada à potência da ação (BLANKEMEYER et al., 1998). Esse fato pode ser explicado pela sua discreta diferença estrutural, na porção glicônica, que é responsável por alterar os parâmetros de solubilidade e farmacocinéticos, mas não os farmacodinâmicos (SIMÕES et al., 2002).

A pequena diferença estrutural também interfere diretamente no processo extrativo e principalmente no isolamento desses glicoalcaloides.

Diferentes metodologias extrativas são relatadas incluindo extração ácido-base (WESTON, 1976; CRABBE & FRYER et al., 1983; ABREU et al., 2007), extração

hidroalcoólica (etanol:água) (MOLA et al., 1997; WEISSENBERG et al., 1998; BLANKEMEYER et al., 1998; SILVA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2010; TIOSSI et al., 2012), alcoólica (etanol e metanol) (CRABBE & FRYER et al., 1980; FUKUHARA & KUBO, 1991; MAURYA et al., 2009).

Segundo TIOSSI et al. (2012) o processo extrativo por percolação, utilizando etanol 80 % foi seletivo para os glicoalcaloides, correspondendo até 90 % do total de alcaloides extraídos da biomassa do fruto de *S. lycocarpum*.

MOLA et al. (1997) utilizando aparelho de Soxhlet e etanol 95 % para diferentes espécies do gênero *Solanum* afirmou que o processo extrativo utilizando etanol é viável, econômico e facilmente implantado em processos industriais, para a produção em ampla escala de solasodina, solamargina e solasonina.

2.4 Antibacterianos e antifúngicos

A utilização de agentes antibacterianos e antifúngicos na terapêutica das doenças infecciosas, tem se revelado extremamente importante para a cura e o controle de infecções, permitindo assim reduzir o quadro de morbidade e mortalidade em adultos (JACKSON et al., 1998).

Contudo a utilização indiscriminada de agentes antibacterianos pode conduzir à seleção de micro-organismos resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que deixaram de ser problemas exclusivos do ambiente hospitalar e estão se tornando um problema emergente na comunidade (SILVA et al. 2007; GELATTI et al., 2009).

Diversas políticas de saúde estão sendo implantadas, atualmente, no Brasil com intuito de reduzir os impactos do aumento da resistência dos microrganismos frente aos

antibacterianos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou o controle de medicamentos à base de substâncias antimicrobianas em sua Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 20, de 05 de maio de 2011, no intuito de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos pela população.

Além disso, a ANVISA em conjunto com a Organização Pan-Americana da Saúde, realizaram um termo de cooperação no intuito de garantir a qualidade e a reprodutibilidade dos processos e resultados produzidos por meio de verificação contínua dos testes, dentre outros, de disco-difusão para análise da sensibilidade de microrganismos frente a antibacterianos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE e AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Face a isso a busca por novas fontes terapêuticas mais eficazes para o tratamento de infecções são uma alternativa para o controle das infecções por bactérias multi-drogas-resistentes, sendo as drogas vegetais uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e antifúngicos.

Diversos grupos de princípios ativos vegetais apresentam propriedades antimicrobianas, dentre eles terpenos, polifenóis, polipeptídeos, heterosídeos, taninos e alcaloides (MICHELIN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2005; WECKESSER et al., 2007).

Os compostos isolados de plantas que apresentaram atividade antimicrobiana, contêm grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos atualmente empregados na terapêutica (GONÇALVES et al. 2005), isso pode levar à descoberta de novas classes de antibióticos e que sejam protótipos para a síntese de novas moléculas por meio de técnicas de modificações moleculares.

Várias solanáceas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e apresentaram resultados promissores frente a algumas bactérias gram-positivas, gram-

negativas e leveduras, como *S. trilobatum* (arnica-do-mato) (LATHA & KANNABIRAN, 2006), *S. tomentosum* (arariba-rosa) (ALIERO & AFOLAYAN, 2006), *S. surattense* (laranjinha-do-mato) (SHEEBA, 2010), *S. torvum* (jurubeba) (LALITHA et al., 2010), *S. stramonifolium* (jurubeba-branca-doce) (SARNTHIMA & KHAMMUANG, 2012), *S. americanum* (maria-pretinha) e *S. melongena* (berinjela) (AL-JANABI & AL-RUBEEY, 2010). Contudo os resultados foram obtidos para os extratos brutos enquanto os compostos isolados testados não apresentaram atividade antimicrobiana.

2.5 Doenças tropicais negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas – DTN (*neglected tropical diseases*) são patologias endêmicas, transmitidas de forma variada; contudo, normalmente, apresentam vetores ou hospedeiros intermediários, afetam populações em regiões empobrecidas (África, América Latina e Ásia), que contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade e com entrave no desenvolvimento dos países (CAMARGO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; SOUZA et al., 2012), são consideradas doenças tropicais negligenciadas a doença de Chagas (Tripanossomíase americana), doença do sono (Tripanossomíase africana), dengue, leishmaniose, giardíase, esquistossomose, helmintíases, cisticercose, tracoma, lepra, filariase linfática, oncocercíase, úlcera de Burun e algumas zoonoses como o anthrax, brucelose, neurocisticercose, teníase, dentre outras.

Três mil pessoas morrem diariamente no mundo em decorrência de doenças tropicais negligenciadas, sendo mais de um milhão de mortos ao ano e 14 % da população apresenta risco de infecção tornando-as importantes obstáculos para o desenvolvimento humano e socioeconômico de sociedades empobrecidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; AL-MUSAYEIB et al., 2012).

Como consequência do acometimento das doenças tropicais negligenciadas a populações com baixa renda, não são consideradas um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas, as quais investem pouco em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Segundo PONTES (2012) no período entre 1975 e 2004 foram disponibilizados apenas 1,3 % dos medicamentos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, apesar de representarem 12 % da carga global de doenças e apenas 5 % dos recursos empregados em pesquisa e desenvolvimento na área de DTN são provenientes de instituições privadas, os demais de instituições filantrópicas (54%) e públicas (41 %).

No Brasil, o Ministério da Saúde apresenta diversas formas de incentivos governamentais para pesquisa e desenvolvimento na área de doenças tropicais negligenciadas. Esses recursos provem de diversas agencias de fomento à pesquisa, que investiram, em 2008, mais de 39 milhões de reais para o aprimoramento do conhecimento em doença de Chagas, leishmaniose, giardíase, hanseníase, malária esquistossomose e tuberculose (BRASIL, 2010).

2.5.1 Giardíase – *Giardia lamblia*

A giardíase, giardose ou lamblíase, causada pela *Giardia lamblia* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) é uma das mais prevalentes parasitoses intestinais nos

países emergentes, variando entre 20 a 30 % das 280 milhões de infecções por ano, considerada um grave problema de saúde, acarreta um elevado custo com tratamento (LANE et al., 2002; THOMPSON, 2000; ROSSIGNOL, 2010)

A *Giardia lamblia* é um protozoário binucleado, pertencente à ordem **Diplomanadida**, flagelado, de tamanho pequeno, que durante seu ciclo vital apresenta as formas de trofozoíto e de cisto. (REY, 2011).

Os trofozoítos (FIGURA 2.4) apresentam um corpo maleável com um achatamento dorsoventral, medindo de 12 a 15 μm de comprimento por 6 a 8 μm de largura, simétrico, piriforme, binucleado e apresentam quatro pares de flagelos e dois feixes de axóstilos, os quais proporcionam-lhes deslocamento rápido e irregular. É um parasita anaeróbico do intestino, com reprodução assexuada por divisão binária longitudinal. (SOUZA, 2010).



FIGURA 2.4 – Trofozoítos de *Giardia lamblia*. Ampliação 40X.

Nos pacientes que apresentam contaminação por *Giardia lamblia*, os trofozoítos aparecem em grande número nas fezes diarreicas, enquanto nas fezes formadas

predominam a forma de cistos, dos quais bilhões podem ser eliminados diariamente. Os trofozoítos na forma de cistos apresentam o aspecto globoso, desaparecendo o disco ventral e os flagelos tornam-se intracitoplasmáticos. (REY, 2011).

A principal via de transmissão da giardíase é a fecal-oral (ROBERTSON et al., 2010), contudo a adesão dos trofozoítos de *G. lamblia* nos enterócitos é essencial para a colonização do intestino delgado e é considerado um pré-requisito para a indução da parasitose e a doença clínica (ELMENDORF et al., 2005).

A giardíase pode ser inteiramente assintomática, ou pode produzir desde uma gastroenterite branda e autolimitada, até uma diarreia crônica, com ou sem má absorção (FLANAGAN, 1992). Em crianças, idosos, e pacientes imunocomprometidos, giardíase pode levar a morbidade e até mesmo a morte (ECKMANN, 2003; FRASER et al., 2000;. SAWANGJAROEN et al., 2005).

A terapia atual da giardíase inclui diversos fármacos dentre eles, os 5-nitroimidazóis, nitrofuranos-5, e, mais recentemente, benzimidazóis e pamoato de pirantel como drogas de escolha (SOUZA et al., 2010). Embora esses fármacos sejam eficazes, diversos problemas têm sido descrito em decorrência da sua utilização como uma alta incidência de fracassos, recaídas frequentes, e diversos efeitos colaterais (UPCROFT & UPCROFT, 2001; BUSATTI et al., 2007). Algumas evidências sugerem que a redução da atividade terapêutica seja em decorrência a uma possível resistência do parasita à droga (UPCROFT & UPCROFT, 2001). Por essas razões, a busca de alternativas terapêuticas é totalmente justificável.

Diversos estudos para a busca de potenciais fitofármacos estão sendo realizados, a revisão da literatura realizada por AMARAL et al. (2006) que referenciara 153 espécies diferentes de vegetais de 69 famílias e encontrados 101 compostos químicos diferentes que foram submetidos à avaliação da atividade giardicida, dentre as quais a

Capsicum annum, *Solanum incanum* e *Solanum nigrum*. Nesta revisão destacam-se as plantas do gênero *Solanum* que apresentaram atividade para *Giardia lamblia*. Dentre as classes de compostos ativos vegetais diversos flavonoides, sesquiterpenos, terpenos, alcaloides e glicoalcaloides demonstraram atividade quanto à atividade contra *Giardia lamblia* (AMARAL et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; VIDAL et al., 2007; VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2010; VERA-KU et al., 2010; JIMÉNEZ-ARELLANES et al., 2012).

2.5.2 Leishmaniose – *Leishmania infantum*

A leishmaniose visceral ou calazar é um parasitismo crônico, grave, de alta letalidade, cuja mortalidade nos casos humanos não tratados pode alcançar 70 a 90%. Na região do Mediterrâneo, na África ocidental e central, no Oriente Médio, na China e no Brasil é causada pela espécie *Leishmania infantum* (SOUZA et al., 2010), enquanto que na região da África oriental, Índia, China e América a espécie responsável por esse parasitismo é a *Leishmania donavani* (PASTORINO et al., 2002; REY, 2011).

A leishmaniose está presente em 47 países com uma incidência anual estimada em 500.000 novos casos, sendo que 90 % ocorrem na Índia, Brasil e Sudão. No Brasil a leishmaniose está presente em quase todas as regiões, do norte ao sudeste. Atualmente esta doença é considerada endêmica em 21 estados do país com mais de 3.000 notificações de novos casos por ano nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. As alterações climáticas, a migração humana e as alterações ambientais fizeram grandes mudanças no perfil de distribuição, com adaptações a áreas peri urbanas e urbanas (BRASIL, 2006; MADEIRA, 2009; POUBEL, 2010).

A *Leishmania infantum* se apresenta sob a forma amastigota no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (células de Kupffer, macrófagos, medula óssea e linfonodos, principalmente). Essa forma pode ser observada no interior dos leucócitos e dos monócitos, dentro e vacúolos parasitóforos das células invadidas.

As amastigotas apresentam um processo de divisão binária, que é responsável pela destruição das células em decorrência do acúmulo de amastigotas filhas que foram formadas. Quando os hospedeiros invertebrados, os flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo (COURA, 2005; SOUZA et al., 2010), sugam o sangue dos animais ou pessoas infectadas, contraem as amastigotas, que são convertidas em promastigotas (FIGURA 2.5), forma flagelada, em seu tubo digestório, as quais, multiplicam-se intensamente, se acumulam em seu sistema digestivo, prontos para serem inoculados em uma próxima picada em novo hospedeiro vertebrado.



FIGURA 2.5 – Forma promastigota de *Leishmania infantum*. Ampliação 40X.

Fonte: www.fotolog.com.br

A leishmaniose visceral tem apresentações clínicas variadas desde assintomáticas até o quadro clássico da doença que é caracterizado pela presença de febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia e com pouca frequência a tosse seca e a diarreia, podendo evoluir para a desnutrição, edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas (PASTORINO et al., 2002; REY, 2011).

Os fármacos estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina têm sido utilizados há mais de cinco décadas para o tratamento de leishmaniose visceral, contudo esses fármacos causam diversos efeitos adversos, dentre os mais frequentes incluem a anorexia, vômitos, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica. A ocorrência desses efeitos adversos torna importante a busca de novos agentes farmacoterapêuticos para a melhoria da qualidade do tratamento (DOCAMPO & MORENO 1986; CERECETTO & GONZALEZ 2002; PALUMBO, 2009; MACIAS et al., 2012).

SEN & CHATTERJEE (2011) realizaram uma revisão sobre as principais plantas que apresentaram potenciais compostos leishmanicidas, pesquisados no período entre 1990 e 2011, observando 61 espécies diferentes com atividade para as distintas espécies do gênero *Leishmania* (*L. infantum*, *L. donavani*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*).

Os extratos de *Caralluma sinaica*, *Periploca aphylla*, *Hedera helix*, *Maesa balansae*, *Haplophyllum bucharicum* apresentaram atividade específica para *L. infantum*. As principais classes de compostos naturais que apresentaram atividade foram os flavonoides, as saponinas, as quinonas, os alcaloides, as ligninas, as lignanas, os taninos, os terpenos e os lipídeos (SEN & CHATTERJEE, 2011; AL-MUSAYEIB et al., 2012; MACIAS et al., 2012).

2.5.3 Doença de Chagas – *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitido por depósito das fezes infectadas de triatomíneos vetores (80 – 90 %), por transfusão sanguínea (5 – 20 %), via congênita (0,5 – 0,8 %) e raramente por transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (COURA & CASTRO, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Dentre as mais de 146 espécies vetores conhecidas para a transmissão da Doença de Chagas, 48 delas foram identificadas no Brasil, sendo que destas, cinco apresentam especial importância na transmissão da doença ao homem, que são o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (ROSA et al., 2012)

Estima-se que 20 milhões de pessoas na América Latina estejam infectadas, 120 milhões vivem em zona de risco e 8 milhões apresentam a forma aguda da doença, conforme ilustra a FIGURA 2.6 (TEIXEIRA et al., 2006; DIAS, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), no Brasil em 2009, segundo dados da Fiocruz e do Ministério da Saúde, 250 pessoas foram diagnosticadas e em 2010, até o mês de outubro, foram diagnosticadas mais 60 novos casos, sendo os estados do Pará e Amazonas os que apresentam maiores índices de novos casos para essa doença, que totaliza 727 novos casos de 2005 a maio de 2010 (BRASIL, 2010).

O ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* nos seres humanos (FIGURA 2.7) inicia através das fezes dos triatomíneos, que ao picarem os vertebrados, defecam após o repasto, eliminando a forma infectante, tripomastigota metacíclica, que penetra no orifício da picada. Nas células próximas ao local da picada os tripomastigotas

metacíclicos perdem o flagelo e a membrana ondulante, adquirindo forma oval, de menor tamanho, sendo denominada forma amastigota. No interior das células, ocorre sua multiplicação por divisão binária e com o aumento do número de amastigotas ocasiona a destruição celular e conseqüentemente a reinfecção do tecido adjacente, bem como entram na corrente sanguínea e no sistema linfático. Nesta fase a forma amastigota reassume a forma flagelada, denominada tripomastigota sanguínea, espalhando-se por todo o organismo e infectando novas células (BRASIL, 2006).

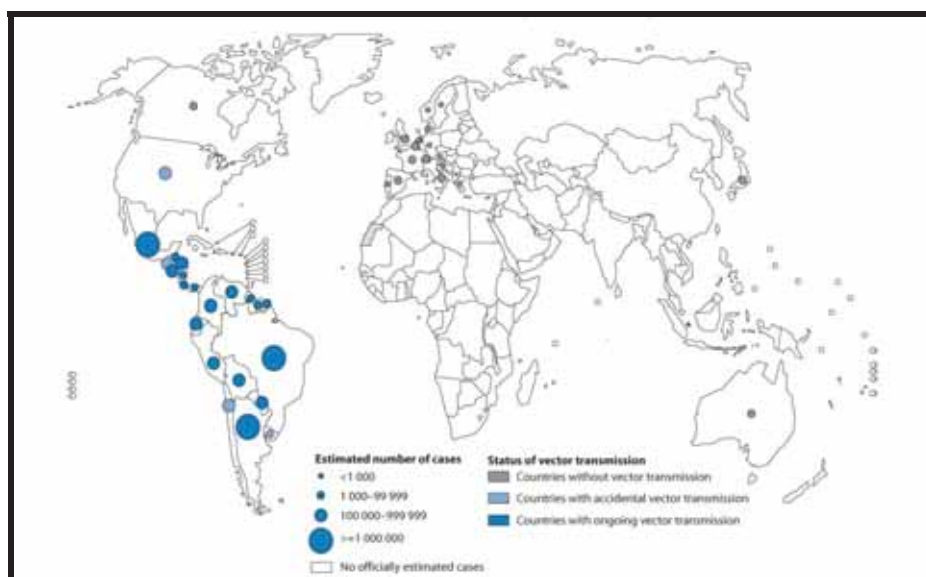


FIGURA 2.6 – Distribuição de casos de infecção de *Trypanosoma cruzi* no período de 2006 a 2009.

FONTE: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=20111213.237022> (Acesso em 30 de Junho de 2012)

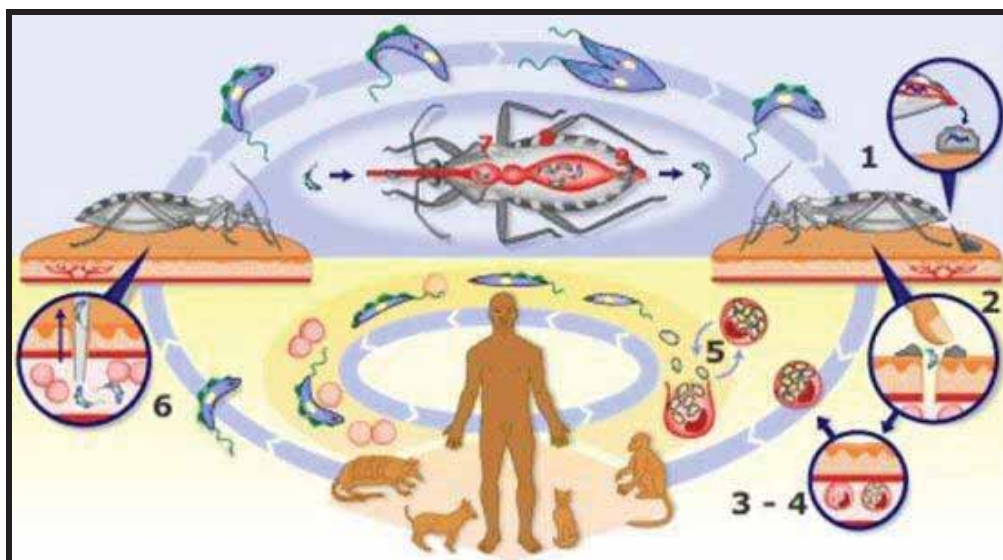


FIGURA 2.7 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

FONTE: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php> (Acesso em 30 de Julho de 2012)

Os triatomíneos ao alimentar-se de sangue infectado, ingere tripomastigotas sanguíneas as quais, em seu intestino médio, serão transformadas em epimastigotas, formas essas capazes de multiplicarem-se. No intestino posterior dos triatomíneos as epimastigotas diferenciam-se para a forma infectante aos vertebrados, tripomastigota metacíclica, que poderá ser eliminada durante o repasto sanguíneo, renovando assim o ciclo de transmissão (BRASIL, 2006).

No início de 1970, dois fármacos foram introduzidos na terapêutica da doença de Chagas, sendo o nifurtimox (3-metil-4{(5-nitrofurfurilidene)amino}tiomorfoline-1,1-dioxide), em 1967, na forma de comprimidos (120 mg), e o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida), em 1973, desenvolvidos com intuito de eliminar os parasitas durante a fase aguda da doença, sendo essas as terapêuticas de primeira escolha, que contudo apresentaram diversos efeitos colaterais e baixa efetividade (COURA e CASTRO, 2002; CASTRO 2006; ALVES, 2012).

No Brasil, o nifurtimox foi descontinuado a partir da década de 80, seguido por outros países da América do Sul (Argentina, Chile e Venezuela), principalmente em

razão da variação do efeito tripanocida em algumas regiões, além de sua eficácia em adultos ser entre 7 e 8 % na fase crônica (OLIVEIRA et al., 2008).

O benzonidazol demonstrou em estudos eficácia superior ao nifurtimox, durante o tratamento na fase aguda da doença. Após 1983, tornou-se um consenso o protocolo de tratamento para pacientes adultos em fase aguda na forma de 10 mg/Kg/dia durante 30 a 60 dias (LAZZARI & FREILIJ, 1998; OLIVEIRA et al., 2008). Apesar de sua maior eficácia, cuidados devem ser tomados quando da sua administração em razão dos sérios efeitos adversos, incluindo dermatopatia alérgica generalizada, neuropatia periférica e depressão da medula óssea (DOCAMPO et al, 1984; URBINA et al., 2003).

Em virtude da sistemática de tratamento atual, o desenvolvimento de novas moléculas e metodologias para o tratamento da doença de Chagas torna-se necessária, não obstante as dificuldades para esse desenvolvimento proveem das diferentes formas do *Trypanosoma cruzi* e os estágios do ciclo de vida, apresentando baixa susceptibilidade a compostos farmacologicamente ativos (CHENA et al., 2005).

Pesquisas com plantas têm sido realizadas para a busca de novos compostos ativos para a doença de Chagas, dentre essas se destacam aquelas realizadas com *Isolona hexaloba*, *Tetrapleura tetráptera* (áridon, aridam), *Scorodophloeus zenkeri* (MUGANZA et al., 2012), *Spiranthera odoratissima* (manacá), *Diospyros hispida* (fruta de boi), *Calophyllum brasiliense* (guanandi) (ALBERNAZ et al., 2010), *Piptadenia africanum* (páu muzence) (MESIA et al., 2008), dentre outras.

Em decorrência dos estudos realizados nos vegetais, diversos compostos, promissores para o tratamento da Doença de Chagas foram evidenciados, dentre eles destacam-se a bisbenzilisquinolona (FOURNET et al., 1997), apomorfina, glaucina, precicetrina, boldina, norarmepavina, codeína (MORELLO et al., 1994), β -carbolina

(RIVAS et al., 1999), sendo a principal característica, o fato de que a maioria é alcalóide.

2.5.4 Doença do Sono – *Trypanosoma brucei*

A doença do Sono ou tripanossomíase africana é causada pelo parasita *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei* e transmitida por moscas da espécie *Glossina morsitans*, mais conhecida como moscas tsé-tsé (COX, 2004).

A distribuição desses tripanosomas é exclusiva na África, sendo a subespécie *T. b. gambiense* encontrada, principalmente, nas regiões Oeste e Central (FIGURA 2.8) e o *T. b. rhodesiense* localizado na região Leste (FIGURA 2.9) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; AIBIODON et al., 2012).

A tripanossomíase africana é a principal doença tropical negligenciada na África, onde cerca de 60 milhões de pessoas correm o risco de desenvolvê-la (NGANTCHOU et al., 2010), estima-se que entre 300 e 500 mil pessoas por ano adquirem essa doença e que 60 mil pessoas morrem por ano como consequência da doença do Sono (OSORIO et al., 2008).

O ciclo de vida da tripanossomíase africana é iniciado no homem pela forma infectante, tripomastigota metacíclica, que está presente nas glândulas salivares da mosca Tsé-Tsé e é injetada durante a picada. O parasita prossegue para o sangue e linfa, onde se diferenciam em forma tripomastigota sanguínea, a qual é capaz de multiplicação por divisão binária longitudinal. Nesta fase, os parasitas são distribuídos por todo o organismo, podendo atingir o sistema nervoso central. Devido à alta



FIGURA 2.8 – Distribuição de frequência epidemiológica da Doença do Sono (*T. b. gambiense*) no ano de 2010 no mundo.

