



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Atividade Biológica de Plantas Medicinais da Caatinga Brasileira e
Correlação com a sua Composição Fenólica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição (Universidade de Coimbra) e Professora Doutora Maria Teresa Batista (Universidade de Coimbra).

Maine Virgínia Alves Confessor

2012

Imagem de capa 1 disponível em <http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>.

Imagem de capa 2 fornecida por Juliana Gines Bortoletto.

“E partirei em busca de muitos ideais, mas sei que hoje se encontraram o meu passado, futuro e presente. Hoje sinto a emoção da despedida. Hoje è um ponto de chegada e, ao mesmo tempo, ponto de partida.”

AGRADECIMENTOS

Se o valor real de um trabalho depender do que se abdica para o realizar então, os inúmeros momentos que não pude estar com minha família, noivo e amigos já o valorizam suficientemente.

Obrigada primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades únicas proporcionadas e aquelas que ainda estão por vir.

Agradeço aos meus Pais, Marco e Evaneide, pois quando eu engatinhei me ensinaram a andar, quando aprendi a correr, me deixaram voar, e assim fui em busca dos meus sonhos, sabendo sempre que quando precisasse poderia voltar e pousar. Estariam me esperando com seus braços sempre abertos. Meus primeiros e eternos amores, Obrigada.

Aos demais familiares externo minha gratidão através do reconhecimento imensurável aos meus irmãos: Annderson, Kliver e Jéssica que impulsionaram meu sonho e sempre valorizaram os meus ideais que de certa forma também são deles.

Aos meus sobrinhos Yasmim, Belinha e Gabriel pelo amor e brincadeiras que descontraem e transformaram meus dias trazendo alegria. Vocês são anjos do céu.

Ao meu noivo, Ayrton, meu amor, que me apoiou, que foi tolerante em todas as vezes que foi privado de minha companhia. Obrigado pela compreensão, pela confiança, pelo carinho e afeto.

A todos os meus amigos, inclusive aqueles que de longe me observam e estimulam minha persistência.

A Residência Pedro Nunes, que não teria o mesmo significado sem as pessoas que ali habitam e se transformam em nossa família. Obrigada, a todos com quem pude orgulhosamente desfrutar do convívio. Vocês foram preciosos tesouros que DEUS em sua infinita bondade colocou em meu caminho para enfeitar os dias.

Aos amigos que conheci nos laboratórios, pessoas sem as quais a execução deste trabalho seria impossível. Obrigada à Doutora Célia Cabral, à Dra. Teresa Amaral, à Fátima Colaço. Em especial ao Gustavo, Joana, João, Isabel e Tânia, que alicerçaram meus conhecimentos e foram fundamentais em todos os aspectos.

A Juliana Gines Bortoletto pelo belo desenho científico disponibilizado.

A Oana Maria Popa por ter sido um anjo quando mais precisei, sem você este trabalho não teria sido concluído.

Ao taxonomista José Iranildo Miranda de Melo pela colaboração e correta identificação botânica dos meus exemplares.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que me deram, além da oportunidade de trabalhar, a possibilidade de crescer profissionalmente. Professora Doutora

Maria José Gonçalves, Professora Doutora Maria Teresa Cruz, Professora Doutora Ligia Salgueiro, Professor Doutor Antonio Paranhos e Professora Doutora Celeste Lopes.

Ao Júri pela atenção dada, bem como pelas sugestões e recomendações tão importantes para a melhoria deste trabalho.

A minha co-orientadora, Professora Doutora Isabel Luci, por sempre ter sido disponível e atenta aos meus anseios, mesmo antes de vir a Portugal pude ter seu suporte.

Meu agradecimento especial a Professora Doutora Teresa Batista, que mesmo sem me conhecer aceitou me acolher e nos momentos decisivos me orientou e me incentivou. Quaisquer palavras seriam insuficientes para expressar meu reconhecimento e minha admiração a esta pessoa que além de ser dotada de inesgotável conhecimento, ainda possui grandeza e generosidade em seu coração.

Por fim, meus agradecimentos a Universidade de Coimbra e ao MONESIA – berço desta vivência e inspiração para embasamento profissional. Instituições que fomentam o desenvolvimento pessoal e profissional e apoiam projetos de investigação científica.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
I. INTRODUÇÃO	11
1. ETNOCIÊNCIAS:	14
2. FITOTERAPIA E PLANTAS MEDICINAIS	16
3. A CAATINGA: UM BIOMA SUBESTIMADO	18
4. <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	22
4.1 Descrição e origem	22
4.2 Indicações e aplicações terapêuticas	24
4.3 Composição química	25
4.4 Efeitos biológicos atribuídos	26
5. <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.)Brenan	27
5.1 Descrição e origem	27
5.2 Indicações e aplicações terapêuticas	28
5.3 Composição química	29
5.4 Efeitos biológicos atribuídos	30
6. Metabolismo secundário das plantas	32
6.1 Processos metabólicos	33
7. Compostos fenólicos	36
7.1 Estrutura e classes de compostos fenólicos	36
7.2 Compostos fenólicos e benefícios para a saúde	41

II. OBJETIVOS	44
III. MATERIAIS E MÉTODOS	46
MATERIAIS	47
1. Material botânico	47
2. Reagentes gerais e padrões	48
3. Equipamentos	48
4. Softwares	48
MÉTODOS	49
1. Preparação dos extratos	49
2. Avaliação da composição fenólica por métodos cromatográficos	50
2.1. Cromatografia em Camada Fina – TLC	50
2.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	51
3. Tratamento ácido dos extratos	52
4. Quantificação dos compostos fenólicos	53
4.1. Dosagem de Fenóis Totais	53
4.2. Quantificação de Taninos	54
4.2.1. Método da Vanilina	54
4.2.2. Método do ácido fosfomolibdotúngstico	54
(adaptado da FP VIII)	
5. Atividade Biológica	55
5.1. Atividade antioxidante	55
5.1.1. Método do DPPH	55
5.1.2. Método do Anião Superóxido	56
5.2. Atividade antifúngica	57
5.3. Atividade anti-inflamatória	58
5.4. Avaliação da viabilidade celular	59
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
1. Rendimento dos extratos	62
2. Monitorização da composição fenólica por métodos cromatográficos	63
2.1. Cromatografia em camada fina – TLC	63
2.2. Cromatografia líquida de alta resolução – HPLC	64
3. Quantificação dos compostos fenólicos	71
3.1. Fenóis totais	71

3.2.Quantificação de Taninos	72
4. Atividade Biológica	74
4.1.Atividade antioxidante	74
4.2.Atividade antifúngica	77
4.3.Atividade anti-inflamatória	80
4.4.Viabilidade celular	83
V. CONCLUSÕES	85
VI. REFERÊNCIAS	88

RESUMO

O Brasil possui grande potencial no que concerne à biodiversidade. O bioma Caatinga representa a quarta maior área coberta por uma única forma vegetacional. Duas espécies nativas deste bioma são amplamente utilizadas como medicinais pela população local, a *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão conhecida por “aroeira” e a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan conhecida por “angico”. Estas espécies são tradicionalmente utilizadas como agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios e também são eficientes no tratamento de outras doenças.

Compostos fenólicos têm sido referenciados como possuidores de muitos efeitos terapêuticos. Vários investigadores referem as atividades destes compostos e correlacionam-os com as suas respectivas características estruturais. Neste sentido, este trabalho teve como propósito avaliar a composição fenólica dos extratos aquosos destas plantas e a correlação com as suas atividades biológicas.

Os extratos foram obtidos de acordo com o seu uso popular, por decocção e maceração da casca das plantas. A caracterização fitoquímica, quantitativa e qualitativa, foi realizada, respetivamente, por métodos espectrofotométricos (para os fenóis totais e taninos) e cromatográficos (TLC, HPLC-PDA).

A atividade antioxidante foi estimada por recurso a duas metodologias, DPPH e anião superóxido; a atividade antifúngica foi testada frente a três fungos dermatófitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*); enquanto a atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo teste de *Griess* e a viabilidade celular foi monitorizada pelo teste do MTT.

Os resultados mostraram uma melhor atividade dos extratos da *M. urundeuva*, nos quais estão presentes, basicamente, os mesmos compostos: ácidos fenólicos (principalmente ácido gálgico e cafeico) e taninos hidrolisáveis e condensados, que constituem os compostos fenólicos maioritários. Estes extratos mostram grande atividade sequestrante para o radical DPPH e anião superóxido; inibição do crescimento fúngico, muito significativa para o *E. floccosum* (MIC e MLC de 100 $\mu\text{g/mL}$) e atividade anti-inflamatória, melhor no decocto, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, sendo estas atividades registadas para concentrações destituídas de citotoxicidade.

A. colubrina também é rica em taninos, essencialmente taninos condensados e, em menor quantidade, ácido gálgico e protocatéquico. Esta planta também apresentou

propriedades antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias, embora inferiores à *M. urundeuva*.

Dentre os métodos de extração, a decocção revelou melhores rendimentos e teores de fenóis totais e de taninos, bem como melhores atividades biológicas.

Finalmente, a predominância de ácido cafeico, galhotaninos e elagitaninos podem justificar as melhores atividades verificadas para a *M. urundeuva*, uma vez que, estes compostos, especificamente os taninos hidrolisáveis são, em geral, agentes biológicos mais potentes.

Do estudo realizado ressalta a importância das duas plantas estudadas na procura de novos produtos naturais biologicamente ativos e contribuição para comprovar a sua eficácia e segurança nas doenças inflamatórias e da pele, para as quais estas plantas são usadas, na medicina popular da região da Caatinga, no Brasil.

Palavras-chave: *Myracrodruon urundeuva*, *Anadenanthera colubrina*, compostos fenólicos, taninos e atividade antioxidante, atividade antifúngica e atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Brazil possesses a large potential in what concerns biodiversity. The Caatinga biome represents the fourth largest area covered by a single vegetation form. Two native species from this biome are widely used as medicine by local populations, *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão known as “aroeira” and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan known as “angico”. These species appear as antimicrobial and anti-inflammatory agents and are also effective on the treatment of other diseases.

Phenolic compounds have been referred as possessing many therapeutic effects. Many researchers point the activities of these compounds and correlate them to their chemical structure. In this sense, this work purposed to evaluate the phenolic composition of aqueous extracts of these plants and the correlation to their biological activity.

The extracts were obtained in accordance to their popular use, by decoction and maceration of the plant barks. Phytochemical characterization, quantitative and qualitative, was accomplished throughout spectrophotometric (total phenols and tannins) and chromatographic methods (TLC, HPLC-PDA), respectively.

Antioxidant activity was estimated by two methodologies, DPPH and superoxide anion; antifungal activity was tested for three dermatophyte fungi (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum*); while anti-inflammatory activity was evaluated by *Griess* assay and cell viability was monitored by the MTT test.

The results showed a better activity of *M.urundeuva* extracts, in which, basically, the same compounds are present: phenolic acids (mainly gallic and caffeic acid) and hydrolysable and condensed tannins, which constitute the major phenolic compounds. These extracts showed high sequestrant activity against the DPPH radical and superoxide anion; a strong fungal growth inhibition to *E. floccosum* (MIC e MLC de 100 $\mu\text{g/mL}$); anti-inflammatory activity, which was better in the decoct at the 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration. These activities were verified for concentrations without cytotoxicity.

A. colubrina is also rich in tannins, essentially condensed tannins and, in a less amount, gallic and protocatechuic acid. This plant also showed antioxidant, antifungal and anti-inflammatory properties, although lower than *M. urundeuva*.

Among the extractions methods, the decoction revealed a better yield and total phenols and tannins, as well as better biological activities.

Finally, the predominance of caffeic acid, gallotannins and elagitannins may justify the relatively better activity verified to *M. urundeuva* once, these compounds, specifically the hydrolysable tannins are, in general, more powerful biological agents.

This work highlight the importance of these two plants in the search for new natural biological active products and to the contribution it gave to prove the effectiveness and safety in inflammatory and skin diseases, for which these plants are used, in popular medicine in Caatinga area, Brazil.

Keywords: *Myracrodruon urundeuva*, *Anadenanthera colubrina*, phenolic compounds, tannins, antioxidant activity, antifungal activity and anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Vista do Bioma Caatinga. A e B caracterizando o período da chuva. C e D caracterizando o período da seca. Pocinhos, Paraíba, Brasil. 19
Imagens: CONFESSOR, M. V. A.
- Figura 2:** Mapa do Brasil evidenciando a distribuição dos biomas. Fonte: 20
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=16.
- Figura 3:** Desenho botânico adaptado de *Myracrodruon urundeuva* Allemão. 23
Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>.
- Figura 4:** Desenho botânico de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Bren. Autor: 27
Juliana Gines Bortoletto.
- Figura 5:** Esquema das principais vias biossintéticas dos metabolitos de plantas. 35
Fonte: <http://pt.scribd.com/doc/22584053/METABOLITOS-SECUNDARIOS>.
- Figura 6:** Estrutura química do fenol. 36
- Figura 7:** Estrutura química de dois tipos de Flavonóides. A: flavona; B: aurona. 38
- Figura 8:** Esquema de classificação dos metabolitos secundários de plantas, 41
ênfatizando os compostos fenólicos.
- Figura 9:** Colheita das cascas de *Myracrodruon urundeuva* (A) e *Anadenanthera 47*
colubrina (B).
- Figura 10:** Cromatogramas dos extratos da aroeira (ARD e ARF) e angico (AND 64
e ANF). A e C: Cromatogramas em placas de celulose desenvolvidas com ácido acético a 15%, sob observação à luz UV, a 365 nm, após revelação com NP-PEG. B e D: Cromatogramas em placas de gel de sílica G F₂₅₄ desenvolvidas com tolueno-acetona-ácido acético (12:30:4), observado à luz visível, após revelação com DMACA. CAT: padrão de catequina.
- Figura 11:** Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente I, para os extratos da 65
aroeira: A – ARD; B – ARF; C – ampliação de ARD). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos (picos de 1 a 4).
- Figura 12:** Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente I, para os extratos da 67
aroeira sujeitos à hidrólise ácida: A – ARD-H⁺; B – ARF-H⁺). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos (picos de 1 a 7).

