

RESSALVA

Alertamos para o fato do item "Conclusão" estar incompleto e para a ausência das Referências e Anexo, não incluídos pela autora no arquivo original.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

JAQUELINE PESSÔA PEREZ OCANHA

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E
DA MOTILIDADE INTESTINAL DE EXTRATOS DE *Paepalanthus geniculatus***

ARARAQUARA - SP

2011

JAQUELINE PESSÔA PEREZ OCANHA

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E
DA MOTILIDADE INTESTINAL DE EXTRATO DE *Paepalanthus geniculatus***

Dissertação 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 Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documento
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP- Campus de Araraquara

O15d Ocanha, Jaqueline Pessoa Perez
Determinação do potencial antimicrobiano, antioxidante e da motilidade intestinal de extrato de *Paepalanthus geniculatus* / Jaqueline Pessoa Perez
Ocanha. -- Araraquara, 2011.
82 f.

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

Orientador: Taís Maria Bauab.

1. *Paepalanthus geniculatus* – Extratos vegetais. 2. Atividade antibacteriana. 3. Atividade antioxidante. 4. Motilidade intestinal. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

CDD: 615

CAPES: 40500004

Tudo Posso

*Posso tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória*

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer ...
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!!!*

Eu dedico esse trabalho ao meu Salvador e PAI cheio de glória e esplendor, meu DEUS a minha família que representa tudo o que eu sou ao meu pai Luíz Martinez Perez e a minha mãe Maria de Lourdes Pessoa Perez, que com muito esforço, dedicação e amor me ensinaram a nunca desistir. Por esse motivo essa nova etapa de minha vida é encerrada com muitos agradecimentos, pois tudo o que sou e tenho é um reflexo dos vossos ensinamentos. Meu pai sempre com aquele ar de serenidade e humildade, me trouxe a paz interior e paciência; minha mãe com o seu jeitinho doce e amoroso, me ensinando o que realmente vale a pena, aprendendo o que é amor de mãe. Às minhas irmãs Patrícia e Débora que me deram força e incentivo para que tudo se tornasse real em minha vida. Ao meu cunhado Alcione, obrigada pelo carinho e ensinamentos. In memoriam agradeço a minha avó Emília Gonzales Perez, mulher forte e batalhadora, um exemplo em minha vida. Amo vocês. Meu avô Beijamim, obrigada, por tudo.

Ao meu esposo, Rodrigo de Souza Ocanha, que nesses 10 anos se tornou o meu melhor amigo, companheiro e fiel, que com paciência e dedicação nunca me deixou desistir; agradeço-o por sempre apoiar as minhas escolhas, com seu carinho me fez enfrentar obstáculos, com seu sorriso me fez ser mais forte, com seu olhar nunca me deixou cair, como seu amor me fez acreditar que tudo era possível, só posso ser grata, Lhe Amo!

Aos meus familiares Pessoa, Perez e os Ocanha, e aos meus amigos que mesmo de longe sempre confiaram em minha caminhada. Obrigada!

É com muita alegria que dedico esse meu trabalho a vocês, que são pessoas maravilhosas e sem dúvida são essenciais em minha vida. Amo a todos!

Ao meu Deus e ao seu filho Jesus Cristo, que me deu a graça de estar nesse mundo e fazendo de mim um instrumento de vossa graça, a minha Mãe protetora, Nossa Senhora Aparecida, que nos vossos braços me deu alento, descanso e serenidade....A Jesus toda honra e Glória.

Ao meu Pai, Luíz Martinez Perez, por ser uma pessoa tão boa e humilde, por ter me ensinado que tudo era possível, sem que deixasse desistir. Te amo.

À minha Mãe, Maria de Lourdes Pessoa Perez, que sempre esteve presente, em todas as minhas dificuldades e alegrias. Amo você.

Às minhas irmãs, Patrícia e Débora e ao meu cunhado Alcione que mesmo estando longe durante a realização desse trabalho, me apoiaram e me deram forças. Amos vocês.

Ao meu marido Rodrigo, que com muita compreensão, amizade, respeito e amor, me ajudou a permanecer firme no meu propósito, sempre presente, agüentando os meus dias de fúria. Te Amo.

A todos os meus familiares, o meu muito obrigada! Amo você!

À minha orientadora Profa. Dra. Tais Maria Bauab, que me acolheu com muito carinho, pegando em minha mão e me ajudando a caminhar, sem medir esforços, teve muita paciência e dedicação, que Deus ilumine sempre sua vida. Obrigada!

Ao Prof. José Ricardo, que deu início a toda essa história, me apresentando a UNESP. Muito obrigada!

Às minhas amigas de república, Vânia, Renata, Luana, Ození, Paula, Greace, Marlene, Michelle que me deram força, carinho e alegria durante esses três anos aqui em Araraquara, jamais esquecerei tudo o que vivemos aqui, Amo muito todas vocês.

À Cris, Carol, Flávia Angélica que me apresentaram a vida acadêmica, com o começo de uma iniciação científica, por sempre me fazerem rir, deixando os dias de trabalho mais alegre, fazendo parte de minha vida e de uma amizade que não acabará....Amo vocês.

Aos amigos de faculdade, Carina, Juliana, Joice, Fernando, Neto muito obrigada pelas palavras e amizade, Marcelo Hiene, Mariana e Flávia Resende pessoas que se tornaram amigos....Obrigada!!!

Ao laboratório de Fisiologia de Microrganismos, ao Sílvio, Marcelo Gonzaga, Leonardo e Danilo, Mariana por sempre me apoiarem, pelo carinho, atenção, ensinamentos, paciência, vocês foram essenciais para que eu continuasse com animo e coragem... Jamais esquecerei vocês. Obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico da FCF; especialmente, à Professora Hérída que me deu o privilégio de ser mais uma integrante da UNESP aos pós-graduandos e graduandos, à técnica Fátima, a todos o meu muito obrigada pela paciência.

Ào laboratório de Bioquímica Clínica, especialmente ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela paciência, disponibilidade em sempre ensinar, pelas horas de conversa, alegria e aos funcionários e alunos deste laboratório por me acolherem tão bem.

Aos, Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, Prof. Dr. Wagner Vilegas e ao aluno Fabiano Pereira do Amaral, que com muita confiança nos foram cedidos os extratos da planta em estudo, do Laboratório de Química Orgânica da Instituição de Química de Araraquara- UNESP.

Às técnicas Marisa, Néia e Silvia por estarem sempre dispostas a me auxiliar em que fosse necessário, e a secretária Margarete... meu Obrigada!

Aos professores da UNESP que me ajudaram direta ou indiretamente em algum momento desse meu trabalho. Obrigada!

Às meninas da Pós- Graduação (Claudia, Sonia, Angélica e Laura) por sempre me atenderem, pela dedicação e é claro pela simpatia dedicada a mim... Obrigada!

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas correções das Referências Bibliográficas.

Ao Prof. Jurandir Jeremias de Carvalho, pelas correções gramaticais e de português.

A todos os funcionários da Unesp.

À Unesp como instituição de ensino.

Agradeço todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir essa etapa de minha vida, proporcionando maiores conhecimentos. Obrigada!

À CAPES pela bolsa concedida.

O Senhor esta no comando de tudo!!!

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Família Eriocaulaceae.....	22
2.2 O Gênero <i>Paepalanthus</i>	25
2.3 Atividade antimicrobiana.....	25
2.4 Antioxidante.....	26
2.4.1 Compostos Fenólicos.....	29
2.4.2 Flavonóides.....	30
2.5 Motilidade.....	31
3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específico.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Extratos vegetais.....	36
4.1.1 Obtenção e procedência.....	36
4.2 Cepas bacterianas e Cepas fúngicas.....	38
4.3 Preparo dos extratos vegetais.....	38
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	38
4.4.1 Padronização da suspensão microbiana.....	38
4.4.2 Preparo da solução utilizada como controle positivo.....	38
4.4.3 Método de difusão em ágar.....	39
4.4.4 Método de diluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
4.4.5 Revelação da leitura utilizando resazurina como revelador para as bactérias.....	40
4.4.6 Revelação da leitura utilizando TCC (cloreto 2,3,5 trifenil tretazólio) como revelador para as leveduras.....	41
4.5 Avaliação da atividade antioxidante e a Determinação de fenóis totais e flavonóides totais.....	41
4.5.1 Atividade Scavenger sobre DPPH.....	41
4.5.2 Atividade antioxidante total sobre ABTS ^{•+}	42
4.5.3 Análise quantitativa de fenóis totais	43
4.5.4 Análise quantitativa de flavonóides totais.....	44
4.6 Motilidade intestinal.....	45
4.6.1 Animais.....	45

4.6.2 Teste de Motilidade intestinal.....	46
4.6.3 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Método de difusão em ágar.....	48
5.2 Teste de diluição em microplacas.....	51
5.3 Determinação da Atividade Antioxidante.....	52
5.3.1 Atividade Scavenger sobre DPPH.....	52
5.3.2 Atividade Antioxidante Total sobre ABTS ^{•+}	53
5.4 Determinação do teor de fenóis totais e flavonóide totais.....	54
5.4.1 Quantificação de fenóis totais nos extratos.....	54
5.4.2 Quantificação de flavonóides totais nos extratos.....	55
5.5 Determinação da Motilidade intestinal em camundongos.....	56
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
9 ANEXO.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS ^{•+}	2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AH	Antioxidante
A.S	Ágar Sabouraud
% AA	Porcentagem de atividade antioxidante
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CMH	Caldo Müller-Hinton
CS	Caldo Sabouraud
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EtOH	Etanol
EROs	Espécies oxidativas de oxigênio
FLT	Flavonóides totais
FT	Fenóis totais
HOCl	Ácido hipocloroso
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50%
MeOH	Metanol
MH	Muller –Hinton
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
PBS	Tampão fosfato (<i>phosphate buffer saline</i>)
R [•]	Espécies radicalares
RL	Radical livre
ROO [•]	Hidroperoxila
UFC	Unidade formadora de colônia
TTC	Cloreto 2,3,5- trifenil tetrazólio

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estrutura química da paepalantina isolada de capítulos florais de <i>P. bromelioides</i>	24
2	Espécie de <i>Paepalanthus</i> sp.....	25
3	Reação de doação de hidrogênio o DPPH.....	29
4	Estrutura química de um flavonóide.....	31
5	Obtenção dos extratos DCM, MeOH e hexânicos de escapos e capítulos da planta <i>P. geniculatus</i>	37
6	Esquematização para a realização do teste em microplacas.....	40
7	Curva padrão com ácido gálico.....	44
8	Curva padrão com quercetina.....	45
9	Teste de difusão em ágar com <i>B. subtilis</i>	48
10	Representação dos resultado em microplacas. Extrato DCM de escapos frente <i>B. subtilis</i>	50
11	IC ₅₀ para o radical DPPH com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos de <i>P. geniculatus</i>	53
12	IC ₅₀ para o cátion ABTS ^{•+} com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos de <i>P. geniculatus</i>	54
13	Determinação de fenóis totais com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos.....	55
14	Determinação de flavonóides totais com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos.....	56
15	Distância percorrida pelo carvão ativo no intestino de camundongos (cm).....	57
16	Distância percorrida pelo carvão ativo no intestino de camundongos (%).	58

LISTAS DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Valores de massas de extratos seco obtidos após os processos de maceração e percolação das respectivas partes de <i>P. geniculatus</i> ..	37
2	Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de escapos de <i>P. geniculatus</i> pelo método de difusão em ágar.....	48
3	Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de capítulos de <i>P. geniculatus</i> pelo método de difusão em ágar.....	49
4	Atividade antimicrobiana do extrato DCM de escapos de <i>P. geniculatus</i> pelo método de difusão em ágar.....	49
5	Atividade antimicrobiana do extrato DCM de capítulos de <i>P. geniculatus</i> pelo método de difusão em ágar.....	50
6	Atividade antimicrobiana do extrato hexânico de escapos de <i>P. geniculatus</i> pelo método de difusão em ágar.....	50
7	Resultados encontrados no teste de microplaca.....	52
8	Distâncias percorridas pelo carvão ativo no intestino de camundongos, sob influência de diferentes tratamentos.....	57