FONTE: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=95200> (Acesso em 30 de Junho de 2012)

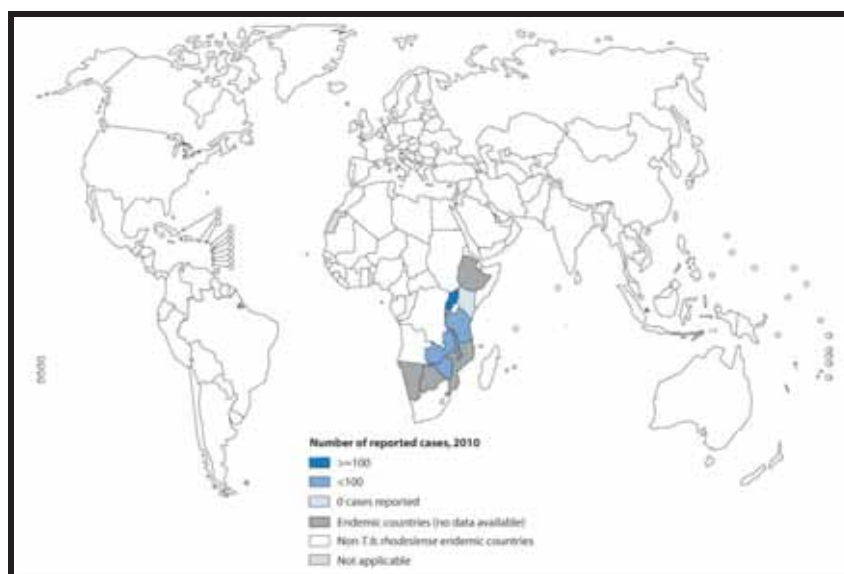


FIGURA 2.9 – Distribuição de frequência epidemiológica da Doença do Sono (*T. b. rhodesiense*) no ano de 2010 no mundo.

FONTE: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=95200> (Acesso em 30 de Junho de 2012)

parasitemia, as formas tripomastigotas sanguíneas se tornam mais curtas e largas. Neste momento, outras moscas Tsé-Tsé, podem ser contaminadas após a picada no ser humano e adquirirem a forma tripomastigota sanguínea a qual tem capacidade de se dividir no intestino médio e diferenciando-se em forma procíclica e em seguida em forma epimastigota. Após a diferenciação migram para as glândulas salivares, onde se desenvolvem e multiplicam até atingir o estágio de tripomastigota infectante, possibilitando iniciar novo ciclo (BRUN, 1979; AIBIODON et al., 2012), conforme mostra a FIGURA 2.10.

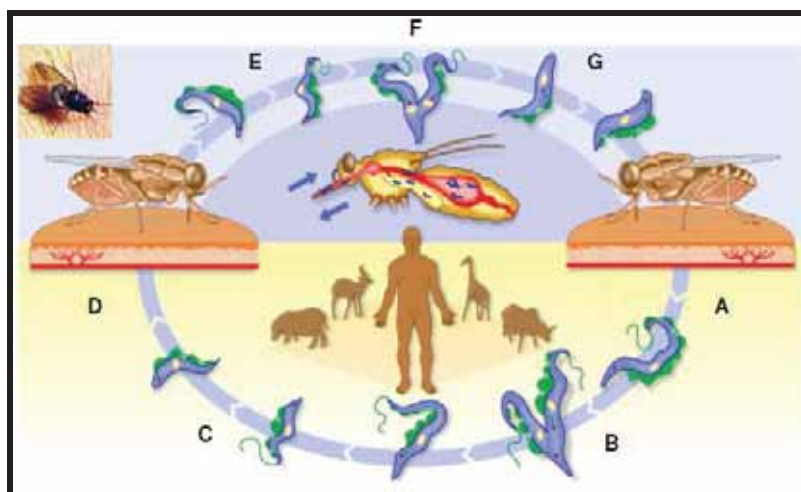


FIGURA 2.10 – Esquema do ciclo biológico da transmissão da tripanossomíase africana.

Fonte: <<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/african-trypanosomiasis>>. Acesso em 30 de julho de 2012.

O tratamento da doença do sono é dependente do estágio da doença. Os fármacos utilizados na fase pré-hemolinfática são mais eficazes, de fácil administração e menos tóxicos (MAUDLIN, 2006). O tratamento padrão, na fase inicial, se faz utilizando o fármaco pentamidina (dose de 4 mg/Kg, por via intramuscular ou intravenosa, sendo administrada a cada 24 horas, durante 7 a 10 dias), introduzido no mercado em 1940, para *Trypanosoma brucei gambiense* e o suramina, introduzido no

mercado em 1920, para *Trypanosoma brucei rhodesiense* (NOK, 2003; KENNEDY, 2004; COX, 2004; OSÓRIO et al., 2008).

Quando a infecção atinge o sistema nervoso central, os fármacos utilizados são mais tóxicos e de difícil administração, sendo os principais, o melarsoprol, introduzido em 1949, e a eflortinina, introduzido em 1981; esse último eficaz somente para o *Trypanosoma brucei gambiense* (NOK, 2003; BISSER et al., 2007). Estudos tem demonstrado resistência parasitária para o melarsoprol (KAGIRA & MAINA, 2007).

A busca de novos tratamentos para a tripanossomíase africana tem sido alvo de inúmeros estudos com princípios ativos tradicionais descritos nas farmacopeias e com diversas plantas medicinais, como *Azadirachta indica* (neem), *Butyrospermum paradoxum* (carité) (MBAYA et al., 2007), *Pavetta crassipes* (BALDE et al., 2010), *Triclisia patens* (manar balé) (CAMACHO et al., 2003), *Unonopsis buchtienii* (icója negro) (WAECHTER et al., 1999), *Acacia nilótica* (acácia), *Bombax buonopozense* (crioulo poilão), *Terminalia avicennioides* (capitaozinho), *Zanthoxylum zanthoxyloides* (MANN et al., 2011), dentre outras.

A partir dos compostos isolados das plantas medicinais estudadas, os alcaloides (triptantrina, 4-azitriptantrina, emetina, berberina) a classe de metabolitos secundários foram os que mais apresentaram atividade antitripanosoma (KUBANEK et al., 1995; MERSCHJOHANN et al., 2001; CAMACHO et al., 2003; SCOVILL et al., 2002; MBAYA et al., 2007; MANN et al., 2011).

2.6 Agentes antioxidantes

Os processos oxidativos, no organismo humano, são processos metabólicos responsáveis pela produção da energia necessária para as atividades essenciais das

células, contudo o metabolismo do oxigênio é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ADEGOKE et al., 1998).

As espécies reativas de oxigênio, conhecidas também por radicais livres, apresentam um importante papel nas reações bioquímicas e fisiológicas; entretanto, a produção excessiva pode levar a processos patofisiológicos, como danos ao DNA, desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, Alzheimer. Além disso, estão envolvidas no processo de envelhecimento (AMES et al., 1995; SOUSA et al., 2006).

A produção dos radicais livres é controlada no organismo pela ação de diversos compostos antioxidantes, os quais tem a capacidade de, em baixas concentrações, reduzirem significativamente ou inibirem a oxidação do composto químico (SOUSA et al., 2006).

Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos, sendo o ácido ascórbico, a vitamina E, quercetina e o β -caroteno, os principais antioxidantes naturais e o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidrotolueno de butila (BHT) os antioxidantes sintéticos mais utilizados (RICE-EVANS et al., 1996).

Diversos compostos do metabolismo vegetal secundário apresentam atividade antioxidante, dentre eles a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, carotenos, pigmentos e esteróis (XING & WHITE, 1996; PIETTA, 2000; Wu et al., 2005; POLITI et al., 2011).

Devido a isso, a busca de novos agentes antioxidantes é justificável frente à diversidade da flora brasileira.

Diversas metodologias têm sido utilizadas para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos, frações e compostos químicos sintéticos e ou naturais,

permitindo uma seleção rápida e sensível de agentes potenciais. Dentre estas metodologias podemos destacar o método de avaliação do sequestro de radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; BROINIZI et al., 2007).

O método de sequestro de radical livre por DPPH consiste na redução do 2,2-difenil-1-picrilidrazila (coloração púrpura, instável que absorve a 515 nm) à difenil-picril-hidrazina (coloração amarela e estável), ao receber um átomo de hidrogênio, provindo de uma substância antioxidante (QUEIROZ, 2011).

A porcentagem da atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo quanto maior o consumo por uma amostra, maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2006, LIU, 2010; QUEIROZ, 2011).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a realização de um estudo farmacognóstico e *Screening* de atividades antimicrobianas, antiparasitárias, antioxidantes e citotóxicas de frutos maduros de *Solanum lycocarpum* St. Hill.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Extração, purificação e isolamento dos glicoalcalóides presentes nos frutos maduros de *Solanum lycocarpum* St. Hill;
- ✓ Realização de *screening* de atividades antimicrobianas do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações e glicoalcalóides isolados;
- ✓ Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados frente aos micro-organismos;
- ✓ Avaliação da atividade giardicida do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados frente à *Giardia lamblia*;
- ✓ Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados frente à *Leishmania infantum*;

-
- ✓ Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados frente ao *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*;
 - ✓ Avaliação da atividade citotóxica em macrófagos do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados;
 - ✓ Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico 96 % bruto, frações e glicoalcalóides isolados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizados frutos maduros de *Solanum lycocarpum* St. Hill, coletados na cidade de Barretos – SP, nas coordenadas geográficas aproximadas de S 20° 34' 15.898"/W 48° 34' 29.989".

A exsicata de *S. lycocarpum* foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia (SPFR) da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FFCLRP/USP, sob o número de registro n° SPFR 11.308, sendo identificada pelo curador Dr. Milton Groppo Junior.

4.2 Preparo da droga vegetal

Os frutos de *S. lycocarpum* foram submetidos à estabilização prévia em estufa a 100 °C (FANEM, modelo 320/3), por 30 minutos e em seguida secos a 60 °C até peso constante. Após secagem, os mesmos foram pulverizados em moinho de facas (TECNAL, modelo TE-648).

4.3 Controle de qualidade da droga vegetal

Após secagem e pulverização dos frutos de *S. lycocarpum*, foram realizadas análises físico-químicas de controle de qualidade, segundo metodologias descritas na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), foram determinados os seguintes parâmetros: perda por dessecação, teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, teor de extrativos, pH e análise granulométrica do pó.

Ensaio de contagem microbiana da droga vegetal foram realizados pesquisando a presença de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, segundo metodologias descritas na “UNITED STATES PHARMACOPEIA” (2009).

4.3.1 Perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi realizada segundo o método gravimétrico de determinação de água em drogas vegetais, como descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

A determinação foi realizada, em triplicata, através da pesagem de 4 g da droga vegetal em um pesa-filtro, previamente dessecado em estufa (FANEM, modelo 315 SE) por 30 minutos a 105 °C. A amostra foi dessecada a 105 °C até peso constante. Foi calculada a porcentagem de perda por dessecação em relação à droga vegetal seca.

4.3.2 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas totais foi realizada em triplicata, pesando-se 3 g do pó da droga vegetal seca, em um cadinho, previamente dessecado e tarado. O material foi incinerado em uma mufla (BRAVAC, Modelo 632), utilizando aumento gradativo de

temperatura sendo, 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C, conforme descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010). Após incinerado, o material foi resfriado em um dessecador e posteriormente, pesado. Calculando-se a porcentagem de cinzas em relação à droga vegetal seca.

4.3.3 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

A partir das cinzas totais, foram determinadas as cinzas insolúveis em ácido conforme descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010). As cinzas totais foram fervidas por 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em um cadinho tampado com vidro de relógio. Após esse período o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água destilada quente, juntando esse volume ao cadinho. O material foi filtrado em papel de filtro qualitativo, e o resíduo insolúvel em ácido foi lavado com água destilada quente até pH neutro. O resíduo insolúvel em ácido foi transferido para o cadinho e foi, inicialmente, seco em chapa de aquecimento e incinerado a 500 °C até peso constante. Calculando-se a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga vegetal seca.

4.3.4 Teor de substâncias extraíveis por água

A determinação de substâncias extraíveis em água foi realizada em triplicata, segundo a metodologia de determinação de substâncias extraíveis por extração a quente, descrita na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

Foram adicionados, em um erlenmeyer, 4,0 g de pó seco de frutos de *S. lycocarpum* e 100 mL de água destilada, pesando em seguida o conjunto completo. Este foi macerado por 1 hora, seguido de refluxo por igual período. Após resfriado, foi corrigido o peso do conjunto, utilizando água destilada, até peso igual o inicial. O

material foi filtrado sob papel de filtro seco e transferido 25 mL do filtrado para uma cápsula de porcelana tarada, onde foi evaporado o solvente e seco o material a 105 °C por 6 horas. Após este período, foi resfriado em dessecador por 30 minutos, pesada a cápsula de porcelana e calculada a porcentagem de materiais extraíveis em relação ao material seco.

4.3.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em triplicata, seguindo metodologia descrita para determinação de pH na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

Preparou-se 100 mL de uma solução extrativa a 1% (p/p) da droga vegetal, através da técnica de infusão, o material foi filtrado e do infuso foi determinado o valor de pH utilizando um pHmetro (Quimis, Modelo Q400MT) previamente calibrado.

4.3.6 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

O grau de divisão granulométrico foi obtido utilizando um conjunto de cinco tamises, de abertura nominal 0,85 µm, 0,600 µm, 0,450 µm, 0,300 µm e 0,250 µm, fechados na parte superior e operado por um agitador de tamises (Granutest).

Ao tamis superior, foram distribuídos, uniformemente, 25 g da droga vegetal e o conjunto foi agitado por 15 minutos. O conteúdo individual de cada tamis foi pesado e determinado o percentual de pó retido.

A partir do grau de divisão granulométrica o pó da droga vegetal foi classificado em pó grosso, moderadamente grosso, semifino, fino e finíssimo, conforme classificação da FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

4.3.7 Análises microbiológicas

4.3.7.1 Contagem do número total de micro-organismos

A contagem do número total de colônias de micro-organismos presentes na droga vegetal foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita na UNITED STATES OF PHARMACOPEIA (2009) e PINTO et al. (2003).

Foram pesados 10,0 g da droga vegetal e transferidos, assepticamente, para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2. A amostra foi submetida à agitação por 10 minutos. Foi retirado 1,0 mL da solução amostra e adicionado em 20,0 mL de ágar tioglicolato, para contagem de bactérias, e 20 mL de ágar Sabouraud, para contagem de fungos, a 47 °C em placa de Petri. Após solidificação do meio, foram as placas foram armazenadas em estufa a 35 °C por 24 horas e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número total de colônias com auxílio de um contador de colônias e calculado o número total de unidades formadoras de colônias segundo metodologia descrita na “UNITED STATES PHARMACOPEIA” (2009).

4.3.7.2 Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*

A verificação da presença de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* presentes na droga vegetal foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita na “UNITED STATES PHARMACOPEIA” (2009) e PINTO et al. (2003).

Foram pesados 10,0 g da droga vegetal e transferidos, assepticamente, para 90,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. A amostra foi incubada a 35 °C durante 24 a 48 horas. Após este período, 1,0 mL da amostra foi

transferida para 2 tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, os quais foram incubados a 35 °C durante 24 horas.

As amostras presentes no caldo tetrionato e no caldo selenito cistina, após a incubação, foram semeadas em um tubo contendo ágar verde brilhante, em uma placa de Petri de ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e em outra placa contendo ágar bismuto sulfito e incubadas a 35 °C durante 24 horas.

O crescimento e as características das colônias formadas foram observados e analisados.

4.3.7.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

A verificação da presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* presentes na droga vegetal foi realizada em triplicata, seguindo a metodologia descrita na “UNITED STATES PHARMACOPEIA” (2009) e PINTO et al. (2003).

Foram pesados 10,0 g da droga vegetal e transferidos, assepticamente, para 90,0 mL de caldo soja-caseína e incubada a 35 °C durante 24 a 48 horas. Após este período, a amostra foi semeada (com auxílio de uma alça) em placas contendo ágar Vogel Johnson e ágar cetrimida, para pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. As placas foram incubada a 35 °C durante 24 horas. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada pelo método de coloração de Gram.

4.4 Obtenção do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto foi obtido através da mistura da droga vegetal (35,0 g) com o etanol 96 % (v/v) (250 mL) submetida a refluxo por 4 horas.

Após este processo o material foi filtrado a vácuo, obtendo-se o extrato fluído 1 (filtrado 1). Ao resíduo vegetal foram adicionados mais 200 mL de etanol 96 % (v/v) e submetido a novo refluxo por 4 horas. Terminado este o material foi filtrado a vácuo, obtendo-se o extrato fluído 2 (filtrado 2). Ambos foram unidos e concentrados sob pressão reduzida até consistência xaroposa e seca a temperatura ambiente, até peso constante, obtendo-se assim o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB). A FIGURA 4.1 mostra um fluxograma da metodologia de obtenção do EB.

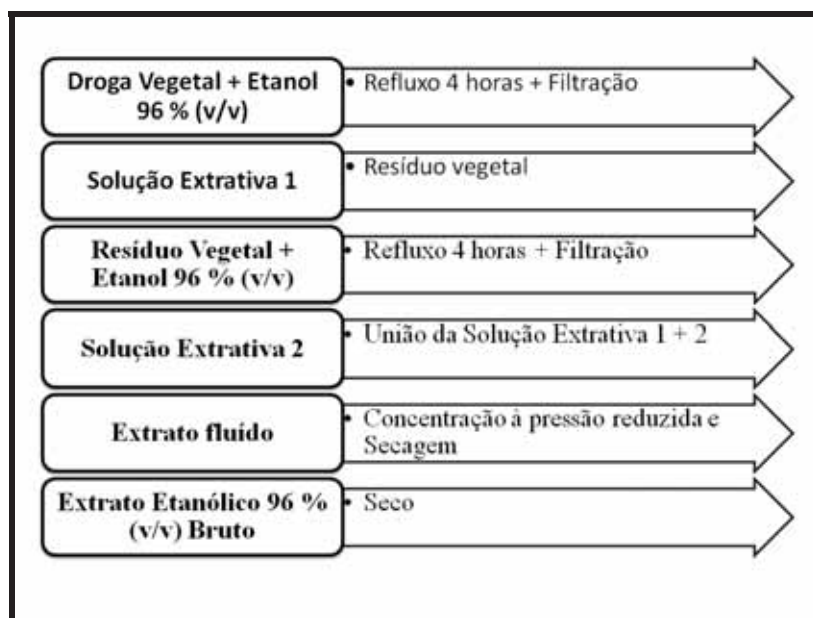


FIGURA 4.1 – Fluxograma de obtenção de extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos maduros de *Solanum lycocarpum* St. Hill, através de técnica de refluxo.

4.5 Caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico 96 % bruto

O objetivo da caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico 96 % bruto foi de evidenciar a presença dos glicoalcalóides, solamargina e solasonina, em sua

composição. Para isso foi utilizado a técnica de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), descrita por (ALMEIDA et al., 1995; MAURYA et al. 2009).

O perfil cromatográfico foi realizado utilizando-se como fase estacionária cromatoplasas em alumínio de Sílica Gel 60 F₂₅₄ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.), de 0,25 µm de espessura, 20 x 20 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos. Como fase móvel foi utilizada uma solução de n-butanol : ácido acético glacial : água (6 : 3: 1) (ALMEIDA et al., 1995).

O teste foi realizado em triplicata. Foram aplicados 15 µL uma solução padronizada de EB a 1 mg/mL e como padrões dos glicoalcalóides foram aplicados 15 µL de uma solução padrão de solamargina 1 mg/mL, 15 µL de uma solução padrão de solasonina 1 mg/mL e 10 µL de uma solução de solamargina e solasonina (1:1) 1 mg/mL, utilizando como solvente etanol 96 % (v/v).

Após o desenvolvimento ascendente do cromatograma foi utilizado como revelador químico uma solução de ácido sulfúrico 10 % (v/v) e aquecimento a 150 °C por 5 minutos e determinados os fatores de retenção (Rf) de cada substância encontrada no EB, dos padrões solamargina e solasonina e da mistura dos padrões.

Os padrões solasonina e solamargina foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara – SP.

4.6 Purificação por partição líquido-líquido

Depois de evidenciada a presença de solasonina (Rf = 0,46) e solamargina (Rf = 0,57) no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, o mesmo foi submetido a um processo de

separação e purificação através de técnicas de Partição Líquido-Líquido e Cromatografia em Coluna.

A partição líquido-líquido foi realizada solubilizando 5 g de EB em 100 mL de Etanol 40 % (v/v) a qual foi transferida para um funil de separação e adicionado 50 mL de uma solução de Hexano:Acetato de Etila (9:1), agitou-se energicamente por 1 minuto e em seguida deixou-se em repouso por 5 minutos. Após realizou a partição e separou as frações hexano:acetato de etila e etanólica 40 % (v/v).

A fração etanólica 40 % (v/v) foi novamente particionada mais duas vezes, cada uma com 50 mL de uma solução de hexano:acetato de etila (9:1), totalizando 3 partições.

As frações foram agrupadas em Fração Etanólica 40 % (v/v) (FE) e Fração Hexano:Acetato de Etila (FH). A FE e a FH foram secas a temperatura ambiente e caracterizadas através de análise cromatográfica em camada delgada comparativa (CCDC), descrita por (ALMEIDA et al., 1995; MAURYA et al. 2009).

A CCDC foi realizada utilizando como fase estacionária cromatoplas em alumínio de Sílica Gel 60 F₂₅₄, de 0,25 µm de espessura, 20 x 20 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos.

Como fase móvel foi utilizada uma solução de n-butanol:ácido acético glacial: água (6 : 3: 1).

O teste foi realizado em triplicata e em cada cromatoplasca ativada foi aplicado 15 µL de uma solução padronizada de FE 1 mg/mL, 15 µL de uma solução padronizada de FH 1 mg/mL, 15 µL uma solução padronizada de EB a 1 mg/mL e como padrões dos glicoalcalóides foi aplicado 15 µL de uma solução padrão de solamargina 1 mg/mL, 15 µL de uma solução padrão de solasonina 1 mg/mL e 10 µL de uma solução de solamargina e solasonina (1:1) 1 mg/mL, utilizou-se como solvente etanol 96 % (v/v).

Após o desenvolvimento ascendente do cromatograma foi utilizado como agente revelador uma solução de ácido sulfúrico 10 % (v/v) e aquecimento a 150 °C por 5 minutos.

Foram determinados os fatores de retenção de cada substância encontrada no FE, FH e comparados com os fatores de retenção do EB, dos padrões solamargina e solasonina e da mistura dos padrões.

4.7 Fracionamento por cromatografia em coluna por adsorção

A partir do resultado evidenciado pela CCDC da técnica de partição líquido-líquido, foi possível encontrar os glicoalcalóides de interesse na fração etanólica 40 % (v/v) (FE) e ausentes na fração hexânica (FH).

Com intuito de isolar os glicoalcalóides do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, foi realizada a purificação da FE através da técnica de cromatografia em coluna por adsorção.

Para a realização da cromatografia em coluna, utilizou-se uma coluna de vidro, medindo 5,0 cm de diâmetro por 40,0 cm de altura, com uma torneira de teflon na base.

A coluna cromatográfica foi empacotada a seco utilizando como fase estacionária alumina neutra, atividade I (Marca VETEC), com 20 cm de altura. Após 12 horas do preparo do empacotamento da coluna, foi aplicado 1 g da Fração etanólica 40 % (v/v) dissolvida em 10 mL de etanol 40 % (v/v).

Foi realizada a eluição com etanol 40 % (v/v) e recolheu-se 240 frações com 15 mL de eluente/tubo, os quais foram analisados através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (ALMEIDA et al., 1995; MAURYA et al. 2009).

Agrupou-se as 240 frações, recolhidas na cromatografia em coluna, em 6 diferentes frações denominadas por F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅, em virtude da semelhança dos perfis cromatográficos e compostos revelados.

As frações F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅ foram secas em estufa a 40 °C e analisadas através da CCDC (ALMEIDA et al., 1995; MAURYA et al. 2009).

A CCDC foi realizada utilizando como fase estacionária cromatoplasas em alumínio de Sílica Gel 60 F₂₅₄, de 0,25 µm de espessura, 20 x 20 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos.

Como fase móvel foi utilizada uma solução de n-butanol:ácido acético glacial: água (6 : 3: 1).

O teste foi realizado em triplicata e em cada cromatoplasca ativada foram aplicadas as amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, solamargina, solasonina e uma mistura de solamargina e solasonina (1:1) (15 µL de uma solução padronizada 1 mg/mL), foi utilizado etanol 96 % (v/v) como solvente.