Figura 13: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente II, para os extratos do angico: A – AND; B – ANF). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos. 69

Figura 14: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente II, para as soluções resultantes do tratamento ácido dos extratos de angico: A – AND-H⁺; B – ANF-H⁺). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos. 70

Figura 15: Concentração de fenóis totais nas cascas da aroeira e do angico, em função do método extrativo. 72

Figura 16: Concentração de taninos totais e de taninos condensados nas cascas da aroeira e do angico, em função do método extrativo. 74

Figura 17: Atividade antioxidante dos extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) para os radicais DPPH e anião superóxido, expressa no valor de IC₅₀. 75

Figura 18: Atividade anti-inflamatória dos extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) para as diferentes concentrações dos extratos (em µg/mL), expressas em percentagem de produção de NO, extrapolada da curva padrão de nitritos, pelo método de *Griess* (* p<0,05; (** p<0,01; (***) p<0,001). 81

Figura 19: Percentagem de inibição do NO para os extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) na concentração de 100 µg/mL. 82

Figura 20: Viabilidade celular dos extratos da aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF), nas concentrações indicadas (µg de extrato/mL), avaliada pelo teste do MTT. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).	37
Tabela 2: Tipos de extrações e abreviaturas atribuídas aos diferentes extratos obtidos.	49
Tabela 3: Gradientes utilizados na análise cromatográfica dos extratos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> e <i>Anadenanthera colubrina</i> .	52
Tabela 4: Rendimento extrativo da casca de cada amostra.	52
Tabela 5: Identificação dos compostos majoritários da ARD, no gradiente I.	62
Tabela 6: Identificação do composto majoritário da ARF, no gradiente I.	65
Tabela 7: Identificação dos compostos majoritários do hidrolisado ácido da ARD, no gradiente I.	67
Tabela 8: Identificação dos compostos majoritários do hidrolisado ácido da ARF, no gradiente I.	68
Tabela 9: Comportamento de padrões de ácidos fenólicos em HPLC-PDA nas mesmas condições cromatográficas usadas para as amostras ARD e ARF, no gradiente I.	68
Tabela 10: Identificação dos compostos majoritários resultantes do tratamento ácido da AND e ANF, no gradiente II.	71
Tabela 11: Concentração de taninos condensados e totais nos extratos analisados.	73
Tabela 12: Atividade antifúngica dos extratos da aroeira e angico.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFISA – Associação Brasileira das empresas do setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção a saúde

AND- decocto do angico

AND_H- hidrolisado do decocto do angico

ANF- macerado do angico

ANF_H- hidrolisado do macerado do angico

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARD- decocto da aroeira

ARD_H- hidrolisado do decocto da aroeira

ARF- macerado da aroeira

ARF_H- hidrolisado do macerado da aroeira

BHA- butil-hidroxianisol

BHT- butil-hidroxitolueno

CAT- Catequina

CET- Conhecimento Ecológico Tradicional

CHS- chalcona-sintetase

cm- centímetros

CO₂– dióxido de carbono

CoA- coenzima A

CT- Conhecimento Tradicional

DMACA- p-dimetilaminocinamaldeido

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EPSP- 5-enolpiruvochiquimato 3-fosfato

EtOH- etanol

g- gramas

HPLC- Cromatografia líquida de alta resolução

IC₅₀- concentração inibitória a 50%

LDL- lipoproteínas de baixo peso molecular

LPS- lipopolissacarídeo

mg- miligramas

mL- mililitros

Min- minutos

MT- Medicina Tradicional

MTT- 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NBT- azul de nitrotetrazólio

nm- nanômetros

NO- monóxido de azoto

NOS- óxido nítrico sintetase

NP- éster aminoetílico do ácido difenilbórico

NP-PEG- Natural product-polyethyleneglycol reagent

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAC- proantocianidina

PBS- tampão fosfato

PDA- fotodiodos

PEG- solução etanólica de polietilenoglicol 4000

PEP- fosfoenolpiruvato

RMN- ressonância magnética nuclear

ROS- espécies reativas de oxigênio

R_t - tempo de retenção

Sh - shoulder

SUS- Sistema Único de Saúde

TLC - cromatografia em camada fina

TNF α - fator de necrose tumoral

UV- ultravioleta

Vis- visível

μ L- microlitro

I.
INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As civilizações primitivas perceberam a existência de plantas comestíveis e, além destas, plantas dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem utilizadas no combate às doenças, revelaram, ainda que empiricamente, o seu potencial terapêutico (CUNHA, 2006). Substâncias naturais de origem animal, vegetal e mineral vêm sendo utilizadas como fontes de medicamentos desde tempos remotos em diferentes culturas humanas (DAVID e ANDERSON, 1969; LEV, 2003) e perpetuando-se através da Medicina Tradicional (MT).

As comunidades humanas desenvolveram um apurado saber acerca das propriedades terapêuticas e medicinais das plantas e animais (ALVES, 2006) e desde 1980 várias publicações têm mostrado a importância do uso da Fitoterapia e Zooterapia em comunidades tradicionais de regiões socioeconômica e ambientalmente distintas, do Brasil (CARTAXO *et al.*, 2010; CONFESSOR, 2009; CONFESSOR *et al.*, 2009; FERREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2011; COUTINHO *et al.*, 2002; MOURA, 2002; ALVES, 2006; ALVES e ROSA, 2006; TEIXEIRA, 2006; AGRA *et al.*, 2008). Embora as pesquisas científicas que visam avaliar o uso de plantas e animais serem relativamente recentes, as práticas populares relacionadas como seu uso são mais antigas, e evidenciam que muitas comunidades têm os recursos naturais como única solução viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (ALBUQUERQUE, 2002).

Dessa forma, pesquisas são necessárias para determinar as doses e concentrações ótimas das preparações, bem como para a identificação dos reais efeitos colaterais desses produtos naturais. Além disso, a eficácia das preparações, técnicas e práticas precisam ser investigadas para a identificação de plantas promissoras para uso seguro como produto promotor de saúde. Nos últimos anos, uma considerável atenção tem sido dada aos compostos bioativos de origem natural, devido à sua capacidade de trazer benefícios para a saúde humana, como redução da incidência de algumas doenças degenerativas como cancro e diabetes (CONFORTI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009), redução de fatores de risco de doenças cardiovasculares (JIMÉNEZ *et al.*, 2008), efeitos antioxidantes, anti-mutagênicos, antialérgicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006), entre outros.

Estudos etnofarmacológicos focando o uso de medicamentos fitoterápicos e zooterápicos podem ser extremamente importantes para rastrear a eventual utilidade terapêutica desta classe de medicamentos biológicos (PIERONI *et al.*, 2002). A eficácia de algumas plantas, como por exemplo, a *Albizia anthelimentica* Brongn, contra helmintos intestinais (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962), tem sido confirmada e os seus fitoconstituintes, identificados. É presentemente sabido que potentes fármacos usados na medicina tradicional advêm de metabolitos secundários produzidos pelas plantas. Um exemplo é a morfina, isolada da papoila (*Papaver somniferum* L.) em 1803 por Seturner, e usada para aliviar a dor (DREYFUS e CHAPELA, 1994; HARVEY e WATERMAN, 1998).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 20-25 % dos medicamentos presentes nas farmácias ocidentais derivam de plantas medicinais e, ainda de acordo com esta entidade, cerca de três quartos da população mundial recorre a este tipo de produtos (GILANI *et al.*, 2005). O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 mil-milhões por ano e vem seduzindo, a cada ano, mais adeptos nos países desenvolvidos (FERNANDEZ e ANTUNES, 2000). Além da grande diversidade de espécies medicinais disponíveis, outro fator que motiva o investimento para a obtenção de medicamentos de origem vegetal é a diminuição do custo e do tempo de produção, já que medicamentos sintéticos, ou semi-sintéticos, possuem elevado custo de produção, pois têm como matéria-prima, na sua maioria, produtos importados (SILVA, 2008).

A planta medicinal, após a sua colheita e processamento, transforma-se em “droga” vegetal que contém certo número de substâncias, que, na sua maioria, atuam no organismo humano (ABIFISA, 2009). O uso indiscriminado de plantas com fim terapêutico, sem o devido conhecimento e orientação médica, pode causar danos, muitas vezes irreversíveis, ao invés dos benefícios esperados. Estudos acerca da validação de espécies contendo compostos com efeitos terapêuticos são necessários para garantir os efeitos curativos da planta, além de permitir a utilização com segurança, visando tratar, com maior eficiência, possíveis enfermidades.

Nesse contexto, o Brasil destaca-se, tanto pela sua riqueza de recursos genéticos, quanto pela sua complexa diversidade cultural (CONFESSOR, 2009). A adaptação dos vários grupos humanos à riqueza biológica do país gerou um inestimável sistema de conhecimento acerca de recursos biológicos utilizados para diferentes finalidades, incluindo o uso da fauna e flora para fins medicinais (ELISABETSKY e WANNMACHER, 1993).

A região Nordeste do Brasil foi durante muito tempo esquecida, por grande parte de a sua extensão ser formada por vegetação tipicamente seca, conhecida por Caatinga. Atualmente, este importante domínio vegetacional passou a ser alvo de pesquisas voltadas para o estudo dos usos terapêuticos das plantas utilizadas por comunidades locais (SILVA, 2008; CARTAXO *et al.*, 2010). Vários pesquisadores (AGRA *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; CARTAXO *et al.*, 2010) têm referenciado espécies que podem ter um elevado potencial farmacológico e fitoquímico para inúmeros objetivos médicos, mas que ainda necessitam de estudos que provem, cientificamente, as suas atividades.

Dentre as várias espécies de plantas medicinais nativas da Caatinga, duas bastante utilizadas tradicionalmente são a *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão. (Anacardiaceae), de nome popular aroeira e a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) de nome vulgar angico, plantas de ampla a intermediária distribuição na região Nordeste e de grande diversidade de usos medicinais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; CONFESSOR, 2009), tornando-se, portanto, plantas-alvo com elevado potencial fitoquímico e de atividade biológica. Diante do exposto, e com base nos pressupostos da pesquisa etnodirigida, estas plantas foram selecionadas visando a avaliação da atividade biológica, bem como a sua correlação com a composição fenólica.

1. ETNOCIÊNCIAS

O prefixo *ethno* refere-se ao sistema de conhecimentos típicos de uma determinada cultura (STURTEVANT, 1964; CAMPOS, 2002). Moura (2002) conceitua Etnociência como a “ciência do outro”, a qual abrange tantas outras, tais como a Etnobotânica (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002), Etnoecologia (NAZAREA, 1999), Etnozoologia (ALVES e ROSA, 2006), Etnoveterinária (CONFESSOR *et al.*, 2009), etc.

Segundo Marques (2002), o que hoje se denomina Etnociência emergiu no panorama científico como um campo interdisciplinar, de cruzamento de saberes, que geram novos campos. Estes saberes foram oriundos do diálogo entre as ciências naturais e as ciências humanas e sociais. É nesta linha de pensamento, que se destacam as etnociências, direcionadas para a tal almejada transdisciplinaridade (MOURA, 2002).

Segundo Diegues (1996), a Etnociência trata de estudos que compreendem o conhecimento de diferentes sociedades sobre os processos naturais, procurando o entendimento da lógica subjacente ao conhecimento humano sobre a natureza, as suas taxonomias e classificações. Ela permite uma compreensão de como os humanos variam os seus conhecimentos e crenças dentro de contextos históricos e ecológicos diferentes, a fim de expressar as múltiplas possibilidades oferecidas pelas culturas humanas (RIST e DAHDOUH-GUEBAS, 2006).

Infelizmente, existe uma resistência em aceitar conhecimentos ou explicações que não condizem com a objetividade ou rigor técnico da ciência ocidental. Porém, de acordo com Chrétien (1994), há ciência em todas as sociedades, inclusive nas arcaicas. Segundo este autor, a importância dos estudos etnocientíficos está justamente na constatação de que toda e qualquer sociedade se esforça para compreender o mundo à sua volta. As sociedades tradicionais possuem um conhecimento apurado sobre o ambiente onde vivem o que lhes permite adaptarem-se às condições desse ambiente (CONFESSOR, 2009).

A Etnobotânica inclui todos os estudos concernentes à relação mútua entre populações tradicionais e as plantas (COTTON, 1996). A Etnobotânica aponta como campo interdisciplinar o estudo e a interpretação do conhecimento, significado cultural, manejo e usos tradicionais dos elementos da flora (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). Os estudos etnobotânicos são importantes, especialmente no Brasil, uma vez que o seu território abriga uma das floras mais ricas do globo (COTTON, 1996).

Apesar da diversidade de conceitos e definições, todas as subdivisões das etnociências convergem a um cerne comum: possuem como essência de estudo o Conhecimento Tradicional (CT) ou Conhecimento Ecológico Tradicional (CET) (MOURÃO *et al.*, 2006). O conhecimento tradicional torna-se, então, de interesse para a ciência, por se tratar do relato verbal, das observações sistemáticas para os fenômenos biológicos, feito por pessoas perspicazes, porém iletradas, e pela percepção de que a ausência de educação e cultura formais não é sinonímia de ausência de conhecimento (ELISABETSKY e SOUZA, 2004).

Neste âmbito, Albuquerque *et al.* (2006) apontam vários caminhos para o estudo de plantas medicinais quanto a aspectos fitoquímicos e atividades biológicas, destacando quatro tipos básicos de abordagens: randômica, etológica, quimiotaxonômica ou filogenética e etnodirigida. A randômica consiste numa abordagem aleatória, ou seja, colheita ao acaso de plantas para triagens fitoquímicas e

farmacológicas; a abordagem quimiotaxonômica consiste na seleção de espécies de uma família ou gênero, para as quais se tenha algum conhecimento fitoquímico de, pelo menos, uma espécie do grupo; a etológica é baseada nos estudos de comportamento animal. A abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito dos seus recursos naturais e a aplicação que fazem deles (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). Duas disciplinas destacam-se neste âmbito: a Etnobotânica e a Etnofarmacologia. Por definição, a Etnobotânica ocupa-se da “inter-relação direta entre pessoas e plantas”, incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais (CONFESSOR, 2009); e a Etnofarmacologia ocupa-se do estudo dos preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde e doença, que incluem, isoladamente ou em conjunto, plantas, animais, fungos ou minerais, indo mais além do que o registro dessas “drogas”, mas incluindo uma avaliação experimental.

Há alguns aspectos que podem ser destacados como limitantes à Etnobotânica e Etnofarmacologia, tais como: dificuldades na colheita de informações fidedignas, a associação do uso de plantas aos constituintes mágico-religiosos e a existência de questões éticas que envolvem acesso ao conhecimento tradicional associado ao uso da biodiversidade. Apesar destes fatores relevantes, estas ciências têm demonstrado ser poderosas ferramentas na busca de substâncias naturais com ação terapêutica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

2. FITOTERAPIA E PLANTAS MEDICINAIS

Através de estudos etnobotânicos é possível compreender as sociedades humanas, passadas e presentes, e as suas interações ecológicas, genéticas, evolutivas, simbólicas e culturais com plantas (ALVES *et al.*, 2007). O homem tem buscado, em todas as épocas e culturas, recursos que melhorem a sua condição de vida para, assim, aumentar as suas hipóteses de sobrevivência. O uso das espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças, portanto, perpetuou-se na história da civilização humana e chegou até os dias atuais, sendo utilizada por grande parte da população mundial como eficaz fonte terapêutica. O uso das plantas medicinais, em países em desenvolvimento, tem sido inclusive amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA, 1996).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde OMS (2003) a planta medicinal é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos; a planta fresca é aquela colhida no momento da sua utilização e a planta seca é aquela que foi precedida de secagem, equivalendo à “droga” vegetal.

Na Portaria GM/MS 971/2006 a Fitoterapia é considerada um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais nas suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. O medicamento fitoterápico é definido como:

“Medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006 p. 46).”

A produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agronômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. Essa fundamentação científica, necessária para o desenvolvimento de um produto fitoterápico, diferencia-o das plantas medicinais e das preparações utilizadas na medicina popular (BRITO, 2010).

As plantas medicinais, as preparações fitofarmacêuticas e os compostos naturais isolados representam um mercado que movimenta mil-milhões de dólares, tanto em países industrializados, como em desenvolvimento. O mercado para os tratamentos que utilizam como base plantas medicinais totalizou US\$ 22 mil-milhões em 2002, sendo que, apenas na Europa e nos Estados Unidos movimentou US\$ 8,5 mil-milhões e US\$ 6,3 mil-milhões, respectivamente (BRITO, 2010). De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde - Abifisa (2009), que se apresenta como principal associação do

setor, o mercado brasileiro de fitoterápicos é dimensionado a partir de um faturamento de R\$ 660,5 milhões, em 2007, e uma quantidade vendida de 37,3 milhões de unidades, valores esses que correspondem a cerca de 3% do mercado farmacêutico brasileiro.

Muitos países da Europa utilizam plantas medicinais de forma ampla, como a Alemanha e a França, que detêm 39 e 29% do total de vendas da União Europeia, respetivamente. No entanto, a legislação europeia tem sido marcada por normas cada vez mais restritivas, exigindo testes que comprovem a eficácia, qualidade e segurança dos fitoterápicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Com base no modelo europeu, os requisitos para a obtenção do registro para este tipo de medicamento são: a comprovação da eficácia terapêutica, da qualidade, tanto da matéria-prima utilizada quanto do produto final, e estudos de toxicidade que definam o grau de risco do produto (FREITAS, 2007).