RESUMO

A família Eriocaulaceae é amplamente distribuída no Brasil, popularmente são conhecidas como “sempre-viva” porque, mesmo após o corte e secagem, conservam a cor e forma por vários anos. O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial biológico de *P. geniculatus*, estudando a atividade antimicrobiana, antioxidante e a motilidade intestinal dos extratos diclorometânico, metanólico e hexânico. Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as técnicas de difusão em ágar e microdiluição. Para determinação do potencial antioxidante foram realizados os ensaios espectrofotométricos: radical ABTS^{•+}, DPPH, determinação dos teores de fenóis e flavonóides totais, utilizando como padrões a quercetina e ácido gálico. Na técnica de difusão em ágar, 100µL de suspensão bacteriana a concentração de 10⁸ UFC/mL foram semeadas em ágar Muller-Hinton e ágar Sabouraud. Discos de papel foram embebidos com 25µL das amostras vegetais e dispostos na superfície das placas de Petri. Após incubação a 37°C por 24 horas em aerobiose foram feitas as leituras dos halos de inibição de crescimento ao redor dos discos (mm). No teste de microdiluição os orifícios das microplacas foram preenchidos com 80µL de caldo de Muller-Hinton, 100µL de soluções da amostra vegetal diluída seriadamente de 1000 a 7,81µg/mL e 20µL da cultura a concentração de 10⁷ células/mL para as bactérias e 10³ células/mL para as leveduras. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas sob condições de aerobiose e posteriormente determinou-se a CBM e CFM. Na avaliação da motilidade intestinal, foram utilizados os extratos de escapos e capítulos no solvente diclorometano e metanólicos (250mg/kg), um controle positivo (cloridrato de loperamida, 5mg/kg), controle negativo (solução fisiológica), controle do solvente (Tween 80 a 20% de metanol). Após 45 minutos os animais receberam uma suspensão de carvão ativo (marcador) e passados 90 minutos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Fez-se a extirpação do intestino desde o piloro até o início do ceco e os resultados foram expressos em porcentagem do comprimento total do intestino delgado. O extrato DCM de escapos apresentou atividade anti- *B. subtilis* pelo método de difusão em ágar. Nos ensaios de microdiluição as amostras de escapos e capítulos metanólicos apresentaram atividade frente *B. subtilis* com CIM= 62,5µg/mL. O extrato metanólico de escapos apresentou atividade *S. aureus* com CIM= 125µg/mL. O extrato metanólico de escapos apresentou atividade para *C. parapsilosis* com CIM= 1000µg/mL. Como controles foram utilizados ciprofloxacino a 35µg/mL e fluconazol 1,5µg/mL para bactérias e leveduras respectivamente. Para o teste de DPPH, o IC₅₀ do extrato DCM de capítulos foi de 20,45 µg/mL; no teste de ABTS^{•+} o IC₅₀ do extrato MeOH de capítulos foi 13,31 µg/mL. Na determinação do teor de fenóis totais a maior porcentagem encontrada foi de 24,06% para extrato DCM de escapos, e no de flavonóides totais a maior porcentagem foi de 44,02% para o extrato MeOH de capítulos. No teste em microplacas o extrato diclorometânico de escapos e extrato metanólico de escapos apresentaram atividade antibacteriana. As frações testadas apresentaram atividade antioxidante, ressaltando que o extrato MeOH de capítulos apresentou melhores resultados tanto no teste de ABTS^{•+} quando no teor de flavonóides totais. Na avaliação da motilidade intestinal em camundongos os resultados encontrados para os extratos MeOH de capítulos e escapos e DCM de escapos aumentaram a motilidade intestinal dos animais na concentração de 250mg/kg. *P. geniculatus* apresentou significativa atividade antibacteriana e interferiu na motilidade intestinal dos camundongos.

Palavras -chave: *Paepalanthus geniculatus*, extratos vegetais, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, motilidade intestinal

ABSTRACT

The family Eriocaulaceae is distributed over several parts of Brazil, are popularly known as "evergreen" because even after cutting and drying, retain their color and shape for many years. This work was to determine the biological potential of *P. geniculatus*, studying the activity antimicrobial, antioxidant and assess the motility of the extracts dichloromethanic, methanolic and hexanic. For activity determination as techniques were used antibacterial ágar diffusion and microdilution against Gram-positive and Gram-negative bacterium and yeasts. To determine the potential antioxidant spectrophotometric assays were performed: radical ABTS^{•+}, DPPH, determining the levels of phenolics and flavonoids, using standards as quercetin and gallic acid. In the diffusion technique, 100 mL of bacterial suspension concentration of 10⁸ CFU/mL were seeded in Muller-Hinton ágar and Sabouraud broth with Drigalski loop. Discs paper with 10 mm in diameter soaked with 25µL of vegetation samples were arranged on the surface of the plates. After incubation at 37 °C for 24 hours under aerobic conditions were the readings of the inhibition of growth around the disks, measured in millimeters. In test microdilution holes of the microplate were filled with 80µL Muller-Hinton broth, 100 mL of sample solutions of serially diluted plant 1000 to 7,81 µg/mL and 20µL of bacterial culture concentration of 10⁷ cells/mL and 10³ cells/mL for yeasts. The microplates were incubated at 37 °C for 24 hours under aerobic conditions and subsequently became the technique of CBM and CFM. In the evaluation of intestinal motility, were used extracts of scapes and chapters in dichloromethane solvent and methanol (250mg/kg), a positive control (loperamide hydrochloride, 5mg/kg), negative control (saline solution), control of the solvent (Tween 80 to 20% methanol). After about 45 minutes the animals received a suspension activated charcoal (marker). After 90 minutes the animals were sacrificed CO₂ chamber, and was held to immediate removal from the gut pylorus to the beginning of the cecum, the results were expressed as percentage of total length of small intestine. The dichloromethanic extract of scapes has presented an activity against the bacterium *B. subtilis* by the diffusion method. The microdilution assay samples scapes and chapters methanol showed activity *B. subtilis* with CIM = 62.5 mg/mL. The extract scapes of methanol extract showed activity *S. aureus* with MIC = 125µg/mL. The scapes methanol extract showed activity for *C. parapsilosis* with CIM=1000µg/mL. As controls were used to ciprofloxacin at concentration 35µg/mL and fluconazole 1,5 mg / mL. For radical DPPH test, the IC₅₀ of the extract DCM chapters was 20.45 µL/mL in ABTS^{•+} test the IC₅₀, the MeOH extract chapters 13.31 µL/mL. In the determination of the highest total phenols percentage of 24.06% was found to extract DCM scapes, and the flavonoids was the highest percentage of 44.02% for MeOH extract chapters. In the test in microplates dichloromethanic extracts of scapes of methanol extract showed antibacterial activity. The fractions tested had antioxidant activity, noting that the extract MeOH chapters offered better results in both the test when ABTS^{•+} test for determination of total flavonoids. In assessing the intestinal motility in mice, the results for the MeOH extracts of chapters and DCM scapes and altered motility gut of animals at a concentration of 250mg/kg. *P. geniculatus* showed important antibacterial activity and interfered on motility gut of mice.

Keyword: *Paepalanthus geniculatus*, vegetal extract, antimicrobial activity, antioxidant activity, intestinal motility.



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, o Reino Vegetal apresenta-se como a mais significativa forma de fornecimento de substâncias úteis para tratamento de doenças que acometem os seres humanos (GOTTLIEB *et al.* 1996). As plantas são, portanto, uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, sendo muitos destes constituintes modelos de síntese de um grande número de fármacos (SIMÕES *et al.* 1999). Muitas indústrias farmacêuticas e grandes grupos de pesquisa vêm demonstrando interesse no desenvolvimento de novos produtos devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras (YUNES *et al.* 2001; CALIXTO, 2003; DUARTE, 2006). O Brasil utiliza as plantas como fontes naturais desde o seu descobrimento, sendo um país abundante nas variedades de vegetais e de compostos potencialmente bioativos, sendo a flora vegetal fundamental ferramenta para o descobrimento de substâncias passíveis de se tornarem medicamentos (GOTTLIEB & BORIN, 1994).

Há uma grande relevância na área farmacêutica, pois as plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo a grande forma de utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, que são substâncias ativas isoladas, como para a obtenção de adjuvantes que são produtos utilizados na formulação de medicamentos, ou, ainda, na elaboração exclusiva de medicamentos à base de extratos vegetais que constituem os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL *et al.* 2001). As plantas medicinais têm grande importância porque representam a única forma terapêutica de grande parcela da população brasileira e de mais dois terços da população do planeta (WHO, 1992; DUARTE, 2006).

A maioria das plantas brasileiras não foi estudada química e/ou biologicamente, constituindo assim, um potencial a ser identificado visando a exploração de novas drogas. Por este motivo há uma importante busca por novos agentes antimicrobianos, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (TRIA & GORDON, 1997; PENNA *et al.* 2001).

Um grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas se dá pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, leva a estudos preocupação para a descoberta de novas escolhas terapêuticas (NOVAIS *et al.* 2003; ANTUNES *et al.* 2006; OLIVEIRA *et al.* 2006; OLIVEIRA *et al.* 2007a). Dentre os produtos naturais de interesse científico estão as plantas medicinais devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos e por possibilitarem a obtenção de moléculas protótipos devido a variedade de constituintes (NASCIMENTO *et al.* 2000; PESSINI *et al.* 2003; DUARTE *et al.* 2004; MICHELLIN *et al.* 2005; RIOS & RECIO, 2005; LIMA *et al.* 2006a).

A atividade antioxidante é uma etapa importante na caracterização biológica de biomoléculas. Os antioxidantes são os compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas, inibindo a iniciação ou a propagação de reações de oxidação (VELIOGLU *et al.* 1998). Compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como seqüestradores de radicais livres ou bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza destacando-se os derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico, bem como os flavonóides (DEGÁSPARI & WASZCZNSKYJ, 2004). Foi descrito que uma série de doenças, dentre as quais, o câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “espécies reativas de oxigênio” (ERO). Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo e a outros processos como a redução da vida média de produtos alimentícios industrializados e das matérias-primas em geral (MELLO & GUERRA, 2002; DEGÁSPARI & WASZCZNSKYJ, 2004).

A motilidade intestinal é causada pelos movimentos peristálticos dos músculos lisos dos intestinos. Este ensaio visa obter informações se o material vegetal em estudo possui efeito em diminuir ou aumentar esses movimentos no intestino de camundongos. A alteração da motilidade pode afetar pessoas que utilizam preparados de plantas medicinais em associação com medicamentos, geralmente de uso contínuo. Esta associação pode aumentar ou diminuir a biodisponibilidade dos mesmos, o que altera a farmacocinética da substância ativa no organismo. Este tipo de interação é muito comum, pois ainda se tem a convicção de que preparados oriundos de plantas não causam danos à saúde. Em 1957 estudo realizado por Janssen & Jageneau, mostrou a avaliação da inibição de propulsão gastrointestinal com suspensão de carvão em

camundongos. Em estudo realizado por Olajide e colaboradores (1999), o extrato metanólico da raiz de *Securidaca longipedunculata* da família Polygalaceae, mostrou ações espasmódicas no trato gastrointestinal de animais de laboratório, levando a um aumento nos movimentos propulsivos do conteúdo intestinal e a uma redução no tempo do esvaziamento gástrico. O número de fezes úmidas aumentou nos animais depois da administração oral, contudo os extratos utilizados produziram ulcerações na mucosa gástrica.



Revisão Bibliográfica



2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O uso dos produtos naturais teve início há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias. Esses produtos eram utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e, estima-se que, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008). No Brasil o uso das plantas medicinais foi difundido principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo denominados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. É, portanto, uma rica fonte de produtos terapêuticos, ainda que este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas, seja pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES 2001; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

Um grande avanço científico nos últimos tempos envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, vem ocorrendo, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos. Com o desenvolvimento tecnológico como a espectroscopia, os químicos orgânicos têm conseguido demonstrar estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são descritos na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica (COWAN, 1999.; SILVA *et al.* 2006). Das plantas existentes no planeta cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com

animais. Muitas destas substâncias têm grande possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (AHMAD & BEG, 2001; LIMA *et al.* 2008).