Após o desenvolvimento ascendente do cromatograma foi utilizado como agente revelador uma solução de ácido sulfúrico 10 % (v/v) e aquecimento a 150 °C por 5 minutos.

Foram determinados os fatores de retenção de cada substância encontrada nas amostras das frações e comparados com os fatores de retenção do EB, FE, FH, dos padrões solamargina e solasonina e da mistura dos padrões.

4.8 Isolamento da solamargina e solasonina

Para o isolamento da solamargina e solasonina foi utilizada a fração F₂ e realizada através da técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

Para a cromatografia em camada delgada preparativa utilizou-se como fase estacionária cromatoplas de vidro, com Sílica Gel 60, de 0,75 μm de espessura, 20 x 20 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos.

Foram aplicadas, na linha de base da cromatoplas, 500 μL de uma solução padronizada da fração F₂ 1 g/mL em etanol 96 % (v/v).

Em paralelo foi utilizada uma cromatoplas em alumínio de Sílica Gel 60 F₂₅₄, de 0,25 μm de espessura, 5 x 20 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos, onde foi aplicado 10 μL de uma solução padronizada da fração F₂ 1 g/mL em etanol 96 % (v/v) como padrão para a separação das sub-frações da cromatoplas preparativa.

A fase móvel utilizada foi uma solução de n-butanol:ácido acético glacial:água (6:3:1).

Após o desenvolvimento da cromatografia por 12 cm, as placas foram secas em estufa a 105 °C por 5 minutos.

A cromatoplas padrão foi revelada utilizado como agente revelador solução de ácido sulfúrico 10 % (v/v) e aquecimento a 150 °C por 5 minutos. Após determinação dos valores de R_fs das amostras, a cromatoplas preparativa foi fracionada em 9 sub-frações conforme mostra TABELA 4.1.

Para a extração das substâncias contidas em cada sub-fração, foi adicionado 5 mL de etanol 96 % (v/v) em cada sub-fração e agitado energicamente. Deixou-se em repouso por 5 minutos e centrifugou-se o material a 2000 RPM por 10 minutos.

Após a centrifugação foi recolhido o sobrenadante de cada sub-fração em separado e com o corpo de fundo repetiu-se o processo de extrativo por mais 2 vezes.

Após o processo de extração de materiais da fase estacionária, as sub-frações foram secas a temperatura ambiente, e sua constituição analisada por meio de

cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (ALMEIDA et al., 1995; MAURYA et al. 2009).

TABELA 4.1 – Valores de Rf mínimos e máximos utilizados para a obtenção das sub-frações.

Sub-fração	Rf (mín – max)
2.1	0,000 – 0,041
2.2	0,041 – 0,166
2.3	0,166 – 0,333
2.4	0,333 – 0,525
2.5	0,525 – 0,641
2.6	0,641 – 0,716
2.7	0,716 – 0,816
2.8	0,816 – 0,875
2.9	0,875 – 1,000

O teste foi realizado em triplicata e em cada cromatoplaça ativada foram aplicadas as amostras das 9 sub-frações, EB, FE, F₂, solamargina, solasonina e uma mistura de solamargina e solasonina (1:1) (15 µL de uma solução padronizada 1 mg/mL), utilizou-se como solvente etanol 96 % (v/v).

Foram determinados os fatores de retenção de cada substância encontrada nas amostras das 9 sub-frações e comparados com os fatores de retenção do EB, FE, F₂, dos padrões solamargina e solasonina e da mistura dos padrões.

4.9 Identificação e quantificação dos glicoalcalóides

Espectros de RMN ^1H (Varian, 500 MHz, 1 mg/mL em piridina- d_5) foram obtidos com finalidade de confirmação estrutural e de pureza da solasonina (Sn) e solamargina (Sg), isolados, respectivamente, das sub-frações 2.5 e 2.7 do extrato etanólico 96 % bruto dos frutos de *S. lycocarpum*. Esse teste foi realizado junto ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IQ/UNESP.

A quantificação dos glicoalcalóides extraídos e purificados do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, da fração etanólica 40 % (v/v), da fração F₂, da solamargina isolada e da solasonina isoladas foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

A metodologia quantitativa foi desenvolvida, validada e realizada pela M.Sc. Renata Fabiane Jorge Tiossi e pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FCFRP/USP.

As amostras (EB, FE, F₂, Sn e Sg) foram solubilizadas em etanol 80 % contendo 3,2 $\mu\text{mol/mL}$ do padrão interno (veratraldeído) e filtradas em filtro 0,45 μm . Foram preparadas curvas padrões de solasonina e solamargina, utilizando padrões destes glicoalcalóides.

A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE com detector ultravioleta (Shimadzu, LC-10AD). Foi utilizada como fase estacionária uma coluna analítica Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies, USA) (4,6 x 250 mm, 5 μm) e a fase móvel foi constituída de uma solução de acetonitrila : tampão fosfato

0,01M, pH 7,2 (36,5:63,5), sob vazão 1 mL/min. Foi injetado 20 µL de cada amostra, com tempo de eluição de 24 minutos e detecção em 200 nm.

As porcentagens de solasonina e solamargina nas amostras analisadas foram determinadas utilizando-se curvas padrões para estas substâncias.

4.10 Testes de susceptibilidade da Atividade Antimicrobiana

4.10.1 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Para análise da atividade antibacteriana e antifúngica das amostras do EB, das Frações (F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅) e dos compostos isolados (Sg e Sn) foi utilizado o método de difusão em ágar com *templates* conduzidos segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

Para isso foram utilizados micro-organismos fornecidos pelo *American Type Culture Collection*: *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica* (ATCC 11076), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 21175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 14053), *Aspergillus niger* (ATCC16404), *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) e *Fusarium sp* (ATCC 20788). Estas amostras estão mantidas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, em freezer à -20 °C.

As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido DMSO (com concentração final de 1 mg/mL). Foram utilizados como controles positivos para bactérias a ampicilina (50 µg/mL) e para os fungos a anfotericina B (64 µg/mL) diluídos em DMSO e como controle negativo, foi preparada uma suspensão de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e DMSO (1%) para as bactérias e caldo Sabouraud e DMSO (1%) para os fungos.

No momento da realização do teste, foram preparadas suspensões padrões, em triplicata, para cada espécime analisada e ajustada na escala 0,5 McFarland. As bactérias foram preparadas em meio BHI ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e os fungos foram inoculados em caldo Sabouraud ($1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL).

Foram preparadas placas de Petri com 20 mL de Ágar Muller-Hinton (AMH), para cepas de bactérias e AMH suplementado com glicose 2% e 0,5 µg/mL de azul de metileno (AMHsupl), para os espécimes de fungos e esterilizadas por calor úmido em autoclave (121 °C, 1,5 atm, por 30 minutos).

Foram semeadas 150 µL da suspensão bacteriana nas placas de AMH e 100 µL da suspensão de leveduras nas placas de AMHsupl. Após 5 minutos foram adicionados 50 µL da solução amostra, do controle positivo e do negativo em cada poço, utilizando “templates” (6 poços de 6 mm de diâmetro interno).

Antes da incubação das placas a 37 °C por 24 horas para as bactérias e a 35 °C por 48 horas para os fungos, as placas foram deixadas 2 horas a temperatura de 4 °C para permitir a difusão das amostras (QUEIROZ, 2011).

A capacidade de inibição do crescimento dos espécimes de bactérias e fungos foi considerada através da determinação do diâmetro dos halos de inibição ao redor dos poços, com auxílio de um paquímetro e expresso como a média de três determinações

experimentais independentes. Cada determinação experimental foi realizada em triplicata.

4.10.2 Avaliação da atividade antiparasitária

4.10.2.1 *Giardia lamblia*

O ensaio de atividade antiparasitária para *Giardia lamblia* foi realizado por ensaios de inibição do crescimento de trofozoítos de *Giardia lamblia* segundo metodologia descrita por SOUZA et al (2011).

As culturas de *G. lamblia* (WBC6) foram utilizadas como modelo celular para os estudos de inibição do crescimento. Os trofozoítos foram mantidos em cultura axênica a 37 °C em 10 mL de meio de Diamond TYI-S-33, modificado por KEISTER (1983). Durante a cultura de rotina, foram adicionados penicilina G (250 µg/mL) e sulfato de estreptomicina (250 µg/mL).

Na fase exponencial de crescimento (2 -3 dias) os trofozoítos de *G. lamblia* foram destacados dos frascos de cultura por refrigeração (4°C / 15min) e centrifugados (1500 g/5 min). Os trofozoítos foram lavados três vezes e contados em câmara de Neubauer ($5,0 \times 10^4$ células). Estas células foram utilizadas no estudo de inibição do crescimento.

As amostras (EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e Sn+Sg) foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração 100 mg/mL e diluídas 1:40 em meio de Diamond TYI-S-33, a fim de obter uma série de diluição da amostra de 10, 50, 60, 80, 100 e 200 µg/mL para o ensaio.

As amostras foram adicionadas na cultura de trofozoíto de *G. lamblia* (5×10^4 trofozoítos/mL) e incubados a 37 °C por 48 horas em tubos de 1,5 mL. Controles de

crescimento foram utilizados substituindo as amostras por dimetilsulfóxido (veículo de dissolução) nas concentrações utilizadas nos ensaios. Após a incubação os tubos foram resfriados a 4°C por 15 min e contados o número total de trofozoítos em câmara de Neubauer, ao microscópio Nikon Eclipse E100.

Os resultados foram expressos em percentagem do número total de células desenvolvidas após 48h de incubação, relativamente aos ensaios realizados na ausência das amostras (controle). Todas as experiências foram realizadas em duplicado e em pelo menos três ensaios independentes. A média e o erro padrão da média das experiências foram calculados.

As concentrações que inibiram o crescimento em 50% (IC₅₀) foram determinadas por interpolação das curvas de regressão dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 6.

4.10.2.2 *Leishmania infantum*

A atividade antiparasitária para *Leishmania infantum* foi realizada por ensaios de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania infantum* segundo metodologia descrita por DENIZOT & LANG (1986).

As culturas de *L. infantum* (Gly C) foram utilizadas como modelo celular para os estudos de inibição do crescimento. As formas promastigotas foram mantidas em cultura axênica a 26 °C em 5 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) adicionado de 10 % de soro bovino fetal.

As amostras (EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e Sn+Sg) foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração 100 mg/mL e diluídas 1:40 em meio RPMI 1640 adicionado de 10 % de soro bovino fetal, a fim de obter uma série de diluição da amostra igual a 10, 50, 60 80, 100 e 200 µg/mL.

As promastigotas de *L. infantum* (5×10^5 células/ml) em fase logarítmica foram incubadas em placas de cultura de 96 poços a 26°C durante 24 horas, em meio RPMI 1640 adicionado de 10 % de soro bovino fetal, na presença de concentrações crescentes dos compostos (10 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os ensaios controles foram efetuados ao mesmo tempo e nas mesmas condições, na presença e ausência do solvente usado na dissolução dos derivados (DMSO).

Após este período foram adicionados 25 μL de solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – MTT (5 mg/mL) por orifício e as placas de cultura foram incubadas a 26°C durante 2 horas. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e as promastigotas de *L. infantum* foram lavadas com tampão PBS.

O sobrenadante de cada orifício foi aspirado e os cristais de formazana foram dissolvidos em 250 μL de DMSO e a absorbância foi lida a 530 nm em leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK).

Todas as experiências foram realizadas em triplicado e, pelo menos, em três ensaios independentes.

Os resultados foram expressos a concentração efetiva a inibir a viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum* a 50% (IC_{50}), foi determinada através de regressões dose-resposta, extrapoladas pelo GraphPad Prism 6.

4.10.2.3 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

O ensaio de atividade antiparasitária para *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* foi realizado pela determinação da viabilidade de proliferação de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* - cepas Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* - cepas 427 (CROOS & MANNING, 1973)

por ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), segundo metodologia descrita por MOSMANN (1983) e modificado por COTINGUIBA (2009). A metodologia é baseada na redução do MTT a formazana por meio de enzimas presentes nas mitocôndrias, desse modo é possível avaliar a atividade metabólica e a viabilidade das células avaliadas (SIEUWERTS et al., 1995).

Os parasitas foram cultivados em meio de cultura LIT (*liver-infusion tryptose*) para *T. cruzi* (FERNANDES & CASTELLANI, 1966) e SDM-79 para *T. brucei* (BRUN & SCHONENBERGER, 1979), ambos suplementados com 10 % de soro fetal bovino a 28 °C em condições assépticas e coletados durante a fase logarítmica de crescimento para a análise.

Após observação de ausência de contaminação na cultura de *T. cruzi* e *T. brucei*, foram avaliadas as seguintes amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e mistura de Sn+Sg (1:1) e como controles positivos foram utilizados o benzonidazol e a pentamidina para *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente.

Foram preparadas soluções estoques do extrato, das frações (20 mg/mL) e dos compostos isolados (5 mg/mL) diluídas em DMSO e, para a dissolução completa utilizou o auxílio de um vortex.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, em triplicatas, através de uma serie de concentrações, sendo para o extrato e as frações 500; 400; 300; 200; 100; 50 e 25 µg/mL e para as substâncias isoladas 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 e 1 µg/mL.

Em cada poço foi adicionado 97 µL da solução padronizada de parasitas *T. cruzi* (1x10⁷ parasitas/mL) e *T. brucei* (1x10⁶ parasitas/mL) e 3 µL de cada concentração das amostras analisadas.

A seguir, as placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas (*T. cruzi*) e 24 horas (*T. brucei*). Após este período foi adicionado 10 µL de solução MTT + PMS (3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio + metassulfato de fenazina) por orifício (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS), repetindo-se a incubação por 75 min ao abrigo da luz. Foram adicionados 100 µL de solução SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% HCL 0,01M, com intuito de dissolver os cristais de formazana, incubando-se a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 min.

A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de Elisa (Bio Rad) a 595 nm e a índice de citotóxicidade 50% (IC₅₀) das amostras e dos controles positivos foram determinados através de análise de regressão linear, após um período de 72 h de incubação para *T. cruzi* e 24 h para *T. brucei*, conforme descrito por COTINGUIBA et. al. (2009).

4.11 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação do potencial de atividade antioxidante das amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e Sn+Sg (1:1) baseando-se na capacidade dos antioxidantes captarem o radical livre do 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), conforme a metodologia descrita por BLOIS (1958), adaptada por ANDRADE et al., 2007.

Foram preparadas soluções das amostras (250 µg/mL) em metanol, como controle positivo foi utilizado quercetina padrão (Sigma[®]) em metanol (250 µg/mL), em virtude de sua reconhecida atividade antioxidante, e a calibração do aparelho foi realizada com metanol.

Os testes foram conduzidos adicionando 1 mL da solução amostra a 2,5 mL de DPPH 0,004% em metanol. As soluções foram homogeneizadas e encubadas por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação foi determinada a

absorbância em 517 nm, através do espectrofotômetro UV-Visível (FEMTO, 700 PLUS), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A atividade antirradicalar foi calculada como a porcentagem de inibição (%IC) do radical DPPH, seguindo a equação Eq 4.1.

$$\%IC = [(Abs\ do\ controle - Abs\ da\ amostra) / Abs\ controle] * 100 \quad (Eq\ 4.1)$$

4.12 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para os testes de citotoxicidade foram utilizados macrófagos (J774), os quais foram mantidos em garrafas de cultura em meio RPMI-1640 (pH 7,0), preparado com 10% de soro bovino fetal, 0,2% de bicarbonato de sódio e 10 mM de HEPES, ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de solução de anfotericina B. As células foram incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada das amostras EB, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sg, Sn e Sn+Sg (1:1). As amostras foram preparadas pesando 2 mg da substância e dissolvida em 20 µL de DMSO, em seguida, foram diluídos 1:5 com meio de cultura e 20 µL foram aplicados em 180 µL de meio e diluídos de forma seriada na proporção 1:1. A faixa de concentração do teste variou de 2000 µg/mL a 1,95 µg/mL e os testes foram realizados em triplicata.

A técnica consistiu em coletar as células com auxílio de “scraper” e centrifugá-las a 1500 RPM por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de 10⁵ células/mL em meio de cultura.

As células foram incubadas em microplacas de 96 poços, a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, observou-se a formação de tapete celular e sendo retirado o meio existente inadequado para a manutenção.

Em outra microplaca de 96 poços foram colocados 100 µL de meio em todos os poços, exceto nos poços da coluna 1, onde foram acrescentados 180 µL de meio de cultura e 20 µL das amostras previamente diluídas 1:5 dos extratos, sendo então realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) a partir destes poços com 200 µL para os demais poços da respectiva microplaca. As amostras assim diluídas foram transferidas para a microplaca contendo o tapete celular (OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008).

Posteriormente ao período de incubação de 24 h a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados 15 µL de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/mL, incubando a microplaca por 3 h na mesma estufa. Quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento.

A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) e por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus – Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade da droga vegetal

Os frutos maduros, secos e pulverizados de *Solanum lycocarpum* St. Hill foram submetidos aos testes gerais de controle de qualidade para matérias-primas vegetais, descritos na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

Os valores dos parâmetros perda por dessecação (PD), teor de cinzas totais (C_T) e cinzas insolúveis em ácido (C_{IA}), teor de extrativos (T_E) e pH obtidos são apresentados na TABELA 5.1. Os resultados da análise granulométrica do pó de frutos secos de *S. lycocarpum* estão apresentados na TABELA 5.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Em decorrência da inexistência de uma monografia oficial para *S. lycocarpum*, nas diversas farmacopeias oficiais, inclusive na do Brasil, face a isso foi realizado um estudo dos valores de referencia, para outras drogas vegetais, de cada parâmetro de controle de qualidade analisado e foi determinado um valor médio de referencia e comparado com os obtidos para o pó dos frutos secos de *S. lycocarpum*. Para isso foram utilizadas as seguintes farmacopeias: FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), “UNITED STATES PHARMACOPEIA” (2009), “BRITISH PHARMACOPEIA” (2009) e “JAPANESE PHARMACOPEIA” (2006).

TABELA 5.1 – Parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal obtida a partir de frutos de *S. lycocarpum*.

Análises	PD (%)	C _T (%)	C _{IA} (%)	T _E (%)	pH
1	4,17	4,2084	2,4656	10,9523	4,51
2	4,20	3,8339	2,3448	10,1454	4,53
3	4,15	4,0875	2,7270	9,9240	4,52
Média ± DP	4,17 ± 0,03	4,04 ± 0,19	2,51 ± 0,20	10,34 ± 0,54	4,52 ± 0,01

PD - perda por dessecação, C_T - teor de cinzas totais, C_{IA} - cinzas insolúveis em ácido, T_E - teor de extrativos e determinação do pH.

Os valores de referência médios observados foram inferiores a 10 % para a perda por dessecação, menores que 5 % para teor de cinzas totais e inferiores a 5% para as cinzas insolúveis em ácido. Para teor de extrativos e determinação de pH não foi possível obter parâmetros médios, pois são característicos de cada espécie de vegetal.

Para a droga vegetal de *S. lycocarpum* utilizada, foram obtidos os seguintes valores dos parâmetros de controle de qualidade: teor de materiais extraíveis igual a 10,34 ± 0,54 %, teor de umidade igual a 4,17 ± 0,03, cinzas totais igual a 4,04 ± 0,19, cinzas insolúveis em ácido igual a 2,51 ± 0,20 e através da técnica de infusão, para o preparo da solução aquosa extrativa, obteve um solução ácida, com pH igual a 4,52 ± 0,001.

Estudos posteriores dos parâmetros de controle de qualidade para droga vegetal são necessários para o desenvolvimento de uma monografia oficial de *Solanum lycocarpum*. Estes estudos devem ser realizados com diferentes exemplares de *S. lycocarpum*, de diferentes regiões do Brasil, possibilitando assim a análise dos

diferentes fenótipos e genótipos do vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SIMÕES et al., 1999).

Portanto, a droga vegetal obtida a partir de pó seco de frutos de *Solanum lycocarpum* apresentou, para os testes gerais de controle de qualidade, valores inferiores à média para outras drogas vegetais descritas nas monografias oficiais, demonstrando estarem adequados para a utilização na produção de extratos.

A partir dos resultados da análise granulométrica foi possível classificar o pó obtido como grosso, segundo a classificação da FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

TABELA 5.2 – Análise granulométrica do pó seco de frutos maduros de *S. lycocarpum*.

Tamis	Abertura (μm)	Porcentagem (%)
20	0,850	34,53
30	0,600	29,48
40	0,425	13,30
50	0,300	5,80
60	0,250	2,21
Coletor	-	14,68
Total		100,00

Para os ensaios de contagem microbiana, não foi evidenciado o crescimento de nenhuma unidade formadora de colônia contaminante para *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, segundo metodologia descrita em UNITED STATES PHARMACOPEIA (2009), demonstrando que o material está viável para o preparo do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto.

5.2 Obtenção e caracterização do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto obtido (FIGURA 5.1) apresentou como características organolépticas coloração marrom escura, cheiro adocicado e forte, aspecto oleoso. O extrato mostrou-se solúvel em água e etanol e parcialmente solúvel em hexano e acetato de etila. O rendimento do processo extrativo foi de 15,73 % (p/p) em massa seca.



FIGURA 5.1 – Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB) de pó dos frutos secos de *Solanum lycocarpum*.

Diversas metodologias extrativas são descritas para a obtenção dos glicoalcalóides, solamargina e solasonina em plantas do gênero *Solanum*, principalmente técnicas ácido:base (SCHWARZ et al., 2007; MIRANDA & BASTOS, 2010; PINTO et al., 2011). Contudo neste trabalho avaliou-se uma metodologia diferente das tradicionais para a extração dos glicoalcalóides, que foi realizada utilizando solução hidroalcoólica 96 % (v/v) sob refluxo, quando comparado o rendimento entre as metodologias, este processo demonstrou um teor de extrativos 3,54 % menor que o descrito por MIRANDA & BASTOS (2010), no entanto o as técnicas

ácido:base descritas apresentam um tempo de extração 3 vezes maior que a técnica extrativa utilizada neste.

Após isso, foi realizada a caracterização cromatográfica do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) descrita por ALMEIDA (1995), onde utilizando em volume, padronizado de 15 µL de uma solução estoque de concentração (1mg/mL) e foi observado 5 bandas em diferentes regiões da cromatoplaça, denominadas de EB₁, EB₂, EB₃, EB₄ e EB₅, apresentando como fator de retenção (Rf), respectivamente, valores iguais a 0,38; 0,46; 0,57; 0,67 e 0,78 (TABELA 5.3).

Essas substâncias foram comparadas com os padrões solamargina, solasonina e uma mistura (1:1) de solamargina e solasonina. Os padrões de solasonina e solamargina apresentaram fator de retenção igual a 0,46 e 0,57, respectivamente (TABELA 5.3).

A mistura de solamargina e solasonina apresentou duas bandas de corrida, que mostraram os mesmos valores de fator de retenção da solasonina e solamargina purificadas (TABELA 5.3), confirmando que as substâncias quando isoladas ou em associações apresentam o mesmo perfil de corrida.

A partir desses dados, foi possível evidenciar que as substâncias EB₂ e EB₃ do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto apresentam os mesmos valores de fator de retenção que as substâncias solasonina e solamargina, respectivamente, podendo concluir que na substância **EB₂** do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto contêm a **solasonina** e na **EB₃** contêm a **solamargina**, dados confirmados após a análise dos espectros de RMN de ¹H para as substâncias isoladas.

TABELA 5.3 – Valores de Fator de Retenção (Rf) das substâncias identificadas no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, os padrões Solasonina, Solamargina e a mistura Sn + Sg.

Substância	Fator de Retenção (Rf)
EB 1	0,38
EB 2	0,46
EB 3	0,57
EB 4	0,67
EB 5	0,78
Sn	0,46
Sg	0,57
Sn (Sn + Sg)	0,47
Sg (Sn + Sg)	0,58

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina;

As substâncias EB₁, EB₄ e EB₅ não foram identificadas em decorrência do objetivo deste projeto que é isolar as substâncias solasonina e solamargina e avaliar suas atividades biológicas. Contudo essas foram analisadas no decorrer do projeto com objetivo de analisar as possíveis atividades biológicas, tornando-as amostras promissoras para projetos futuros.

5.3 Purificação por partição líquido-líquido

Após a caracterização cromatográfica do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, onde foram identificadas à presença dos glicoalcalóides, solasonina e solamargina, iniciou-se a fase de purificação e isolamento utilizando técnicas de partição líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa.

A partição líquido-líquido foi realizada no intuito de separar as substâncias que apresentavam polaridades inferiores à dos glicoalcalóides a serem isolados.