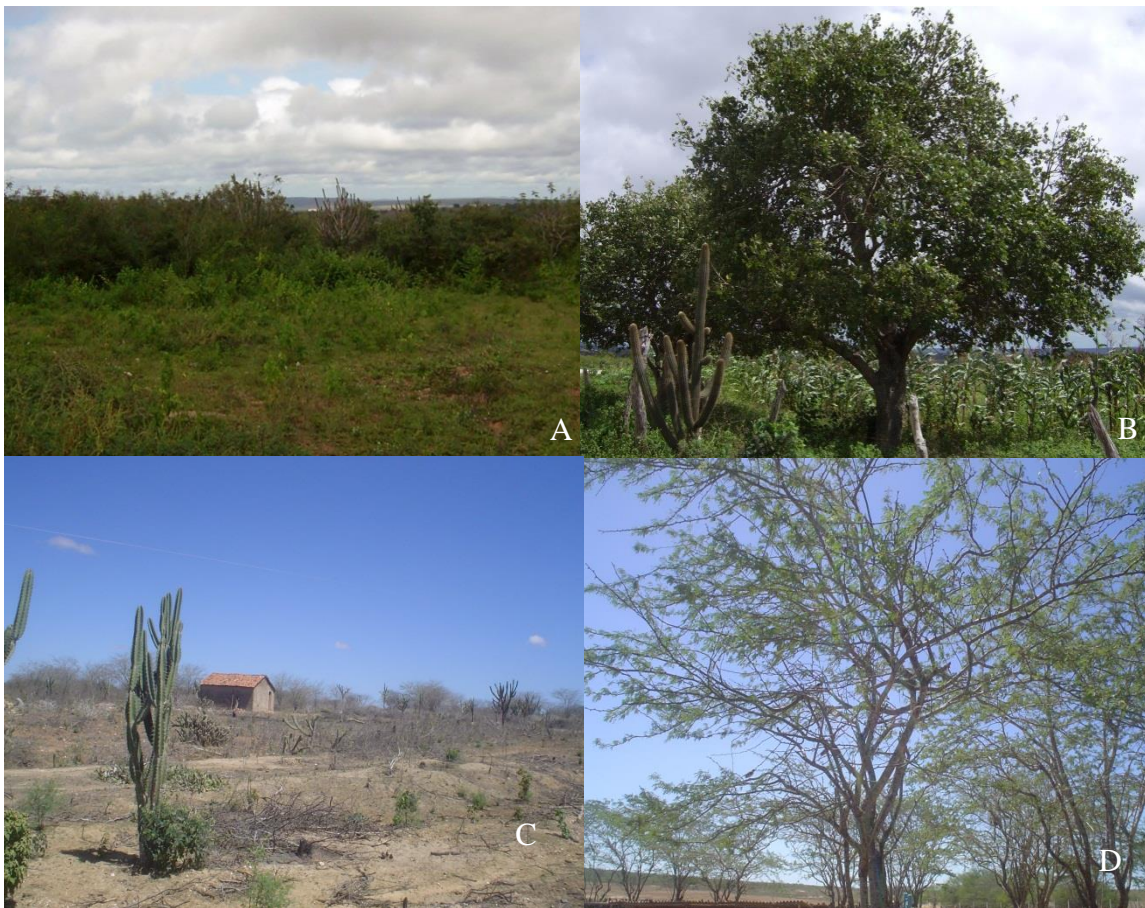
Relativamente ao Brasil, este é o país com destaque mundial para as plantas superiores, devido a uma rica diversidade étnica e cultural associada ao uso de plantas medicinais. Apesar de deter este valioso conhecimento tradicional, ter o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em tecnologias e terapêuticas apropriadas e apresentar cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (maioria na Amazônia, depois Mata Atlântica seguido do Cerrado), em apenas 8% foram estudados os compostos bioativos e em 1.100 espécies avaliadas as suas propriedades medicinais, até o ano de 2006 (BRASIL, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Em 2009, de acordo com a base de registros da ANVISA e de dados económicos da base de dados ANVISA/SAMMED, foram registados 727 produtos fitoterápicos, no Brasil (BRITO, 2010).

Apesar do amplo uso no Brasil de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, apenas recentemente, políticas públicas voltadas para essa terapêutica têm sido desenvolvidas. Ações transversais vêm sendo equacionadas pelo Ministério da Saúde de forma a desenvolver e incentivar o setor, inserindo a sua prática no Sistema Único de Saúde – SUS (VALDIR e MELLO, 2008).

3. A CAATINGA: um bioma subestimado

A etimologia da palavra caatinga é de origem tupi e a sua formação lexical significa *kaa* (floresta, mata) e – *tinga* (um sufixo que significa “branco”, “claro”) (AMANCIO ALVES, 2007), referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação

seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, 2003). Apesar das várias definições existentes, a Caatinga (Figura 1) compreende basicamente um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas (CASTELLETTI *et al.*, 2003; PRADO, 2003).



**Figura 1: Vista do Bioma Caatinga. A e B caracterizando o período da chuva. C e D caracterizando o período da seca. Pocinhos, Paraíba, Brasil.
Imagens: CONFESSOR, M. V. A.**

A Caatinga ocupa a região entre a floresta amazônica (sul do equador) e Mata Atlântica, cobrindo aproximadamente 10% da região árida e semiárida brasileira (FERNANDES, 2002). Representa 70% da região Nordeste e 11% do território nacional brasileiro (Figura 2), estendendo-se por cerca de 800.000 km² (CASTELLETTI *et al.*, 2003; PRADO, 2003). Com características físicas e biológicas únicas, a Caatinga no Nordeste brasileiro consiste em formações áridas e semiáridas heterogêneas (IBGE, 2004).



Figura 2: Mapa do Brasil evidenciando a distribuição dos biomas. Fonte: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169.

O principal e mais característico componente físico do bioma Caatinga é o seu clima, onde, segundo a classificação de Köppen, é do tipo semiárido BSh (ANDRADE-LIMA, 1981). Temperatura média anual muito elevada é outra característica marcante das caatingas, com valores entre 26 a 28°C (TRENTIM *et al.*, 2011). No entanto, todas as áreas superiores a 250m de altitude têm temperatura média mais baixa (20 – 22°C) (PRADO, 2003).

De acordo com Arruda (1997), a região Nordeste caracteriza-se por apresentar temperaturas elevadas e ser a região mais seca do país. A sua variabilidade espacial e temporal de precipitação é elevada, o que é característico de climas semiáridos. Os índices, de um ano para outro, apresentam desvios de até 200%. Esse clima apresenta precipitação anual de baixa a moderada, variando de 300 mm na maioria das regiões áridas, até mais de 1600 mm nas regiões de planalto elevado, as quais recebem chuvas orográficas (MARES *et al.*, 1985). Cerca de 50% da área recebe menos de 750 mm, enquanto certas regiões localizadas têm menos de 500 mm (PRADO, 2003).

O semiárido nordestino possui uma longa estação seca, onde as chuvas são caracterizadas como torrenciais e irregulares, havendo períodos de extrema deficiência

hídrica, denominados de seca, que têm ocorrido com frequência irregular a cada 10 a 20 anos (RODAL *et al.*, 1992).

Quanto aos solos, a origem geomorfológica e geológica das caatingas têm resultado em vários mosaicos complexos com características variadas mesmo a pequenas distâncias (SAMPAIO, 1995). Dada a natureza desta região, entissolos e, particularmente, latossolos são muito abundantes, derivados de rochas-mãe sob ação do clima. Afloramentos extensivos de rochas são regionalmente chamados de “lajedos”, que atuam ecologicamente como meios desérticos e como locais onde apenas plantas suculentas são encontradas. Em muitas áreas, a base rochosa é exposta como acúmulos de grandes rochas que se encontram em algumas áreas suficientemente extensas surgindo como cordilheiras montanhosas baixas, localmente conhecidas como serras (MARES *et al.*, 1985).

As caatingas, segundo Prado (2003), podem ser caracterizadas como florestas arbóreas ou arbustivas, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos, uma vegetação extremamente adaptada às condições climáticas, que apresentam espinhos, microfilia e algumas características xerofíticas. De acordo com este autor, algumas das espécies lenhosas mais típicas da vegetação das caatingas são: *Amburana cearensis* (Fr.All.) A.C. Smith, (“imburana de cheiro”, Fabaceae –Papilionoideae), *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul (“angico”, Fabaceae – Mimosoideae), *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (“pau-pereiro”, Apocynaceae), *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (“catingueira”, Fabaceae-Caesalpinioideae), *Cnidocolus phyllacanthus* (Müll. Arg.) Pax & Hoffm. (“faveleira”, Euphorbiaceae), *Commiphora leptophloeos* (Mart.) Gillet (“imburana”, Burseraceae, também conhecida como *Bursera leptophloeos* Mart.), várias espécies de *Croton* (“marmeleiros” e “velames”, Euphorbiaceae) e de *Mimosa* (“calumbies” e “juremas”, Fabaceae-Mimosoideae), *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., (“aroeira”, Anacardiaceae), *Schinopsis brasiliensis* Engler (“baraúna”, Anacardiaceae) e *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex A. DC.) Standley (“pau d’arco roxo”, Bignoniaceae).

Apesar de ser a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional, pouca atenção tem sido dada à conservação da variada e marcante paisagem da Caatinga, e a contribuição da sua biota à biodiversidade extremamente alta do Brasil tem sido subestimada (SILVA *et al.*, 2003b). Tradicionalmente descrito como um ecossistema pobre em espécies e endemismos, agora tem sido demonstrado a importância deste bioma para a conservação

da biodiversidade brasileira (LEAL *et al.*, 2003). Foram registradas 932 espécies de plantas vasculares (380 endêmicas) (GIULIETTI *et al.*, 2004), 187 de abelhas (ZANELLA e MARTINS, 2003), 240 de peixes (ROSA *et al.*, 2003), 167 de répteis e anfíbios (RODRIGUES *et al.*, 2002), 62 famílias e 510 espécies de aves (SILVA *et al.*, 2003a).

4. *Myracrodruon urundeuva* Allemão

4.1 Descrição e origem

O termo aroeira tem sido usado para designar plantas classificadas em três géneros da família Anacardiaceae: *Lithraea*, *Schinus* e *Astronium*. A aroeira-preta ou aroeira-do-sertão é a *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Figura 3) (SANTOS, 1987; MORAES e FREITAS, 1997). Esta planta é uma árvore nativa da América do Sul (LORENZI e MATOS 2002), classificada como espécie vulnerável à extinção, pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA, 2008) e considerada, num estudo realizado no Município de Caruaru, Pernambuco, Brasil, como a espécie com maior versatilidade de usos, entre as nativas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008).



**Figura 3: Desenho botânico adaptado de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.
Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/makepdf>.**

Apresenta-se como uma árvore decídua, de 5-15m de altura e 15-60 cm de diâmetro. Possui uma copa plana com galhos longos ascendentes, acinzentados e com pelos quando jovens e sem pelos em indivíduos velhos. O tronco é reto e cilíndrico, às vezes mais espesso na base. A casca do caule é castanho escura e escamosa, com 10-15 mm de espessura, dura, com superfície áspera e depressões longitudinais em indivíduos velhos, enquanto indivíduos mais jovens têm casca cinza, lisa e com lenticelas ásperas. O interior do caule é fibroso, cor de rosa e possui 9-12 mm de espessura (LEITE, 2002).

É uma planta considerada madeira de lei, assim sendo, é muito densa, dura, elástica, resistente a cupins, recebe excelente polimento e, quando seca, é difícil de trabalhar (SANTOS, 1987; MORAES e FREITAS, 1997). De acordo com testes

realizados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), a aroeira é muito resistente e está classificada como muito durável e encontra-se incluída no grupo das madeiras chamadas imputrescíveis (BRAGA, 1990).

Além das propriedades mecânicas que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química, constituída por substâncias produzidas pela própria árvore, com efeitos fungicida e inseticida. Essas substâncias formam-se principalmente no processo de transformação do alborno em cerne (BRAGA, 1990).

4.2 Indicações e aplicações terapêuticas

Estudos sobre o uso de plantas da Caatinga pela população local têm indicado que este ambiente tem muitas plantas medicinais como recurso, apesar de a preferência estar direcionada a uma minoria de plantas nativas do total dos recursos disponíveis (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002; ALBUQUERQUE, 2006; AGRA *et al.*, 2008). A aroeira enquadra-se nesta observação, uma vez que se apresenta como uma das plantas mais preferidas pela população, especialmente pela sua eficácia no tratamento, facto que foi bem constatado por Ferreira-junior (2011) num estudo realizado na Caatinga pernambucana. Além disso, em alguns estudos, a aroeira é apresentada como uma das plantas com maior Relativa Importância (RI) (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). Albuquerque *et al.* (2007) avaliaram vários trabalhos envolvendo o uso de plantas medicinais na Caatinga do Nordeste do Brasil e verificaram a existência de 10 espécies com alto RI, dentre estas a *M. urundeuva*, que se encontra, juntamente com *A. cerarensis*, de entre as plantas com maior RI (RI=2.0).

A aroeira possui uma diversidade de indicações terapêuticas de cunho popular: inflamações, nomeadamente inflamação de garganta, inflamações uterinas e ovarianas, inflamação de órgãos internos e externos, infecções e dores em geral, dores nas costas, dor de dentes, dor de cabeça, ferimentos, sangramentos vaginais, asma, resfriados, tosse, tuberculose, bronquite, gastrite, câncer, deslocamento da placenta, anemia, difteria, úlceras da pele, anti-séptico e expectorante, problemas hepáticos, renais e intestinais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; CARTAXO *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Ferreira-junior (2011), 37 subcategorias tradicionais da condição de inflamação foram identificadas, sendo a aroeira indicada para o tratamento de 13 das subcategorias encontradas e também para os oito sintomas associados às

inflamações, pelos entrevistados. Este mesmo autor também encontrou especificidade do uso da aroeira para o tratamento de acne, na comunidade estudada.

Para Monteiro *et al.* (2005), um total de 97 diferentes tipos de usos foi reportado. Destes, os principais foram feridas, inflamações em geral e doenças relacionadas com o sistema genito-urinário feminino.

A casca e as folhas são as partes utilizadas da aroeira para a preparação de decoctos, infusos, macerados aquosos e lixiviados. Estas preparações podem ser bebidas, utilizadas em banhos ou para lavagens da área afetada, dependendo da doença/afecção (CARTAXO *et al.*, 2010). Monteiro *et al.* (2005) afirma, entretanto, que a melhor maneira de utilizar a *Myracrodruon urundeuva* é através do decocto. Cartaxo *et al.*, (2010) indica que estudos acerca desta planta são necessários em relação à atividade analgésica, especialmente contra dores de cabeça e dentes, a atividade anti-inflamatória, antigripal, expectorante, e também para o resfriado, problemas intestinais, renais, de fígado e cancro.

4.3 Composição química

Um estudo químico demonstrou que o extrato de acetato de etila tem duas frações principais, uma apresenta predominantemente chalconas e o outro taninos (VIANA *et al.*, 1997). Além disto, foram identificadas três chalconas dimérica, nomeadas urundeuvinas A, B e C (VIANA *et al.*, 1995).

Há a predominância de taninos nos extratos obtidos utilizando a aroeira (VIANA *et al.*, 1997; CHAVES *et al.*, 1998; LEITE, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2002). No entanto, têm-se registado variações na concentração de taninos, relacionadas com o período de colheita e com a parte da planta (MONTEIRO *et al.*, 2005 e 2006).

Silva (2008) realizou uma análise fitoquímica do caule e da folha de indivíduos jovens e adultos da aroeira permitindo constatar que as partes analisadas possuem flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, além de açúcares, tendo detetado derivados cinâmicos apenas no caule. A lectina foi isolada do extrato bruto da parte central do caule de *M. urundeuva* (SÁ *et al.*, 2009).

4.4 Efeitos biológicos atribuídos

Botelho *et al.* (2007), utilizando um gel 5% (v/v) preparado a partir de um extrato fluido obtido através da maceração da casca de *Myracrodruon urundeuva* em uma solução hidro-alcoolica glicerinada, reportaram atividade anti-inflamatória e antibacteriana em periodontite em ratos, estes autores atribuíram esta atividade as chalconas previamente isoladas por Viana *et al.*, (1997). Atividade anti-inflamatória no tratamento de colite *in vivo* foi observada utilizando enemas preparados de extratos aquosos da casca da aroeira (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Foram observados efeitos anti-ulcerosos de extratos alcóolicos e aquosos, em ratos (MENEZES *et al.*, 1986, 1990; RAO *et al.*, 1990; SOUZA *et al.* 2007). Outros estudos, em ratos, evidenciaram efeitos anti-inflamatórios, analgésico e anti-ulcerogénico, os quais foram atribuídos aos taninos e às propriedades antioxidantes relacionadas a estes compostos (SOUZA *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 1997). Quanto aos flavonóides e chalconas têm-lhes sido imputadas atividades analgésica e anti-inflamatória do trato genital de ratos (VIANA *et al.*, 2003).