Os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos, e até carcinogênico. A realização de estudos etnobotânicos possibilita o resgate e a preservação dos conhecimentos populares, entretanto existe pouca informação quanto ao seu potencial de risco a saúde (SIMÕES *et al.* 1999). As espécies empregadas para fins terapêuticos são aquelas que apresentam substâncias biologicamente ativas originárias do metabolismo secundário da planta e que apresentam diversidade de funções biológicas e/ou aplicações na medicina moderna (DI STASI, 1996; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). A época em que uma droga é coletada um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

As plantas que sintetizam esses metabólitos secundários sofrem influencia de fatores ambientais como a sazonalidade, o ritmo cicardiano, as modificações de temperatura e a disponibilidade hídrica e também da interação entre processos químicos, biológicos, físicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A intensidade luminosa constitui um desses fatores que alteram as concentrações e/ou composições dessas substâncias, o que contribui para a crescente preocupação com a destruição da camada de ozônio. Portanto, os estudos de distribuição geográfica e o reconhecimento da dispersão e da diversidade dessas plantas no tempo e no espaço contribuem para a recomendação da conservação e proteção de certas áreas, tanto para o

suprimento das necessidades humanas quanto para a garantia da manutenção da biodiversidade (ROCHA, 2004; FÁVERO, 2007).

As investigações científicas visam determinar o potencial terapêutico das plantas que contudo há falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células alvos, diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes. Nos últimos anos, uma quantidade de substâncias encontradas em plantas tem indicado o papel chave dos antioxidantes, impedindo que os radicais livres e outros oxidantes sejam os grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI, 2005; BARREIRAS & DAVID, 2006).

As atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido estudadas em muitos países tais como o Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que têm uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTINÉZ *et al.* 1996; NAVARRO *et al.* 1996; MAHASNEH *et al.* 1999; AHMAD & BEG, 2001; DUARTE *et al.* 2005; RIOS & RECIO, 2005.; LIMA *et al.* 2006b; CALVO *et al.* 2010).

Outros parâmetros a serem descobertos sobre os constituintes químicos das plantas e suas funções são as propriedades biológicas, por esse motivo são realizados estudos de motilidade intestinal em camundongos. Tais estudos caracterizam as propriedades constipantes ou laxantes das plantas, podendo vir a serem novos medicamentos (JANSSEN & JAGENEAU, 1957; CLOSE *et al.* 1997; BANJI *et al.* 2010).

2.1 Família Eriocaulaceae

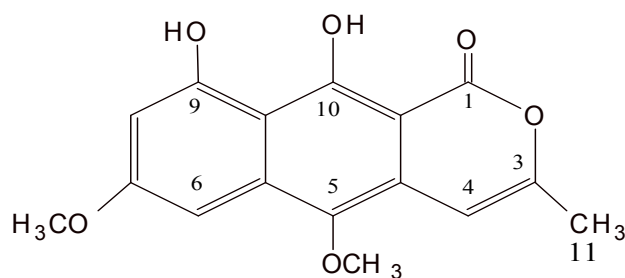
A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies amplamente distribuídas por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais da América do Sul (GIULIETTI *et al.* 2000). Esta família inclui desde plantas anuais de pequeno porte até plantas perenes com mais de 2 metros de altura. A característica principal da família é o

desenvolvimento de inflorescências de pequeninas flores agrupadas em capítulos (HENSOLD, 1998). As Eriocaulaceae possuem grande interesse econômico referente à extração de capítulos (GIULIETTI *et al.* 1996) e escapos florais (SCHMIDT *et al.* 2007). As características etnofarmacológicas das eriocauláceas são pouco conhecidas, embora alguns membros desta família apresentem significativos efeitos sobre o trato gastrointestinal, como por exemplo, a atividade antiulcerogênica e laxativa de *Leiothrix flavescens* (MORAIS *et al.* 2010), atividade antiulcerogênica de *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA *et al.* 2004), e atividade antiinflamatória intestinal de *Paepalanthus bromelioides* (DI STASI *et al.* 2004).

Várias espécies da família Eriocaulaceae são conhecidas popularmente como “capim-dourado” ou “sempre-vivas” pois, mesmo após o corte, conservam a cor e forma por vários anos. Neste sentido, são exploradas para fins artesanais e ornamentais (GIULIETTI *et al.* 1996). Embora as “sempre-vivas” sejam exportadas com intuito ornamental para os Estados Unidos e países europeus, a literatura descreve a utilização de muitas espécies de Eriocaulaceae no tratamento de úlcera da epiderme, infecções bacterianas e hanseníase (GIULIETTI, *et al.* 2000). Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar substâncias bioativas nas espécies desta família, sendo algumas, fontes promissoras de compostos fenólicos (MAYWORM & SALATINO, 1993; ANDRADE *et al.* 1999, SANTOS *et al.* 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004; SILVA *et al.* 2007a; SILVA *et al.* 2007b; FANG *et al.* 2008).

A presença de substâncias fenólicas nos vegetais pode ser responsável pela atividade antimicrobiana dos mesmos (COWAN, 1999; RANSFORD & LAGMAN, 2002). Dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides* (VILEGAS *et al.* 1990; DEVIENNE *et al.* 2002; VARANDA *et al.* 2004) e *Paepalanthus vellozioides* (VARANDA *et al.* 1997) isolou-se uma isocumarina denominada de paepalantina (Figura 1).

Segundo Di Stasi e colaboradores (2004) a isocumarina denominada de paepalantina, que foi isolada dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides* apresenta atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória intestinal.



Paepalantina

Figura 1: Estrutura química da paepalantina isolada de capítulos florais de *P. bromelioides*.

Isocumarinas são polifenóis derivados da via do acetato e estruturalmente semelhantes as cumarinas, possuindo como diferença um anel lactônico invertido. Poucos estudos de atividade biológica foram realizados com estes compostos, sendo que algumas isocumarinas foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico, mutagênico, clastogênico e antimicrobiano (VARANDA *et al.* 1997; TAVARES *et al.* 1999; COELHO *et al.* 2000; VARANDA *et al.* 2004). Os efeitos citotóxicos e mutagênicos da paepalantina podem estar relacionados entre si, podendo a citotoxicidade ser consequência da interação desta isocumarina com o DNA (VARANDA *et al.* 1997).

Interessantemente, fármacos que interatuam com ácidos nucleicos estão entre os agentes quimioterápicos mais empregados no tratamento antineoplásico (BURREN *et al.* 1992). A presença de dois grupos de hidroxilas nos C9 e C10 da molécula da paepalantina é similar ao arranjo catecólico encontrado em muitos flavonóides e que permite a estes compostos atuarem como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (KITAGAWA *et al.* 2003). O potencial antioxidante desta isocumarina foi avaliado por Leitão e colaboradores (2002), que demonstraram a capacidade antioxidante por técnicas espectrofotométricas, empregando DPPH. Através de testes espectrofotométrico, Kitagawa e colaboradores (2003) demonstraram que a paepalantina captura ácido hipocloroso (HOCL) e inibe a mieloperoxidase, enzima que, na presença de íons cloreto, participa da produção de HOCL e em ensaios dependentes de lucigenina, a paepalantina atuou no sequestro de radical ânion superóxido.

2.2 O gênero *Paepalanthus*

No Brasil há várias formações de vegetais, em decorrência da vasta diversidade no clima, extensão territorial e características do solo (MACHADO *et al.* 2004; CASTELLANI *et al.* 2001). A família Eriocaulaceae inclui os gêneros: *Eriocaulon* Linn, *Syngonanthus* Ruhl e *Paepalanthus* Kunth (ROSA & SCATENA, 2007; SANTOS *et al.* 2008). As plantas do gênero *Paepalanthus* apresentam-se como sub-arbustos, as inflorescências são secas, redondas e pequenas, de cor branca variáveis (Figura 2). As espécies deste gênero são muito utilizadas pela população que vive na Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais) em seus trabalhos artesanais. No Brasil são conhecidas 59 espécies que são distribuídas desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. No entanto, a maior concentração está no Estado de São Paulo, Goiás e principalmente em Minas Gerais onde 31 espécies foram encontradas (GIULIETTI, 1978).



Figura 2: Espécie de *Paepalanthus* sp.

<http://eptv.globo.com/terradagente/0,0,4,69%3B11,sempre-viva.aspx>

2.3 Atividade antimicrobiana

Os testes de sensibilidade são aconselhados para qualquer organismo associados a processos infecciosos que determinem uma terapia antimicrobiana

conhecida ou quando o micro-organismo pode apresentar resistência. Vários métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos.

Dentre estes o teste de difusão em ágar, utilizando discos de papel, é considerado de fácil execução, reprodutível e permite a experimentação de diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa (COWAN, 1999; NETO *et al.* 2002; MORAIS, 2006).

O método de diluição em meio líquido também são freqüentemente utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. A prova de sensibilidade por este método foi uma das primeiras a serem desenvolvidas, servindo ainda hoje como método de referência (LANGFIELD *et al.* 2004).

As duas técnicas, difusão em ágar e diluição em tubos, requerem grande quantidade de substâncias-teste, o que restringe grandemente a sua utilização em bioensaios para compostos antimicrobianos uma vez que os produtos naturais na grande maioria das vezes são extraídos em pequenas quantidades. Segundo diversos autores a técnica alternativa mais amplamente utilizada em ensaios microbiológicos é a microdiluição, ensaios em microplacas que possibilitam a utilização de pequenas quantidades e/ou volumes de amostras e reagentes. Outro aspecto vantajoso desta metodologia é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste, bem como diferentes microrganismos em um mesmo ensaio. Possibilita ainda demonstrar qual a mínima concentração da substância a ser testada necessária para inibir o crescimento microbiano (COWAN, 1999; PALOMINO *et al.* 2002; ELOFF, 2000; LANGFIELD, 2004; ALVES *et al.* 2008).

2.4 Antioxidante

Radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer (DRÖGE, 2002). Antioxidantes são substâncias que

reagem com radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a conseqüente destruição tissular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$), acarretam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-alílico, começando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (HASLAM, 1996; VALKO *et al.* 2004).

A vida em aerobiose se caracteriza pela continua produção de radicais livres que é contrabalançada pelo consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Portanto, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Contudo, se a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA, conduzindo a dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e material genético (BARREIROS & DAVID, 2006).

Deste modo, várias patologias incluindo o câncer, doença de Alzheimer e de Parkinson, doenças cardiovasculares seguidas de doenças inflamatórias e imunológicas como artrite, asma, alergia e outras relacionadas com o processo de envelhecimento apresentam em sua etiologia, pelo menos em parte, os efeitos danosos da produção de radicais livres em conseqüência do estresse oxidativo. Mais especificamente, antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre estes, podem ser citados: a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares (VASCONCELOS *et al.* 2006).

O crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas,

vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, carotenóides, ácido ascórbico, tocoferóis, e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (WOLFE *et al.* 2003; MANACH *et al.* 2004). A oxidação é importante para a produção de energia e para apoiar o metabolismo das células aeróbias. No entanto, em alguns casos, a produção excessiva de oxigênio através de vias metabólicas pode resultar no descontrole dos radicais livres. Essas desordens podem acarretar em danos as moléculas, incluindo os lipídeos, DNA, carboidratos e proteínas (DUBOST *et al.* 2007).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante é via a captura do radical $ABTS^{\bullet+}$, o qual pode ser gerado através de uma reação química eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.* 2005).

Outros métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, avaliando a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH $^{\bullet}$, de coloração púrpura que absorve a 517 nm (ROGINSKY & LISSI, 2005). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R $^{\bullet}$), o DPPH $^{\bullet}$ é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 3). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH $^{\bullet}$ remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.* 1998).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante. O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O método é influenciado pelo solvente e pelo pH das reações. O método é considerado fácil e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas.