Na caracterização do perfil cromatográfico do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto foi possível evidenciar que as substâncias EB₄ e EB₅ apresentam polaridade inferior e a EB₁ polaridade superior quando relacionadas com a solamargina (EB₃) e solasonina (EB₂). A partir dessa observação iniciou-se o processo de purificação destas substâncias através da purificação prévia por partição líquido-líquido.

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto foi solubilizado em etanol 40 % (v/v) e realizou a partição com três porções de solução de hexano:acetato de etila (9:1). Após a separação de fases, obteve-se duas frações diferentes: fração etanólica 40 % (v/v) (FE) e a fração hexano:acetato de etila (FH) (FIGURA 5.2). As mesmas foram secas à temperatura ambiente.

As Frações FE e FH foram caracterizadas através por CCDC, onde na fração FE observou-se três bandas, com fatores de retenção iguais a 0,38, 0,46 e 0,57, que foram comparados com o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, correspondendo às substâncias EB₁, EB₂ e EB₃. Na fração FH apresentou-se duas bandas com fatores de retenção iguais a 0,68 e 0,77, correspondendo às substâncias EB₄ e EB₅.



FIGURA 5.2 – Purificação do Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto por Partição líquido-líquido (FE = Fração etanólica 40 % (v/v); FH = Fração hexânica).

Pela técnica de partição líquido-líquido, foi possível purificar o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto das substâncias de baixa polaridade EB₄ e EB₅, as quais migraram para a fração (FH) da solução de Hexano:Acetato de Etila (9:1) e as substâncias solamargina (EB₃) e solasonina (EB₂), as quais apresentam maior polaridade, permaneceram na fração etanólica 40 % (v/v) (FE).

5.4 Fracionamento por cromatografia em coluna por adsorção

Após a purificação do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto por partição líquido-líquido, a fração etanólica 40 % (v/v) (FE) obtida foi utilizada para a separação da solasonina e solamargina de outros compostos da mistura, pela técnica de cromatografia em coluna (CC).

Na coluna cromatográfica preparada utilizando como fase estacionária alumina neutra atividade I e como eluente etanol 40 % (v/v), recolheu-se 240 frações de 15 mL

por tubo, que após serem secas, foram analisadas através da técnica de cromatografia em camada delgada comparativa foram agrupadas em seis (06) frações identificadas como F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅, conforme TABELA 5.4.

Na fração F₂ e F₃ foram observados compostos com os mesmos valores de retenção que a solasonina e a solamargina, 0,46 e 0,57 respectivamente. Contudo, a fração F₃ continha outros compostos, além da Sn e Sg, que apresentou um fator de retenção igual a 0,62.

A fração F₂ apresentou na CCDC, somente as duas substâncias a solamargina e a solasonina.

Utilizando a técnica de cromatografia em coluna, foi possível purificar a solamargina e solasonina, na Fração F₂. Contudo não foi possível o isolamento dos glicoalcalóides utilizando exclusivamente a técnica cromatográfica.

Segundo MAURYA (2009), os glicoalcalóides solamargina e solasonina são de fácil extração, porém devido a sua pequena variação de estrutura e polaridade tornam os métodos clássicos de isolamento tediosos e requerem múltiplas etapas cromatográficas para o isolamento dos mesmos.

Dificuldades essas, que também foram evidenciadas neste trabalho, que se deve muito em virtude da grande semelhança estrutural entre a solamargina e a solasonina. Essas duas diferem somente pela presença de uma hidroxila da glicose na solasonina e do grupo metila da raminose na solamargina, que propiciam uma diferença muito sutil de polaridade, o que dificulta a separação das mesmas por técnicas cromatográficas, pois utilizam a polaridade como item fundamental para o isolamento.

TABELA 5.4 – Correspondência das frações com as das frações eluídas na cromatografia em coluna.

Fração	Fração eluída (tubo número)
F ₀	1 a 30
F ₁	31 a 44
F₂	45 a 80
F₃	81 a 135
F ₄	136 a 173
F ₅	174 a 240

F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5;

Contudo utilizando técnicas de purificação e isolamento convencionais, foi possível obter a fração (F₂) que apresenta somente os glicoalcalóides solamargina e solasonina.

5.5 Isolamento da solamargina e solasonina

Após a purificação da solamargina e da solasonina do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto na forma da fração F₂. Utilizou-se a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), para o isolamento das substâncias Sn e Sg.

Foram aplicadas em duas cromatoplas, com espessuras de 0,25 e 0,75 µm, uma solução estoque da fração F₂ (1 g/mL), que após desenvolvida a cromatografia, revelou-se a cromatoplasca de espessura 0,25 µm e a partir dos fatores de retenção

observados, cortou-se a placa de maior espessura, separando o material em 9 sub-frações (2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9) (TABELA 4.1).

Foi possível observar a presença de solasonina (Rf 0,46) nas sub-frações 2.4, 2.5 e 2.6. Sendo que a fração 2.4 apresentou somente traços de solasonina, a banda correspondente apresentou coloração muito fraca. Na fração 2.5 observou-se uma única banda, com fator de retenção característico da solasonina. A fração 2.6 apresentou além da solasonina outra banda com fator de retenção igual 0,57, da solamargina, portanto uma mistura de glicoalcalóides.

Já a solamargina foi observada nas sub-frações 2.6, 2.7 e 2.8. Na sub-fração 2.7 apresentou uma única banda isolada e característica, com fator de retenção igual 0,57, da solamargina, e na sub-fração 2.8, apresentou traços do material. Portanto, obteve-se o isolamento da solasonina na sub-fração 2.5 e da solamargina na sub-fração 2.7.

5.6 Identificação e quantificação dos glicoalcalóides

As sub-frações 2.5 e 2.7, solasonina e solamargina, respectivamente, foram comparadas com padrões por cromatografia em camada delgada e caracterizadas por análises espectrofotométricas de RMN de ^1H (VARIAN, 500 MHz, piridina- d_5), para confirmação estrutural e de pureza.

Foram obtidos os espectros de RMN de ^1H para as sub-frações 2.5 e 2.7, anexo A e B, respectivamente.

Os valores obtidos para a sub-fração 2.5 de RMN de ^1H (piridina- d_5) foram δ 0,81, (3H, *d*), 0,86 (3H, *d*), 0,86 (3H, *d*), 1,05 (3H, *s*), 1,06 (3H, *d*), 1,62 (3H, *d*), 1,75 (3H, *d*), 4,66 (1H, *br d*), 4,80 (1H, *br d*), 4,93 (1H, *d*), 5,31 (1H, *br d*) e para a sub-fração 2.7 os valores de RMN de ^1H (piridina- d_5) obtido foram δ 0,80 (3H, *d*), 0,85 (3H, *s*),

1,04 (3H, *s*), 1,06 (3H, *d*), 1,69 (3H, *d*), 2,74 (1H, *m*), 3,93 (1H, *m*), 4,40 (1H, *m*), 4,90 (1H, *d*), 4,93 (1H, *d*), 5,21 (1H, *d*), 5,30 (1H, *d*).

Os espectro de RMN de ^1H das sub-frações 2.5 e 2.7 foram comparados com espectros de RMN de ^1H padrões de solasonina e solamargina (FUKUHARA & KUBO, 1991; RIPPERGER, 1995; TIOSSI & BASTOS, 2010; MIRANDA & BASTOS, 2010).

Os espectros de RMN de ^1H das sub-frações 2.5 e 2.7 são compatíveis com os padrões de solasonina e solamargina, respectivamente, confirmando assim as estruturas das sub-frações 2.5 e 2.7.

Após identificação das substâncias solasonina e solamargina, foram realizadas análises quantitativas, no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações etanólica e F₂, e solamargina e solasonina isoladas.

A partir do cromatograma do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (FIGURA 5.3) e utilizando os valores da curva analítica (não mostrada), foi determinado a concentração de $4,63 \pm 1,61$ % de solasonina e $4,37 \pm 1,51$ % de solamargina no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto. Este valor demonstra que, aproximadamente, 9 % do total de compostos extraídos em base seca correspondem aos glicoalcalóides, solamargina e solasonina.

O cromatograma da Fração Etanólica 40 % (v/v) (FIGURA 5.4) apresenta uma concentração maior de solasonina ($15,27 \pm 1,15$ %) e solamargina ($35,70 \pm 2,38$ %), relacionando com o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (TABELA 5.5), isso demonstra eficiência no processo de partição líquido-líquido realizado com intuito de purificar os glicoalcalóides.

Na fração F₂ (FIGURA 5.5) foram apresentados $18,02 \pm 0,38$ % de solasonina e $19,99 \pm 0,12$ % da solamargina (TABELA 5.5), contendo porcentagens de glicoalcalóides superiores ao extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, porém inferior à fração etanólica 40 % (v/v), demonstrando que a metodologia utilizada para a purificação

(cromatografia de coluna, utilizando alumina neutra tipo I, como fase estacionária, e etanol 40 % (v/v) como eluente) possibilitou uma separação dos glicoalcalóides na fração F₂, contudo ocorreu a formação de uma cauda durante a eluição, possibilitando a identificação dos glicoalcalóides em outras frações (F₃), diminuindo assim o rendimento do processo.

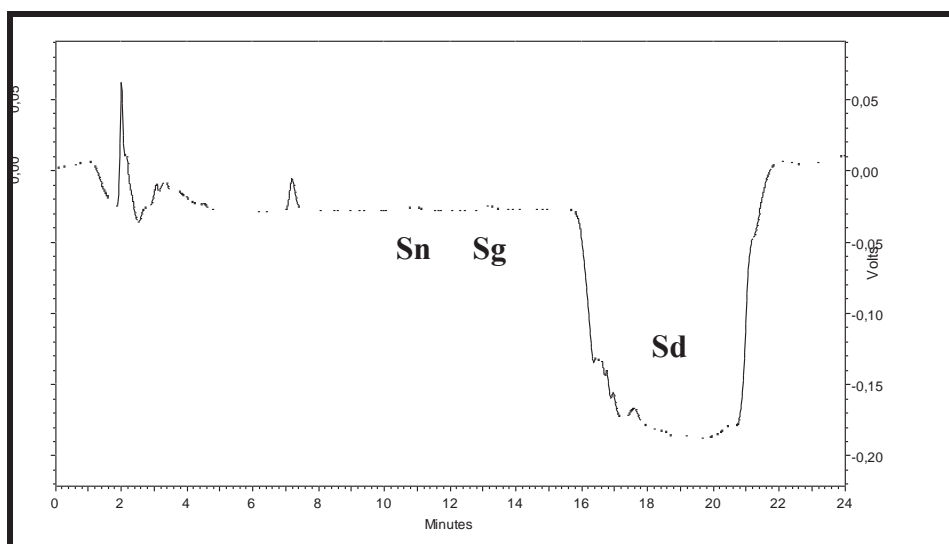


FIGURA 5.3 – Cromatograma do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto por CLAE, 200 nm nas condições estabelecidas para análise (Sn = T_r 10,5 min / Sg = T_r 13,0 min).

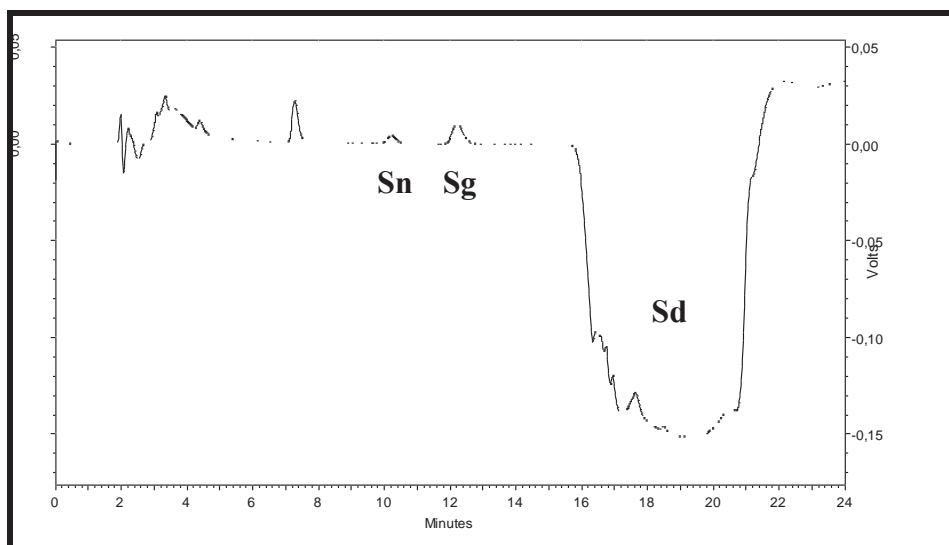


FIGURA 5.4 – Cromatograma da fração etanólica 40 % (v/v) por CLAE, 200 nm nas condições estabelecidas para análise (Sn = T_r 10,0 min / Sg = T_r 12,0 min).

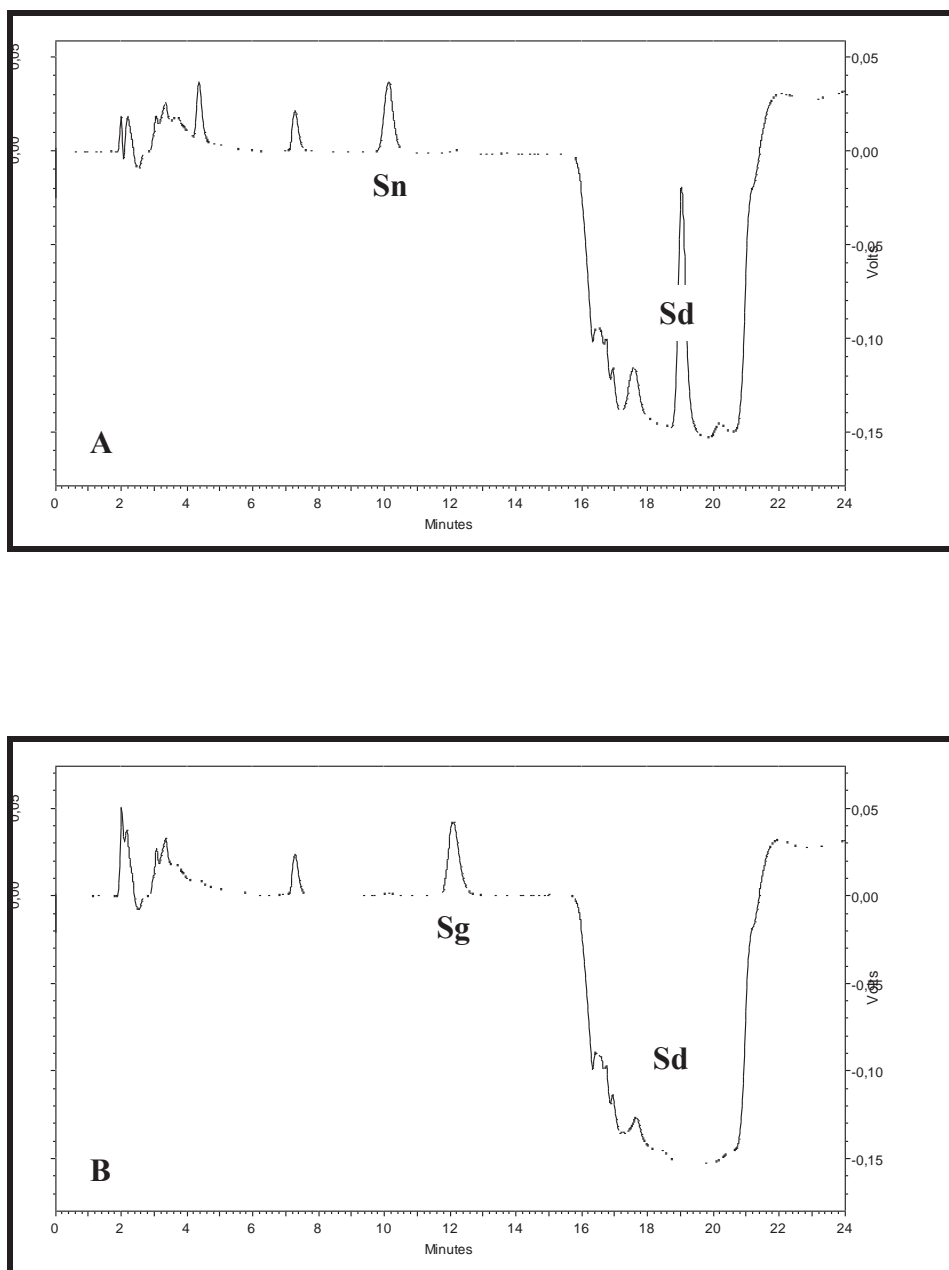


FIGURA 5.5 – Cromatograma da solasonina (A) e solamargina (B) por CLAE, 200 nm nas condições estabelecidas para análise ($S_n = T_R 10,0 \text{ min}$ / $S_g = T_R 12,0 \text{ min}$).

TABELA 5.5 – Concentração percentual de solasonina e solamargina no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), fração F₂, solasonina e solamargina extraídos de frutos maduros e secos de *Solanum lycocarpum*.

Amostras	Solasonina (Sn)	Solamargina (Sg)
EB	04,63 ± 1,61 %	04,37 ± 1,51 %
FE	15,27 ± 1,15 %	35,70 ± 2,38 %
F ₂	18,02 ± 0,38 %	19,99 ± 0,12 %
Sn	71,54 ± 2,18 %	02,76 ± 0,33 %
Sg	01,91 ± 0,15 %	63,14 ± 2,29 %

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₂ = fração 2, Sn = solasonina, Sg = solamargina;

Os glicoalcalóides isolados apresentaram concentração de 71,54 ± 2,18 % para a solasonina e 63,14 ± 2,29 % para a solamargina, contaminação menor que 2 % de solamargina e solasonina estão presentes nas amostras isoladas, contudo a diferença do percentual esta na presença da molécula solasodina, presente nas duas amostras, é em decorrência da liberação de solasodina durante o aquecimento na técnica extrativa, onde os O-glicosídeos (solamargina e solasonina) podem sofrer processo de hidrólise e liberar a genina (solasodina) da parte glicônica (carboidratos), conforme pode ser evidenciado nas FIGURAS 5.3, 5.4 e 5.5, este fenômeno também foi descrito em TIOSSI e BASTOS (2010).

5.7 Testes de susceptibilidade da atividade antimicrobiana

5.7.1 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Em virtude da diversidade de grupos de princípios ativos vegetais que apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas (GONÇALVES et al., 2005; LV et al., 2010; GUHULOTHU et al., 2011; VALYA et al., 2011), foram realizados os testes de avaliação antibacterianas e antifúngicas com 16 micro-organismos.

Foram analisadas todas as amostras dos compostos extraídos, purificados e isolados do fruto de *S. lycocarpum* (EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn e Sg) quanto à atividade antibacterianas e antifúngicas, onde foi possível evidenciar a ausência de eficácia sobre todos os micro-organismos analisados, demonstrando a ausência destas atividades.

Na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica foram utilizados como controles positivos os antibióticos ampicilina e anfotericina B, respectivamente para as bactérias e os fungos, os quais apresentaram halos de inibição dentre os valores de referência para cada espécie.

5.7.2 Avaliação da atividade antiparasitária

5.7.2.1 *Giardia lamblia*

Os resultados dos testes de atividade antiparasitária frente à *Giardia lamblia* com as amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e mistura de Sn+Sg (1:1)

estão apresentados na TABELA 5.6 na forma dos valores do índice de citotoxicidade 50 % (IC₅₀).

TABELA 5.6 – Atividade giardicida *in vitro* do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.

Amostras	<i>Giardia lamblia</i>
	IC ₅₀ (µg/mL)
EB	105,40
FH	> 200,00
FE	95,05
F ₀	> 200,00
F ₁	22,17
F ₂	13,68
F ₃	100,70
F ₄	> 200,00
F ₅	> 200,00
Sn	103,70
Sg	120,30
Sn + Sg (1:1)	13,23
metronidazol	0,5

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e metronidazol = controle positivo;

Na avaliação da atividade giardicida foi utilizado o fármaco metronidazol, como controle positivo (EDLIND et al., 1990), para as formas trofozoíticas de *G. lamblia* ($IC_{50} = 0,50 \mu\text{g/mL}$).

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB) apresentou potencial atividade giardicida ($IC_{50} = 105,40 \mu\text{g/mL}$), o mesmo sendo apresentado pela fração etanólica 40 % (FE) que apresentou $IC_{50} 95,05 \mu\text{g/mL}$ para trofozoítos de *G. lamblia*, demonstrando melhor eficácia que o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto.

A fração hexânica (FH) não apresentou atividade citotóxica potencial para trofozoítos de *G. lamblia*, pois foi obtido IC_{50} superior a $200,00 \mu\text{g/mL}$, que para os testes de atividade giardicida são valores considerados elevados, pois nessas concentrações podem ser tóxicos para o parasita (SOUSA et al., 2001; SOUSA et al., 2006).

As frações obtidas pelas técnicas cromatográficas para o isolamento dos glicoalcalóides apresentaram purificação dos compostos responsáveis pela atividade giardicida do EB, sendo os mesmos concentrados nas frações F₁ e F₂, com IC_{50} igual a 22,17 e 13,68 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, demonstrando uma maior concentração das substâncias giardicidas promissoras do EB.

Os resultados demonstram a potencial atividade giardicida dos glicoalcalóides, solamargina e solasonina, os quais estão presentes em abundância nas frações F₁ e F₂.

Isso pode ser evidenciado também na fração F₃, que tem uma quantidade reduzida dos glicoalcalóides, frente à fração F₂, e foi demonstrada uma atividade giardicida semelhante a do EB com IC_{50} igual a 100,70 $\mu\text{g/mL}$.

Nas frações F₀, F₄ e F₅, que não contêm os glicoalcalóides, o valor de IC₅₀ foi superior a 200,00 µg/mL, demonstrando que não apresentam atividade giardicida frente à trofozoítos de *G. lamblia*.

A solamargina (IC₅₀ = 120,30 µg/mL) e a solasonina (IC₅₀ = 103,70 µg/mL) isoladas apresentaram pequena atividade giardicida para os trofozoítos de *G. lamblia*.

Na mistura de solasonina e solamargina (1:1) (IC₅₀ = 13,23 µg/mL) foi possível observar maior eficácia giardicida quando comparado com os compostos isolados e testados separadamente, demonstrando assim a ocorrência de um sinergismo entre as moléculas solasonina e solasonina para a realização da atividade giardicida.

Com esses resultados foi possível evidenciar que a atividade giardicida do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos de *S. lycocarpum* sobre os trofozoítos de *G. lamblia* são atribuídas ao sinergismo apresentado entre os glicoalcalóides solasonina e solamargina misturados e presentes nas frações F_E, F₁ e F₂.

5.7.2.2 *Leishmania infantum*

Os resultados dos testes de atividade antiparasitária frente à *Leishmania infantum* com as amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ e mistura de Sn+Sg (1:1) estão apresentados na TABELA 5.7 na forma dos valores do índice de citotoxicidade 50 % (IC₅₀).

Na avaliação da atividade leishmanicida foi utilizado o fármaco metiltefosina, como controle positivo, para as formas promastigotas de *Leishmania infantum* (IC₅₀ = 3,1 µg/mL).

TABELA 5.7 – Atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.

Amostras	<i>Leishmania infantum</i>	
	IC ₅₀ (µg/mL)	
EB	98,14	
FH	> 200,00	
FE	69,35	
F ₀	> 200,00	
F ₁	30,84	
F ₂	25,36	
F ₃	16,20	
F ₄	> 200,00	
F ₅	> 200,00	
Sn + Sg (1:1)	16,20	
miltefosina	3,1	

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e miltefosina = controle positivo;

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB) apresentou potencial atividade leishmanicida ($IC_{50} = 98,14 \mu\text{g/mL}$), o mesmo sendo apresentado pela fração etanólica 40 % (FE) que apresentou IC_{50} igual a $69,35 \mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas de *L. infantum*, demonstrando concentração das substâncias que apresentam atividade leishmanicida nesta fração, pois apresentou melhor eficácia em relação ao extrato etanólico 96 % (v/v) bruto.

A fração hexânica (FH) não apresentou atividade citotóxica potencial para formas promastigotas de *L. infantum*, pois foi obtido IC_{50} superior a $200,00 \mu\text{g/mL}$, que para os testes de atividade leishmanicida são valores considerados elevados, pois estudos indicam que em concentrações superiores a $200,00 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar efeitos citotóxicos para o parasita (SOUSA et al., 2010).

Para as frações obtidas do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto foi possível observar a concentração dos compostos responsáveis pela atividade leishmanicida do EB, sendo os mesmos concentrados nas frações F₁, F₂ e F₃, com IC_{50} igual a 30,84, 25,36 e 16,20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, demonstrando que a atividade leishmanicida ocorreu em todas as frações que contêm os glicoalcalóides, solasonina e solamargina.