Têm sido também referidas propriedades cicatrizantes, em ratos, para extratos etanólicos de *M. urundeuva* (RODRIGUES *et al.*, 2002). Outros estudos evidenciaram efeitos antioxidantes e antidiarreicos (CHAVES *et al.*, 1994), assim como efeitos neuroprotetores, que foram demonstrados em células meso-encefálicas de ratos por ação das chalconas e taninos isolados do extrato bruto da casca do caule (NOBRE-JUNIOR *et al.*, 2008, 2009).

A lectina mostrou atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (SÁ *et al.*, 2009), sendo o primeiro peptídeo bioativo detetado no tronco. A lectina também atua como inseticida eficaz contra as térmitas, e também como larvicida e contra os transmissores de febre-amarela e dengue (*Aedes aegypti*).

Alves *et al.* (2009) observaram, em testes *in vitro*, que o extrato hidro-alcoólico de *M. urundeuva* apresenta atividade antimicrobiana e antiaderente sobre os microorganismos que formam o biofilme dentário, bem como atividade fungicida contra estirpes de *Candida* isoladas da cavidade oral.

Os frutos, folhas, casca e ramos foram avaliados quanto à formação de biofilme e crescimento do *Staphylococcus epidermidis*, nas concentrações de 0,4 e 4,0 mg/mL. O extrato da casca, na concentração de 4,0 mg/mL apresentou-se como sendo o extrato de plantas da Caatinga com maior atividade; registou-se uma taxa de formação de

biofilmes por *S. epidermidis* de 16.1%. Todavia, o efeito antibacteriano e anti-biofilme não foi verificado na concentração de 0,4 mg/mL. Para os frutos, folhas e ramos não houve considerável inibição em ambas as concentrações (TRENTIM *et al.*, 2011).

5. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

5.1 Descrição e origem

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan. pertencente à família Fabaceae - Mimosidae, é uma árvore conhecida popularmente como angico, é uma espécie bem distribuída no Brasil, encontrando-se em toda a região Nordeste (AMORIM, 2005) (Figura 4).

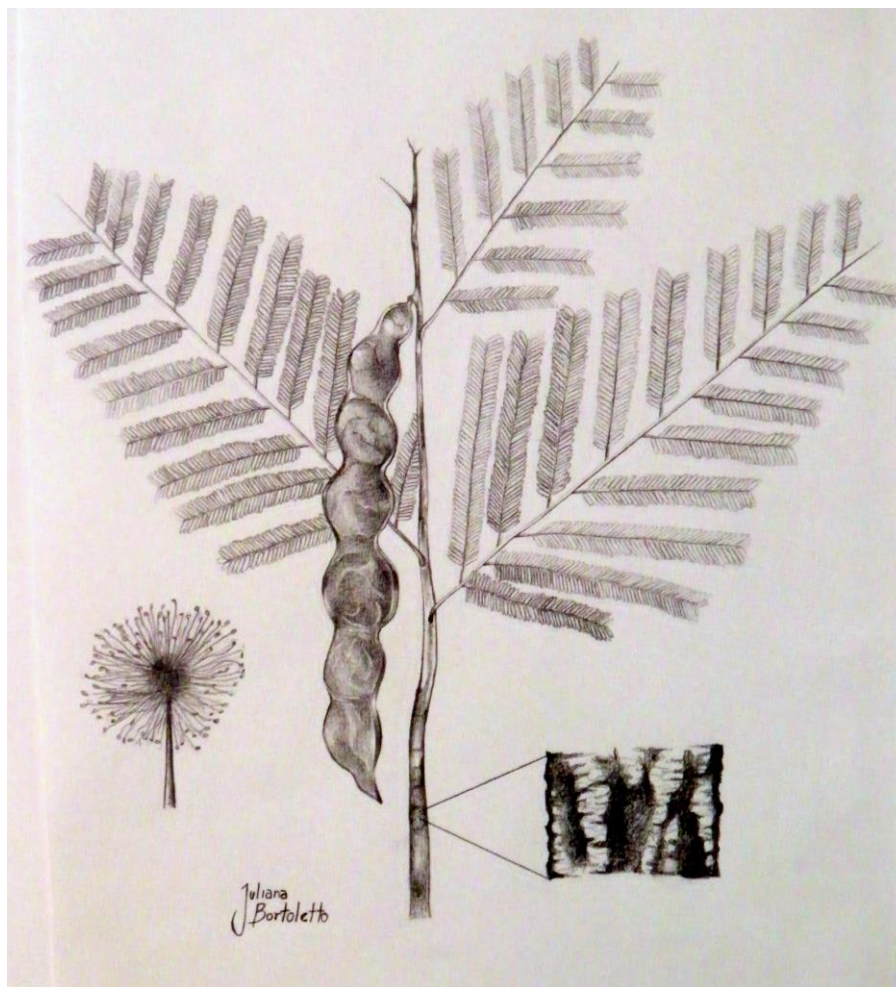


Figura 4: Desenho botânico de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Bren. Autor: Juliana Gines Bortoletto.

O angico é uma árvore de grande a médio porte, que cresce entre 5 e 20 metros de altura e podendo o seu tronco chegar a 60 cm de diâmetro. A casca de cor castanho-avermelhada é lisa quando jovem e, nas árvores mais velhas, apresenta vários espinhos conspícuos - espículas características da espécie - que formam cristas que recobrem todo o caule (SILVA, 2000). Tem uma copa alta de folhagem rarefeita. A árvore apresenta flores milíferas, brancas, arredondadas, diminutas e agrupadas em cachos grandes, com um aroma característico e dispostas em inflorescência do tipo panículas de espigas globosas (MAIA, 2004). Os frutos são do tipo vagem ou legume, alongados, achatados, rígidos, glabros, brilhantes, deiscentes, de cor castanha, com 10 a 20 cm de comprimento, contendo de 5 a 10 sementes lisas e escuras, produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI e MATOS 2002). Apresenta florescências entre os meses de Setembro e Novembro e frutifica entre agosto e Setembro. Apresenta rebrotação de ramos e regeneração natural por meio das sementes (SANTOS, 2010).

A madeira é pesada (densidade 0,93 g/cm³), compacta, bastante dura, composta de fibras grossas, útil na construção civil, obras hidráulicas, confecção de dormentes, tabuado, carpintaria, além do seu uso como fonte de energia e combustíveis - como lenha e carvão. O angico é utilizado na medicina popular (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002, MONTEIRO *et al.*, 2006) e na indústria de curtimento de couro (MAIA, 2004). É uma das principais árvores utilizada no reflorestamento de áreas abertas que sofrem devastações, devido à boa adaptação em terras secas e pela rápida propagação (SANTOS, 2010). Devido à sua ampla gama de usos foi indicada como de alta prioridade para conservação *in situ* na 1ª Reunião Técnica para "Estratégias para a Conservação e Gestão dos Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas do Brasil" (VIEIRA, 2002).

5.2 Indicações e aplicações terapêuticas

A *A. colubrina* é uma planta versátil (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006), sendo considerada uma das três mais importantes no estudo realizado por Lucena *et al.* (2007) em 3 municípios da caatinga pernambucana e no trabalho de Albuquerque *et al.* (2007), neste último apresentando um RI de 1,6.

Várias são as doenças tratadas com o angico: gripe, congestão nasal, tosse, inflamação da garganta, dor de barriga, diarreia, cancro, problemas pulmonares, sendo também usado como expectorante, anti-séptico, em infecções e inflamações. A casca e folhas são utilizadas para a preparação de decoctos, cataplasmas, infusões e xarope, além de macerados e lixiviados. Estas preparações podem ser bebidas ou utilizadas para lavar o local afetado (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006, CARTAXO *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Monteiro *et al.* (2005) reportou que a melhor forma de utilizar a *A. colubrina* é o xarope, mas há que ter em consideração a indicação terapêutica atribuída. Neste mesmo estudo, houve 97 diferentes tipos de usos citados pelos entrevistados, sendo os principais são as inflamações em geral, feridas, como expectorante e para o tratamento de tosse, o que justifica o xarope como principal forma de uso do angico neste estudo. Cartaxo *et al.* (2010) refere a necessidade de estudos sobre a *A. colubrina* focando o seu uso no tratamento de sintomas relacionados com o sistema respiratório, especificamente tosse, congestão nasal, expectoração e problemas pulmonares.

No estudo realizado por Ferreira-junior *et al.* (2011) o angico foi enquadrado no grupo de plantas com mais indicações terapêuticas para inflamações, sendo recomendado para 10 das 37 subcategorias da condição de inflamação identificadas e sete dos oito sintomas apontados pelos entrevistados. Além disto, foi incluído no grupo das espécies consideradas mais eficaz no tratamento das inflamações.

O angico pode ser considerado também uma planta tóxica ou cianogénica, uma vez que apresenta glicosídeos cianogénicos nas folhas que libertam ácido cianídrico (HCN) (AMORIM, 2005).

5.3 Composição química

Anadenanthera colubrina apresenta uma maior concentração de fenóis totais e taninos na casca do caule do que nas folhas (MONTEIRO *et al.*, 2006), verificando-se também variação na concentração de taninos relacionada com o período de colheita (MONTEIRO *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006). Um total de 9% de compostos fenólicos foi obtido por extração gradual com ciclohexano seguido de etanol, 8% foi obtido quando o processo extrativo utilizou apenas etanol como solvente e 0,33% com apenas ciclohexano como solvente (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Oliveira *et al.*, (2010), utilizando extratos etanólicos da madeira, quantificaram 0,231 de fenóis totais expressos em mg de ácido gálgico/g. Este autor detetou também taninos, flavonóides, terpenóides e esteróides. Alcalóides, taninos e flavonóides foram identificados em extratos alcóolicos das folhas por Santos *et al.*, (2010), tendo-se mostrado negativos os testes para esteróides e saponinas.

De um extrato de CH₂Cl₂-MeOH das partes aéreas de *A. colubrina* foram isolados os flavonóides anadantoflavona e apigenina, para além de outros compostos tais como: ácido 4-hidroxibenzóico, ácido cinâmico, alnusenol, lupenona, lupeol, ácido betulínico, *alfa*-amirina, *beta*-amirina, *beta*-sitosterol, estigmasterol (GUTIERREZ-LUGO *et al.*, 2003).

O teor de linhina encontrado por Oliveira *et al.* (2010) foi de 27,6 %. A resina desta espécie contém um heteropolissacarídeo ácido constituído principalmente por galactose (24,1 %) e arabinose (67,8 %). Contém também ramnose (2,0 %) e 7% de ácidos urónicos (EIRAS *et al.*, 2010).

5.4 Efeitos biológicos atribuídos

A anadantoflavona, apigenina, lupenona, lupeol e *alfa*-amirina apresentaram-se como os compostos mais ativos quanto à inibição de lipoxigenases em humanos, apresentando, assim, importância nos estudos do câncer, aterosclerose e doenças inflamatórias Gutierrez-Lugo *et al.* (2003).

O heteropolissacarídeo ácido encontrado nesta espécie apresentou efeitos imunomoduladores e antitumorais em ratos inoculados com sarcoma-18 (CARTAXO *et al.*, 2010; MORETÃO *et al.*, 2004). Cuidado deve ser tomado com o uso das folhas desta espécie, uma vez que Brito *et al.* (2000) demonstrou a ocorrência de intoxicação em ratos após o consumo de folhas de *A. colubrina*.

A atividade antioxidante do extrato etanólico da madeira foi de 71,90%, tendo sido comprovada a influência, dos compostos extraídos, para a atividade fungicida da madeira. De facto, o crescimento de *Phanerochaete chrysosporium* foi completamente inibido na madeira não extraída, enquanto que se registou crescimento intenso dos fungos na presença da madeira que havia sido previamente sujeita ao processo de extração (OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

O extrato metanólico da casca de *A. colubrina* mostrou-se promissor como fungicida contra *Alternaria alternate*, reduzindo a doença da Mancha marrom de

alternaria (ABS) da tangerina a níveis obtidos com fungicidas comerciais (CARVALHO *et al.*, 2011).

Apesar dos relatos na literatura etnomédica da atividade antibacteriana do angico, Gonçalves *et al.* (2005) não observou ação desta planta utilizando extratos hidro-alcoólicos da casca, frente a 10 bactérias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus* spp.), contudo todos os microrganismos utilizados neste estudo apresentaram resistência a alguns antibióticos comerciais, sugerindo que sejam também resistentes aos extratos destas plantas.

Os frutos, folhas, casca e ramos foram avaliados quanto à formação de biofilme e crescimento bacteriano de *S. epidermidis* nas concentrações de 0,4 e 4,0 mg/mL. A casca, na concentração de 4,0 mg/mL, apresentou-se como o extrato de planta da Caatinga com a menor taxa de formação de biofilmes por *S. epidermidis*, 11,6%. No entanto, utilizando a concentração de 0,4 mg/mL houve crescimento bacteriano e formação de biofilme. Para os frutos, folhas e ramos não houve considerável inibição em ambas as concentrações (TRENTIM *et al.*, 2011).

Estudos realizados com folhas de *A. colubrina* colhidas no município de Patos, Paraíba, Brasil causaram intoxicação por HCN na dose de 10 mg por kg de peso vivo (MEDEIROS *et al.*, 2000). Amorim *et al.* (2004) reproduziram a intoxicação cianídrica em amostras de angico com doses de 5 a 10 g/kg/pv em bovinos no nordeste brasileiro. As intoxicações cianídricas por *Anadenanathera* spp. em bovinos ocorrem quando os animais comem folhas murchas e quentes, após derrubadas destas árvores ou após a queda de galhos durante temporais. O ácido cianídrico responsável pela toxicidade é resultante da hidrólise dos glicosídeos cianogênicos (AMORIM, 2005). Em ensaios com coelhos (BRITO *et al.*, 2000) demonstraram que a *A. colubrina* mantém a sua toxicidade por períodos de 2 a 5 meses após a secagem das folhas.

A infusão da casca do angico (10 g/L de água) provocou, no fígado de murganho, o aumento do volume citoplasmático e celular, além de focos de inflamação crônica (SOUZA *et al.*, 2006).

6. Metabolismo secundário das plantas

Todos os constituintes das plantas derivam do metabolismo dos glúcidos, sintetizados durante o processo fotossintético a partir de CO₂ e H₂O. Estes compostos dividem-se em dois grupos: metabolitos primários e secundários. O metabolismo primário é considerado como uma série de processos envolvidos na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento da planta, enquanto o metabolismo secundário consiste num sistema com importante função para a sobrevivência e competição no ambiente. Os metabolitos secundários distinguem-se dos primários, pois, geralmente, não são essenciais para os processos metabólicos básicos da planta (DIXON, 2001; SANTOS, 2010).

A grande diversidade destes metabolitos resulta, em parte, dos processos evolutivos direcionados pela seleção para aquisição de defesas contra ataques microbianos ou predação por animais (DIXON, 2001). Além disto, estes metabolitos participam no processo reprodutivo da planta, atraindo polinizadores, por exemplo. A biossíntese está restrita a específicos estágios de desenvolvimento da planta e a células especializadas, e pode ser induzido pelo estresse causado pela deficiência de nutrientes ou ataque de organismos (LUCENA, 2011). A maioria dos metabolitos secundários é oriunda das vias do isopreno, fenilpropanóides, alcalóides e/ou ácidos gordos.

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabolitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis - sazonais e diários, intraplanta, inter- e intraespecífica - e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Os metabolitos secundários representam, portanto, uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (GOBBO-NETO e LOPEZ, 2007).