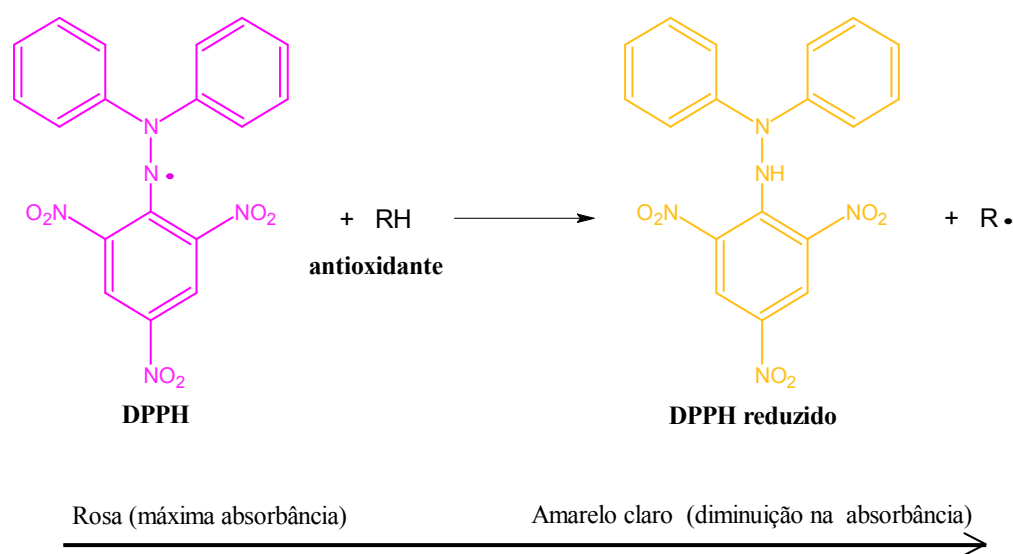


Figura 3: Reação de doação de hidrogênio para o DPPH.

2.4.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (HAVSTEEN, 1983; NACZK & SHAHIDI, 2004)

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN *et al.* 2005).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (HASLAM, 1996).

Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais e possuem funções de defesa contra o ataque de pragas. Já em animais e humanos tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis. Esse poder de neutralização das estruturas radicalares dos compostos fenólicos é devido à sua estrutura química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas (GIADA & MANCINI-FILHO, 2006).

Além da sua atividade antioxidante direta, pesquisas recentes têm destacado múltiplas funções e mecanismos importantes relacionados à habilidade dos compostos fenólicos de se ligarem a receptores celulares e transportadores de membranas e influenciarem a expressão gênica, a sinalização e a adesão celular (MANACH *et al.*, 2005).

2.4.2 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os diversos sistemas biológicos. Do ponto de vista químico, os flavonóides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C), formando um sistema C6-C3-C6 (HARBORNE *et al.* 1975). A Figura 4 é a estrutura química básica de um flavonóide.

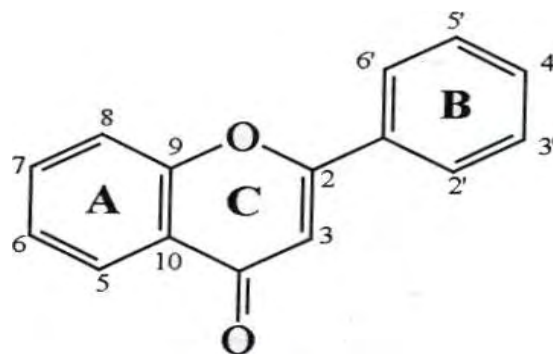


Figura 4: Estrutura química de um flavonóide

As características benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de capturar os radicais livres (DECKER, 1997). Os compostos fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica (HARTMAN & SHANKEL, 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Existe na literatura muita controvérsia sobre o mecanismo de ação dos flavonóides. Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos apresentam a capacidade de doar átomos de hidrogênio e inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN & SHANKEL, 1990; ARORA *et al.* 1998). Os flavonóides mais investigados são: a quercetina, a miricetina, a rutina e anaringenina (HARTMAN & SHANKEL, 1990).

2.5 Motilidade

Linhagens de camundongos têm sido utilizadas como modelos experimentais de pesquisa biomédica desde o início do século 20. O camundongo é o animal experimental de escolha em várias áreas por ser de fácil criação e manipulação, ter uma

reprodução rápida e apresentar uma grande diversidade genética (CHORILLI *et al.* 2007). Estes animais são utilizados em diversos modelos experimentais para avaliação da atividade farmacológica e para a avaliação da motilidade intestinal de extratos vegetais (MARONA *et al.* 1992; MUJUMDAR *et al.* 2000; MICHELIN & SALGADO, 2004; FIGUEIREDO *et al.* 2005; SALGADO *et al.* 2005; SALGADO *et al.* 2006).

Dos métodos de eutanásia por inalação, o CO₂ é o mais recomendado para pequenos roedores de laboratório, principalmente para grande quantidade de animais, pois é barato, não inflamável, não explosivo e seguro, desde que aplicado com equipamento apropriado. É recomendado o uso de 70% de CO₂ a 70% (CO₂/O₂) ou ar para a rápida perda de consciência, sem hipóxia. Isto resulta em rápida anestesia, seguida por morte, com efeitos reduzidos quanto à irritação das vias aéreas sendo recomendada a utilização de CO₂ disponível comercialmente em cilindros. Este gás tem rápida ação letal por provocar depressão do sistema nervoso central, mas ainda assim, após detecção de parada respiratória, recomenda-se manter os animais na câmara por mais 10 minutos, para confirmação de sua morte (CLOSE *et al.*, 1997; CONSELHO, 2002- IN: Resolução Nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária).



Objetivos

3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi determinar a atividade biológica e o potencial antioxidante de extratos metanólico, diclorometânico e hexânico de capítulos e escapos de *Paepalanthus geniculatus* (Família Eriocaulaceae).

3.2 Específicos

- 1- Determinar a atividade antimicrobiana, utilizando cepas bacterianas e de leveduras nos teste de difusão em ágar e teste de microplacas.
- 2- Verificar a atividade antioxidante utilizando como modelo os radicais ABTS^{•+} e DPPH e a determinação de teores de fenóis totais e flavonóides totais.
- 3- Avaliar o potencial de motilidade intestinal dos extratos de *Paepalanthus geniculatus* em camundongos Swiss (*Mus musculus*).



Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos vegetais

4.1.1 Obtenção e procedência

Foram utilizados extratos de *Paepalanthus geniculatus*, extraídos e fornecidos pela Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, do Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara- UNESP.

Foram utilizados os extratos obtidos de escapos e capítulos de *Paepalanthus geniculatus* em diferentes solventes: hexânico, diclorometânico e metanólico.

A espécie *Paepalanthus geniculatus* foi coletada no dia 6 de janeiro de 2006, na região da Serra do Cipó, no Estado de Minas Gerais. O material foi coletado e identificado pelo Prof. Dr. Paulo T. Sano do Instituto de Biociências da USP/SP. Uma exsicata de número SPF 139.580 depositada no Herbário no IB- USP – São Paulo.

Os materiais de estudo foram secos em estufa a 40°C durante 96 horas sendo esporadicamente reviradas. Após a secagem foram separadas em capítulos e escapos e posteriormente trituradas em moinho de facas para realização do processo de extração. Os extratos foram preparados por maceração e/ou percolação de acordo com a Figura 5 com os rendimentos descritos na Tabela 1.

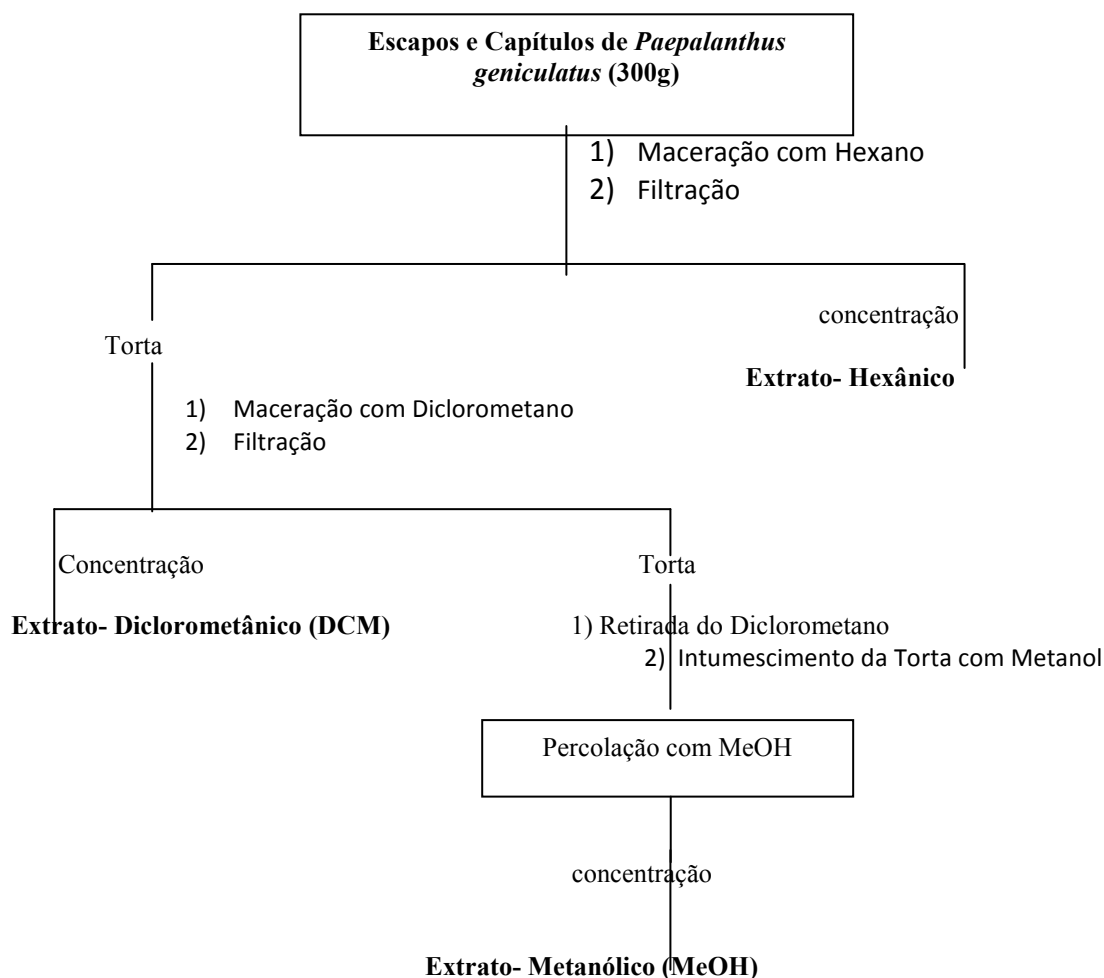


Figura 5: Obtenção dos extratos DCM, MeOH e hexânicos de escapos e capítulos de *P. geniculatus*.

Tabela 1: Valores de massa de extratos seco obtidos após os processos de maceração e percolação das respectivas partes de *P. geniculatus*.

	Escapos e Capítulos (g)	Rendimento (%)
Droga vegetal	300,0	100,00
Extrato Hexânico	5,51	1,84
Extrato Diclorometânico	9,30	3,1
Extrato Metanólico	14,64	4,88

4.2 Cepas bacterianas e Cepas fúngicas

As cepas bacterianas e fúngicas de referência utilizadas neste estudo foram: *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Foram utilizadas as cepas fúngicas de referência: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 6258.

4.3 Preparo dos extratos vegetais

As amostras vegetais foram pesadas e em seguida uma solução de Tween 80 a 20% em metanol foi acrescido ao extrato (100 µL), e água (900 µL). Para todos os testes foi feito o mesmo procedimento, e nos testes de antioxidantes e na determinação dos teores de fenóis e flavonóide totais essa solução foi diluída 1/10.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.1 Padronização da suspensão microbiana

A suspensão dos microrganismos foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24 horas (bactérias) e 48 horas (leveduras), em tubos contendo tampão fosfato pH 7,2 (PBS) estéril até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para a levedura). A concentração final de bactérias foi confirmada com leitura espectrofotométrica a 620 nm obtendo absorvância de 0,10 a 0,15 que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para as leveduras a concentração final foi confirmada com leitura espectrofotométrica a 625 nm obtendo-se absorvância entre 0,08 a 0,10, que corresponde a $1,5 \times 10^6$ UFC/ mL. A partir dessa suspensão procedeu-se uma diluição de forma que a concentração do inóculo bacteriano foi de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, e para o inóculo de leveduras foi de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.4.2 Preparo da solução utilizada como controle positivo

Utilizou-se como controle positivo para as bactérias o ciprofloxacino na concentração de 35 µg/mL e para as leveduras o fluconazol a concentração de 1,5 µg/mL.