A confirmação da atividade dos glicoalcalóides frente às formas promastigotas de *L. infantum* pode ser evidenciada pela ausência da atividade das frações F₀, F₄ e F₅, que não contêm os glicoalcalóides e apresentaram valor de IC_{50} foi superior a $200,00 \mu\text{g/mL}$.

Na mistura de solasonina e solamargina (1:1) ($IC_{50} = 16,20 \mu\text{g/mL}$) foi possível observar a eficácia leishmanicida semelhante às apresentadas pelas frações F₁, F₂ e F₃, o que demonstra a possibilidade da ocorrência de um sinergismo entre as moléculas solasonina e solasonina para a realização desta atividade antiparasitária.

Com os resultados obtidos foi possível evidenciar que a atividade leishmanicida do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos de *S. lycocarpum* sobre as formas promastigotas de *L. infantum*, poderão ser atribuídas à possibilidade de sinergismo entre os glicoalcalóides solasonina e solamargina misturados e presentes nas frações F_E, F₁, F₂ e F₃.

5.7.2.3 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

Os resultados dos testes de atividade tripanossomicida com as amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e mistura de Sn+Sg (1:1) estão apresentados na TABELA 5.8 na forma dos valores do índice de citotoxicidade 50 % (IC₅₀) das amostras para as cepas analisadas de *T. cruzi* e *T. brucei*.

Para avaliação da atividade tripanossomicida foram utilizados, como controle positivo, para as formas epimastigotas de *T. cruzi*, o fármaco benzonidazol (IC₅₀ = 9,00 µg/mL) e para as formas procíclicas de *T. brucei* (IC₅₀ = 2,19 µg/mL).

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto apresentou potencial atividade tripanossomicida para o *T. cruzi* (IC₅₀ = 194,70 µg/mL) e *T. brucei* (IC₅₀ = 214,55 µg/mL), o mesmo foi observado para a fração etanólica 40 % que apresentaram, respectivamente, IC₅₀ 119,65 e 145,12 µg/mL para *T. cruzi* e *T. brucei*.

Com a utilização das técnicas cromatográficas para o isolamento dos glicoalcalóides (solamargina e solasonina), foi possível observar a separação dos compostos químicos responsáveis pela atividade tripanossomicida do EB, onde os mesmos ficaram concentrados, principalmente na Fração F₂ que apresentou IC₅₀ igual a 77,10 e 85,92 µg/mL para *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente.

TABELA 5.8 – Atividade tripanossomicida *in vitro* do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações, solasonina e solamargina.

Amostras	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
EB	194,70	214,55
FH	> 500,00	358,12
FE	119,65	145,12
F ₀	> 500,00	418,68
F ₁	> 500,00	62,73
F ₂	77,10	85,92
F ₃	280,80	126,06
F ₄	> 500,00	246,86
F ₅	> 500,00	202,90
Sn	> 100,00	> 100,00
Sg	15,30	> 100,00
Sn + Sg (1:1)	> 100,00	> 100,00
pentamidina	-	2,19
benzonidazol	9,00	-

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e benzonidazol / pentamidina = Controle positivo;

A fração F₃ (IC₅₀ igual a 280,80 e 126,86 µg/mL, respectivamente para *T. cruzi* e *T. brucei*) apresentou baixa atividade tripanocida, em decorrência da presença de pequena quantidade de solamargina em sua constituição.

A fração F₁ apresentou atividade tripanossomicida somente para o *T. brucei* (IC₅₀ = 62,73 µg/mL), que não foi observada a presença de solamargina em sua composição, demonstrando que estudos posteriores devem ser realizados para identificação e caracterização dos compostos dessa fração.

A solamargina isolada (IC₅₀ = 15,30 µg/mL) apresentou atividade tripanossomicida somente para a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

As frações F₀, F₄ e F₅ e o glicoalcalóide, solasonina, não apresentaram nenhuma atividade tripanossomicida sobre as cepas de *T. cruzi* e *T. brucei*.

Com esses resultados foi possível evidenciar que atividade tripanossomicida do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos de *S. lycocarpum* sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* - cepas Y são atribuídas ao glicoalcalóide solamargina isolado e presente nas frações F₂ e F_E.

Em oposição, para as formas procíclicas de *T. brucei* - cepa 427 a atividade tripanossomicida do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos de *S. lycocarpum* foram em decorrência ao(s) composto(s) químico(s) presente(s) na fração F₁ e F₂.

5.8 Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres

Os resultados obtidos para as amostras EB, FH, FE, F₀, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, Sn, Sg e mistura Sn+Sg (1:1) foram determinadas em porcentagem de atividade antioxidante, correspondente à quantidade do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) reduzido a difenil-picril-hidrazina por ação do agente antioxidante (TABELA 5.9).

TABELA 5.9 – Atividade antioxidante do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, frações e glicoalcalóides de *S. Solanum lycocarpum* St. Hill.

Amostra (250 µg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
EB	55,32 ± 0,41
FH	37,79 ± 5,26
FE	87,25 ± 0,68
F ₀	15,54 ± 0,56
F ₁	26,74 ± 1,29
F ₂	32,79 ± 2,24
F ₃	21,79 ± 3,99
F ₄	20,20 ± 2,53
F ₅	60,17 ± 7,04
Sn	29,32 ± 0,57
Sg	25,32 ± 1,02
Sn+Sg	33,58 ± 1,24
Quercetina	96,28 ± 0,10

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e Quercetina = controle positivo.

Frente à análise da ação antioxidante das 12 amostras testadas, em três delas foram evidenciadas a ação, no extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, na fração etanólica 40 % (v/v) e na fração F₅.

Quanto maior a porcentagem de redução do DPPH, melhor é a atividade antioxidante do composto, face ao controle positivo, a quercetina, o qual já é utilizado como um agente, comercial, antioxidante.

Este estudo demonstrou que o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de frutos de *S. lycocarpum*, obtido por refluxo, apresenta compostos antioxidantes, em virtude de ter a capacidade de redução de $55,32 \pm 0,41$ % dos radicais DPPH, representando 57,45 % da atividade demonstrada no controle.

Os compostos antioxidantes presentes no extrato, responsáveis pela redução do DPPH apresentam características polares, pois ao fracionar o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto em fração hexânica e fração etanólica 40 % (v/v), essa última, apresentou valores elevados de ação antioxidante, atingindo 90,62 % da atividade exibida pelo controle.

Ao purificar a fração etanólica 40 % (v/v) através de cromatografia em coluna, em frações F₀, F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅, o(s) composto(s) antioxidante(s) foram eluídos na F₅, apresentando um percentual de redução do DPPH igual a $60,17 \pm 7,04$ %.

Os compostos da fração F₅ não foram caracterizados, em virtude de que o objetivo deste trabalho foi o isolamento dos glicoalcalóides, solamargina e solasonina, bem como a realização de um “screening” de atividades biológicas do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto e dos glicoalcalóides, estudos posteriores podem ser realizados para identificação e caracterização dos compostos dessa fração.

Diversos estudos têm demonstrado que as principais classes de compostos químicos que apresentam atividade antioxidante são os fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolípidios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (GULÇIN et al., 2006; ROESLER et al., 2007; HAMID et al., 2010). SILVA et al (2003) demonstraram a presença de flavonas e flavonoides

nos frutos de *S. lycocarpum*, que, pela característica de polaridade, podem ser as responsáveis pela atividade antioxidante da Fração F₅.

Porém, os glicoalcalóides, solamargina (25.32 ± 1.02) e solasonina (29.32 ± 0.57) não apresentaram ação redutora do radical DPPH.

Em razão dos resultados obtidos, torna-se promissor o aprimoramento dos estudos da fração etanólica 40 % (v/v) e fração F₅ frente à ação antioxidante, para o desenvolvimento de novos compostos e produtos antioxidantes, para serem utilizados na indústria de medicamentos, alimentos, cosméticos, dentre outras.

5.9 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para a avaliação da citotoxicidade das amostras de extrato etanólico 96 % (v/v) bruto (EB), da fração etanólica 40 % (v/v) (FE), da fração hexânica (FH), da fração F₂, da solamargina isolada (Sg), da solasonina isolada (Sn) e de uma mistura em proporções iguais de solamargina e solasonina (Sn + Sg), utilizou-se macrófagos (linhagem J774) e as faixas de concentração inibitória de 50 % dos macrófagos, IC₅₀, conforme mostra a TABELA 5.10.

A partir desses resultados foi possível evidenciar que o extrato etanólico 96 % (v/v) bruto apresenta alta citotoxicidade para os macrófagos em oposição à fração hexânica que mostrou menor citotoxicidade.

TABELA 5.10 – Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em macrófagos (J774) do Extrato etanólico 96 % (v/v) bruto de fruto de *Solanum lycocarpum*, frações e substâncias isoladas.

Amostra	Faixa de IC₅₀ (µg/mL)
EB	15,65 – 31,25
FH	> 2.000,00
FE	500,00 – 1.000,00
F ₀	31,25 – 62,50
F ₁	15,65 – 31,25
F ₂	15,65 – 31,25
F ₃	62,50 – 125
F ₄	250,00 – 500,00
F ₅	500,00 – 1.000,00
Sn	31,25 – 62,50
Sg	> 2.000,00
Sn+Sg	125,00 – 250,00

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1;

A solamargina isolada apresentou uma faixa de citotoxicidade superior a 2.000 µg/mL, sendo considerada de baixa toxicidade, em comparação à solasonina que apresentou efeito tóxico, pois o IC₅₀ foi menor para ela, 31,25 – 62,5 µg/mL.

Ao misturar a solamargina e a solasonina, o efeito tóxico foi alterado, resultando em um aumento no IC₅₀ da mistura, com faixa de concentração igual a 125 – 250 µg/mL, sugerindo que a mistura dos glicoalcalóides diminuem o efeito tóxico da solasonina.

Em suma, face aos resultados observados, foi possível isolar dos frutos de *S. lycocarpum* os glicoalcalóides, solamargina e solasonina, pelas técnicas cromatográficas (partição líquido-líquido, coluna e camada delgada preparativa).

A técnica extrativa utilizada, sistema de refluxo utilizando como solvente uma solução hidroalcoólica 96 % (v/v), apresentou resultados extrativos semelhante às técnicas convencionais de extração de alcalóides (maceração e soluções ácido:base), que demandam maior tempo do que a utilizada neste trabalho, isso possibilita a redução do tempo de produção de extratos e redução do uso de produtos que agridem o ambiente, o que a torna um método potencial para o uso comercial.

O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, a fração etanólica 40 % (v/v) e a fração F₂ apresentaram atividade antiparasitária para *Giardia lamblia*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, além disso a fração etanólica 40 % (v/v) apresentou baixa citotoxicidade para macrófagos demonstrando ser promissor no desenvolvimento de novo produto fitoterápico.

As frações F₁ e F₂ apresentaram menor IC₅₀ para *G. lamblia* e *L. infantum*, nas quais demonstram-se promissoras no desenvolvimento de um produto fitoterápico novo, contudo estudos de citotoxicidade em outras células devem ser realizados no sentido de avaliar as vantagens e desvantagens do seu uso.

As frações etanólica 40 % (v/v) e F₅ apresentaram maior atividade antioxidante frente às outras amostras analisadas, o que demonstra que os possíveis mecanismos de ação das drogas frente aos agentes biológicos não estão relacionados com os processos oxi-redutores das células.

Estudos de isolamento, identificação e caracterização da estrutura da fração F₅ deverá ser realizado, posteriormente, em decorrência dos resultados promissores obtidos no teste de atividade antioxidante.

Os glicoalcalóides isolados apresentaram baixa atividade antiparasitária para *G. lamblia* e a solamargina isolada apresentou atividade promissora para o desenvolvimento de um fitofármaco para *T. cruzi*.

A mistura de solasonina e solamargina (1:1) demonstrou atividade promissora para o desenvolvimento de uma associação de fitofármacos para o combate de *G. lamblia* e *L. infantum*.

Em decorrência as diferentes ações dos glicoalcalóides, isolados e em associação, é possível compreender que a pequena diferença estrutural das moléculas faz com que elas interajam com os parasitas estudados em sítios diferentes, pois não houve correlação entre os efeitos apresentados e a estrutura da molécula utilizada. O que torna viáveis estudos futuros quanto ao mecanismo de ação desses potenciais fitofármacos para o desenvolvimento de produtos alopáticos.

Portanto se faz necessário a continuidade de estudos de *screening* de atividades biológicas para os produtos obtidos do fruto de *S. lycocarpum* St. Hill, bem como a avaliação do mecanismo de ação das frações e compostos isolados e associados em potencial para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos e de fitofármacos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos chegar às seguintes conclusões:

- ✓ A técnica de extração de refluxo e etanol 96 % (v/v) como líquido extrator foi a condição de extração mais eficientes para os glicoalcalóides;
- ✓ Foram identificados e isolados os glicoalcalóides (solamargina e solasonina) a partir do extrato etanólico 96% (v/v) bruto e da fração F₂;
- ✓ A fração F₂ apresentou a maior quantidade de solamargina e solasonina, já as frações F₁ e F₃ apresentaram traços desses dois glicoalcalóides;
- ✓ O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, suas frações e os dois glicoalcalóides não apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica.
- ✓ Apresentaram atividade antiparasitária para *Giardia lamblia*: extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁ e F₂.
- ✓ Apresentaram atividade antiparasitária para *Leishmania infantum*: extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁, F₂ e F₃.

-
- ✓ Apresentaram atividade antiparasitária para *Trypanosoma cruzi*: extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v) e fração F₂.

 - ✓ Apresentaram atividade antiparasitária para *Trypanosoma brucei*: extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v), frações F₁ e F₂.

 - ✓ Não apresentaram atividade antiparasitária: frações F₀, F₄ e F₅.

 - ✓ Solamargina apresentou atividade antiparasitária para as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Já solasonina isolada não apresentou essa atividade. Porém, a mistura de solasonina e solamargina (1:1) apresentou ação sinérgica para *Giardia lamblia* e *Leishmania infantum*, sendo promissores a continuidade dos estudos;

 - ✓ Apresentaram atividade antioxidante superior a 50 % da capacidade de reduzir o radical DPPH: extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, fração etanólica 40 % (v/v) e fração F₅. Porém, solamargina e solasonina não apresentaram essa atividade.

 - ✓ Em decorrência das atividades biológicas observadas nas frações F₁ e F₅, torna-se importante o isolamento e a identificação dos constituintes químicos responsáveis por essas atividades;

 - ✓ O extrato etanólico 96 % (v/v) bruto apresentou-se tóxico para macrófagos em baixa concentração. Solasonina apresentou toxicidade superior a da solamargina. Quando da mistura das substâncias em proporções iguais, a toxicidade da

solasonina se apresentou diminuída.

- ✓ O desenvolvimento de novos estudos com o objetivo da avaliação *in vivo* da atividade antiparasitária da fração F₂, solamargina e da mistura de solamargina e solasonina (1:1) são necessários em virtude da eficácia apresentada nos testes *in vitro* e da ampla diferença entre os valores de IC₅₀ de atividade antiparasitária e de citotoxicidade do material frente a macrófagos;

- ✓ Em virtude da promissora ação antiparasitária do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto obtido de frutos de *Solanum lycocarpum*, fração F₂, solamargina e da mistura de solamargina e solasonina (1:1), torna-se necessário outros estudos relacionados ao mecanismo de ação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIODUM, O. O.; GBOTOSHO, G. O.; AJAIYEoba, E. O.; BRUN, R.; ODUOLA, A. M. Antitrypanosomal activity of some medicinal plants from Nigerian ethnomedicine. **Parasitology Research**, v. 110, p. 521-526, 2012.

ABREU, P.; RELVA, A.; MATTHEW, S.; GOMES, Z.; MORAIS, Z. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated and organic crop system. **Food Control**, v. 18, p. 40-44, 2007.

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 283-298, 1998.

AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L. R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, p. 826-842, 2009.

ALBERNAZ, L. C., PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 116-121, 2010.

ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.

ALIERO, A. A.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of *Solanum tomentosum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 369-372, 2006.

AL-JANABI, A.; AL-RUBEEY, S. A. Detection of antimicrobial activity of *Solanum melongena* L. (egg plant) against pathogenic microorganisms. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, p. 35-39, 2010.

ALMEIDA, A. E.; ROCCA, M. A. Glicoalcalóides dos frutos do *Solanum flaccidum* Vell. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 111-118, 1995.

ALMEIDA, A. E.; CARDOSO, C. R. P.; ALMEIDA, D. V.; MOREIRA, R. R. D.; SILVA, M.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of glycoalkaloids from *Solanum palinacantum* Dunal (Solanaceae) found in the Brazilian cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 122-126, 2010.

AL-MUSAYEIB, N. M.; MOTHANA, R. A. Study of the *in vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants from Saudi Arabia. **Molecules**, v. 17, p. 11379-11390, 2012.

ALVES, R. T.; REGASINI, L. O.; FUNARI, C. S.; YOUNG, M. C. M.; RIMOLDI, A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ALBUQUERQUE, S.; ROSA, J. A. Trypanocidal

activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 528-533, 2012.

ALVIN, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

AMARAL, F. M. M; RIBEIRO, M. N. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; REIS, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696-720, 2006.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 5258-5265, 1995.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ARAUJO, M. G. F.; GALEANE, M. C.; CASTRO, A. D.; SALGADO, H. R.; ALMEIDA, A. E.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; MOREIRA, R. R. D. Pharmacognostical evaluation of fruits of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 9, p. 248-253, 2010.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

BALDE, E. S.; MEGALIZZI, V.; TRAORE, M. S.; COS, P.; MAES, L.; DECAESTECKER, C.; PIETERS, L.; BALDE, A. M. In vitro antiprotozoal, antimicrobial and antitumor activity of *Pavetta crassipes* K. Schum leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 529-535, 2010.

BARBOSA FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BARBOSA, E.; CALZADA, F.; CAMPOS, R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 552–554, 2007.

BELLO, C. M.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 75-83, 2002.

BISSER, S.; N'SIESI, F. X.; LEJON, V.; PREUX, P. M.; NIEUWENHOVE, S. V.; BILENGE, C. M. M.; BUSCHER, P. Equivalence Trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 3, p. 322-329, 2007.

BLANKEMEYER, J. T.; McWILLIAMS, M. L.; RAYBURN, J. R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Development toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 383-389, 1998.

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

BRASIL. **Ministério da saúde**. Portal da Saúde. <http://portal.saude.gov.br>, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de Doença de Chagas Aguda. 2005 à 2010**, Brasil, 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA, British Pharmacopoeia Commission Office, London, 2009.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em

subprodutos de pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Tropica**, v. 36, n. 3, p. 289-292, 1979.

BUSATTI, H. G.; VIEIRA, A. E.; VIANA, J. C. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. **The Journal Parasitology Research**, v. 102, p. 145-149, 2007.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, S. L.; CROFT, P. N.; MARSHALL, S. J.; GHAZANFAR, S. A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 185-191, 2003.

CAMARGO, E. E. S.; BANDEIRA, M. A. M.; OLIVEIRA, A. G. **Diagnóstico dos programas de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, visando subsidiar a distribuição no sistema único de saúde**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 223 p., 2010.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (*American trypanosomiasis*). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.

CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1187-1213, 2002.

CHANG, C. V.; FELICIO, A. C.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 265-269, 2002.

CHENA, M. A.; ELIZONDO, S.; RODRIQUES-PAEZ, L.; NOGEUDA, B.; WONG, C. Trypanocidal activity of N-isopropyloxamate on cultured epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 189-197, 2005.

CIPOLLINI, D. F., J. BERGELSON. Environmental and developmental regulation of trypsin inhibitor activity in *Brassica napus* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 1411-1422, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COURA, J. R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias**. Editora Guanabara, v. I, 2005.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 231-245, 2004.

CRABBE, P. G.; FRYER, C. Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and solasodiene by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 187, p. 87-100, 1980.

CRABBE, P. G.; FRYER, C. Modeling of acid hydrolysis of solasodine glycosides. Part I: formation of solasodine by glycosidic hydrolysis. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 29, p. 572-579, 1983.

CROOS, G.; MANNING, J. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, p. 315-331, 1973.

CRUZ, G. L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. 2ed. São Paulo: Civilização Brasileira, p. 360, 1982.

DALL'AGNOL, R.; VON POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 337-341, 2000.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. S13-S22, 2007.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 223-238, 1984.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Federation proceedings**, v. 45, p. 2471-2476, 1986.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EANES, R. C.; TEK, N.; KIRSOY, O.; FRARY, A.; DOGANLAR, S.; ALMEIDA, A. E. Development of practical HPLC methods for the separation and determination of eggplant steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 984-1000, 2008.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 259–270, 2003.

EDLIND, T.; HANG, T.; CHAKRABORTY, P. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 6, p. 1408-1411, 1990.

ELIAS, S. R. M.; ASSIS, R. M.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; REZENDE, M. H. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solanaceae). **Revista Brasileira Botânica**, v. 26, p. 169-174, 2003.

ELMENDORF, H.G.; ROHRER, S.C.; KHOURY, R.S.; BOUTTENOT, R.E.; NASH, T.E. Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1001–1011, 2005.

FARINA, F.; PIASSI, F. G.; MOYSES, M. R.; BAZZOLLI, D. M. S.; BISSOLI, N. S. Glycemic and urinary volume responses in diabetic mellitus rats treated with *Solanum lycocarpum*. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 35, p. 40-44, 2010.

FARMACOPÉIA BASILEIRA, 5ª ed., v.(1) e (2), Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2010.

FERNANDES J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FERREIRA, B. R. C.; NUNES, F. R. A.; NUNES, M. L. A.; PAULA, F. B. A.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; NUNES, M. L. A.; SILVA, T. D.; MOREIRA, D. A. C. Parâmetros bioquímicos de animais tratados com polvilho extraído dos frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. **Anais**, p. 164, 2005.

FLANAGAN, P. A. Giardia: diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. **Epidemiology & Infection**, v. 109, p. 1–22, 1992.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; SCHININI, A.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; SANABRIA, R.; GUINAUDEAU, H.; BRUNETON, J. The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 163-170, 1997.

FRANCO, S. L. **Própolis: Otimização do processo extrativo, desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 152 p., 2001.

FRASER, D.; BILENKO, N.; DECKELBAUM, R. J. Giardia lamblia carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 419–424, 2000.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 685-687, 1991.

GELATTI, L. C.; BECKER, A. P.; BONAMIGO, R. R.; AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, p. 501-506, 2009.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p. 353-358, 2005.

GUERRA, M. O.; REIS, J. E. P.; OLIVEIRA, L. E. G. Avaliação do potencial teratogênico do fruto de lobeira (*Solanum grandiflorum*) administrado no período de organogênese do rato. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 16, p. 52-56, 1997.

GUGULOTHU, V.; AJMEERA, R.; VATSVAYA, S. R. Screening for in vitro antimicrobial activity of *Solanum americanum* Miller. **Journal of Recent Advances in Applied Sciences**, v. 26, p. 43-46, 2011.

GÜLÇİN, I.; MSHVILDADZE, V.; GEPDIREMEN, A.; ELIAS, R. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowi* tuber. **Phytomedicine**, v.13, p. 343-351, 2006.

HALL, C. A.; HOBBY, T.; CIPOLLINI, M. Efficacy and mechanisms of α -solasonine and α -solamargine induced cytotoxicity on two strains of *Trypanosoma cruzi*. **Journal Chemical Ecology**, v. 32, p. 2405-2416, 2006.

HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O. O.; USMAN, L. A.; AMEEN, O. M.; LAWAL, A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 142-151, 2010.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. **Acta Medica**, v. 8, p. 13-27, 1998.

JAPANESE PHARMACOPOEIA, THE. 30th ed., 1788 p., 2006.

JIMÉNEZ-ARELLANES, A.; CORNEJO-GARRIDO, J.; ROJAS-BRIBIESCA, G.; PILARNICASIO-TORRES, M. D.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; VIDMATA-CÁRDENAS, B.; MOLINA-SALINAS, G. M.; TORTORIELLO, J.; MECKES-FISCHER, M. Microbiological and pharmacological evaluation of the micropropagated *Rubus liebmannii* medicinal plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, doi:10.1155/2012/503031, 2012.

KAGIRA, J. M.; MAINA, N. Occurrence of multiple drug resistance in *Trypanosoma brucei* rhodesiense isolated from sleeping sickness patients. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 17-22, 2007.

KEISTER, D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 487-488, 1983.

KENNEDY, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 496-504, 2004.