Assim sendo, os produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas proporcionam uma riqueza de fitoconstituintes, também conhecidos como “princípios ativos”, que são importantes pelas suas propriedades biológicas e consequente aplicabilidade pelos seus efeitos terapêuticos, importância toxicológica, farmacológica e ecológica (MANN *et al.*, 1998; SANTOS, 2002).

Os principais metabolitos secundários encontrados nas plantas são: terpenos, um grupo de constituintes lipofílicos; compostos fenólicos livres e glicosilados; alcalóides, derivados dos aminoácidos, entre outros. Alguns compostos encontram-se largamente

difundidos no reino vegetal, tal como muitos compostos fenólicos, enquanto outros, como os alcalóides são produzidos apenas por algumas famílias ou determinadas espécies. Aproximadamente 100.000 metabolitos já são conhecidos, com cerca de 4.000 novos que vão sendo descobertos a cada ano (VERPOORTE *et al.* 2000).

Os terpenos derivam do isopentenil difosfato (IPP), conhecem-se 25.000 estruturas. Os alcalóides, por volta de 12.000, contêm um ou mais átomos de azoto e derivam principalmente de aminoácidos. Aproximadamente 8.000 compostos fenólicos são provenientes das vias biossintéticas do chiquimato ou do acetato/malonato. Alguns são importantes como toxinas ou inibidores da alimentação contribuindo para a sobrevivência da planta, assim como podem contribuir para a defesa relativamente a radiações e microorganismos.

6.1. Processos metabólicos

A biossíntese de metabolitos secundários é realizada por vias metabólicas específicas, ocorrendo uma estreita relação entre essas vias e aquelas responsáveis pela síntese de metabolitos primários. As vias de biossíntese que sintetizam os metabolitos primários fornecem, portanto, moléculas que são utilizadas como precursoras nas principais vias de síntese de metabolitos secundários (Figura 5).

Os processos para a modificação e síntese dos hidratos de carbono, proteínas, ácidos gordos e ácidos nucleicos são os mesmos em todos os organismos, com algumas variações. A biossíntese da maioria dos metabolitos secundários inicia-se a partir de um grupo restrito de compostos, os quais são modificados até um ilimitado número de compostos, através das várias vias de síntese. Há três principais precursores de metabolitos secundários: ácido chiquímico, precursor de vários compostos aromáticos; acetato, precursor de ácidos gordos, polifenóis, isopreno, prostaglandinas, entre outros e aminoácidos, precursores dos alcalóides - Vias do ácido chiquímico, do acetato, e do mevalonato, respectivamente. Estes intermediários são formados a partir de produtos da via glicolítica ou seus intermediários (LUCENA, 2011).

Os precursores para os compostos fenólicos das plantas derivam de dois processos na célula vegetal: glicólise e via da pentose-fosfato. A glicólise consiste no processo catabólico durante o qual os hidratos de carbono gerados pela fotossíntese são quebrados até piruvato e CO₂. Este processo oxida hexoses para a geração de ATP e produz compostos para o processo anabólico (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Os fenóis são biossintetizados essencialmente por duas vias; a via do chiquimato e a via do malonato (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). A via do chiquimato é comum a plantas e microorganismos e resulta na biossíntese de corismato. O chiquimato é sintetizado a partir dos intermediários das vias da glicólise e pentose-fosfato, o fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato. Os passos subsequentes resultam na formação de 3-desidroquinato, pela enzima 3-desidroquinosintase, 3-desidrochiquimato pela enzima 3-desidroquinato desidratase, e o chiquimato pela enzima chiquimato-desidrogenase. O chiquimato posteriormente é convertido em chiquimato-3-fosfato pela chiquimato-quinase, e em seguida, no 5-enolpiruvochiquimato 3-fosfato (EPSP) pela 5-enolpiruvochiquimato 3-fosfato-sintase. O EPSP é depois convertido em corismato pela corismato-sintase. O corismato encontra-se no ponto de divisão para a biossíntese de aminoácidos aromáticos: triptofano por um lado, e fenilalanina e tirosina por outro. Fenilalanina e tirosina são os precursores dos fenilpropanóides (ácidos fenólicos e seus derivados, cumarinas, estilbenos, etc) e outras classes de compostos fenólicos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006; FIGUEIRINHA, 2011).

Após a desaminação da fenilalanina, há a produção do ácido cinâmico, que é posteriormente hidroxilado na posição 4, formando o ácido *p*-cumárico. Alternativamente o ácido cinâmico pode ser metabolizado em ácido benzóico e depois em ácido salicílico. O ácido *p*-cumárico, através de várias hidroxilações e metilações pode originar os ácidos cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico e sinápico. Os ácidos ferúlico e sinápico são os precursores dos linhanos e lenhinas (FIGUEIRINHA, 2011).

A síntese dos flavonóides inicia-se a partir da condensação do *p*-cumaróil-CoA e três moléculas de malonil-CoA. Esta reação é catalisada pela enzima chalcona-sintetase (CHS), originando a 4,2',4',6'-tetra-hidroxichalcona, composto este que pode iniciar um número variado de reações que vão dar origem aos diferentes flavonóides. Da polimerização dos flavonóides resultam os taninos condensados, enquanto os taninos hidrolisáveis, elagitaninos e galhotaninos, têm como precursores o ácido gálico, derivando da 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloil- β -D-glucose que é sintetizado a partir da β -glucogalhina (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

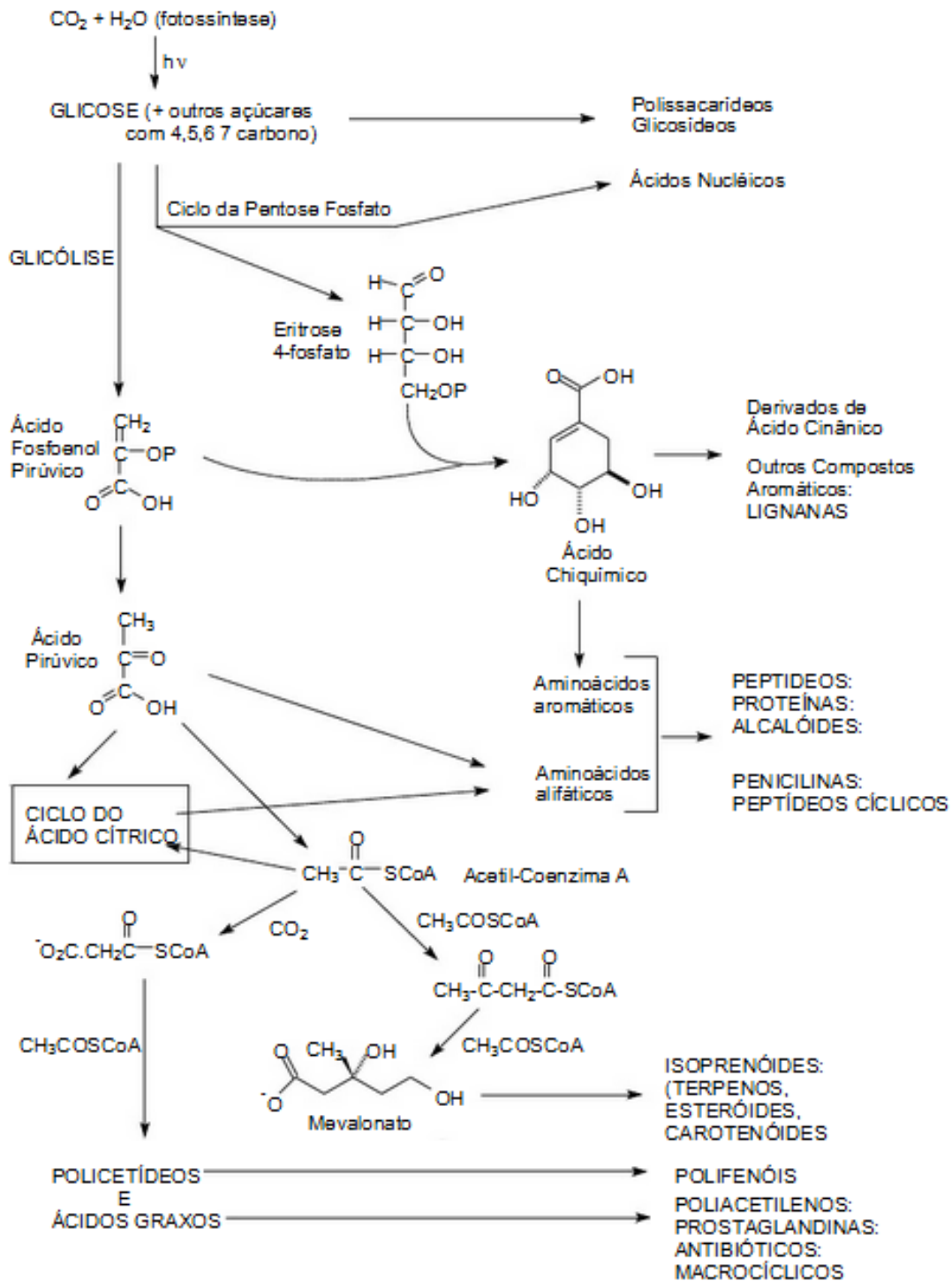


Figura 5: Esquema das principais vias biossintéticas dos metabolitos de plantas. Fonte: <http://pt.scribd.com/doc/22584053/METABOLITOS-SECUNDARIOS>.

7. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são os mais abundantes metabólitos secundários em plantas. Caracterizam-se, estruturalmente, por apresentarem anéis aromáticos hidroxilados como unidade estrutural comum, os fenóis (Figura 6) (COSTA *et al.*, 2012; VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

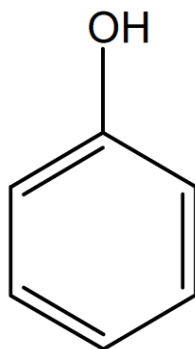


Figura 6: Estrutura química do fenol.

Os compostos fenólicos fazem parte dos componentes não essenciais na alimentação e apresentam bioatividade associada à sua capacidade de quelar metais, inibir a enzima lipoxigenase e sequestrar radicais livres. Estes compostos incluem moléculas de sinalização, pigmentos e sabores que podem atrair ou repelir, além de protegerem a planta contra insetos, fungos, bactérias e vírus (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

7.1. Estrutura e classes de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (Figura 8) podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono, e são conhecidos por polifenóis ou compostos polifenólicos quando do seu núcleo base, fazem parte, pelo menos, duas estruturas aromáticas (CORREIA, 2005). Estes compostos podem ser divididos em várias classes, de acordo com o número de anéis aromáticos e os substituintes que apresentam (COSTA *et al.*, 2012). A maioria dos compostos fenólicos estão presentes como ésteres ou glicosídeos e menos frequentemente e em menor quantidade, sob a forma livre (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Os principais grupos são: fenóis simples, ácidos

fenólicos e derivados, estilbenos, linhanos, flavonóides, taninos, cumarinas e antraquinonas (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Estrutura	Classe
C 6	Fenóis simples
C 6 - C 1	Ácidos benzóicos e derivados
C 6 - C 2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C 6 - C 3	Ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos, álcoois cinâmicos e derivados
C 6 - C 3	Cumarinas, isocumarinas e cromonas
C 6 - C 3 - C 6	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C 6 - C 3 - C 6	Flavanonas
C 6 - C 3 - C 6	Flavonas
C 6 - C 3 - C 6	Flavonóis
C 6 - C 3 - C 6	Flavanóis
C 6 - C 3 - C 6	Antocianidinas
C 6 - C 1 - C 6 , C 6 - C 2 - C 6	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C 6 , C 10 , C 14	Quinonas
C 18	Betacianinas
Oligómeros e polímeros	Taninos

Fenóis simples são aqueles que apresentam apenas um anel benzênico com substituição *orto*, *meta* ou *para*, sendo o grupo hidroxilo o grupo funcional (ex: resorcinol - 1,3-dihidroxibenzeno). Ácidos hidroxibenzóicos caracterizam-se pela presença de um grupo carboxilo funcional em um fenol (ex: ácido gálico). Aldeídos hidroxibenzóicos são os que apresentam um grupo aldeído ao invés do grupo carboxilo (ex: vanilina). Acetofenonas e ácidos fenilacéticos são compostos C6-C2 raramente encontrados na natureza (ex: 2-hidroxiacetofenona). Os ácidos hidroxicinâmicos são fenóis do tipo C6-C3 derivados do ácido cinâmico por adição de grupos hidroxilo ao anel aromático. Estes compostos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, (ex: ácido cafeico, um ácido di-hidroxilado). Tal como a maioria dos ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se, frequentemente, esterificados com hidroxilos alcóolicos ou fenólicos (ex: ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido clorogénico), mas também podem esterificar com outros hidroxiácidos,

polissacarídeos, açúcares, álcoois, lípidos, e, menos frequentemente, encontram-se sob a forma de aminoácidos aromáticos. As cumarinas também apresentam um esqueleto C6-C3, mas possuem um anel oxigenado como parte da unidade C3 (ex: umbeliferona) (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006; FIGUEIRINHA, 2011).

Flavonóides são compostos C15 que apresentam a estrutura C6-C3-C6. Desta estrutura fazem parte dois anéis benzênicos que estão ligados por uma cadeia de 3 carbonos (Figura 7). Podem ser agrupados, em três grandes classes, baseado no arranjo da cadeia tricarbonada: Chalconas e dihidrochalconas apresentam uma cadeia linear C3 ligando os dois anéis, a cadeia C3 das chalconas (ex: buteína) contém uma ligação dupla, enquanto a cadeia C3 das dihidrochalconas (ex: floretina-2'-O-D-glucósido) é saturada; auronas (Figura 7B), que são formadas pela ciclização de chalconas, onde o grupo *m*-hidroxilo reage com o carbono α para formar um anel de 5 membros; e os flavonóides típicos, que apresentam dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel não aromático (C) (figura 7A). Dentro de cada classe de flavonóides existe ainda a possibilidade de ocorrerem substituições nos anéis A, B e/ou C: hidroxilação, metilação, metoxilação, prenilação, benzilação e glicosilação (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

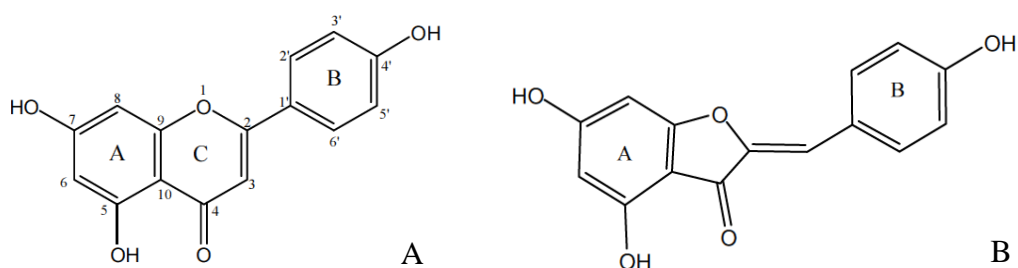


Figura 7: Estrutura química de dois tipos de Flavonóides. A: flavona; B:aurona.

Isoflavonas, isoflavanonas e neoflavonóides também pertencem ao grupo dos flavonóides, apresentando todos a estrutura C6-C3-C6, mas em que o anel B se encontra ligado a um carbono diferente do anel oxigenado. As flavanonas, também chamadas dihidroflavonas possuem o anel C saturado, uma função carbonilo em C4 e o anel B ligado ao C2. Os flavanonóis diferem das flavanonas pela presença de um hidroxilo na posição 3, constituindo importantes intermediários na síntese de flavonóis, flavanóis simples ou condensados e antocianidinas (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006; IWASHINA, 2000).