4.4.3 Método de difusão em ágar

Foi utilizada a técnica de difusão em ágar com discos de papel. Suspensão de amostras bacterianas e das leveduras, a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e $2,5 \times 10^3$ UFC/mL respectivamente, foram semeadas em ágar Müller Hinton (M.H) e ágar Sabouraud (A.S), com alça de Drigalski. Os extratos foram testados nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Utilizou-se discos de papel Whatman nº1 (com 6 mm de diâmetro) embebidos com 20 µL das soluções de extratos os quais foram colocados na superfície das placas de Petri, contendo o inóculo. As placas foram incubadas por duas horas em geladeira para a difusão do extrato e incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 horas para as bactérias e 48 horas para as leveduras. Após incubação fez-se as leituras dos halos de inibição de crescimento formados ao redor do disco, medidas com paquímetro (mm) (MURRAY *et al.* 2003; NCCLS M2-A8, 2003, CLSI, 2009).

4.4.4 Método de diluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram utilizados os meios de culturas CMH para crescimento bacteriano e para as leveduras o meio de cultura apropriado foi o RPMI 1640.

Os extratos foram preparados em solução Tween 80: metanol: água (1: 4: 45) numa concentração inicial de 2000 µg/mL, diluída seriadamente até 7,8 µg/mL. Aos orifícios das microplacas foram adicionados 20 µL das suspensões bacterianas e fúngicas.

As bactérias foram incubadas em estufa a 37 °C em aerobiose por 24 horas. As leveduras foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas (ELLOF, 1998; NCCLS, 2003- M7-A6; CLSI, 2006).

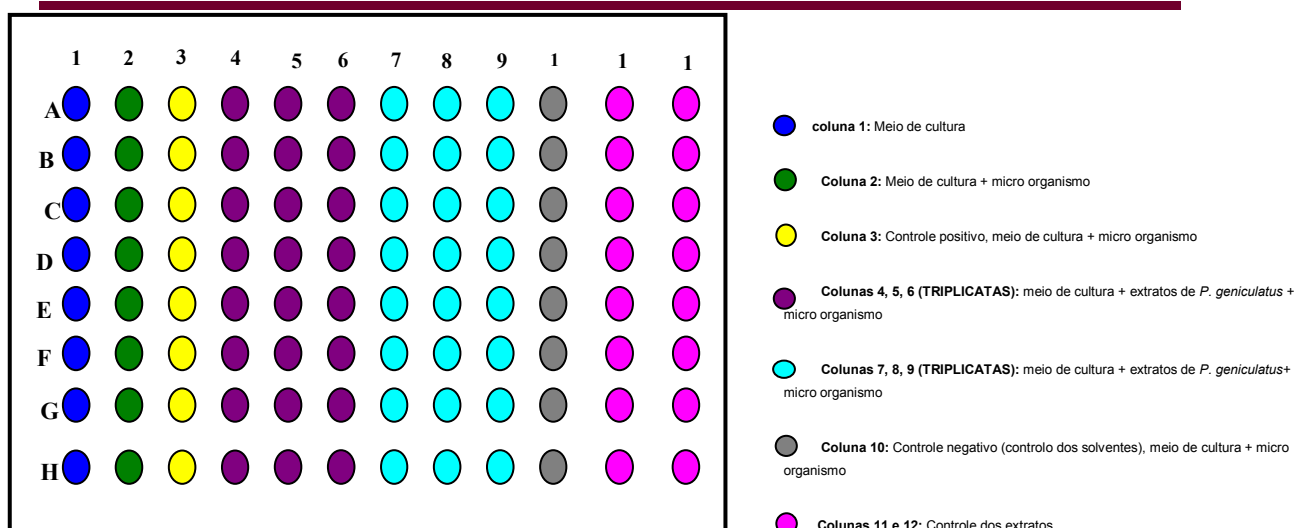


Figura 6: Esquema para a realização do teste em microplacas

Após a incubação foram avaliadas a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM), repicando uma amostra de cada orifício em placa de MH e AS respectivamente. As placas semeadas com bactérias foram incubadas em estufa a 37 °C em aerobiose por 24 horas e as placas semeadas com as leveduras foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas.

4.4.5 Revelação da leitura utilizando resazurina como revelador para as bactérias.

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Foram pipetados 50 µL de solução de resazurina a concentração de 0,0005 g/ 5mL de água, nos orifícios das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas ou até que ocorresse a mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra vegetal sem a mudança de coloração para rosa (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; PALOMINO *et al.* 2002; MONTEJANO *et al.* 2005).

4.4.6 Revelação da leitura utilizando TTC cloreto 2,3,5- trifenil tetrazólio como revelador para as leveduras

O corante TTC foi preparado a 1% em água estéril. Esse corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido pelo micro-organismo. Os micro-organismos vivos reduzem o TTC por ação enzimática, originários de formazano, que é mantido dentro grânulos nas células, que se tornam vermelhas (KENNER *et al.* 1961).

4.5 Avaliação da atividade antioxidante e a Determinação de fenóis totais e flavonóides totais

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no laboratório de Bioquímica Clínica sob a supervisão do Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti segundo proposto por KOLEVA *et al.* 2002.

4.5.1 Atividade Scavenger sobre DPPH

Atividade antioxidante foi avaliada pela atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH[•], de coloração púrpura que absorve a 517 nm (ROGINSKY & LISSI, 2005). Por ação de um agente antioxidante (AH) o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorção a 517 nm. Utilizando soluções de extrato em variadas concentrações, a partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995; SANCHEZ-MORENO *et al.* 1998). A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (IC₅₀). Quanto maior a supressão de DPPH por uma amostra, menor será o valor do IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

A porcentagem de supressão do radical DPPH foi obtida pela seguinte equação:

$$\%AA = \left[\frac{A.\text{controle} - (A.\text{amostra} - A.\text{branco})}{A.\text{controle}} \right] \times 100$$

onde:

A.controle = absorbância inicial da solução de DPPH + EtOH;

A.amostra = absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra + EtOH);

A.branco = absorbância da amostra.

Preparou-se uma solução a 0,1mg/mL numa solução composta por Tween 80: metanol : água (1:4:45) (solução A). Esse procedimento foi realizados para todos os testes, DPPH, ABTS^{•+}, fenóis totais e flavonóides totais.

Os extratos MeOH de escapos e capítulos foram testados nas concentrações de 11,56; 14,44; 17,64; 23,04; 29,16; 43,56; 60,84µg/mL. Os extratos de DCM de escapos e capítulos foram testados nas concentrações de 16; 19,36; 23,04; 27,04; 31,36; 36; 47,61; 51,84 e 60,84µg/mL.

4.5.2 Atividade Antioxidante total sobre ABTS^{•+}

O radical catiônico do ABTS^{•+} [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] é utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como supressor de radicais. O ABTS^{•+} é um radical gerado pela reação entre os sais ABTS^{•+} e persulfato de potássio (PELLEGRINI *et al.* 1998).

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 0,1mL da solução de ABTS^{•+} radical e volumes variados do extrato; o volume final de 0,3mL foi ajustado com solução tampão fosfato de potássio 50 mM, em pH 7,4. Após incubação por 15 minutos, determinou-se a absorbância em 734nm, utilizando-se o espectrofotômetro de placa da marca BIOTEK[®].

A porcentagem de supressão do radical ABTS^{•+} foi obtida pela seguinte equação:

$$\%AA = \left[\frac{A.\text{controle} - (A.\text{amostra} - A.\text{branco})}{A.\text{controle}} \right] \times 100$$

onde:

A.controle = absorbância inicial da solução de ABTS^{•+};

A.amostra = absorbância da mistura reacional (ABTS^{•+} + amostra + Tampão);

A.branco = absorbância da amostra.

A partir da solução A foram feitas as diluições nas concentrações 0,1; 0,25; 0,4; 0,69; 1; 1,36; 1,7; 2,25; 2,7 e 3,36 µg/mL de extrato MeOH de escapos e capítulos. Os extratos de DCM de escapos e capítulos foram testados nas concentrações de 4; 4,7; 5,4; 6,25; 7; 8; 9; 10,02 e 11,1 µg/mL.

4.5.3 Análise quantitativa de fenóis totais

A concentração de fenóis totais (FT) dos extratos foi determinada como descrito por Jayaprakasha e colaboradores (2001), onde 0,025 mL de uma solução a 0,1mg/mL dos extratos, foram adicionados da 0,125 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Depois de 5 min, foi adicionado 0,1 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v) e os tubos foram mantidos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente durante 60 minutos. Decorrido este tempo, a absorbância foi determinada a 735 nm. Realizou-se uma curva padrão com ácido gálico (Figura 7) variando de 5 a 100 µg/mL final. A concentração de Fenóis totais foi calculada utilizando-se a equação da reta onde x foi expresso em µg/mL equivalente em ácido gálico.

Os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos foram testados na concentração de 10 µg/mL.

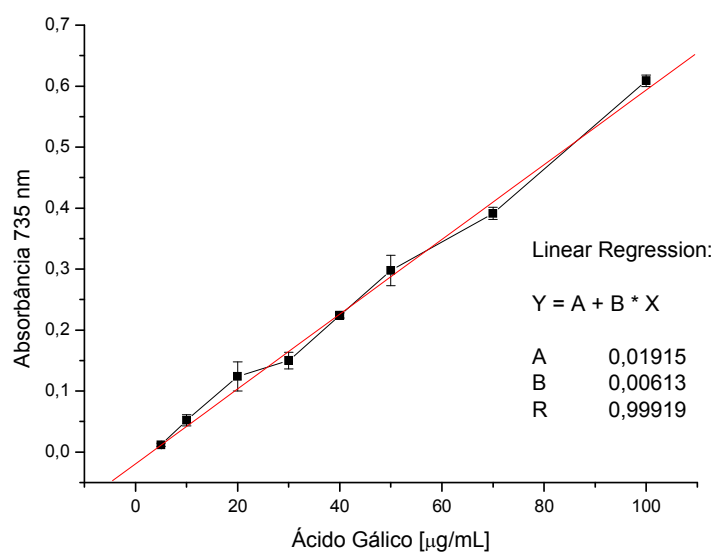


Figura 7: Curva padrão com ácido gálico.

4.5.4 Análise quantitativa de flavonóides totais

A dosagem de flavonóides totais dos extratos de *P. geniculatus* foram determinadas usando o método colorimétrico do cloreto de alumínio, descrito por Chang e colaboradores (2002), com modificações.

Foram adicionados (0,50 mL) dos extratos, diluído 1:10 em EtOH 99%, foi adicionado 0,25 mL de solução de cloreto de alumínio 10% em EtOH e 0,25 mL de solução de acetato de sódio 1,0 M em EtOH. Após incubação por 40 minutos em temperatura ambiente, a mistura de reação foi mensurada a 425 nm, contra um branco constituído de 0,25 mL de acetato de sódio mais 0,50 mL do solvente e 0,25 mL de EtOH 99%. Realizou-se uma curva padrão com quercetina (Figura 8) de concentração variando de 5 a 100 µg/mL final. A concentração de FLT foi calculada utilizando-se a equação da reta onde x foi expresso em µg/mL equivalente em quercetina.

Os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos foram testados na concentração de 50 µg/mL.