KUBANEK, J.; WILLIAMS, D. E.; SILVA, E. D.; ALLEN, T.; ANDERSEN, R. J. Cytotoxic alkaloids from the flatworm *Prostheceraeus villatus* and its tunicate prey *Clavelina lepadiformis*. **Chem Inform**, v. 26, 1995.

LALITHA, V.; RAVEESHA, K. A.; KIRAN, B. Antimicrobial activity of *Solanum torvum* Swart. Against important seed borne pathogens of paddy. **Iranica Journal of Energy & Environment**, v. 1, n. 2, p. 160-164, 2010.

LANE, S.; LOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 123-147, 2002.

LATHA, P. S.; KANNABIRAN, K. Antimicrobial activity and phytochemicals of *Solanum trilobatum* Linn. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 23, p. 2402-2404, 2006

LAZZARRI, J. O.; FREILIJ, H. Tratamiento de la enfermedad de Chagas cronica en Argentina. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, p. 11-16, 1998.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluated antioxidant ability. **Chemical reviews**, v. 110, p. 5675-5691, 2010.

LV, Y.; ZHANG, F.; CHEN, J.; CUI, J.; XING, Y.; LI, X.; GUO, S. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucrata*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1300-1306, 2010.

MACHADO, M.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Revista de Fitoterapia**, v. 9, n. 1, p. 75, 2009.

MACÍAS, I. R.; MARÍN, C.; CHAHBOUN, R.; OLMO F.; MESSOUR, I.; HUERTAS, O.; ROSALES, M. J.; SÁNCHEZ, R.; MANZANEDA, E. A.; MORENO, M. S. In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 107, p. 370-376, 2012.

MADEIRA, A. <http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239906534180PROGRAMADEVIGECONTOLE.pdf>. 2009.

MANN, A.; IFARAJIMI, O. R.; ADEWOYE, A. T.; UKAN, C.; UDEME, E. E.; OKORIE, I. I.; SAKPE, M. S.; IBRAHIM, D. R.; YAHAYA, Y. A.; KABIR, A. Y.;

OGBADOYI, O. *In vivo* antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from nupeland of north central Nigeria. **Journal of Traditional of Complementary Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 15-21, 2011.

MARUO, V. M.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 48-52, 2003.

MAUDLIN, I. African trypanosomiasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 8, p. 679-701, 2006.

MAURYA, A.; GUPTA, S.; NEGI, S.; SRIVASTAVA, S. K. pH-Zone-refining centrifugal partition chromatography for preparative isolation and purification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum*. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3126-3132, 2009.

MBAYA, A. W.; NWOSU, C. O.; ONYEYILI, P. A. Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of *Butyrospermum padadoxum* (Sapotaceae) stem bark in rats infected with *Trypanosoma brucei* an *Trypanosoma congolense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 526-530, 2007.

MERSCHJOHANN, K.; SPORER, F.; STEVERDING, D.; WINK, M. In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. **Planta Medica**, v.67, p. 623-627, 2001.

MESIA, G. K.; TONA, G. L.; NANGA, T. H.; CIMANGA, R. K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 409-415, 2008.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do ministério da saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 200-202, 2010.

MIRANDA, M. A.; BASTOS, J. K. **Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcoólico e de alcalóides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 110 p., 2010.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G. A. B. Hotspots revised: Earth's biologically and most endangered terrestrial ecoregions. **CEMEX**, Cidade do México, 2004.

MOLA, J. L.; ARAUJO, E. R.; MAGALHAES, G. C. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 460-462, 1997.

MORAES, A. O.; MELO, E.; AGRA, M. F.; FRANÇA, F. A família Solanaceae nos “Inselbergues” do semi-árido da Bahia, Brasil. **Série Botânica**, v. 64, p. 109-122, 2009.

MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte C**, v. 107, n. 3, p. 367-371, 1994.

MORELLO, M. J.; SHAHIDI, F.; HO, T. C. Free radicals in foods: Chemistry, nutrition, and health effects. **ACS Symposium Series 807**, Washington, DC, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTIDOME, M.; LEEKING, M. E.; GOTTLIEB, O. R. Química de solanáceas brasileiras. In: A presença de solamargina e solasonina no juá e na lobeira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 375-376, 1970.

MOTTA, S.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P. Administração de polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. **Revista Lecta**, v. 20, n. 1, p. 53-60, 2002.

MUGANZA, D. M.; FRUTH, B. I.; LAMI, J. N.; MESIA, G. K.; KAMBU, O. K.; TONA, G. L.; KANYANGA, R. C.; COS, P.; MAES, L.; APERS, S.; PIETERS, L. In

vitro antiprotozoal and cytotoxic activity of 33 ethnopharmacologically selected medicinal plants from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 301-308, 2012.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, “fruta do lobo” (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v. 69, p. 1565-1572, 2008.

NGANTCHOU, I.; NYASSE, B.; DENIER, C.; BLONSKI, C.; HANNAERT, V. SCHNEIDER, B. Antitrypanosomal alkaloids from *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae): Their effects on three selected glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3495-3498, 2010.

NOK, A. J. Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. **Parasitology Research**, v. 90, p. 71-79, 2003.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102, p. 569-573, 1998.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; ARAÚJO, R. J. P.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. fruit is not a

hypoglycemic Agent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 525-530, 2003.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA, A. S. J.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. C. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, T. B.; SALAZAR, K. A. A.; DUARTE, S. M. S.; MOREIRA, D. A. C.; PAULA, F. B. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimitagênica do polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) in vivo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 4, p. 297-301, 2010.

OLIVIERA JR, E. N.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORREA, A. D.; SANTOS, J. Z. L. Alterações pós-colheita da “fruta-de-lobo” (*Solanum lycocarpum* St. Hill) durante o amadurecimento: Análises físico-químicas, químicas e enzimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 410-413, 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA: **Tecnologia em serviços de saúde, Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos**. Termo de Cooperação 37, 1ª ed., 2006.

OSORIO, E. J.; ROBLEDO, S. M.; BATISTA, J. Alkaloids with antiprotozoal activity. **The Alkaloids. Chemistry and Biology**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. **American Journal of Therapeutics**, v. 16, p. 178-182, 2009.

PASSOS, F. B.; RIBEIRO, J. F. **Avaliação de *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) e de poleiros artificiais como facilitadores na restauração de área perturbada de Cerrado sentido restrito.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, p. 87, 2009.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **Jornal de Pediatria**, v 78, p. 120-127, 2002.

PETERS, V. M.; PINHEIRO, N. L.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O. Absence of interceptive effect in rats treated with *Solanum lycocarpum*. **Contraception**, v. 63, p. 53-55, 2002.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PINTO, L. V. A.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; JESUS, V. A. M.; TOOROP, P. E.; HILJORST, H. W. M. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1175-1187, 2007.

PINTO, F. C. L.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Glicoalcalóides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011

POLITI, F. A. S.; MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 2757-2768, 2011.

PONTES, F. Doenças negligenciadas. **Revista Inovação em Pauta**, v.6, p. 69-73, 2012.

POUBEL, S. B.; CASTRO, E. A.; Soccol, V. T. **Variabilidade genética de isolados de *Leishmania infantum* x *L. chagasi* procedentes de várias regiões do Brasil**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 75 p., 2010.

QUEIROZ, G. M.; PIETRO, R. C. L. R. **Estudo fitoquímico, avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae)**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 133 p., 2011.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ª Edição, Guanabara Koogan, 351 p., 2011.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 151-212, 2008.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1475-1477, 1995.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 122, p. 27-31, 1999.

ROBBER, J. **Farmacognosia farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 372 p., 1997.

ROBERTSON, L. J.; HANEVIK, K.; ESCOBEDO, A. A.; MORCH, K.; LANGELAND, N. Giardiasis: Why do the symptoms sometimes never stop?. **Trends Parasitology**, v. 26, p. 75-82, 2010.

ROCHA, M. C. S.; POTIGUARA, R. C. V. **Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Solanum paludosum* Moric e *S. stramonifolium* Jacq (Solanaceae) da restinda de Algodual – PA.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural da Amazônia, 57 p., 2009.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSSIGNOL, J. F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 45-53, 2010.

SARNTHIMA, R.; KHAMMUANG, S. Antibacterial activities of *Solanum stramonifolium* seed extract. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 14, p. 111-115, 2012.

SAWANGJAROEN, N.; SUBHADHIRASAKUL, S.; PHONGPAICHIT, S. The in vitro anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. **The Journal Parasitology Research**, v. 95, p. 17–21, 2005.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.)

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.

SCHWARTZ, A.; PINTO, E.; HARAGUCHI, M.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hill) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1025-1028, 2007.

SCOVILL, J.; BLANK, E.; KONNICK, M.; NENORTAS, E.; SHAPIRO, T. Antitrypanosomal activities of tryptanthrins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 882-883, 2002.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056– 1069, 2011.

SHEEBA, E. Antibacterial activity of *Solanum surattense* Burm F. **Journal of Science, Engineering And Technology**, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2010.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica e Biológica**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SILVA, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. Frutas nativas dos cerrados. **Embrapa**, Brasília, 166 p., 1994.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

SILVA, T. M. S.; AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 292-293, 2005.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; ROS PETROVICK, P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: **Ed. UFRGS**, 1999, 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SOARES-MOTA, M. R.; SCHWARZ, A.; BERNARDI, M. M.; MAIORKA, P. C.; SPINOSA, H. S. Toxicological evaluation of 10 % *Solanum lycocarpum* St Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2009, doi:10.1016/j.etp.2009.07.006.

SOUSA, M.; GONCALVES, C.; BARROS, V.; POIARES-DA-SILVA, J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 258-265, 2011.

SOUSA, M. C.; POIARES-DA-SILVA, J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2939-2942, 1999.

SOUSA, M. C.; SILVA, O.; POIARES-DA-SILVA, J.; GOMES, E. T. *In vitro* anti-giardial activity of extracts of *Guiera senegalensis* leaves and identification of the active constituents: quercitrin, 5-methyl-dihydroflavasperone and methylflavasperone. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, s.1, p. 297, 2006.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FREITAS, T. P. T.; PAZ, R. C. R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in

wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 333-335, 2010.

SOUZA, V. M. O.; SALES, I. R. F.; PEIXOTO, D. M.; COSTA, V. M. A.; RIZZO, J. A.; SILVA, A. R.; CAMILO, R. F.; PIEROTTI, F. F.; SOLE, D.; SARINHO, E. S. C. Giardia lamblia and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 3, p. 233-238, 2012.

SUN, F.; LI, S.; HE, D.; CAO, G.; NI, X.; TAI, G.; ZHOU, Y.; WANG, D. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. **Phytochemistry**, 2010, doi:10.1016/j.phytochem.2010.06.002.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H. Development of the Short Time Exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, p.760-770, 2008.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TIOSSI, R. F. J.; BASTOS, J. K. **Obtenção de extrato padronizado de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. contendo glicoalcalóides, desenvolvimento de método analítico por CLAE e de forma farmacêutica de uso tópico.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 134 p., 2010.

TIOSSI, R. F. J.; MIRANDA, M. A.; SOUSA, J. P. B.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; McCHESNEY, J. D.; BASTOS, J. K. A validated reverse phase HPLC analytical method for quantitation of glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its extracts. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, ID 947836, 8 p., 2012.

THOMPSON, R.C. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

UNITED STATES OF PHARMACOPEIA, 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 150-164, 2001

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long- acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 39-48, 2003.

VALYA G.; RAGAN A.; RAJU, V.S. Screening for *in vitro* antimicrobial activity of *Solanum americanum* Miller. **Journal of Recent Advances in Applied Sciences**, v. 26, p. 43-46, 2011.

VAZ, N. P.; MAIA, B. H. L. N. S. **Constituintes químicos de *Solanum caavurana* Vell.: Isolamento, mapeamento fitoquímico por IES-EM/EM e sua aplicação no tratamento da hanseníase.** Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, 25 p. 2010.

VERA-KU, M.; GONZÁLEZ, M. M.; PUC, R. M.; VALLADO, M. R.; POLANCO, P. S.; RIVERA, R. C.; SÁNCHEZ, S. R. P. Medicinal potions used against infectious bowel diseases in Mayan traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 303–308, 2010.

VIDAL, F.; VIDAL, J. C.; GADELHA, A. P. R.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P.; MONTEIRO-LEAL, L. H. *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 25–31, 2007.

VIEIRA, G. J.; FERREIRA, P. M.; MATOS, L. G.; FERREIRA, E. C.; RODOVALHO, W.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; COSTA E. A. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 892-896, 2003.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; KANCHANAPOOM, T.; SAWANGJAROEN, N.; HUTADILOK-TOWATANA, N. Antioxidant, antibacterial and anti-giardial activities of *Walsura robusta* Roxb. **Natural Product Research**, v. 24, p. 813–824, 2010.

WAECHTER, A.; CAVE, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUNOZ, V.; FOURNET, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii*. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 175-177, 1999.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p. 508-516, 2007.

WESTON, R. J. An investigation of methods for isolation of the steroidal alkaloid solasodine from native New Zealand *Solanum* species. **Journal of Applied Chemistry & biotechnology**, v. 26, p. 657-666, 1976.

WISSENBERG, M.; LEVY, A.; SVOBODA, J. A.; ISHAAYA, I. The effect of some *Solanum* steroidal alkaloids and glycoalkaloids on larvae of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the tobacco hornworm, *manduca sexta*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 203-209, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015**. WHO, 40, p. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. WHO, 184 p., 2010.

WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S. Y.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confuse*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5917-5921, 2005.

XING, Y.; WHITE, P. J. Antioxidants from Cereals and Legumes in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications “in” SHAHIDI, F. **AOCS Press**: Champaign, Illinois, p. 25-55, 1996.

YOSHIKAWA, M.; NAKAMURA, S.; OZAKI, K.; KUMAHARA, A.; MORUKAWA, T.; MATSUDA, H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, as antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 210-214, 2007.

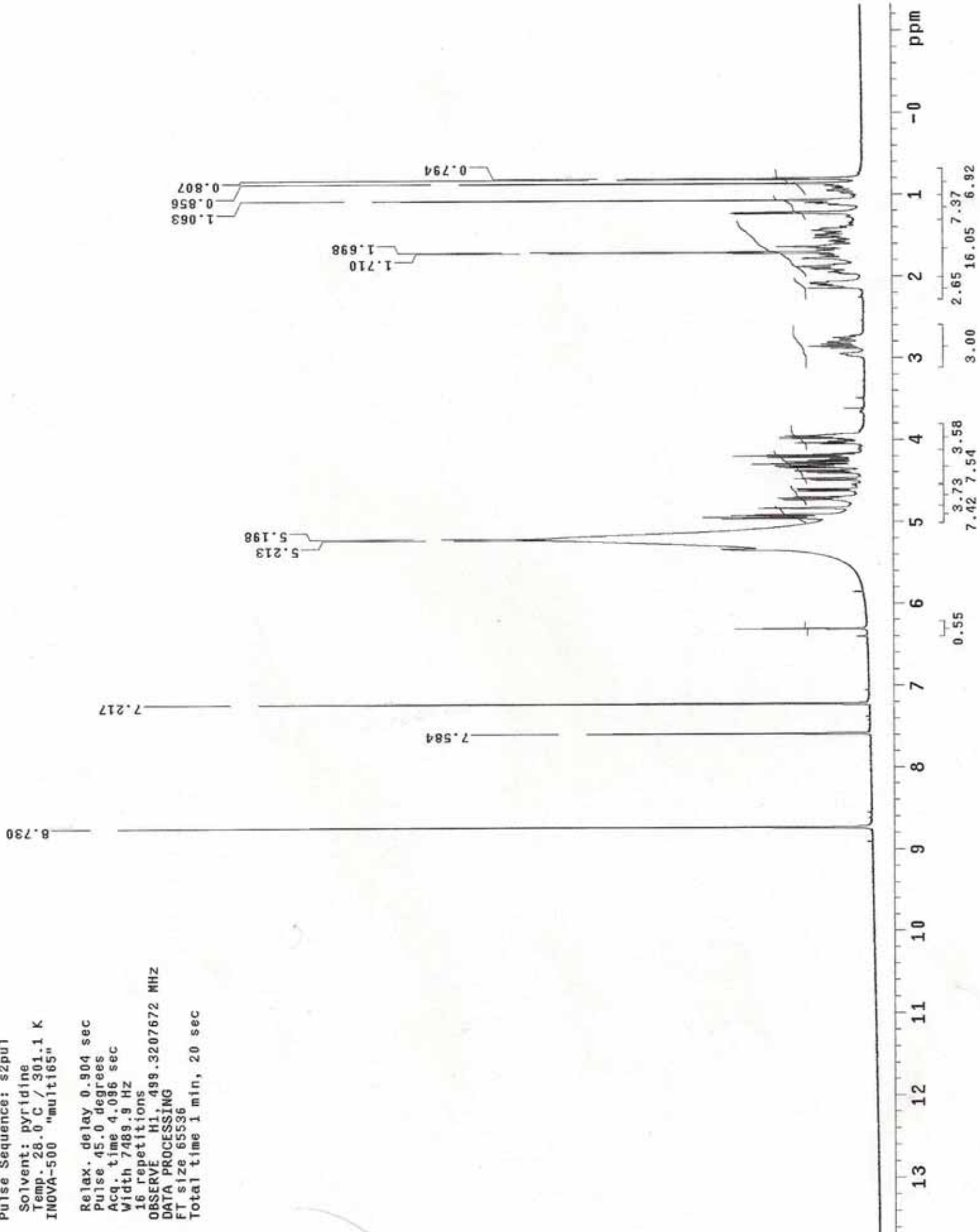
ANEXOS

ANEXO A – RMN ¹H – sub-fração 2.5

Gilmarcio Sn 22/02/2011

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: pyridine
Temp: 28.0 C / 301.1 K
INOVA-500 "multis05"

Relax. delay 0.904 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 4.086 sec
Width 7489.9 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1 499.3207672 MHZ
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 1 min, 20 sec



ANEXO B – RMN ¹H – sub-fração 2.7

Gilmarcio Sg 21/02/2011

Pulse Sequence: s2qul

Solvent: pyridine

Temp. 28.0 C / 301.1 K

INOVA-500 "multif5"

Relax. delay 0.904 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 4.096 sec

Width 7489.9 Hz

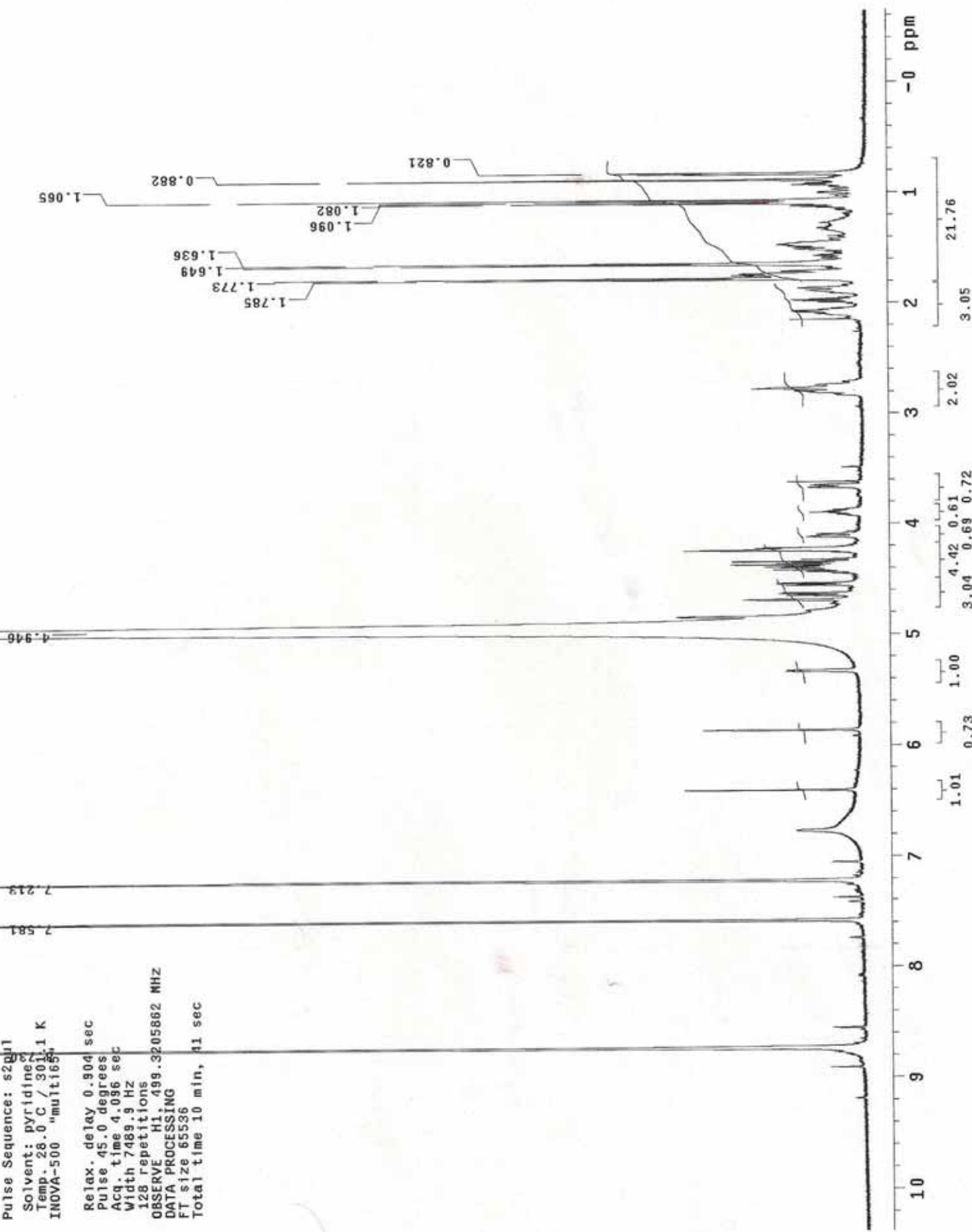
128 repetitions

OBSERVE H1, 499.3205662 MHZ

DATA PROCESSING

FT size 65536

Total time 10 min, 41 sec



ANEXO C – Resumo dos Resultados da Atividade Biológica

TABELA 8.1 – Resumo da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto dos frutos de *S. lycocarpum*, frações e glicocalcóides.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
EB	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FH	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₀	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₁	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₂	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₃	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₄	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
F ₅	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sn	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sn + Sg (1:1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C.P.	S15	S14	S15	S23	S18	S18	S16	S18	S18	S18	S23	S24	S24	S25	S24	S24

R = resistente (ausência de halo de inibição); S = sensível (valor do halo de inibição em mm); EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e C.P. = controle positivo; 1 – *A. flavus*; 2 – *A. niger*; 3 – *B. subtilis*; 4 – *C. albicans*; 5 – *E. faecalis*; 6 – *E. coli*; 7 – *Fusarium* sp; 8 – *L. casei*; 9 – *P. aeruginosa*; 10 – *S. enterica*; 11 – *S. aureus*; 12 – *S. mitis*; 13 – *S. mutans*; 14 – *S. salivarius*; 15 – *S. sanguinis*; 16 – *S. sobrinus*.

TABELA 8.2 – Resumo da atividade biológica do extrato etanólico 96 % (v/v) bruto dos frutos de *S. lycocarpum*, frações e glicoalcalóides.