Leucoantocianidinas, também chamadas de *cis*-3,4-flavanodióis, são sintetizadas a partir de flavanonóis via redução da função carbonílica em C4 (ex: leucocianidina). Encontram-se, geralmente, na madeira e desempenham papel importante na formação de taninos condensados. Devido ao anel C completamente saturado as leucoantocianidinas, juntamente com o 3-flavanóis, são referidos como flavanóis. Exemplos de 3-flavanóis são a catequina e a galhocatequina e os seus respectivos epímeros, epicatequina e epigalhocatequina. Os 3-flavanóis, possuem apenas uma hidroxilação no anel C, em posição 3, mas, são frequentemente hidroxilados no anel A e no anel B, constituindo as unidades básicas elementares das proantocianidinas. Diferentemente da maioria dos outros flavonóides, os flavanóis estão presentes como livres ou polimerizadas, não glicosiladas (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

As flavonas possuem o anel C ligado a um grupo cetona, além de uma ligação carbono-carbono (C2-C3) insaturada (ex: luteolina - 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona), os flavonóis diferem das flavonas pela presença de um hidroxilo no carbono 3. As antocianidinas apresentam um anel pirilo, geralmente não são encontradas na forma livre. Estão presentes nos vacúolos de tecidos de plantas coloridas como as folhas e pétalas de flores (ex: cianidina). Antocianinas são glicosídeos solúveis em água das antocianidinas (ex: cianina) (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Os *O*-glicósidos de flavonas e flavonóis mais frequentemente identificados são constituídos por apenas uma ose ligada à genina, embora possam existir di- e tri-glicósidos, tendo sido reportado apenas um tetraglicósido. A glucose, a ramnose e a galactose são as oses mais frequentes, enquanto a arabinose, xilose e ácido glucurónido são mais raros (ANDERSEN e MARKHAN, 2006). Biflavonóides apresentam um esqueleto C30; são dímeros de flavonas (ex: ginkgetina).

Outros compostos fenólicos são as benzoquinonas, antraquinonas e naftaquinonas, linhanos, etc. Benzofenonas e xantonas apresentam uma estrutura C6-C1-C6, enquanto os estilbenos tem a estrutura C6-C2-C6. Betacianinas têm um espectro de absorção que se assemelha às antocianinas, mas contêm azoto (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Os taninos correspondem a outro grupo de compostos fenólicos, podendo ser agrupados em taninos condensados, hidrolisáveis e complexos. Os taninos compreendem um grupo de compostos com uma diversidade estrutural e pesos moleculares compreendidos entre 500 e 3000 daltons, que compartilham a capacidade de complexar e precipitar macromoléculas, como as proteínas (VERMERRIS e

NICHOLSON, 2006). Frequentemente apresentam estruturas oligoméricas ou então poliméricas de flavonóides ou de ácidos fenólicos e, conseqüentemente, um elevado número de hidroxilos fenólicos, muitos deles com padrões de hidroxilação mono-, di- e tri-hidroxilados. Além disso, são frequentes as esterificações com o ácido gálgico, ácido fenólico tri-hidroxilado (FIGUEIRINHA, 2011).

Taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são flavonóides oligoméricos ou poliméricos formados por unidades de 3-flavanóis (ex: (epi)catequina) (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Existem diversas particularidades estruturais das proantocianidinas, tais como: variação no padrão de hidroxilação das unidades do núcleo flavonóide, estereoquímica dos três centros quirais do anel heterocíclico, localização e tipo de ligação interflavânica, estrutura das unidades construtivas e variabilidade na combinação das diferentes unidades que integram o polímero (SCHOFIELD e MBUGUA, 2001).

Os taninos hidrolisáveis incluem os galhotaninos e os elagitaninos. Os galhotaninos possuem um núcleo formado por um composto poli-hidroxilado, normalmente uma ose, esterificado por vários resíduos de ácido gálgico, embora alguns galhotaninos possam conter catequinas e unidades triterpenóides, em vez de glucose (FIGUEIRINHA, 2011). Os elagitaninos são derivados da pentagalhoilglucose, e, ao contrário dos galhotaninos, contém ligações C-C adicionais entre os resíduos de ácido gálgico adjacente; os elagitaninos dividem-se em A e B: no grupo A, os resíduos de ácido gálgico estão ligados por ligações C-C e encontram-se nas posições 2 e 3 ou 4 e 6 do anel glucosídico com conformação C4→C1, enquanto nos elagitaninos do grupo B as ligações mais frequentes ocorrem em 1 e 6, 1 e 3, 2 e 4 ou 3 e 6 de uma glicopiranosose com conformação C1→C4.

Taninos complexos são definidos como aqueles que apresentam uma unidade de catequina glicosidicamente ligada a um galhotanino ou elagitanino e, tal como o próprio nome refere, a estrutura destes compostos pode ser bastante complexa (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

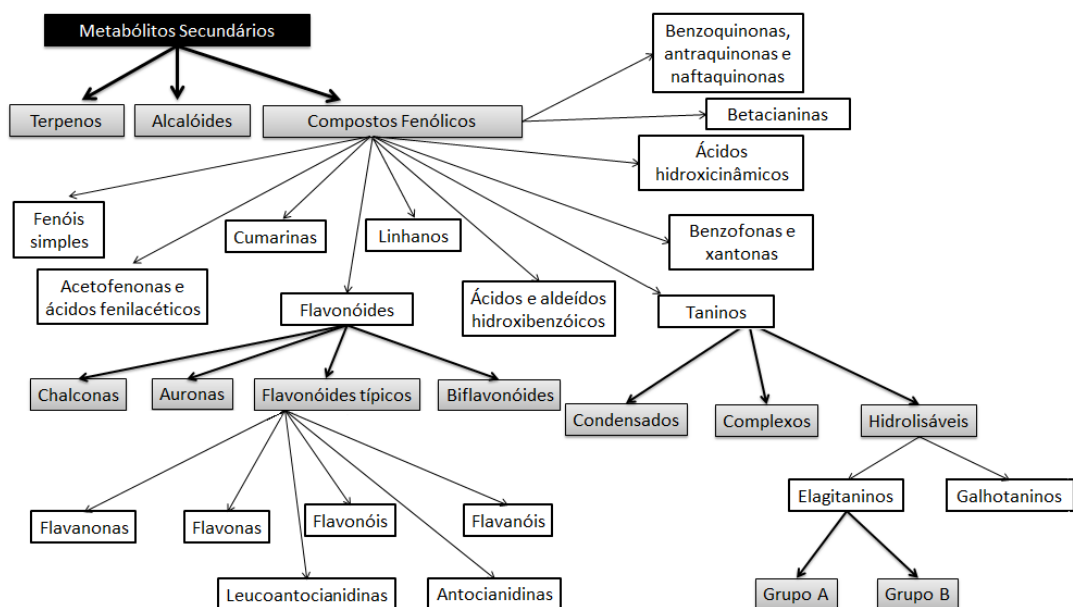


Figura 8: Esquema de classificação dos metabólitos secundários de plantas, enfatizando os compostos fenólicos.

7.2. Compostos fenólicos e benefícios para a saúde

Há inúmeras evidências que os compostos fenólicos têm efeitos na saúde humana, constituindo, provavelmente, a aplicação mais antiga destes compostos o uso do fenol como anti-séptico (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Vários investigadores têm descrito as atividades destes compostos e correlacionado com suas respectivas estruturas químicas. Os polifenóis vegetais são, portanto, fitoconstituintes de grande importância atual, essencialmente devido à sua bioatividade, e, especialmente à sua atividade antioxidante (FERREIRA, 2011). Estudos recentes, realizados em vegetais, têm sugerido, por exemplo, que a atividade anti-inflamatória pode depender de um mecanismo de ação antioxidante, o qual, frequentemente, está relacionado com a presença de polifenóis (TAPIERO *et al.*, 2002).

Radicais livres provenientes do metabolismo celular são bastante reativos e, quando desemparelhados, podem causar dano oxidativo às moléculas das células e, assim, apresentar impactos negativos, o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies oxidantes tem sido responsabilizado por muitas patologias, nomeadamente as inflamações e as doenças delas decorrentes, como a diabetes, doenças cardiovasculares e degenerativas (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Além das vitaminas C e E, muitos outros compostos presentes nas frutas e vegetais apresentam propriedades antioxidantes, tais como várias classes de polifenóis (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006). Ao suplementar as defesas antioxidantes, através da ingestão destes compostos, é pois possível limitar o dano oxidativo e, assim, diminuir a progressão da resposta inflamatória. Deste modo, os polifenóis podem contribuir significativamente para prevenir ou minimizar estas patologias (CORREIA, 2005).

É perceptível que a atividade antioxidante dos polifenóis oferece muitos benefícios para a saúde, embora haja casos em que o impacto dos polifenóis não está relacionado diretamente com a atividade antioxidante, mas com outras atividades igualmente relacionadas com estes compostos. É disto exemplo os efeitos que alguns destes compostos exercem ao nível do trato gastrointestinal. Estes efeitos incluem: ligação do ferro, captura de azoto reativo, cloro e espécies reativas de oxigénio (ROS), além da inibição de cicloxigenases e lipoxigenases (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

O mecanismo pelo qual os flavonóides exercem as suas diferentes atividades biológicas depende, essencialmente, de três propriedades características destes compostos: capacidade de complexar com moléculas incluindo macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos; capacidade de captar radicais livres e capacidade de complexar iões metálicos (CORREIA, 2005). Como agentes quelantes de iões metálicos, influenciam a disponibilidade de vários minerais. Como agentes redutores, podem participar na prevenção do cancro do trato digestivo e órgãos internos. Eles também podem proteger os lípidos de baixa densidade (LDL) contra a oxidação e inibir a agregação de plaquetas, propriedades estas que contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares. Outro uso comum dos compostos fenólicos é como protetor solar, pois a presença do anel aromático resulta numa absorvência eficiente da radiação UV-B, prevenindo queimaduras solares (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Os taninos, especialmente os condensados (proantocianidinas – PACs), têm alta capacidade de complexarem com proteínas, podendo ser irreversível ou reversível. As interações reversíveis ocorrem através de ligações inespecíficas, como pontes de hidrogénio, enquanto as ligações irreversíveis ocorrem a partir da formação de ligações covalentes e efeito hidrofóbico. A inibição enzimática, atribuída não só aos taninos condensados, mas também ao restante do grupo dos flavonóides, pode ser conseguida pela formação de complexos solúveis e insolúveis entre um polifenol e a enzima ou

substrato da enzima (CORREIA, 2005). As PACs apresentam várias propriedades, tais como antimicrobiana e antifúngica, antiviral, anticancerígena (AFAQ, *et al.* 2002; ADAMS, *et al.* 2006), cardioprotetora, antioxidante (GONÇALVES *et al.*, 2005) e anti-inflamatória (KOLECKAR *et al.*, 2008).

Outra atividade atribuída aos compostos fenólicos está correlacionada com a capacidade estrogénica, o critério mais importante para esta atividade é a presença de um grupo OH fenólico livre em uma posição *para* seguido das posições *meta* e *orto*. Os elagitaninos são polifenóis que contem subunidades do ácido elágico, que tem tido indicações de atuarem como agentes químio-preventivos. Para os compostos fenólicos também têm sido sugeridas propriedades preventivas dos efeitos adversos das toxinas fúngicas (micotoxinas) na saúde humana, bem como a sua intervenção como agentes de desintoxicação (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

II.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos finais do presente trabalho consistem na caracterização de compostos fenólicos em duas plantas medicinais da Caatinga brasileira – *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão (aroeira) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico) e no rastreio de atividades biológicas em extratos aquosos destas plantas, a fim de avaliar o seu potencial biológico e a correlação com a composição fenólica dos extratos.

Presidiram ao planeamento deste trabalho os seguintes objetivos:

- Extrair compostos fenólicos existentes na casca de *Myracrodruon urundeuva* e *Anadenanthera colubrina*, por recurso a métodos utilizados na medicina tradicional;
- Caracterizar quimicamente os constituintes fenólicos predominantes nos extratos obtidos;
- Quantificar os compostos fenólicos existentes nos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos;
- Verificar a atividade anti-inflamatória dos extratos;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos;
- Testar a citotoxicidade dos extratos.

**III.
MATERIAIS
E
MÉTODOS**

MATERIAIS

1. Material botânico

No presente estudo foram utilizadas as cascas dos caules das árvores referentes às espécies *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, colhidas no Município de Campina Grande, Paraíba, Brasil no mês de Setembro de 2011 (Figura 9). As plantas foram identificadas pelo Professor Doutor José Iranildo Miranda de Melo, da Universidade Estadual da Paraíba e um exemplar de casca de cada planta foi depositado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal.



Figura 9: Colheita das cascas de *Myracrodruon urundeuva* (A) e *Anadenanthera colubrina* (B).

O material seco foi conservado ao abrigo da luz e humidade no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra até ao momento da sua utilização.

2. Reagentes gerais e padrões

Acetato de sódio anidro, ácido fórmico, etanol, metanol p.a. e metanol Lichrosolv para HPLC, e tolueno foram adquiridos à MERCK. O *n*-hexano, à Carlo Erba Reagenti SpA; acetona da PanReac; ácido acético e ácido sulfúrico à J. T. Baker.

Placas pré-revestidas para cromatografia em camada fina (TLC): celulose POLYGRAM CEL 300 (20x20 cm e 0,1 mm de espessura) e gel de sílica 60 F254 (20x20 cm e 0,25 mm) adquiridas à MERCK.

Padrões: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido gálgico, ácido protocatéquico, ácido vanílico, catequina, piroglahol foram adquiridos à SIGMA Chemical.

3. Equipamentos

Evaporador rotativo BUCHI R-114 com controlador V-850 e bomba de vácuo V-700 BUCHI acoplado a um circuito de refrigeração.

Liofilizador FTSSYSTEMS tipo EZ-DRY, modelo EL 1501-1 com manifold modelo EZT18, de 8 portas e válvula de borracha.

Aparelho de ultrassons Branson, modelo B-2200 E1.

Sistema de microfiltração GV0250/0 Vacum Filter holder SCHLEICHER & SCHUELL e Filter holder FM 013/0 de SCHLEICHER & SCHUELL.

Cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) GILSON, equipado com duas bombas modelo 305 e 306; misturador modelo 811B; módulo manométrico modelo 805 e um injetor automático GILSON 234, acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) GILSON, modelo 170 e a uma estação de controle e tratamento de dados Unipoint System constituído por uma interface 506 C/Interface system module da GILSON.

Espectrofotómetro de UV-Visível de duplo feixe, Cintra 101 GBC, Jasco V-530.

4. Softwares

Controle e tratamento de dados HPLC, Gilson (Unipoint 2.10). Construção de gráficos, GraphPad (Prism 5). Controle e tratamento de dados do espectrofotómetro de UV-Visível, Cintra 101GBC.

MÉTODOS

1. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados tomando por base o modo de utilização na Medicina Tradicional, informação resultante do levantamento etnofarmacológico realizado pela autora do presente trabalho. Dois métodos foram utilizados: a decocção (extração com água, à ebulição, até uma redução do volume a metade) e a maceração com água (à temperatura ambiente) (Tabela 2).

As duas plantas estudadas, *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, foram submetidas aos mesmos procedimentos, tal como se refere na Tabela 2.

Tabela 2: Tipos de extrações e abreviaturas atribuídas aos diferentes extratos obtidos.

Planta	Nome tradicional	Método de extração	Legenda
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira	Decocção	ARD
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Aroeira	Maceração	ARF
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Angico	Decocção	AND
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Angico	Maceração	ANF

As cascas foram secas ao sol e ao ar livre, em seguida, cortadas em fragmentos de menor tamanho possível, utilizando uma tesoura de poda.

Os decoctos foram preparados partindo de 48,100 g de casca para 1 L de água, aquecendo à fervura, numa placa de aquecimento, até à redução do volume, a metade.

Para os macerados, usaram-se igualmente 48,100 g de cascas, aos quais foi adicionado 1 L de água destilada, num balão de Erlenmeyer, tendo o processo extrativo decorrido por 24 h, à temperatura ambiente, na ausência da luz.

Posteriormente, as misturas foram filtradas sob vácuo, num funil de Buckner e o filtrado, tratado com *n*-hexano, a fim de remover constituintes apolares, tais como gorduras, terpenos, clorofilas, xantofilas, etc. De seguida, as amostras foram concentradas no evaporador rotativo a <40°C e, finalmente, liofilizadas e conservadas a -20°C até o momento de utilização.