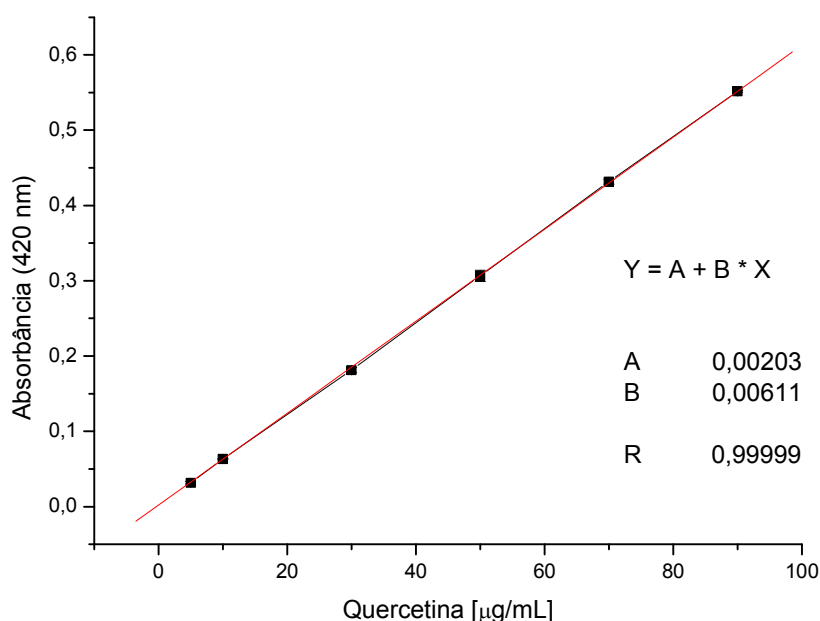


Figura 8: Curva padrão com quercetina.

4.6 Motilidade Intestinal

4.6.1 Animais

Neste experimento foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, com 30 dias de idade, pesando entre 22 e 30g, os quais foram adaptados ao biotério experimental por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. Os animais, com livre acesso à alimentação e à água, foram mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 1 °C, umidade monitorada e fotoperíodo de 12hs claro/escuro. No dia do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam água *ad libitum*. O cloridrato de loperamida é um derivado piperidínico, e corresponde ao 4-(4-clorofenil)4-hidróxi-N,N-dimetil- α,α -difetil-1-piperidinabutiramida. Este fármaco demonstrou ser eficaz contra diarreia induzida por bisacodil, reina, fenolftaleína e outros, sendo agonista opiáceo e anti- secretório (VERHAEREN *et al.* 1996).

4.6.2 Teste de Motilidade Intestinal

Foram constituídos 7 grupos experimentais com 8 animais em cada. Destes, 4 grupos foram tratados com os extratos vegetais, sendo 2 grupos tratados com escapos e capítulos de extrato DCM e 2 grupos tratados com escapos e capítulos do extrato MeOH (250 mg/kg), 1 grupo recebeu solução fisiológica (controle negativo), 1 grupo de controle do solvente (100µl de uma solução Tween 80 a 20% em metanol mais 900 µl de solução fisiológica) e outro grupo recebeu o um fármaco antidiarréico o cloridrato de loperamida (controle positivo, 5 mg/kg), as soluções foram administradas via oral por meio de gavagem.

Após 45 minutos, os animais receberam a suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, 0,5 mL/ animal, também por gavagem.

Após 90 minutos, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e foi realizado a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. Assim, foi feita a medida do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pela suspensão de carvão ativo. Os resultados foram expressos em porcentagem do comprimento total do intestino delgado (JANSSEN & JAGENEAU, 1957; MICHELIN & SALGADO, 2004). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP, sob o parecer nº 41/2010.

4.6.3 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (Anova). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa (DMS) para $\alpha = 0,05$. Foi utilizado o software Prisma 4.1 para a realização das análises estatísticas.



Resultados

5 RESULTADOS

5.1. Método de difusão em ágar

A Figura 9 retrata o teste de difusão em ágar, com o extrato DCM de escapos para o *B. subtilis*.

Na figura 9 ilustra os resultados do teste de difusão em ágar.

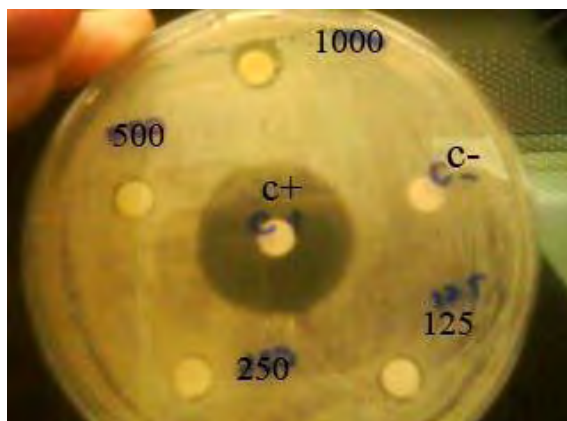


Figura 9: Teste de difusão em ágar com o *B. subtilis*.

Nas tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 estão apresentados os resultados obtidos no teste de difusão em ágar.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de escapos de *P. geniculatus* pelo método de difusão em ágar.

MICRO-ORGANISMOS	AMOSTRA VEGETAL (µg/mL)				ANTIMICROBIANOS		MeOH+Tween 80 a 20% em metanol
	1000	500	250	125	Ciprofloxacino (35µL/mL)	Fluconazol (1,5µL/mL)	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-

(-): não houve formação de halo de inibição de crescimento.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de capítulos de *P. geniculatus* pelo método de difusão em ágar.

MICRO-ORGANISMOS	AMOSTRA VEGETAL (µg/mL)				ANTIMICROBIANOS		MeOH+Tween 80 a 20% em metanol
	1000	500	250	125	Ciprofloxacino (35µL/mL)	Fluconazol (1,5µL/mL)	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-

(-): não houve formação de halo de inibição de crescimento

Tabela 4: Atividade antimicrobiana do extrato DCM de escapos de *P. geniculatus* pelo método de difusão em ágar.

MICRO-ORGANISMOS	AMOSTRA VEGETAL (µg/mL)				ANTIMICROBIANOS		MeOH+Tween 80 a 20% em metanol
	1000	500	250	125	Ciprofloxacino (35µL/mL)	Fluconazol (1,5µL/mL)	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>B. subtilis</i>	8,59*	7,28*	6,65*	6,63*	25,4*	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-

(*) Halos de inibição de crescimento medidos em mm.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato DCM de capítulos de *P. geniculatus* pelo método de difusão em ágar.

MICRO-ORGANISMOS	AMOSTRA VEGETAL (µg/mL)				ANTIMICROBIANOS		MeOH+Tween 80 a 20% em metanol
	1000	500	250	125	Ciprofloxacino (35µL/mL)	Fluconazol (1,5µL/mL)	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-

(-): não houve formação de halo de inibição de crescimento

Tabela 6: Atividade antimicrobiana do extrato hexânico de escapos de *P. geniculatus* pelo método de difusão em ágar.

MICRO-ORGANISMOS	AMOSTRA VEGETAL (µg/mL)				ANTIMICROBIANOS		MeOH+Tween 80 a 20% em metanol
	1000	500	250	125	Ciprofloxacino (35µL/mL)	Fluconazol (1,5µL/mL)	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	25,4*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	24,6*	-

(-): não houve formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco.

Os extratos metanólico e hexânico não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Entretanto o extrato diclorometânico de escapos apresentou halos de inibição de 8,59mm para *B. subtilis* na concentração de 1000µg/mL, 7,28mm na concentração de 500µg/mL, 6,65mm na concentração de 250µg/mL, 6,63mm na concentração de 125µg/mL. As leveduras não apresentaram valores relevantes no teste de difusão.

5.2 Teste de diluição em microplacas

A Figura 10 é a foto do teste de microplaca, com o extrato DCM de escapos e capítulos, onde observa-se a coloração azul, interpretada pela inibição do extrato frente a bactéria *B. subtilis*.

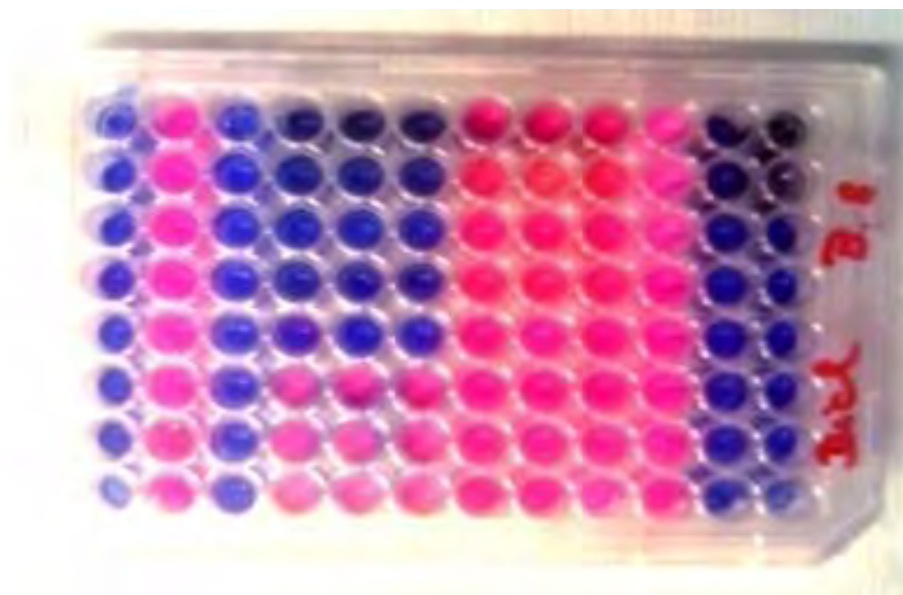


Figura 10: Representação dos resultados em microplacas. Extrato DCM de escapos frente *B. subtilis*

A concentração inicial testada foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicando que se não houve atividade nesta concentração não significa que a substância não tenha atividade antimicrobiana. Pois existem extratos que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações maiores.

Os extratos metanólicos de escapos e capítulos apresentaram atividade *B. subtilis* com MIC= 1000 $\mu\text{g/mL}$. O extrato metanólico de escapos apresentou atividade *S. aureus* com MIC= 125 $\mu\text{g/mL}$ e para o extrato metanólico de capítulos o *S. aureus* apresentou MIC=1000 $\mu\text{g/mL}$. Porém as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* não apresentaram MIC nas concentrações testadas.

No extrato DCM de escapos apresentou atividade para *B. subtilis* com MIC= 62,5 $\mu\text{g/mL}$ no extrato DCM de capítulos não apresentou MIC nas concentrações testadas. Os extratos DCM de escapos e capítulos não apresentaram MIC nas concentrações testadas para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*.

O extrato metanólico de escapos apresentou atividade para *C. parapsilosis* com MIC= 1000 $\mu\text{g/mL}$, entretanto o extrato metanólico de capítulos não apresentou MIC

nas concentrações testadas. Os extratos metanólico de escapos e capítulos não apresentaram MIC nas concentrações testadas para *C. albicans* e *C. krusei*. O extrato metanólico de escapos apresentou atividade para *C. tropicalis* com MIC= 500 µg/mL, já para o extrato metanólico de capítulos não apresentou MIC nas concentrações testadas.

O extrato DCM de escapos apresentou atividade para *C. tropicalis* com MIC = 1000 µg/mL, e os extratos DCM de capítulos não apresentaram MIC nas concentrações testadas. Os extratos DCM de escapos e capítulos não apresentaram MIC nas concentrações testadas para as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

O extrato hexânico de escapos não apresentaram MIC nas concentrações testadas para nenhuma das bactérias e leveduras.

Tabela 7: Atividade antimicrobiana no teste de diluição em microplacas.

Micro-organismos	Extratos (µg/ mL)				
	escapos			capítulos	
	DCM	MeOH	hexano	DCM	MeOH
<i>B.subtilis</i>	62,5	1000	N	N	1000
<i>P. aeruginosa</i>	N	N	N	N	N
<i>S. aureus</i>	1000	125	N	N	1000
<i>E. coli</i>	N	N	N	N	N
<i>C. parapsilosis</i>	N	1000	N	N	N
<i>C. krusei</i>	N	N	N	N	N
<i>C. albicans</i>	N	N	N	N	N
<i>C. tropicalis</i>	1000	500	N	N	N

(N) não houve atividade

5.3 Determinação da Atividade Antioxidante

5.3.1 Atividade Scavenger sobre DPPH

Para este ensaio foram utilizados, quatro extratos (extrato MeOH de escapos e capítulos e extrato DCM de capítulos e escapos).

A Figura 11 apresenta os resultados encontrados de IC₅₀ para o teste radical DPPH, onde o IC₅₀ apresentado pela quercetina foi de 4,71, o ácido gálico 2,37, o extrato DCM de capítulos 20,45; DCM de escapos 25,86; o extrato MeOH de capítulos 22,24 e MeOH de escapos 25,5 µl/mL.