Amostras	<i>Giardia lamblia</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Leishmania infantum</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Trypanosoma brucei</i> IC ₅₀ (µg/mL)	Atividade Antioxidante (%)	Citotoxicidade IC ₅₀ (µg/mL)
EB	105,40	98,14	194,70	214,55	55,32 ± 0,41	15,65 – 31,25
FH	> 200,00	> 200,00	> 500,00	358,12	37,79 ± 5,26	> 2.000,00
FE	95,05	69,35	119,65	145,12	87,25 ± 0,68	500,00 – 1.000,00
F ₀	> 200,00	> 200,00	> 500,00	418,68	15,54 ± 0,56	31,25 – 62,50
F ₁	22,17	30,84	> 500,00	62,73	26,74 ± 1,29	15,65 – 31,25
F ₂	13,68	25,36	77,10	85,92	32,79 ± 2,24	15,65 – 31,25
F ₃	100,70	16,20	280,80	126,06	21,79 ± 3,99	62,50 – 125
F ₄	> 200,00	> 200,00	> 500,00	246,86	20,20 ± 2,53	250,00 – 500,00
F ₅	> 200,00	> 200,00	> 500,00	202,90	60,17 ± 7,04	500,00 – 1.000,00
Sn	103,70	n.d.	> 100,00	> 100,00	29,32 ± 0,57	31,25 – 62,50
Sg	120,30	n.d.	15,30	> 100,00	25,32 ± 1,02	> 2.000,00
Sn + Sg (1:1)	13,23	16,20	> 100,00	> 100,00	33,58 ± 1,24	125,00 – 250,00
C.P.	0,5	3,1	9,00	2,19	96,28 ± 0,10	

EB = extrato etanólico 96 % (v/v) bruto, FH = fração hexânica, FE = fração etanólica 40 % (v/v), F₀ = fração 0, F₁ = fração 1, F₂ = fração 2, F₃ = fração 3, F₄ = fração 4, F₅ = fração 5, Sn = solasonina, Sg = solamargina, Sn+Sg = mistura de solasonina e solamargina 1:1 e C.P. = controle positivo; n.d. = não determinado (falta de amostra);

ANEXO D – Autorização Ministério do Meio Ambiente



Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior

Número: 31514-1	Data da Emissão: 03/11/2011 18:55
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: GILMARCIO ZIMMERMANN MARTINS	CPF: 303.749.498-08
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE BARRETOS	CNPJ: 44.776.805/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Material, Preparo de Extratos, Purificação e Isolamento dos glicocalcólides	10/2011	10/2015
2	Avaliação das Atividades Biológicas e Atividade Citotóxica	04/2012	10/2015

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Outras espécies do gênero <i>Solanum</i> que estiverem listadas como ameaçadas de extinção pela IN MMA No.6 de 2008 precisarão de licença específica para que sejam coletadas.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BARRETOS	SP	Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Solanum</i>

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas, Frutos/estróbilos
2	Método de captura/coleta (Plantas)	Coleta manual

Este documento (Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64292625





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior

Número: 31514-1	Data da Emissão: 03/11/2011 18:55
------------------------	--

Dados do titular

Nome: GILMARCIO ZIMMERMANN MARTINS	CPF: 303.749.498-08
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE BARRETOS	CNPJ: 44.776.805/0001-05

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Ciências Farmacêuticas	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64292625





Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior

Número: 31514-1	Data da Emissão: 03/11/2011 18:55
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: GILMARCIO ZIMMERMANN MARTINS	CPF: 303.749.498-08
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE BARRETOS	CNPJ: 44.776.805/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64292625



ANEXO E – Artigos Publicados

Optimization of Extraction Conditions and Antioxidant Activity of *Solanum lycocarpum* Fruits

^{1,3}G.Z. Martins, ¹A.N. dos Santos, ¹M.V. Ribeiro Vilela,

¹M. de Carvalho Ferreira, ²W. Pereira de Oliveira and ³R.R. Duarte Moreira

¹University Center of the Educational Foundation of Barretos, Barretos, São Paulo State, Brazil

²Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil

³Department Natural Active Principles and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, State University Paulista, Araraquara, São Paulo State, Brazil

Abstract: Antioxidants are substances that may protect cells from the damage caused by unstable molecules known as free radicals. The capacity of natural antioxidant from phytochemical has increase attention from researchers and public. However, the extraction process is affecting the activity and the bioavailability of bioactive compounds. The *Solanum lycocarpum* is a plant of the Brazilian “cerrado”, popularly used as a hypoglycemic, hypocholesterolemic and control of metabolic diseases. Its effects are attributed to the presence of several glycoalkaloids (solamargine, solasonina) and solasodine. Therefore, the purpose of this communication was, investigate the optimization of extraction condition and evaluation of antioxidant activity from fruits of *Solanum lycocarpum*. The extracts were obtained using different solvent systems, i.e., water, 50% ethanol, ethanol absolute and ethyl ether (1:10 and 1:20) and different extraction processes: maceration with constant agitation at room temperature, maceration with constant agitation and heating at 30°C and ultrasound. The extracts were characterized by the amount of material extracted (1, 6 and 24 h) and the action of antioxidant activity by DPPH method. The results showed that the polar solvent (50% ethanol) and extractive process maceration with agitation to ambient temperature showed higher contents of extractable of fruits of *S. lycocarpum* (3.4 g %) and also showed higher antioxidant activity (88.57±2.41% de inhibition). This action whether the presence of glycoalkaloids (solamargine, solasonine and solasodine) in fruits *S. lycocarpum* which are polar compounds and may explain this increased antioxidant action of this extract.

Key words: Antioxidant activity, solanaceae, *Solanum lycocarpum*, glycoalkaloids, solasodine, cerrado

INTRODUCTION

The Solanaceae family is characteristically ethnobotanical, that is, extensively utilized by humans and comprises more than 2000 species many of which evolved in the Amazonian regions of South America and Cerrado. It is an important source of food, spice and medicine. Solanaceae are known for possessing a diverse range of alkaloids, steroids free or as glycosides, secondary metabolites structurally diverse and complex. These compounds and in general, are of therapeutic interest since they exhibit a wide range of activities such as cytotoxicity, anticancer, anti-inflammatory antiulcerogenic and molluscicide (Cruz, 1982).

Solanum lycocarpum A. St. Hil, is a species belonging to family Solanaceae and popularly known as “fruta-do-lobo”, “lobeira” or “jurubebã”, is a Brazilian

plant, of the Cerrado, predominantly in the Southeast and Midwest of the Brazil. The fruit of lobeira is a food source for mammals, especially during the dry season when the availability of other fruits are scarce (Motta *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2003). The fruits are used in folk medicine as a calming, sedative, antiepileptic, antispasmodic (Cruz, 1982; Lorenzi, 1991) and anti-inflammatory (Vieira Jr. *et al.*, 2003). However, the main popular use is for the treatment of diabetes and obesity, reducing cholesterol levels (Yoshikawa *et al.*, 2007). Lobeira powder solution is also used by people to treat diabetes. Chemical investigations of *Solanum* species have revealed the presence of glycoalkaloids mainly solamargine, solasonine and solasodine (Motidome *et al.*, 1970; Haragushi *et al.*, 1978; Kerber *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 2005) in the fruits of *S. lycocarpum*.

Corresponding Author: Gilmarcio Zimmermann Martins, University Center of the Educational Foundation of Barretos, Roberto Frade Monte, 389, CEP 14783-226, Barretos, São Paulo State, Brazil

Glycoalkaloids are a group of nitrogen-containing compounds that are naturally produced in various cultivated and ornamental plant species of the Solanaceae family. This large family of plants includes commonly consumed vegetables such as potatoes, tomatoes, eggplants and peppers. Glycoalkaloids may have evolved in selected plant species to protect against predators and pathogens such as bacteria, fungi, viruses, insects and animals. Glycoalkaloids also impart certain flavors in some plants (Sun *et al.*, 2010; Milner *et al.*, 2011).

So as to, when trying to extract the chemical components of a plant is necessary establishment of parameters to an optimal extraction. Several extraction methods are used to obtain extracts and the method used is normally dependant on what type of botanical material that is being used (Vinatoru, 2001). Depending on the nature of the extraction process, the temperature, pH, time, agitation, particle size of drug, polarity of extractor liquid could have an effect on the yield and selectivity. When you want to test the biological activity of medicinal plants is necessary to ensure that its chemical components have been extracted and preferably in larger quantities (Wang and Weller, 2006; Dai and Mumper, 2010).

An antioxidant is a molecule capable of inhibiting the oxidation of other molecules. Oxidation is a chemical reaction that transfers electrons from a substance to an oxidizing agent. Oxidation reactions can produce free radicals. In turn, these radicals can start chain reactions. When the chain reaction occurs in a cell, it can cause damage or death. Antioxidants terminate these chain reactions by removing free radical intermediates and inhibit other oxidation reactions (Hamid *et al.*, 2010). Antioxidants are compounds which, when present in low (Beer *et al.*, 2002). concentrations compared to oxidizable substrates, can quench free radicals and significantly delay or inhibit oxidation of the substrate and protect biological systems against potential harmful effects of free radicals (Armao, 2000; Diplock *et al.*, 1998). Natural antioxidants can be phenolic compounds (tocopherols, flavonoids, anthocyanins and phenolic acids), nitrogen compounds (alkaloids, chlorophyll derivatives, amino acids and amines) or carotenoids, as well as vitamins C and E and phospholipids (Hudson, 1990; Shahidi, 2002). Most of these antioxidant compounds are present in foods as endogenous constituents and are referred to as dietary antioxidants (Siddhuraju *et al.*, 2002). The Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences (NRC, 1989) defined a dietary antioxidant as a substrate in foods that significantly decreases the adverse effects of free radicals such as Reactive Oxygen Species (ROS), Reactive Nitrogen Species (RNS) or both on normal physiological function in humans. Free radicals are

molecules or molecular fragments containing one or more unpaired electrons. The presence of unpaired electrons confers a considerable degree of reactivity to free radicals (Valko *et al.*, 2004). Free radicals are ubiquitous in the body and can be generated by normal physiological processes, including aerobic metabolism and inflammatory responses, to eliminate invading pathogenic microorganisms (Hussain *et al.*, 2003). Reactive oxygen species can be produced from endogenous sources such as mitochondria, cytochrome P450 metabolism, peroxisomes and inflammatory cell activation (Inoue *et al.*, 2003). Trosznska *et al.* (2002) reported that imbalance between ROS/RNS and antioxidant defense systems may lead to chemical modification of biologically relevant macromolecules like DNA, proteins, carbohydrates or lipids. To avoid such modifications, antioxidants inhibit oxidation of these molecules and prevent initiation of oxidizing chain reactions (Klein and Kurilich, 2000; Velioglu *et al.*, 1998). They scavenge free radicals by donation of an electron or hydrogen atom or by deactivation of prooxidant metal ions and singlet oxygen (Shahidi, 2002). Therefore, the purpose of this communication was to obtain the optimal extraction and antioxidant activity of *S. lycocarpum*.

MATERIALS AND METHODS

Samples and reagents: The ripe fruits of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil, were collected from at Barretos (São Paulo State, Brazil) (S20°34'15.898"-W48°34'29.989"), in October and November, 2007. A voucher specimen (number SPFR 11.308) is deposited in the Herbarium, Department of Biology of the University of São Paulo-FFCLRP/USP.

Selection of extraction conditions: Ripe fruits of *S. lycocarpum* were dried at 40°C. Dried fruits of *S. lycocarpum* were subjected to different solvent systems, i.e., water, 50% ethanol, ethanol absolute and ethyl ether (1:10 and 1:20) and different extraction processes: maceration with constant agitation at room temperature, maceration with constant agitation and heating at 30°C and ultrasound. Extracts were filtered and concentrated under vacuum. We analyzed three times of extraction, with the aim of assessing the amount of material extracted and 1, 6 and 24 h.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay: The antioxidant activity of extracts, on the basis of the scavenging activity of the stable DPPH free radical (DPPH), was determined following a previously described method by Andrade *et al.* (2007). For these assays the

extracts were evaluated at concentrations at 1, 5, 10 and 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The radical scavenging effect of each sample was calculated and compared with that rutin (0, 5 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Appropriately diluted extracts of *S. lycocarpum* fruits and rutin (each 3.0 mL) were added to 0.1 mL of methanolic solution of DPPH 1 mM. A control sample was placed under same conditions. The resulting was placed, after 30 min, in a Hitachi (Tokyo, Japan) U-2000 UV-visible spectrophotometer for measurement of absorbance at 517 nm and the decrease in the absorbance was noted until the concentration of DPPH reached 50%. The remaining concentration of DPPH in the reaction medium was calculated from a standard calibration curve. All tests were conducted in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

In recent decades, there has been an increasing worldwide interest in the use of medicinal plants and herbal medicines for the cure, prevention and treatment of various diseases. However, problems relating to the quality of the vegetable raw material such as extracts, does not appear to be fully resolved, leading to products with a variation of the effectiveness, safety and quality (Maria *et al.*, 2006; Coradi *et al.*, 2011).

The study of the extraction procedure is important because of changes in conditions that determine the quality and extraction yield of individual chemical constituents extractable (Hinneburg and Neubert, 2005).

The use of planning extraction of plant material plays a central role in the development and modernization of processes standardized medicinal plants preparations. This study evaluated of the best extractor liquid extraction and/or liquid binary mixtures of solvents at different concentrations of ethanol-water extraction to glycoalkaloids. The results indicated that all ratios tested could effectively extract glycoalkaloids but we were in search of the best ratio ethanol: water for much extraction of glycoalkaloids from fruits of *S. lycocarpum*. The results showed that 50% ethanol was the most effective proportion, significantly increasing the extraction of glycoalkaloids.

The optimized conditions for the extraction of glycoalkaloids, in terms of better liquid extracts for the species studied, was carried out using various processes already described in the literature (Vaananen *et al.*, 2000; Alt *et al.*, 2005; Cataldi *et al.*, 2005).

Other authors have optimized extraction conditions for various medicinal plants and so could concentrate on extracts good amount of active (Luthria, 2006; Gribova *et al.*, 2008; Uma *et al.*, 2010; Pawar and Surana, 2010).

The optimization process involves the extraction under various conditions such as extraction temperature, comparison between different methods and liquid extracts (alcohol at various dilutions, addition of surfactants to the solutions mixed alcohol-water or water). As we have seen, there are a number of factors affecting extraction performance that interfere in solvent optimization. The selection of extractor liquid is often a neglected part of production of vegetables extracts because that importance not well understood and generally errors occur in your choice damaging the process of extraction of active principles. Therefore the optimizations of extraction conditions are important in the preparation of the extracts, mainly related to the choice of the extractor liquid (Vinatoru, 2001; Wang and Weller, 2006; Dai and Mumper, 2010). This article describes important parameters that should be considered when optimizing extraction systems for *S. lycocarpum*.

The results (Fig. 1) demonstrated that the extracts obtained by larger polarity solvents showed higher levels of the extractives compared to the solvent of low polarity (diethyl ether), that showed the lowest percentage of extractives (0,06 g %). The polar solvent which extracted largest quantity of substances of fruits of *S. lycocarpum* (3,4 g %), was 50% ethanol, using the extraction process of maceration and agitation without heating.

When comparing the relationship between the amount of plant and solvent, it was observed that the lower this ratio, the higher extractive content are obtained, as can be seen in Fig. 1.

The same trend was observed for the other extractive techniques used maceration with stirring and heating and ultrasound but with less income and quarrying (Fig. 1). The heating during the extraction process does not seem to have affected significantly the extraction of active compounds, since the literature reports the presence of glycoalkaloids in fruits of *S. lycocarpum* and this class of substances is stable at temperatures used in extraction processes of this work.

DPPH scavenging activity: The antioxidant activity of extracts of fruits, based on free scavenging, was determined by the method described by Andrade *et al.* (2007). After determining the volumes required for 50% inhibition of DPPH free radical, can be seen that for the extract obtained by the technique of maceration with agitation and temperature, using a mixture of water and ethanol had a higher proportion of 1:1 DPPH inhibition (90%) and the lowest percentages of inhibition were presented by the ether extract (45%), as shown in Fig. 2a.

The results of the antioxidant activity of hydroalcoholic extract 1:1 obtained by the technique of

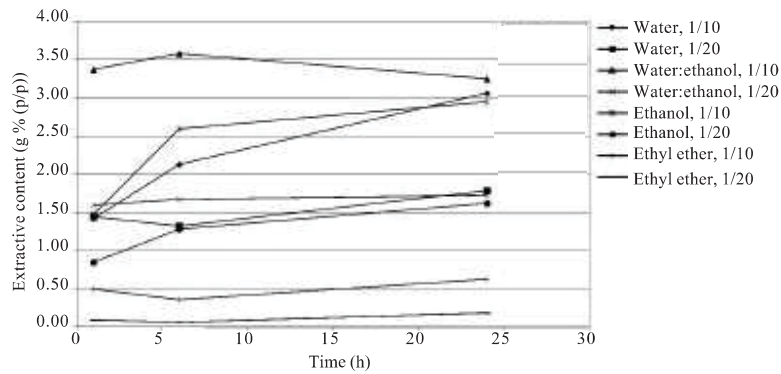


Fig. 1: Relation of the amount of extractives content compared with solvents and solvent:plant proportion using the technique of maceration with agitation and temperature

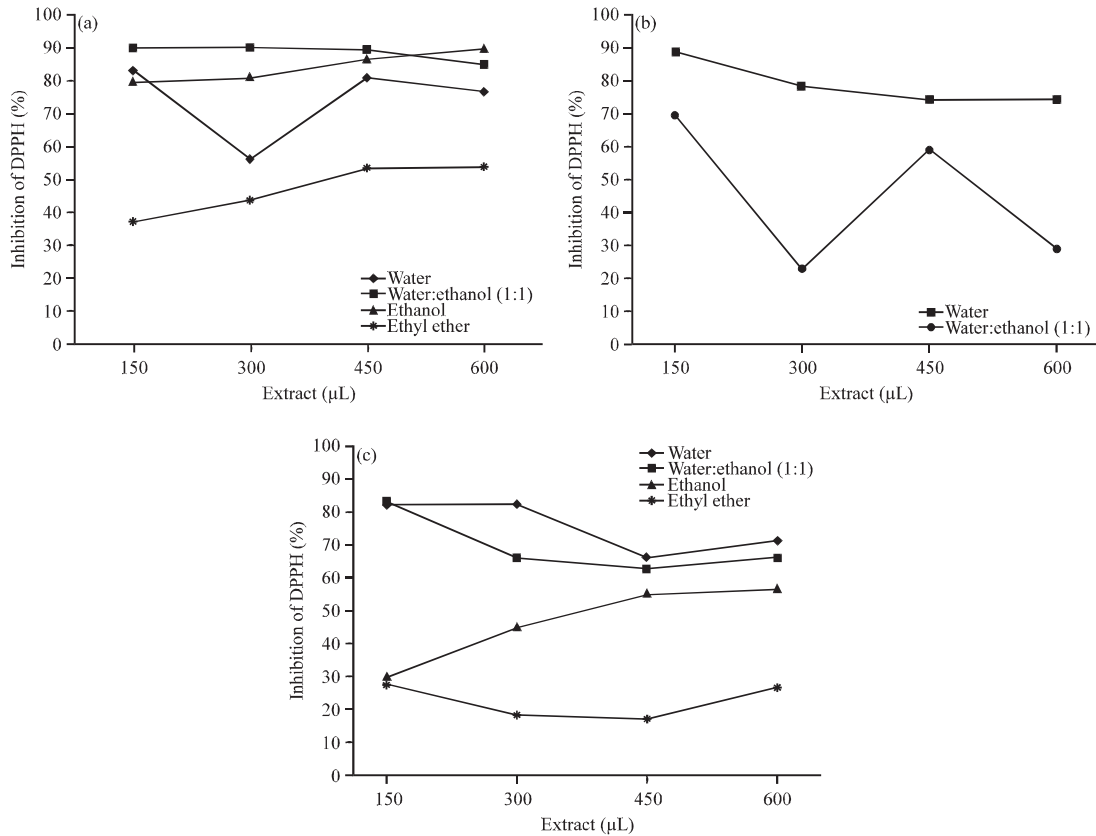


Fig. 2(a-c): Relation of percentage inhibition of DPPH radical and the volume of extract used in the analysis, (a) Technical maceration with agitation and room temperature, (b) Technical maceration with agitation and heating at 60°C and (c) Technical ultrasound

maceration with agitation and heated to 60°C are shown in Fig. 2b. Studies show that the oxidation process is accelerated when the temperature increase (Silva *et al.*,

1999; Gribova *et al.*, 2008), the results showed that using a temperature of 60°C for the production of crude extracts with 50% ethanol, these antioxidants are oxidized during

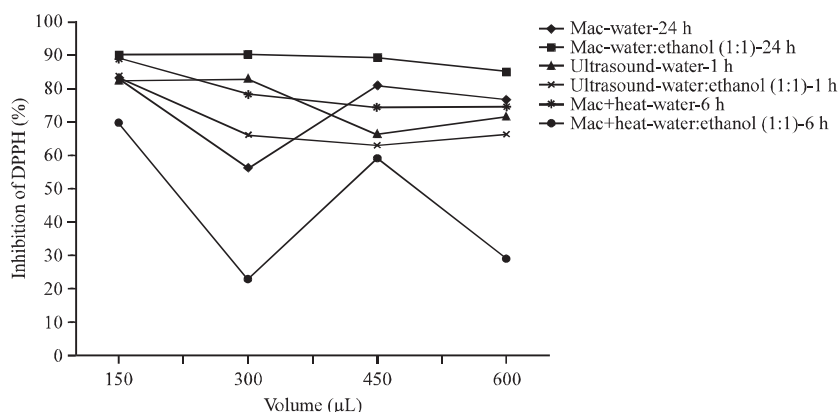


Fig. 3: Relation of percentage inhibition of DPPH radical and the volume of extracts obtained from different extraction techniques

the extraction process thereby reducing the antioxidant effect when compared with the technique of maceration without heating.

In Fig. 2c which represents the antioxidant activity of extract obtained by the ultrasound technique, one can observe that all results were below those obtained with the extracts obtained by maceration with stirring and without heating (Fig. 2a, b), showing that in this specific case, this technique has not proved suitable for obtaining extracts with antioxidant potential.

As can be seen in Fig. 3, the extract showed higher antioxidant activity was obtained by maceration with agitation at room temperature and ethanol-water mixture 1:1 (v/v) as extraction liquid and extraction time from 1 to 6 h and a relationship of equals' 1:10 plant solvent.

The fact of the presence of glycoalkaloids (solamargine, solasonine and solasodine) in fruits *S. lycocarpum* which are polar compounds, may explain this increased antioxidant action of this extract which is probably related to the extraction of these substances in larger amounts and may be responsible for this action.

CONCLUSION

The optimized condition for the extraction of glycoalkaloids *S. lycocarpum* was 50% ethanol by maceration. In this context, experiments like this can be extended to evaluate the extraction process other medicinal plants belonging to family Solanaceae. From the present study, can also conclude, that *S. lycocarpum* is an important source of natural antioxidants with good free radical scavenging and radical scavenging capacities. It may employed for treatment of various diseases and provide the development of products

with antioxidant with possible applications in the pharmaceutical and food industries.

ACKNOWLEDGMENT

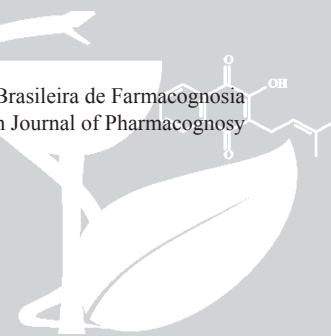
We are grateful to University Center of the Educational Foundation of Barretos-UNIFEB, São Paulo State, Brazil, for financial support.

REFERENCES

- Alt, V., R. Steinhof, M. Lotz, R. Ulber, C. Kasper and T. Scheper, 2005. Optimization of glycoalkaloids analysis for use in industrial potato fruit juice downstreaming. *Eng. Life Sci.*, 5: 562-567.
- Andrade, C.A., C.K. Costa, K. Bora, M.D. Miguel, O.G. Miguel and V.A. Kerber, 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity evaluation of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. *Cunn. ex G. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae Don, Leguminosae-Mimosoideae. Braz. J. Pharmacogn.*, 17: 231-235.
- Arao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11: 419-421.
- Beer, D., E. Joubert, W.C.A. Gelderblom and M. Manley, 2002. Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *Afr. J. Enol. Vitic.*, 23: 48-61.
- Cataldi, T.R., F. Lelario and S.A. Bufo, 2005. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 3103-3110.