Os extratos resultantes foram denominados por ARD e ARF para a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e AND e ANF para o angico (*Anadenanthera colubrina*), referindo-se o “D” ao Decocto e o “F” ao extrato obtido com água, a Frio (Tabela 2).

Os rendimentos dos extratos foram calculados tomando por base os pesos das cascas utilizadas (48,100 g) e o peso do liofilizado obtido.

2. Avaliação da composição fenólica por métodos cromatográficos

A análise fitoquímica dos compostos fenólicos em plantas medicinais é indispensável para o estabelecimento da relação estrutura/atividade biológica. Com o objetivo de se obter informações acerca dos compostos presentes nos extratos em estudo recorreu-se a monitorização por TLC e por HPLC em fase reversa.

2.1. Cromatografia em Camada Fina - TLC

A cromatografia em camada fina é um método analítico relativamente rápido e de baixo custo para a separação de compostos fenólicos presentes em misturas complexas, tais como extratos de matrizes vegetais (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

As amostras, liofilizadas, foram solubilizadas em metanol a 50%, numa concentração de 5 mg/mL.

Para o estudo de taninos procedeu-se a uma TLC em placas pré-revestidas com sílica e uma fase móvel constituída por tolueno-acetona-ácido acético (12:30:4, v/v/v), sendo utilizada, como revelador, uma solução de *p*-dimetilaminocinamaldeído a 1% em metanol contendo ácido sulfúrico 1,5 M (DMACA). A catequina foi utilizada como composto de referência, e os resultados expressos em valores de *R_f* relativos ao composto de referência (ESCRIBANO-BAILÓN *et al.*, 1992).

O outro sistema utilizado foi o de placas de celulose eluídas com ácido acético a 15% descrito por Mabry *et al.* (1970), tendo-se utilizado um revelador geral para ácidos fenólicos e flavonóides, o NP-PEG (*Natural product-polyethylenglycol reagent*). Este revelador é constituído por é uma solução metanólica do éster aminoetílico do ácido difenilbórico a 1% (NP) e uma solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5% (PEG), que são sequencialmente aspergidos sobre as placas cromatográficas.

Após aplicação das amostras e padrões, as placas de TLC foram desenvolvidas em câmaras previamente saturadas com os respectivos desenvolventes e observadas sob a luz visível e ultravioleta (254 e 366 nm), antes e após terem sido submetidas à ação dos reveladores.

2.2. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

A separação dos compostos por esta técnica baseia-se na diferente afinidade dos compostos para a fase estacionária da coluna e a fase móvel que a atravessa. A identificação foi baseada, para cada composto, numa combinação da análise do tempo de retenção (R_t) e do perfil espectral e máximos de absorção registados, para cada composto, na região do ultravioleta e/ou do visível (UV/Vis), por recurso a uma matriz de fotodíodos, que faz a aquisição das absorvências do composto na gama espectral que previamente determinarmos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

A cromatografia de alta resolução em fase reversa, com diferentes gradientes de eluição, foi o método utilizado para separação e identificação dos compostos fenólicos. A fase estacionária consistiu de uma coluna cromatográfica de sílica, de fase reversa, Spherisorb S5 ODS-2 (250 x 4,6 mm i.d., com partículas de 5 μm), da Waters Corporation (Milford, Massachusetts), mantida a uma temperatura constante de 25°C, e protegida por uma pré-coluna Nucleosil C18 (30 x 4 mm i.d., com partícula de 5 μm), Macherey-Nagel (Düren, Germany). O processo cromatográfico decorreu com uma fase móvel constituída por uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% e metanol, eluentes A e B, respetivamente, em dois gradientes descontínuos, seguidos de eluição isocrática, tal como se ilustra na Tabela 3.

A adição de ácidos à fase móvel, normalmente, ácido fórmico ou ácido acético, é imperativa na separação de compostos fenólicos, uma vez que reduz a ionização dos hidroxilos fenólicos, resultando em picos mais estreitos e com menos arrastamento (ANDERSEN e MARKHAM, 2006) e, conseqüentemente, numa melhor resolução/separação dos diversos constituintes da amostra.

Os liofilizados foram solubilizados em metanol a 25%, microfiltrados através de uma membrana de 0,45 μm de poro, desgaseificados e posteriormente injetados no HPLC (100 μl) e cromatografados nas condições descritas na tabela 3, com um fluxo de 1 mL/min. A aquisição dos espectros foi feita entre 200 e 600 nm e o registro dos perfis cromatográficos foi realizado a 280 e 320 nm.

A identificação dos compostos também foi feita, sempre que possível, por comparação com os respectivos padrões, preparados e injetados nas mesmas condições das amostras em análise.

Tabela 3: Gradientes utilizados na análise cromatográfica dos extratos de *Myracrodruon urundeuva* e *Anadenanthera colubrina*.

AMOSTRAS	TEMPO (min.)	A (%)	B (%)
ARD e ARF Gradiente I	0	95	5
	0-2	95	5
	2-10	85	15
	10-35	70	30
	35-50	50	50
	50-60	0	100
AND e ANF Gradiente II	0	95	5
	0-2	95	5
	2-10	85	15
	10-50	70	30
	50-65	55	45
	65-75	20	80
	75-80	0	100

A: ácido fórmico a 5% e B: metanol

3. Tratamento ácido dos extratos

Como complemento à identificação dos constituintes fitoquímicos presentes nas amostras procedeu-se a um tratamento ácido dos extratos.

Colocou-se 1 mL de metanol contendo 1 mg de cada extrato numa ampola âmbar e adicionou-se 1mL de HCl 4N. Em atmosfera de azoto, selou-se a ampola à chama do bico de Bunsen. Após agitação por 30 segundos no vortex, colocou-se a ampola na estufa a 100°C durante 1 hora. Posteriormente, transferiu-se o conteúdo da ampola para um balão de fundo redondo e adicionaram-se 2 mL de água destilada. Com o auxílio do evaporador rotativo levou-se a solução a resíduo. Repetiu-se este passo as vezes necessárias até o pH da solução ser aproximadamente 5. Finalmente, solubilizou-se a amostra em metanol e analisou-se por HPLC/PDA nas condições referidas na tabela 3.

4. Quantificação dos compostos fenólicos

Os métodos quantitativos utilizados no presente trabalho são métodos espectrofotométricos que se baseiam em reações colorimétricas para a quantificação de compostos fenólicos.

Para cada método foi obtida uma curva de calibração, utilizando diferentes concentrações do respetivo padrão, sendo a concentração dos compostos na amostra calculados por extrapolação através da equação da reta. Os resultados foram obtidos em equivalentes de padrão, expressos em miligramas por grama de extrato (mg/g) e, atendendo aos rendimentos de cada extrato, calculou-se, posteriormente, a percentagem dos compostos fenólicos, nas cascas.

O liofilizado dos extratos foi sempre solubilizado imediatamente antes do seu uso, no solvente indicado para cada metodologia.

4.1. Dosagem de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais exprime a concentração total de compostos contendo hidroxilos fenólicos existentes numa amostra e, embora não forneça indicação sobre o tipo de composto presente, torna-se importante na comparação do teor de fenóis totais de extratos de plantas diferentes e, conseqüentemente, na avaliação da eficácia extrativa.

O liofilizado dissolvido em acetona a 70% (100 μ L) foi colocado num balão volumétrico de 10 mL, ao qual, em seguida, se adicionou 1,9 mL de água Milli-Q e 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após agitação durante 1 min, no vórtex, adicionaram-se imediatamente 5 mL de solução de carbonato de sódio a 20%, perfazendo de seguida, com água Milli-Q, o volume de 10 mL. Posteriormente procedeu-se à agitação do balão por 1 min, seguido de repouso por 20 minutos, ao abrigo da luz. A absorvência foi medida a 700 e 735 nm contra o ar (JULKUNEN-TITTO R, 1985).

4.2. Quantificação de Taninos

Devido à sua diversidade estrutural, a determinação de taninos envolve vários métodos de dosagem, essencialmente baseados em reações de oxidação-redução, alguns dos quais são seletivos para os diversos tipos de taninos.

4.2.1 Método da Vanilina

O método da vanilina consiste na formação de complexos corados (SCHOFIELD e MBUGUA, 2001), que resultam da reação dos flavanóis com aldeídos aromáticos, e que são depois avaliados espectrofotometricamente. Consequentemente, este método é essencialmente dirigido para a quantificação de flavanóis monoméricos ou oligo- e poliméricos, designados por taninos condensados ou proantocianidinas.

Para execução deste teste, a 100 μL de cada amostra, solubilizada em metanol anidro adicionaram-se 3 mL de uma solução de vanilina a 4%, preparada em metanol anidro. Após agitação da mistura durante 1 min, 1,5 mL de HCl concentrado foram adicionados de imediato, tendo a mistura sido novamente agitada. Após 20 min, determinou-se a absorvência, a 500 nm, contra um branco constituído por 100 μL da amostra, 3 mL de metanol anidro e 1,5 mL de HCl concentrado, preparado segundo o processo anteriormente descrito.

Todo o procedimento decorreu na ausência da luz.

A curva de calibração foi obtida utilizando como padrão a catequina.

4.2.2 Método do ácido fosfomolibdotúngstico (adaptado da FP VIII)

Este método permite avaliar o teor em taninos, independentemente do seu tipo, hidrolisado ou condensado, e baseia-se nas propriedades redutoras destes polifenóis e da sua capacidade em complexar com proteínas, nomeadamente com o colagénio da pele.

Preparou-se uma solução aquosa de cada extrato, solubilizando 0,258 g de cada amostra (**m₁**) em 50 mL de água. Com esta solução, procedeu-se à determinação de:

1. *Polifenóis totais* – 5 mL da solução preparada foram diluídos em água num balão aferido de 25 mL. A 2 mL desta diluição juntou-se 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico (reagente Folin-Ciocalteu) e 10 mL de água. Após agitação,

completou-se o volume de 25 mL com carbonato de sódio a 290 g/L. A absorvência a 760 nm foi determinada após 30 minutos (**A₁**).

2. *Polifenóis não adsorvidos pela pele em pó* – 10 mL da solução inicialmente preparada foram agitados com 0,1 g de pele em pó, durante 60 min, após o que se filtrou. Tomaram-se 5 mL deste filtrado e procedeu-se do mesmo modo que anteriormente descrito, tendo-se determinado a absorvência desta solução destanizada, a 760 nm (**A₂**).

Ensaio com o padrão – preparou-se, extemporaneamente, uma solução aquosa de pirogalhol a 0,05 g (**m₂**) / 100 mL. Desta solução do padrão retiraram-se 5 mL, que foram diluídos com água até 100 mL. Tomaram-se 2 mL desta diluição, juntou-se 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água. Após agitação, completou-se o volume de 25 mL com carbonato de sódio a 290 g/L. A absorvência a 760 nm foi determinada após 30 minutos (**A₃**).

A percentagem de taninos totais foi expressa em pirogalhol segundo a fórmula que adaptámos da Farmacopeia Portuguesa:

$$\frac{12,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 \times m_1}$$

5. Atividade Biológica

5.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de diversos extratos de plantas tem sido amplamente estudada devido ao seu interesse para a saúde humana, quer como protetor das células contra efeitos provocados por radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ROS), produzidas durante o metabolismo oxidativo (IMLAY, 2003), quer por agressores exógenos, tais como a poluição, as radiações e certas substâncias usadas na indústria alimentar como conservantes e/ou edulcorantes (MOURE, *et al.*, 2001).

5.1.1 Método do DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um radical sintético que mimetiza, *in vitro*, os radicais livres que se formam *in vivo*. Apesar de ser um radical sem importância biológica, os métodos que a ele recorrem são bastante utilizados por serem relativamente simples e por fornecerem boas indicações no *screening* da atividade antioxidante.

O método que utilizamos baseia-se em determinar o decréscimo da absorção, a 517 nm, pela ação de moléculas com capacidade de captar o eletrão do radical, transformando-o num não radical, estável e destituído da cor violeta que é peculiar das suas soluções alcoólicas, sendo a absorção a 517 nm proporcional à quantidade de DPPH residual (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

As amostras foram solubilizadas em metanol a 40%. As misturas de reação foram preparadas em tubos de ensaio, e alíquotas de 100 μ L de várias concentrações de cada extrato foram adicionadas a 1 mL de solução tampão acetato 0,2 M, pH=6,0. Posteriormente adicionou-se 1,4 mL de metanol e, finalmente, 0,5 mL de uma solução metanólica de DPPH, a 500 μ M. A mistura reacional foi agitada durante 30 seg, no vórtex, e mantida à temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 30 min. A absorvência foi medida a 517 nm, num espectrofotómetro Cintra 101 GBC contra um branco preparado de igual modo ao das amostras, mas na ausência da solução de DPPH.

Os resultados foram expressos na concentração da amostra, em μ g/mL da mistura de reação, que reduziu a 50% os valores de absorvência de uma solução de DPPH (IC₅₀), por extrapolação nas retas obtidas para cada extrato:

$$\text{ARD, } y = 3,0035x + 0,1371 \text{ (R}^2 = 0,996\text{);}$$

$$\text{ARF, } y = 4.413x - 0.085 \text{ (R}^2 = 0.993\text{);}$$

$$\text{AND, } y = 4,1595x - 0,3776 \text{ (R}^2 = 0,9966\text{);}$$

$$\text{ANF, } y = 4.159x - 0.377 \text{ (R}^2 = 0.996\text{).}$$

Os padrões utilizados para este teste foram o butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT).

5.1.2 Método do Anião superóxido

O ensaio baseia-se na redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pela riboflavina (KOSTYUK, *et al.*, 2000), catalisada pelo anião superóxido.

As amostras foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas de amostra liofilizada em tampão fosfato 16 mM a pH 7,8. As misturas reacionais (3 mL) foram obtidas com tampão fosfato 16 mM a pH 7,8, solução de EDTA 0,1 mM, NBT 85 μ M, riboflavina 6 μ M e um volume apropriado das amostras. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente (22°C) sob luz fluorescente (20 W, 20 cm). A reação foi interrompida removendo da luz. A absorvência foi medida a 560 nm num espectrofotômetro de UV/Vis - Jasco V-530. Os resultados foram expressos em μ g de liofilizado que reduziram 50% da absorvência máxima (IC₅₀).

5.2 Atividade antifúngica

As dermatofitoses são micoses superficiais ocorrentes em pêlos, unhas e pele, provocadas por fungos dermatófitos. Espécies do género *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são reconhecidas como alguns dos responsáveis por estas infecções. As limitações encontradas no tratamento destas dermatofitoses impulsionam a busca por drogas naturais alternativas.

A avaliação da atividade antifúngica foi testada, portanto, utilizando três fungos filamentosos dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*. Os fungos foram isolados a partir de culturas clínicas de dermatófitos de unhas e pele (*E. floccosum* FF1) e a partir de culturas de colecção CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) (*T. rubrum* CECT 2794 e *M. gypseum* CECT 2908) e posteriormente identificados por metodologias padrão em microbiologia. Os isolados foram conservados em Sabouraud em caldo com glicerol, a -70°C, após um teste prévio (em Sabouraud agár), de forma a garantir as características ótimas de crescimento e pureza de cada estirpe.

Um método de macrodiluição em caldo foi utilizado para determinar as concentrações mínimas inibitórias (MIC) e concentrações mínimas letais (MLC), baseado no documento referência M38-A, *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2002) para fungos filamentosos.

A diluição de cada amostra foi preparada em água estéril, numa concentração inicial de 800 μ g/mL em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), tendo sido utilizadas também diluições a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 em tubos de vidro estéreis. Usaram-se culturas de cada fungo numa suspensão ajustada a $1-2 \times 10^4$ células/mL em soro

fisiológico numa diluição de 500x, tendo-se confirmado a concentração pela leitura da absorvência.