Os extratos DCM e MeOH de capítulos apresentaram um IC₅₀ menor no teste antioxidante do radical DPPH comparado aos outros extratos testados, provavelmente isso ocorreu pela composição química dos capítulos, que apresentou também uma maior porcentagem de fenóis totais.

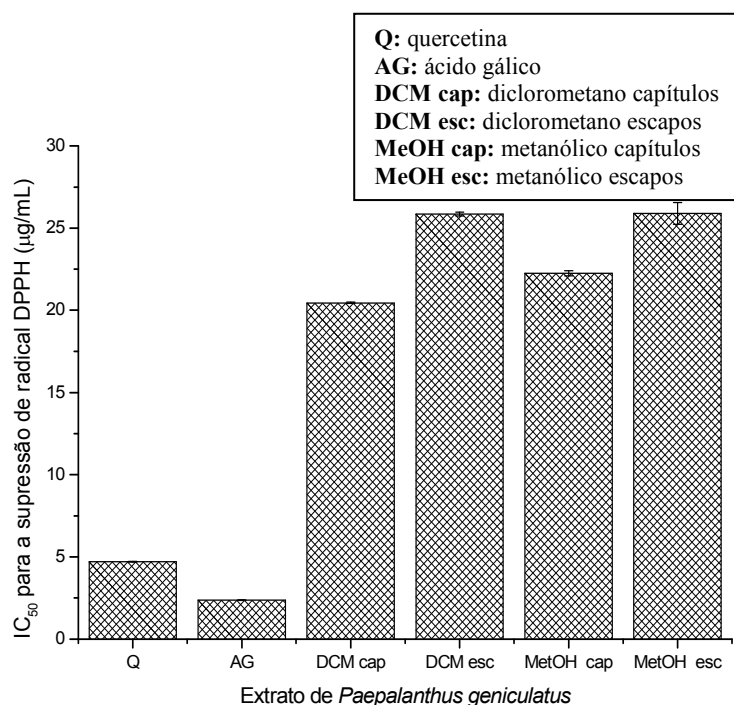


Figura 11: IC₅₀ para o radical DPPH com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos de *P. geniculatus*.

5.3.2 Atividade Antioxidante Total sobre ABTS^{•+}

Para este ensaio foram utilizados, quatro extratos (extrato MeOH de escapos e capítulos e o extrato de DCM escapos e capítulos).

A Figura 12 apresenta os resultados encontrados de IC₅₀ para o teste do cátion ABTS^{•+}, onde a quercetina apresentou um IC₅₀ de 0,4, o ácido gálico 0,3, o extrato DCM de capítulos 29,03, DCM de escapos 29,08, o extrato MeOH de capítulos 13,31 e MeOH de escapos 15,93 µL/mL.

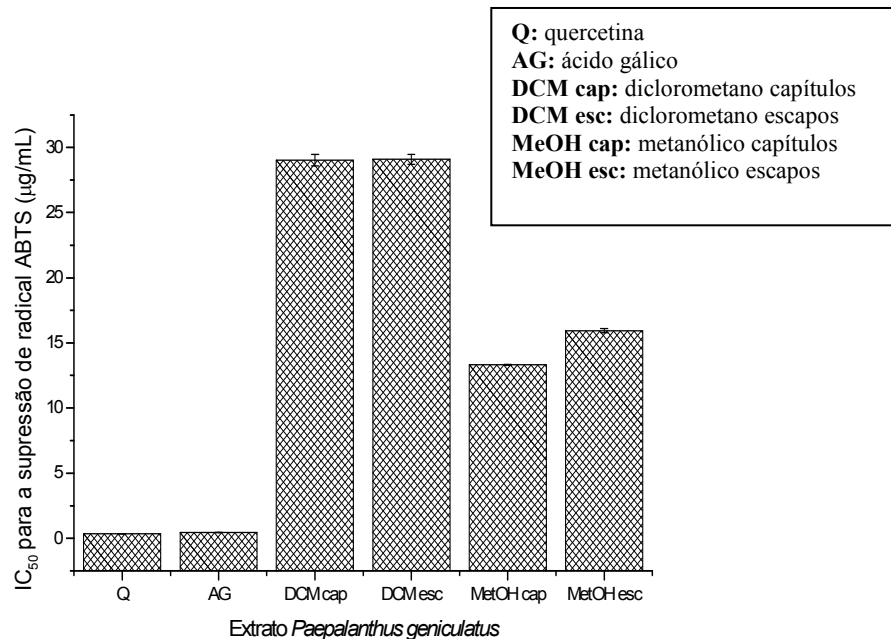


Figura 12: IC₅₀ para o cátion ABTS^{•+} com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos de *P. geniculatus*.

5.4 Determinação do teor de fenóis totais e flavonóide totais

5.4.1 Quantificação de fenóis totais nos extratos

A curva analítica para o ácido gálico (Figura 7) apresentou um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,99919 que foi usada como referência na determinação do teor de fenóis totais. A partir da equação da reta ($y = 0,01915x + 0,00613$) e do valor médio das absorbâncias obtidas para as soluções dos extratos, obteve-se concentração de fenóis apresentados na Figura 13.

A Figura 13 apresenta os resultados encontrados em porcentagem para o teste de fenóis totais, onde os teores encontrados foram de 24,06% para o extrato DCM de escapos; 15,79% para o extrato DCM de capítulos; 15,30% para o extrato MeOH de escapos e 18,08% para o extrato MeOH de capítulos.

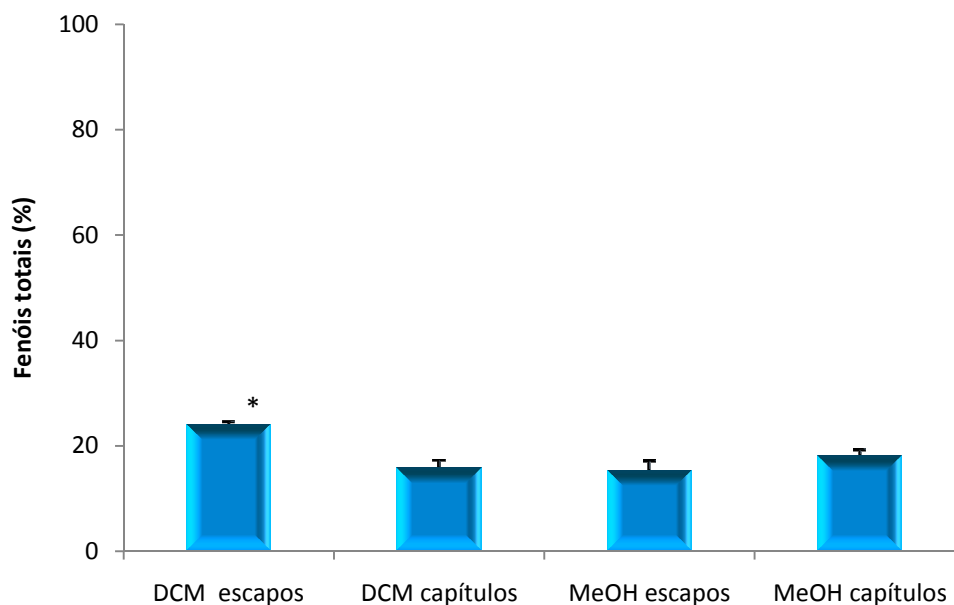


Figura 13: Determinação de fenóis totais com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos.

5.4.2 Quantificação de flavonóides totais nos extratos

A curva analítica para a quercetina (Figura 8) apresentou um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,99999 que foi usada como referência na determinação do teor de flavonóides totais. A partir da equação da reta ($y = 0,00203x + 0,00611$) e do valor médio das absorbâncias obtidas para as soluções dos extratos, obteve-se concentração de flavonóides apresentados na Figura 14.

A figura 14 apresenta os resultados encontrados em porcentagem para o teste de flavonóides totais, onde os teores encontrados foram de 21,16% para o extrato DCM de escapos; 14,45% para o extrato DCM de capítulos; 27,87% para o extrato MeOH de escapos e 44,02% para o extrato MeOH de capítulos.

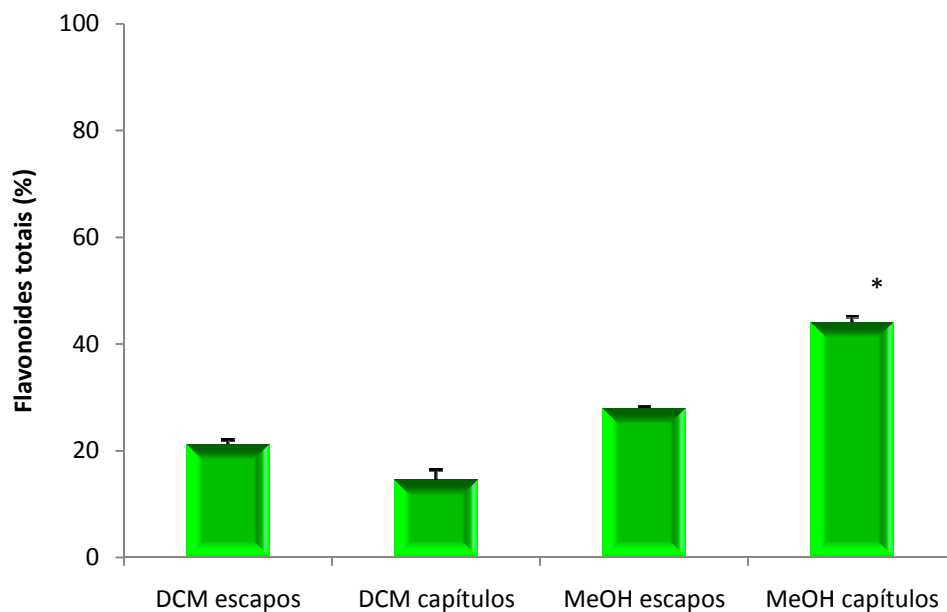


Figura 14: Determinação de flavonóides totais com os extratos MeOH e DCM de escapos e capítulos.

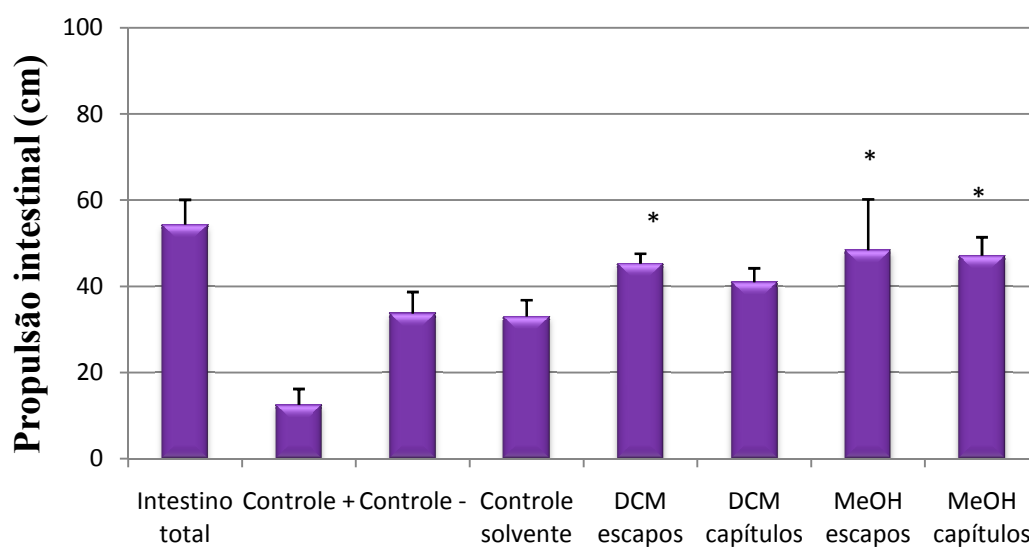
5.5 Determinação da motilidade intestinal em camundongos

Os resultados no teste de motilidade intestinal estão resumido na Tabela 7. Foram utilizados os extratos DCM de escapos e capítulos, e o extrato MeOH de escapos e capítulos na concentração de 250mg/kg. Como controle positivo o cloridrato de loperamida a 5 mg/kg, o controle negativo foi a solução fisiológica 0,3 mL, o controle do solvente foi a água e o Tween 80 a 20% (0,3 mL)

Tabela 8: Distâncias percorridas pelo carvão ativo no intestino de camundongos, sob influência de diferentes tratamentos.