- Coradi, P.C., A.F.L. Filho and E.C. Melo, 2011. Quality of raw materials from different regions of Minas Gerais State utilized in ration industry. *Rev. Bras. Eng. Agri. Ambient*, 15: 424-431.
- Cruz, G.L., 1982. Dictionary of Useful Plants Brazil. Brazilian Civilization, Sao Paulo state, Brazil, Pages: 360.
- Dai, J. and R.J. Mumper, 2010. Plant phenolic extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties: Review. *Molecules*, 15: 7313-7352.
- Diplock, A.T., J.L. Charleux, G. Crfozier-Willi, F.J. Kok and C. Rice-Evans *et al.*, 1998. Functional food science and defense against reactive *Oxygen* species. *Br. J. Nutr.*, 80: S77-S112.
- Elias, S.R.M., R.M. Assis, E. Stacciarini-Seraphin and M.H. Rezende, 2003. Leaf anatomy in young plants of *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). *J. Bot.*, 26: 169-174.
- Gribova, N.Y., T.A. Filippenko, A.N. Nilolaevskii, N.I. Belaya and A.A. Tsybulenko, 2008. Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from solid parts of medicinal plants. *J. Anal. Chem.*, 63: 1034-1037.
- Hamid, A.A., O.O. Aiyelaagbe, L.A. Usman, O.M. Ameen and A. Lawal, 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Afr. J. Pure Applied Chem.*, 4: 142-151.
- Haragushi, M., R.T. Uchimura, M. Motidome and A.B. Gottlieb, 1978. Aproveitamento dos esteroides dos frutos da lobeira [Use of steroids in the fruits of lobeira]. *Sci. Cult.*, 32: 81-82.
- Hinneburg, I. and R.H.H. Neubert, 2005. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *J. Agr. Food. Chem.*, 53: 3-7.
- Hudson, B.J.F., 1990. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science, London, pp: 1-18, 193-200.
- Hussain, S.P., L.J. Hofseth and C.C. Harris, 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 276-285.
- Inoue, M., E.F. Sato, M. Nishikawa, A.M. Park, Y. Kira, I. Imada and K. Utsumi, 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.*, 10: 2495-2505.
- Kerber, V.A., O.G. Miguel and E.A. Moreira, 1993. Qualitative assessment of alkaloids in three species of *Solanum*-Solanaceae (*S. grandiflorum*, *S. lacerdae* e *S. lycocarpum*) emphasis on Solasodine. *Rev. Bras. Farmacog.*, 74: 67-69.
- Klein, B.P. and A.C. Kurilich, 2000. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 35: 580-584.
- Lorenzi, H., 1991. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Sao Paulo State, Brazil.
- Luthria, D.L., 2006. Application of green chemistry principles for extraction of phytolipids and phenolic compounds. *Indian J. Chem.*, 45: 2291-2296.
- Maria, T.F., Bara, P.A.M. Ribeiro, M. Do, C.B. Arantes, L. Ley, S.S. Amorim and J.R. de Paula, 2006. Determinacao do teor de principios ativos em materias-primas vegetais. *Braz. J. Pharmacog.*, 16: 211-215.
- Milner, S.E., N.P. Brunton, P.W. Jones, N.M. O'Brien, S.G. Collins and A.R. Maguire, 2011. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 3454-3484.
- Motidome, M., M.E. Leeking and O.R. Gottlieb, 1970. Chemistry of Brazilian Solanaceae presence of solamargine and solasonine in jua and lobeira. *An. Acad. Brasil Cien.*, 42: 375-376.
- Motta, S., M.O. Guerra, V.M. Peter and J.E.P. Reis, 2002. Administration of Sprinkles lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) to lactating rats: Physical development of young. *Rev. Lecta.*, 20: 53-60.
- NRC, 1989. Recommended Dietary Allowances. 10th Edn., National Academic Press, Washington, DC., USA., ISBN: 9780309046336, Pages: 302.
- Pawar, C.R. and S.J. Surana, 2010. Optimizing conditions for gallic acid extraction from *Caesalpinia decapetala* wood. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23: 423-425.
- Shahidi, F., 2002. Antioxidants in Plants and Oleaginous Seeds. In: Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition and Health Effects, Morello, M.J., F. Shahidi and C.T. Ho (Eds.). American Chemical Society, Washington DC., USA., pp: 162-175.
- Siddhuraju, P., P.S. Mohan and K. Becker, 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem, bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chem.*, 79: 61-67.
- Silva, F.A.M., M.F. Borges and M.A. Ferreira, 1999. Metodos para avaliacao do grau de oxidacao lipidica e da capacidade antioxidante [Methods for assessing the degree of lipid oxidation and antioxidant capacity]. *Quim. Nova*, 22: 94-103.
- Sun, F., S. Li, D. He, G. Cao, X. Ni, G. Tai, Y. Zhou and D. Wang, 2010. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. *Phytochemistry*, 71: 1534-1538.
- Trosznska, A., I. Estrella, M.L. Lopez-Amores and T. Hernandez, 2002. Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) seed coat acetone extract. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 35: 158-164.

- Uma, D.B., C.W. Ho and W.M.W. Aida, 2010. Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. *Sains Malaysiana*, 39: 119-128.
- Vaananen, T., P. Kuronen and E. Pehu, 2000. Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids. *J. Chromatogr. A*, 869: 301-305.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes and J. Telser, 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266: 37-56.
- Velioglu, Y.S., G. Mazza, L. Gao and B.D. Oomah, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4113-4117.
- Vieira Jr., G., P.M. Ferreira, L.G. Matos, E.C. Ferreira and W. Rodovalho *et al.*, 2003. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. *Phytother. Res.*, 17: 892-896.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochem.*, 8: 303-313.
- Wang, L. and C.L. Weller, 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 17: 300-312.
- Yoshikawa, M., S. Nakamura, K. Ozaki, A. Kumahara, T. Morikawa and H. Matsuda, 2007. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. *J. Natl. Prod.*, 70: 210-214.
- Yoshikawa, M., T. Morikawa, K. Yamamoto, Y. Kato, A. Nagatomo and H. Matsuda, 2005. Flora the saponins A-C, Acylated Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides with Anti-hyperlipidemic Activities from Flowers of the Tea Plant (*Camellia sinensis*). *J. Nat. Prod.*, 68: 1360-1365.



Aop13112

Received 5 Oct 2012
Accepted 13 Oct 2012

Keywords:
flavonoids
Mycobacterium
naphthopyranone
Paepalanthus spp

ISSN 0102-695X

***Paepalanthus* spp: Antimycobacterial activity of extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions**

Raquel R. D. Moreira,¹ Gilmarcio Z. Martins,¹ Rosemeire C. L. R. Pietro,¹ Daisy N. Sato,¹ Fernando R. Pavan,¹ Sergio R.A. Leite,² Wagner Vilegas,² Clarice Q. F. Leite¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo, Brazil,

²Instituto de Química, Universidade do estado de São Paulo, Brazil.

Abstract: *Paepalanthus* spp., Eriocaulaceae, are native plants from Brazil known as "sempre-vivas" (everlasting flowers). In this work, we evaluated the potential anti-mycobacterial activity of two methoxylated flavonoids (flavonoid 7-methylquercetaetin and 7-methylquercetaetin-4'-O-β-D-glucopyranoside) isolated and identified from *P. latipes* and the naphthopyranone fractions from *P. bromeliodes* ethanolic extracts. The MIC value of 500 µg/mL was verified for all compounds tested against *M. tuberculosis* H37Rv. For *M. avium*, the MIC value ranged from 1000-2000 µg/mL excepting to naphthopyranone fractions with MIC of 500 µg/mL. This is the first report of activity determination of *Paepalanthus* spp. flavonoids activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium*.

Introduction

Tuberculosis still remains an important public health problem worldwide, accounting for eight million new cases per year (WHO, 2007). The agent of tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* kills nearly three million people a year throughout the world. Despite improvements in chemotherapy, tuberculosis is severely affected by the development of multi-resistant strains to drugs that are commonly used to treat the disease (WHO, 2007). The treatment of infections caused by other opportunistic environmental *Mycobacterium* species as *M. avium* is difficult, due their intrinsic resistance to a wide range of medications (Nuermberger & Grosset, 2004). Most *Mycobacterium* species are resistant to isonicotinic acid hydrazide (isoniazid), one of the most used therapeutic agents for the treatment of tuberculosis (Chung et al., 2006; Zhang et al., 1992). These challenges have motivated the research of novel antimycobacterial agents to reduce the global burden of tuberculosis and have been discussed in the current biomedical literature (Wilkinson et al., 2007; Pavan et al., 2009; Higuchi et al., 2011, Ma et al., 2010).

Natural products and/or their semi-synthetic derivatives can lead to novel antimycobacterial drugs and may have important role in the chemotherapy of tuberculosis. The literature reports the antimycobacterial activity of many classes of natural products such as alkanes, phenolics, acetogenic quinones, flavonoids, and

triterpenes (Pauli et al., 2005; Copp & Pearce, 2007).

Eriocaulaceae is a pantropical, predominantly herbaceous monocotyledonous family, comprising around 1400 species in ten genera (Giulietti et al., 2012). Plants of this family are known as "everlasting flower" ("sempre-vivas" in Portuguese, since they maintain their appearance and color after drying) and they can be found in "Campos Rupestres" vegetation in Brazil. These plants are exported to Europe, Japan and North America as an ornamental flower, representing an important source of income to the population of Minas Gerais State, Brazil (Giulietti et al., 2012).

Taxonomic studies to delimit the genus, about which there is still some confusion, and the biological investigation into the isolated molecules of Eriocaulaceae, are of great importance, because several molecules possess antioxidant actions (Santos et al., 2003), citotoxic and mutagenic activities (Moreira et al., 2002), macrophage activation (Moreira et al., 2001).

This study aimed to evaluate the antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* and *M. avium* of the two flavonoids (6-hydroxy-7-methoxyquercetin (**1**) and 6-hydroxy-7-methoxyquercetin-4'-O-β-D-glucopyranoside (**2**) from 96% crude ethanolic extract from *P. latipes* and the naphthopyranone fractions obtained from *P. bromeliodes*.

Material and Methods

Plant material

Paepalanthus spp., Eriocaulaceae, were collected at Serra do Cipó, Minas Gerais State, Brazil, and authenticated by Prof. Paulo Takeo Sano. Voucher specimens of *Paepalanthus latipes* Silveira (SPF/CFSC 13846) and *P. bromelioides* Silveira (SPF/CFSC 13856), were deposited at the Herbarium of the Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil.

Preparation and fractionation of extracts and isolation of compounds

The aerial parts of the *P. latipes* and *P. bromelioides* were dried in an oven with air circulation, at 60 °C for seven days, and then powdered. The dry powders were macerated (528 g of *P. latipes* and 500 g of *P. bromelioides*) for one week, at room temperature, with 96% ethanol. The macerates were filtered and evaporated at 60 °C under reduced pressure, resulting in 11 g of the dry extract of *P. latipes* and 8 g of *P. bromelioides*. The extracts were fractionated by gel permeation column Sephadex LH-20 (Pharmacia) and 96% methanol as eluent, resulting in 110 fractions for *P. latipes* and 150 fractions for *P. bromelioides*. Naphthopyranone fractions were identified by thin layer chromatography (mobile phase: CHCl₃:MeOH:H₂O, 43:37:20 v/v/v, developer: NP/PEG and viewing under UV) (Vilegas et al., 1990). The compounds 6-hydroxy-7-methoxyquercetin (**1**) and 6-hydroxy-7-methoxyquercetin-4'-*O*-β-D-glucopyranoside (**2**) were identified by spectroscopic methods (IR, UV, ES-MS, NMR 1D and 2D) (Nehme, 1997).

Mycobacterial strains

Mycobacterium tuberculosis H37Rv ATCC 27294 and *Mycobacterium avium* ATCC 15769 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The mycobacteria were cultured in Middlebrook 7H9 supplemented with 10% OADC and additional 0.05% Tween 80 (to avoid clumps), at 37 °C for 7-10 or 3-5 days, respectively for *M. tuberculosis* and *M. avium*.

Antimycobacterial activity-Determination of in vitro Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The antimycobacterial activity was assessed using the Alamar Blue™ (MABA) method (Collins & Franzblau, 1997). Microplates of 96 wells were used. The wells were filled with different concentrations of extracts and compounds in dimethyl sulfoxide (DMSO),

which varied from 4000 to 250 µg/mL. Isoniazid (Difco, Detroit, MI, USA) was the antimycobacterial drug standard, at concentrations of 0.015-0.50 µg/mL. The tests were performed in triplicate. According to this technique, the MIC of a compound is the concentration that inhibit 90% of the growth of *M. tuberculosis* H₃₇Rv, using Alamar Blue™ (resazurin) as a vital fluorescent dye. The bacterial suspensions were prepared at a concentration equivalent to the turbidity standard of McFarland n° 1 and diluted in the ratio 1:25 in Middlebrook 7H9 Broth. The inoculum was supplemented with 10% OADC. Cultures were incubated for seven days at 37 °C and then added Alamar Blue for reading. A negative control was performed without mycobacteria to confirm the absence of reaction of the tested compounds with the resazurin. The dye fluorescence (indicative of bacterial growth) was measured in a microfluorimeter (Tecan SPECTRAfluor Plus microplate reader), with excitation at 530 nm and emission at 590 nm (Collins & Franzblau, 1997).

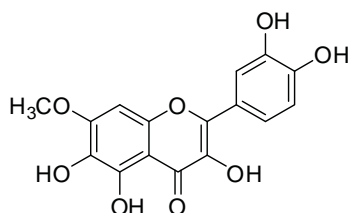
Results

The fractionation and rechromatographed of crude ethanolic extracts in silica gel CC resulted in isolation of two methoxylated flavonoids previously isolated from *P. latipes* (Vilegas et al., 1999) and naphthopyranone fraction from *P. bromelioides*.

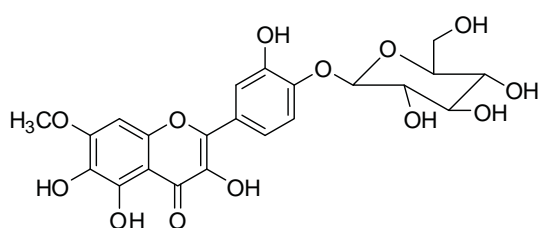
The NMR studies showed that both flavonoids have a methoxy group at position 7, and a hydroxyl group at position 6 which does not occur in quercetin, luteolin and 3-methylquercetin. Besides, this the flavonoid 7-methylquercetagenin (**1**) presents two free hydroxyl at C3' and C4', analogously to the three flavonoids mentioned. The 7-methylquercetagenin (**1**) was identified in fractions 90-102 (9.0 mg) and 7-methylquercetagenin-4'-*O*-β-D-glucopyranoside (**2**) was identified in fractions 69-78 (10.0 mg), as well as in the crude ethanolic extract from *P. latipes*. The results obtained from the ES-MS (70 V, positive mode) confirmed the identification of the flavonoids **1** and **2**, by comparison with the results of Nehme (1997), which also support our NMR data. The naphthopyranones (paepalantine-9-*O*-β-D-glycopyranosyl-(1-6)-β-D-glycopyranoside (**3**), paepalantine-9-*O*-β-D-allopyranosyl-(1-6)-β-D-glycopyranoside (**4**)) were identified in fractions 25-35 (6.5 mg) of the *P. bromelioides* crude ethanolic extract by thin layer chromatography (R_f 0.40 and 0.45) and the results were confirmed using benchmarks according Vilegas et al (1990).

The antimycobacterial activities of the extracts, fractions and flavonoids from *Paepalanthus* spp. and *P. latipes* against *M. tuberculosis* and *M. avium*, using the Alamar Blue assay (MABA), are showed in Table 1. The

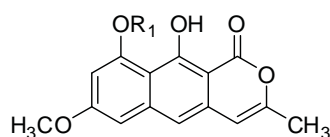
ethanol extracts and isolated compounds tested against *M. tuberculosis* H₃₇Rv showed low activity, with MIC value of 500 µg/mL. *M. avium* was even more resistant to the ethanol extracts and compounds (MIC ranging on 1000-2000 µg/mL), excepting to naphthopyranone fraction, whose MIC was 500 µg/mL.



1



2



3 R₁=Glc-Glc
4 R₁=Alo-Glc

Table 1. Antimycobacterial activity of *Paepalanthus* spp. crude extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fraction.

Samples	<i>M. tuberculosis</i> MIC (µg/mL)	<i>M. avium</i> MIC (µg/mL)
<i>P. latipes</i> 96% ethanolic extract	500	1000
<i>P. bromelioides</i> 96% ethanolic extract	500	2000
7- methylquercetagenin	500	1000
7-methylquercetagenin-4'-O-β-D-glucopyranoside	500	1000
naphthopyranone fraction	500	500

Discussion

Many natural products, including essential oils and phenolic compounds have been extensively tested for antibacterial activity (Friedman et al., 2002; 2003; 2004; 2006).

In this study, the ethanol extract and methoxylated flavonoids (flavonoid 7-methylquercetagenin and 7-methylquercetagenin-4'-O-β-D-glucopyranoside)

from *P. latipes*, and naphthopyranone fractions isolated from *P. bromelioides* ethanolic extract, tested against *M. tuberculosis* and *M. avium*, exhibited no significant antimycobacterial activity, despite their characteristic polyphenolic compounds. The MIC values ranged from 500 µg/mL against *M. tuberculosis* to 1000-2000 µg/mL to *M. avium*, except for naphthopyranone, that presented the same 500 µg/mL MIC against both bacteria.

Tosun et al. (2004) considered inactive the plant extracts that could not prevent growth of *M. tuberculosis* up to concentration of 200 µg/mL. According to Gu et al. (2004), a MIC ≤ 128 mg/mL defines a substance as active against *M. tuberculosis* (Gu et al., 2004). For Cantrell et al. (2001), isolated compounds that exhibit a MIC of 64 µg/mL or lower are considered promising (Cantrell et al., 2001).

Thus, the high MIC value of 500 µg/mL, disqualifies the isolated flavonoids compounds or purified naphthopyranone fractions as promising candidates against *M. tuberculosis* and *M. avium*. The antimycobacterial activity of flavonoids has already been reported by many authors. Lin et al. (2002) described the antimycobacterial activity of 142 synthetic chalcones, flavonoids (including some methoxyflavones) and chalconeslike compounds. Murillo et al. (2003) analyzed fourteen flavonoids from *Derris indica*, including rotenoids and prenylated isoflavones (Murillo et al., 2003). The antimycobacterial methoxyflavones from *Kaempferia parviflora* was also report by Gu et al. (2004). However, according to Castellar et al (2011), in all researches, no correlation on structure-activity of flavonoids against mycobacteria could be drawn. In the opinion of Silva et al. (2009), high lipophilicity of a substance is an important feature for its antimycobacterial activity.

Due to the fact that the cell wall of mycobacteria contain high amount of lipids, such as mycolic acid, lipophilic substances are likely to penetrate more easily into the cell (Palomino et al., 2002). It has been demonstrated for a series of terpenes that the activity improves with the lipophilicity of a given substance, when compared to their more polar analogues (Cantrell et al., 2001). Pavan et al. (2009), from 37 plant extracts analyzed, found sixteen with promising activity, twelve of which were chloroform extracts and only four methanol extracts. The chloroform as extractor agent, could extracts more apolar compounds and the lipophilic nature of those compounds allows them to more easily penetrate the mycobacterial lipid rich cell wall. This probably favors their antimycobacterial activity.

In previous reports, we have described the isolation and structure determination of paepalantine, a naphthopyran-1-one isolated from the chloroform extracts of the capitulae of *Paepalanthus bromelioides*, as well as from *Paepalanthus vellozioides*, with potent

antibiotic effect against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* (Coelho et al., 2000; Kitagawa et al., 2003; Devienne et al., 2005) and also antiviral activities (Cotterill et al., 2003).

In another study, we verified that ethanol extracts of *P. bromeliodes* and *P. latipes* were able to induce innate immune response through the production of high levels of H₂O₂ by mouse peritoneal macrophages (Moreira et al., 2001). Since *M. tuberculosis* can survive inside macrophages, their activation is essential for tuberculosis control. Thus, it is possible that the antimicrobial activity of the tested products, poorly in vitro, may be higher in vivo depending on macrophage activation.

Conclusion

This is the first report of antimycobacterial activity of *Paepalanthus* spp. flavonoids. The results showed that the ethanol extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions exhibited no significant activity against *M. tuberculosis* and *M. avium*. Further, biological studies are needed to verify whether the antituberculosis activity *in vivo* is more intense, since the alcoholic extracts of the plant species studied were shown to be capable of producing macrophage activation.

Acknowledgements

We are thankful to Mr. Nivaldo from the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of the Institute of Chemistry, UNESP, Araraquara-SP, Brazil, for helping in RMN analysis. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ref. Processes: 2008/10390-2 and 2011/11593-7 and CNPq for financial support.

References

- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 67: 685-694.
- Castellar A, Coelho TS, Silva PEA, Ramos DF, Lourenço MCS, Lage CLS, Julião LS, Barbosa YG, Leitão SG 2011. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Rev Bras Farmacogn* 21: 835-840.
- Chung MJ, Lee KS, Koh WJ, Kim TS, Kang EY, Kim SM, Kwon OJ, Kim S 2006. Drug-sensitive tuberculosis, multidrug-resistant tuberculosis and nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in non AIDS adults: comparisons of thin-section CT findings. *Eur Radiol* 16: 1934-1931.
- Coelho RG, Vilegas W, Devienne KF, Raddi MS. 2000. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. *Fitoterapia* 71: 497-500.
- Collins LA, Franzblau SG 1997. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Ch* 41: 1004-1009.
- Copp BR, Pearce NA 2007. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep* 24: 278-297.
- Cotterill AS, Donner CD, Gill M, White JM 2003. Pigments of fungi. Part 70. Total synthesis of (R)-semixanthomegnin and the X-ray crystal structure of (+/-)-7-chloro-10-methoxy-3-methyl-3, 4-dihydro-1H-naphtho 2,3-c pyran-1,6,9-trione. *Aust J Chem* 56: 49-57.
- Devienne KF, Raddi G, Coelho RG, Vilegas W. 2005. Structure-antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. *Phytomedicine* 12: 378-381.
- Friedman M, Buick R, Elliott CT 2004. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic-resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *J Food Protect* 67: 1774-1778.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE, Kozukue N. 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J Food Protect* 69: 354-361.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Protect* 65: 1545-1560.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Protect* 66: 1811-1821.
- Giulietti AM, Andrade MJG, Scatena VL, Trovó M, Coan A I, Sano PT, Santos F AR, Borges R LB, van den Berg C 2012. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. Filogenia molecular, morfologia e suas implicações para a taxonomia de Eriocaulaceae. *Rodriguésia* 63: 1-19.
- Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN 2004. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med* 70: 509-514.
- Higuchi CT, Sannomiya M, Pavan FR, Leite SRA, Sato DN, Franzblau SG, Sacramento LVS, Vilegas W, Leite CQF 2008. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. eCAM, doi:10.1093/ecam/nen077.
- Kitagawa RR, Raddi MS, Khalil NM, Vilegas W, da Fonseca LM. 2003. Effect of the isocoumarin

- paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. *Biol Pharm Bull* 26: 905-908.
- Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. 2002. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem* 10: 2795-2802.
- Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, Nunn AJ, Wang X. 2010. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet* 375: 2100-2109.
- Moreira R, Carlos I, Vilegas W 2001. Macrophage activation by *Paepalanthus* spp. Euriocaulaceae. *Rev Bras Farmacogn* 9: 37-42.
- Moreira RRD, Santos LE, Varella SD, Varanda EA, Vilegas W 2002. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. *Rev Bras Farmacogn* 12: 11-19.
- Murillo JI, Encarnación-Dimayuga R, Malmström J, Christophersen C, Franzblau SG. 2003. Antimycobacterial flavones from *Haplopappus sonorensis*. *Fitoterapia* 74: 226-230.
- Nehme C 1997 *Estudo químico de plantas da família Eriocaulaceae-Escapos*. P. bromelioides e P. latipes. (Master). Natural Products, São Paulo State University, Faculty of Pharmaceutical Sciences.
- Nuermberger E, Grosset J 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections. *Eur J Clin Microbiol* 23: 243-255.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Portaels F 2002. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch* 46: 2720-2722.
- Pauli GF, Case RJ, Inui T, Wang Y, Cho S, Fischer NH, Franzblau SG 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci* 78: 485-494.
- Pavan FR, Sato DN, Higuchi CT, Santos ACB, Vilegas W, Leite CQE 2009. *In vitro* anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian "Cerrado" plants. *Rev Bras Farmacogn* 19: 204-206.
- Santos LC, Piacente S, Montoro P, Pizza C, Vilegas W 2003. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Euriocaulaceae). *Rev Bras Farmacogn* 13: 67-74.
- Silva ML, Martins CH, Lucarini R, Sato DN, Pavan FR, Freitas NH, Andrade LN, Pereira AC, Bianco TN, Vinholis AH, Cunha WR, Bastos JK, Silva R, Da Silva Filho AA 2009. Antimycobacterial Activity of Natural and Semi-Synthetic Lignans. *Z Naturforsch C* 64: 779-784.
- Tosun F, Kizilay CA, Sener B, Vural M, Palittapongarnpim P 2004. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol* 95: 273-275.
- Vilegas W, Roque NF, Salatino A, Giesbrecht AM, Davino S 1990. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry* 29: 2299-2301.
- World Health Organization 2007. Public private mix for TB care and control. Geneva: WHO. (WHO/HTM/TB/2007.378).
- Wilkinson BL, Bornaghi LF, Wright AD, Houston TA, Poulsen SA 2007. Anti-mycobacterial activity of a bis-sulfonamide. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1355-1357.
- Zhang Y, Heym B, Allem B, Young D, Cole ST 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358: 591-593.

***Correspondence**

Fernando R. Pavan
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo
14801-502 Araraquara-SP, Brazil
fernandopavan@fcfar.unesp.br