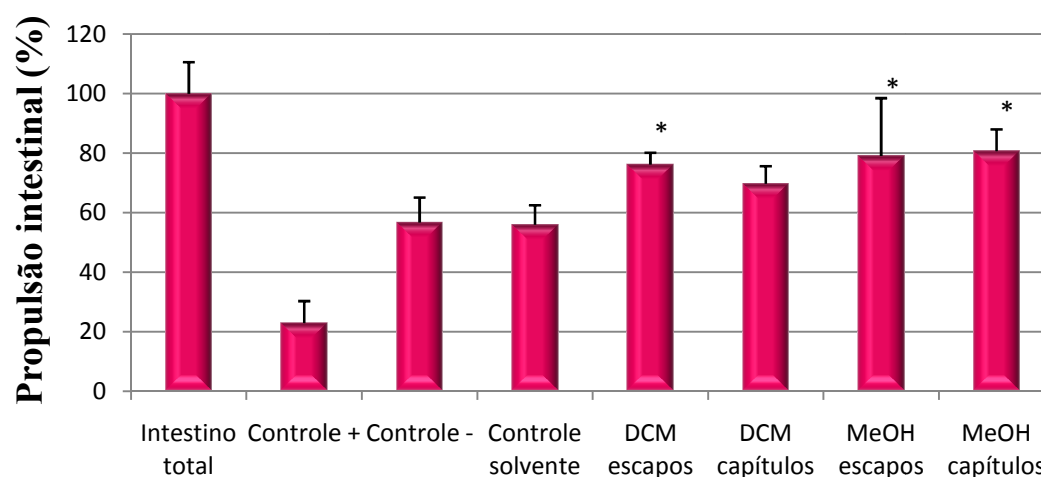
Tratamentos	Média da distância percorrida (cm) $\pm$ DP	Média da distância percorrida (%) $\pm$ DP
Capítulos/MeOH	47,1 $\pm$ 4,3*	80,73 $\pm$ 7,29*
Escapos/MeOH	48,4 $\pm$ 11,8*	79,14 $\pm$ 19,38*
Capítulos/DCM	41,0 $\pm$ 3,2	69,79 $\pm$ 5,90
Escapos/DCM	45,3 $\pm$ 2,3*	76,25 $\pm$ 3,94*
Controle solvente (Tween 80+metanol+água)	33,0 $\pm$ 3,8	56,05 $\pm$ 6,51
Controle negativo (sol. fisiológica)	33,7 $\pm$ 5,0	56,78 $\pm$ 8,35
Controle positivo (cloridrato de loperamida)	12,5 $\pm$ 3,7	23,04 $\pm$ 7,31
Comprimento do Intestino	54,3 $\pm$ 5,8	100,0 $\pm$ 10,64

*(diferença quando comparado ao controle positivo (estatística $p < 0,05$); **DP**: desvio padrão)



*extratos que apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle positivo.

Figura 15: Distâncias percorridas pelo carvão ativo no intestino de camundongos (cm)



*extratos que apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle positivo.

Figura 16: Distâncias percorridas pelo carvão ativo no intestino de camundongos (%)

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos frente aos extratos de *P. geniculatus* demonstrou que houve uma diferença significativa na distância percorrida pelo carvão ativo nos animais após administração dos extratos, quando comparados com os controles. Portanto, segundo a análise estatística realizado, os valores de distância percorrida pelo carvão ativo encontrado nos tratamentos foram estatisticamente diferentes do valor encontrado para o controle positivo (cloridrato de loperamida). Assim sendo, pode-se inferir que os extratos MeOH de capítulos e escapos e DCM de escapos tenham alterado a motilidade intestinal dos animais na concentração de 250mg/kg, enquanto o extrato DCM de capítulos não apresentou alteração significativa na motilidade intestinal dos animais.



6 DISCUSSÃO

É crescente o interesse em terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especificamente aqueles provenientes de plantas (RATES, 2001; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006; OLIVEIRA *et al.* 2007b). No Brasil, plantas medicinais são popularmente utilizadas sob diversas formas, como chá, xarope e tinturas (MATOS, 1997). No entanto, o uso oficial dessas fontes terapêuticas nos serviços de saúde requer conhecimento científico para a transformação dessas plantas em fonte terapêutica para uso seguro, racional e benéfico (RATES, 2001; MICHILIS, 2004; TÔRRES *et al.* 2005; VENDRUSCOLO *et al.* 2005; SILVA *et al.* 2006).

As plantas com atributos terapêuticos utilizadas no cuidado à saúde tradicional compõem importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Aparecem como parte do cuidado tradicional à saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e, por isso têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CEBALLOS *et al.* 1993; CUNHA, 1995; LIMA, 1996; COWAN, 1999; FARIAS & LIMA, 2000; BELÉM, 2002; MICHELIN *et al.* 2005).

Destaca-se, no entanto, a importância de se definir a CIM das plantas para determinação da atividade farmacológica de novos agentes especialmente no Brasil que apresenta uma grande diversidade. Desta forma, diversos estudos baseam-se no desenvolvimento e pesquisa de substâncias mais eficazes, menos tóxicas e no controle da resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (MENG *et al.* 2000; HO *et al.* 2001; MICHELIN *et al.* 2005; LEITÃO *et al.* 2006; LIMA *et al.* 2006a; LIMA *et al.* 2006b; BARBOSA-FILHO *et al.* 2007; SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA, 2007).

Diferentes métodos são utilizados na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais e outros produtos naturais. Dentre eles podemos citar o método de difusão em agar e o método de diluição em meio líquido (macrodiluição e microdiluição). É importante determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de extratos bioativos (ELOFF, 1998; COWAN, 1999).

A interpretação do nível de inibição aceitável é controverso entre os autores, quando comparados com antibióticos padrões, sendo que alguns autores consideram

somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que ambos os métodos de determinação de atividade antimicrobiana apresentaram resultados significativos.

Dos cinco extratos (extratos MeOH de escapos e capítulos, extratos DCM de escapos e capítulos e extrato hexânico de escapos) analisados, dois apresentaram atividade antibacteriana, porém esta atividade foi diferente para cada metodologia, sendo verificada maior atividade antibacteriana nos testes de diluição em microplacas quando comparadas à atividade dos testes em difusão em ágar.

O estudo realizado por Murray e colaboradores (2003), mostra a grande resistência dos microrganismos frente a substâncias antimicrobianas, o que foi observado no presente estudo onde as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* apresentaram-se resistentes a todos os extratos vegetais estudados.

Paepalanthus geniculatus apresentou boa atividade contra as bactérias Gram positivas *B. subtilis* (MIC= 62,5 µg/mL no extrato MeOH de escapos) e *Staphylococcus aureus* (MIC= 125 µg/mL no extrato DCM de escapos). Para *Candida*, somente uma pequena inibição observada para *C. tropicalis* 500 µg/mL, com o extrato MeOH de escapos. O extrato hexânico não apresentou atividade para todos os microrganismos testados. Estes resultados se devem possivelmente pela presença de flavonóides como constituinte(s) químico(s) dessa planta, proposição esta condizente com a literatura que mostra a importância desses constituintes como moléculas bioativas (CUSHNIE & LAMB, 2005; SALATINO *et al.* 1990)

Aligianis e colaboradores (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL.

Segundo Ostrosky e colaboradores (2008) a atividade antimicrobiana realizada em microplacas é até 30 vezes mais sensível que o teste realizado em difusão em ágar, fato esse verificado neste trabalho (Figura 6) onde pode-se notar que os extratos que

apresentaram atividade antibacteriana, mostraram uma atividade mais potente quando testadas em microplacas.

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos e que apresentam elevada estabilidade oxidativa, possuindo a propriedade de prevenir a oxidação de outras substâncias, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Participam, de alguma forma, na inibição do processo oxidativo deteriorativo, quer nos alimentos, no organismo animal ou humano. Em substâncias não nutrientes, são enquadrados principalmente os compostos fenólicos, que podem atuar de forma efetiva como antioxidantes, estando presentes nos vegetais num número bastante elevado de compostos (MANCINI & MANCINI-FILHO, 2005).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula, quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ , interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio, reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007, KYNGMI & EBELER, 2008).

Os testes $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH foram realizados como triagem da atividade antioxidante destes compostos vegetais (extratos de escapos e capítulos DCM e extratos de escapos e capítulos MeOH), os quais não apresentaram uma atividade antioxidante significativa, em comparação ao padrão de quercetina e ácido gálico, ainda que os extratos utilizados nesse trabalho são extratos brutos, enquanto os padrões são substâncias isoladas. O resultado encontrado de IC_{50} no teste do radical DPPH foi 20,45 $\mu\text{l/mL}$ para o extrato de capítulos DCM, e 22,24 $\mu\text{l/mL}$ para o extrato de capítulos MeOH. No teste do cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$ o IC_{50} encontrado foi 13,31 $\mu\text{l/mL}$ para o extrato de capítulos MeOH e 15,93 $\mu\text{l/mL}$ para o extrato de escapos MeOH. O teor de FT no extrato de escapos DCM, apresentou maior porcentagem (24,06%), isso podendo estar relacionado ao padrão ácido gálico que apresenta maior teor de compostos fenólicos. E na determinação do teor de FLT o extrato de capítulos MeOH apresentou 44,02% e escapos MeOH apresentou 27,87% de FLT isso é devido a polaridade dos extratos e dos flavonóides que são encontrados em maiores quantidades em composições polares.

Salatino e colaboradores (1990) realizaram o estudo do teor de fenóis dos capítulos de 86 espécies de 8 gêneros de Eriocaulaceae. Os maiores teores e a maior variabilidade foram obtidos com *Paepalanthus*, com valores entre 0,7-8,9 %. As espécies de *Paepalanthus*, as espécies pertencentes a *Paepalanthus* subg. *Platycaulon* foram as que apresentaram os maiores teores (3,6-8,4 %), enquanto que as de *Paepalanthus* subg. *Xeractis* apresentaram os menores teores (0,7-3,6 %). Do ponto de vista evolutivo, segundo os autores, esses resultados apontam para uma posição basal de *Paepalanthus*, devido aos maiores teores de fenóis, e uma posição mais avançada de *Leiothrix*. Silva e colaboradores (2009) isolaram e identificaram flavonóides, derivados de rutina e apigenina, em extratos de espécies *Leiothrix spiralis*, *Syngonanthus suberosus*, *Syngonanthus dealbatus* e *Eriocaulon ligulatum*, e demonstraram importante atividade antimicrobiana destas espécies.

Os extratos MeOH de capítulos e escapos apresentaram um IC₅₀ menor no teste antioxidante do cátion radical ABTS^{•+} quando comparado aos outros extratos, provavelmente isso ocorreu pela composição dos extratos MeOH que são polares, e por esse motivo pode ser que os flavonóides estejam em maiores concentrações nesse solvente, já que o mesmo também apresenta uma composição química mais polares, isso pode ser comprovado também no teste de FLT, que demonstrou um maior porcentagem de FLT para os extratos metanólico.

Em muitas espécies o escapo é uma parte abundante e muito utilizada na confecção de peças artesanais, iniciou-se uma investigação dos escapos de *P. bromelioides* e *P. latipes*. Deles, Nehme (1997) obteve derivados 7-metoxilados da quercetina, enquanto que Santos (1997) encontrou naftopiranonas nos capítulos e flavonóis 6-metoxilados derivados do kaempferol e da quercetina nos escapos de *P. hilairei*.

Os resultados obtidos no teor de FT apresentaram uma porcentagem maior para o extrato DCM de escapos isso quando comparado aos demais extratos testado, provavelmente porque o padrão utilizado nesse teste foi o ácido gálico, que é usado como padrão para quantificação de fenol.

O teor de FLT obtido nesse trabalho apresentou uma porcentagem maior nos extratos MeOH de escapos e capítulos, isso quando comparado aos demais extratos