Os tubos foram incubados numa estufa a 30°C por 7 dias, altura em que se determinou a MIC, por verificação macroscópica do crescimento ou não de fungo. Para avaliar a MLC, alíquotas de 20 μL foram retiradas de cada tubo negativo (sem crescimento de fungo na leitura da MIC) e cultivadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose agar, após o que se procedeu à incubação das placas a 30°C por 7 dias, para posterior avaliação do MLC. Para cada estirpe, controles de esterilidade do meio e das amostras foram verificados.

Todos os procedimentos inerentes a este ensaio foram efetuados em condições assépticas, utilizando uma câmara de fluxo e flamejando sempre o material esterilizado em uso.

5.3 Atividade anti-inflamatória

A inflamação consiste num processo complexo e de evolução variável que é desencadeada através de um estímulo. São vários os processos de ativação dos eventos celulares a partir do dano ocasionado ao tecido, sendo o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) um agente patogénico que, ao ser reconhecido, desencadeia a resposta inflamatória.

Os macrófagos exercem funções de fagocitose e segregam fatores solúveis, com funções imunoreguladoras. De acordo com diferentes situações podem proliferar na presença de um fator de crescimento específico, ou serem ativados, nomeadamente pelo LPS, para desempenhar funções especializadas (FIGUEIRINHA, 2011).

O monóxido de azoto (NO) é um radical diatómico livre, sendo a sua formação catalisada pelas sintases do monóxido de azoto (NOS) em muitos tipos de células envolvidas nos processos inflamatório e imunitário. A atividade anti-inflamatória pode, portanto, ser determinada pela capacidade do extrato em inibir o NO em células estimuladas com um agente inflamatório, nomeadamente com o LPS, uma vez que a formação do NO pela isoforma indutível da sintase do NO pode ser determinada, indiretamente, através da reação de *Griess*, a qual quantifica os nitritos acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares (GREEN *et al.*, 1982).

Assim sendo, foram utilizados macrófagos Raw 264.7, mantidos a 37°C sob uma atmosfera humidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Para a realização das

experiências as células aderentes foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02% em tampão fosfato (PBS) e sujeitas à ação dos extratos, na presença e ausência do estímulo inflamatório, o LPS.

De seguida procedeu-se à reação de *Griess*, que envolve a formação de um cromóforo, resultante da reação dos nitritos com a sulfanilamida e aminas heterocíclicas. Durante esta reação, a pH ácido, os nitritos sofrem diazotação com a sulfanilamida e formam um sal de diazónio, que se liga à amina heterocíclica N-(1-naftil)etilenodiamina, formando um composto rosa com espectro de absorção característico, que pode ser quantificado por espectrofotometria (FIGUEIRINHA, 2011).

Deste modo, para a quantificação dos nitritos, cultivaram-se células $0,3 \times 10^6$ em 600 μL de meio, em placas de cultura com 48 compartimentos, após o que se deixou a estabilizar por 12 horas. Em seguida, as células foram incubadas, por 1 hora na presença dos vários extratos, sendo posteriormente adicionado o LPS. As células foram incubadas, então, durante 24 horas, na presença dos vários estímulos: com LPS como controle positivo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS e os vários extratos, em diferentes concentrações, extratos sem LPS e meio para controle negativo. Posteriormente, procedeu-se à diluição do sobrenadante (170 μL) com igual volume do reagente de *Griess* (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%), deixando este atuar durante 30 min, na ausência de luz. O valor da absorvência foi medido a um comprimento de onda de 550 nm, e a concentração de nitritos foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio, segundo a equação da reta:

$$y = 0,008x \quad R^2 = 0,9966$$

5.4 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular /citotoxicidade não é uma tarefa fácil devido à multiplicidade de efeitos e mecanismos de ação. A redução do brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) constitui o fundamento de um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para verificar a proliferação celular e citotoxicidade, uma vez que o MTT é acumulado pelas células viáveis, por endocitose, resultando a redução do anel tetrazólico deste sal na formação de cristais de formazano, que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois

transportados para fora das células por exocitose. Com base neste princípio, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular, a partir do ensaio do MTT.

Deste modo, cultivaram-se células $0,3 \times 10^6$ em $600 \mu\text{L}$ de meio em placas de cultura com 48 compartimentos, deixando estabilizar por 12 horas a 37°C sob uma atmosfera humidificada, contendo 5% de CO_2 e 95% de ar. Em seguida, as células foram incubadas, durante 24 horas, na presença dos vários estímulos: com LPS como controle positivo ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$), LPS e os vários extratos em diferentes concentrações e extratos sem LPS. Posteriormente, removeu-se o meio e, às células, adicionou-se MTT ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) preparado em PBS, deixando este atuar, por incubação, durante 15 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se $300 \mu\text{L}$ de isopropanol ácido ($0,04 \text{ N}$) às células aderentes. O valor da absorvência foi determinado a um comprimento de onda de 570 nm com um filtro de referência de 620 nm . Os valores de viabilidade celular foram expressos em percentagem, relativamente à absorvência determinada nas células controle.

IV.
RESULTADOS
E
DISCUSSAO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos está ilustrado na Tabela 4, verificando-se que a decocção é o método que proporciona uma maior eficácia extrativa para ambas as plantas.

Quanto ao teor de extratáveis das duas plantas em estudo, a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) foi a que exibiu melhores resultados. O decocto apresentou o maior rendimento, 27,98%, enquanto o macerado do angico (*Anadenanthera colubrina*) foi o que revelou menor rendimento (8,12 %).

Tabela 4: Rendimento extrativo da casca de cada amostra.

EXTRATO	RENDIMENTO (%)
ARD	27,98%
ARF	19,67%
AND	19,6%
ANF	8,12%

Os processos que utilizamos, que têm como solvente extrativo a água, e especialmente o decocto, mostraram-se, para a aroeira, mais eficientes do que qualquer um dos utilizados por Queiroz *et al.* (2002). Estes autores verificaram um rendimento de 22,4% com a acetona-água (7:3) e 18,7% utilizando metanol-água. Estes resultados sugerem que os métodos utilizados na medicina tradicional, e em particular, o decocto, pode, para esta planta, constituir o melhor método extrativo, seguido da acetona-água, da maceração com água, e finalmente do metanol-água. Além disso, é de ressaltar que a água é um solvente atóxico e económico tornando-se, por essa razão um bom solvente extrativo para a aroeira.

A natureza do solvente extrativo e o processo de extração são ambos cruciais para proporcionarem a eficácia da extração dos fitoconstituintes, garantindo a preservação máxima de eventual alteração, sendo que para tal são necessários cuidados ao longo de todo o processo, destacando-se a proteção da luz, do calor e da contaminação microbiana.

2. Monitorização da composição fenólica por métodos cromatográficos

2.1. Cromatografia em camada fina – TLC

A monitorização por TLC para os diferentes extratos foi efetuada por ser uma técnica simples e versátil, e para a qual se utiliza pequena quantidade de amostra. Além disso, as separações cromatográficas podem ser obtidas em tempo relativamente curto, proporcionando uma aproximação à composição qualitativa dos extratos, e da qual, por vezes, é possível inferir a natureza química dos compostos existentes.

Pelos perfis cromatográficos em camada fina (TLC) foi possível inferir que os extratos da aroeira (ARD e ARF) apresentam composição fenólica semelhante: ambos revelaram a presença de ácidos fenólicos, detetados na placa de celulose, por observação, à luz UV (365 nm), de várias manchas de fluorescência azulada (Figura 10A) e a eventual ocorrência taninos do tipo condensado, na placa de sílica (Figura 10B). A existirem taninos condensados, estes serão de alto peso molecular, tendo em conta que não houve migração destes compostos na placa, ficando conseqüentemente retidos no ponto de aplicação, o que, de acordo com Escribano-Bailón *et al.* (1992) é indicativo de estarmos em presença de polímeros.

Relativamente ao angico (AND e ANF), este mostrou ser particularmente rico em taninos, que podem ser visualizados na placa de gel de sílica, ilustrada na Figura 10D, enquanto a celulose (Figura 10C) se mostrou ineficaz na separação dos compostos existentes nestes extratos. Este comportamento na celulose, assim como o que foi verificado nas placas de sílica é comum aos taninos. As manchas de tom azulado (Figura 10D), acompanhadas de arrastamento, sugerem a presença de compostos com características químicas que são associadas aos taninos condensados (proantocianidinas). O facto do cromatograma apresentar este arrastamento característico para os taninos deve-se à variedade de isómeros e moléculas com diferentes graus de polimerização. Todos os compostos detetados no cromatograma apresentam fatores de retenção inferiores ao do padrão (catequina), levando a concluir que estes são essencialmente oligómeros de flavanóis (HAGERMAN, 1998; ESCRIBANO-BAILÓN *et al.* (1992). Contrariamente ao observado na aroeira, o angico não possui taninos condensados muito polimerizados.

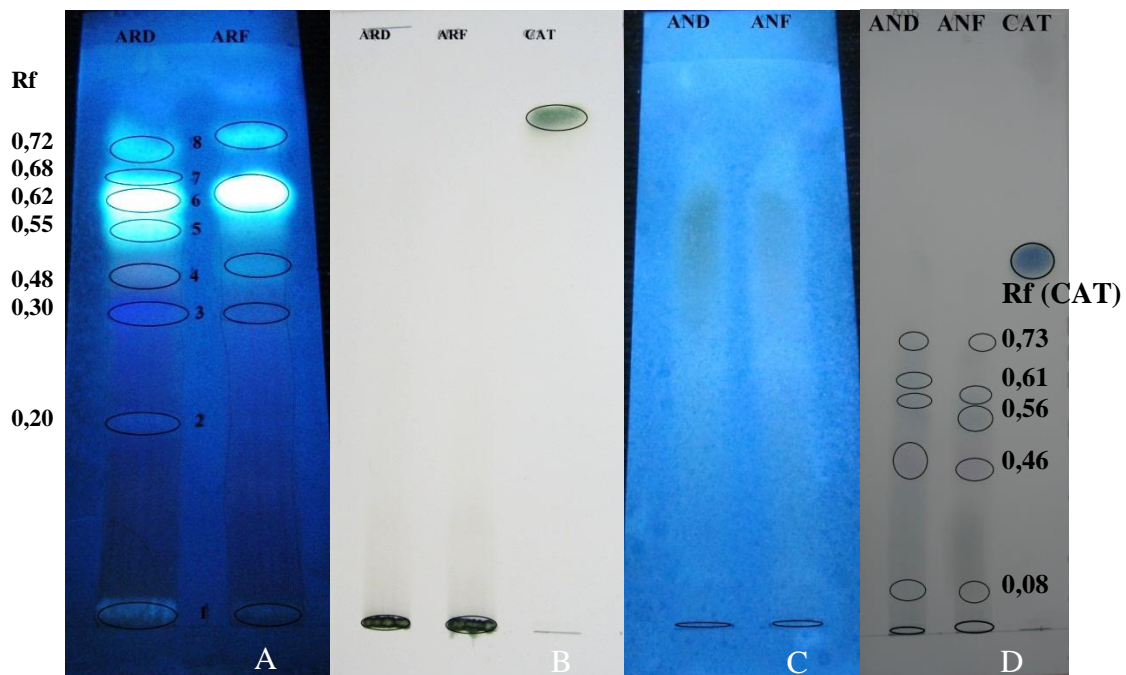


Figura 10: Cromatogramas dos extratos da aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF). A e C: Cromatogramas em placas de celulose desenvolvidas com ácido acético a 15%, sob observação à luz UV, a 365 nm, após revelação com NP-PEG. B e D: Cromatogramas em placas de gel de sílica G F₂₅₄ desenvolvidas com tolueno-acetona-ácido acético (12:30:4), observado à luz visível, após revelação com DMACA. CAT: padrão de catequina.

2.2. Cromatografia líquida de alta resolução – HPLC

A separação cromatográfica obtida por HPLC, acoplado a um detetor de fotodíodos, possibilita detetar e identificar os diferentes compostos de cada extrato que absorvam no ultravioleta (UV) e/ou visível (Vis). Este método analítico, para além da separação dos diversos constituintes de uma amostra, fornece, para cada um deles, o respetivo tempo de retenção e, simultaneamente, o seu perfil espectral e localização dos máximos de comprimentos de onda, elementos essenciais à identificação de compostos fenólicos (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

Os extratos foram analisados por HPLC, evidenciando os seus perfis cromatográficos, registados a 280 e a 320 nm, diferenças qualitativas e quantitativas.

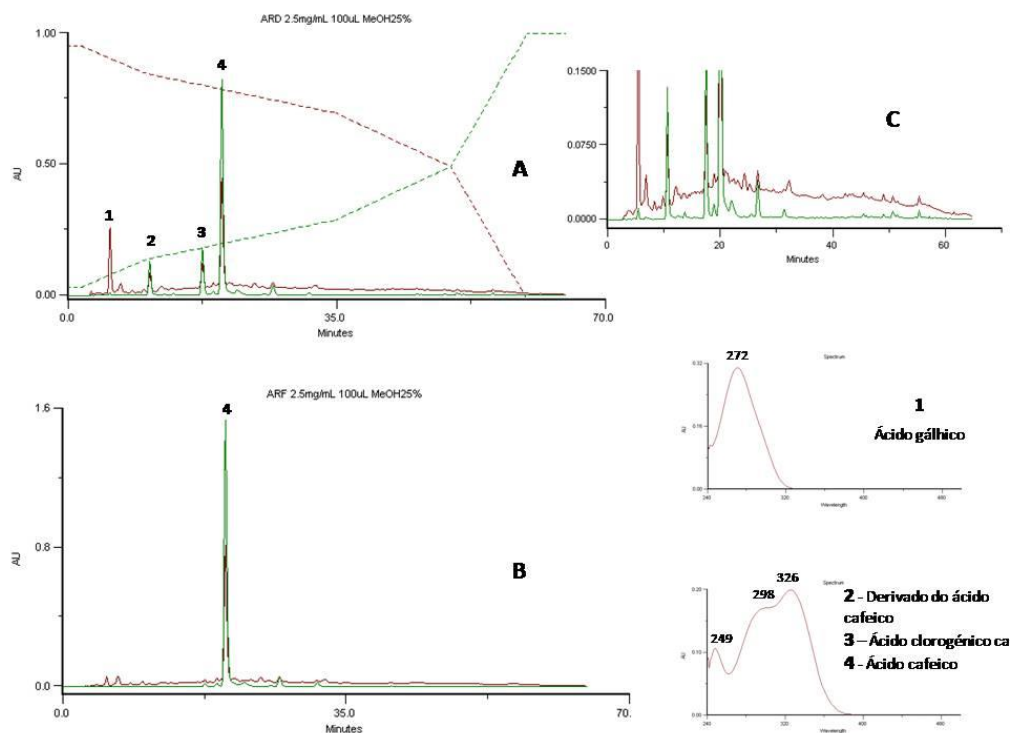


Figura 11: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente I, para os extratos da aroeira: A – ARD; B – ARF; C – ampliação de ARD). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos (picos de 1 a 4).

De seguida referencia-se o comportamento cromatográfico (R_t) e espectral, no UV, para os compostos maioritários presentes na aroeira, ácidos fenólicos e/ou seus derivados, para o decocto (Tabela 5) e o macerado (Tabela 6).

Tabela 5: Identificação dos compostos maioritários da ARD, no gradiente I.

Pico	R_t (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Composto
1	5,42	272	Ácido gálgico
2	10,62	285, 324	Derivado do ácido cafeico
3	17,48	249, 298sh, 326	Ácido clorogénico
4	20,00	247, 300sh, 326	Ácido cafeico

sh – valores de absorvência correspondentes a inflexões no espectro de UV.

Tabela 6: Identificação do composto maioritário da ARF, no gradiente I.

Pico	R_t (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Composto
4	20,07	247, 300sh, 326	Ácido cafeico

sh – valores de absorvência correspondentes a inflexões no espectro de UV.

Dos perfis espectrais de UV realça o predomínio de ácidos fenólicos para a aroeira (ARD e ARF) (Figura 11).

A elucidação estrutural de alguns dos compostos foi complementada por comparação com substâncias de referência (Tabela 9). Os ácidos fenólicos presentes nos extratos da aroeira são essencialmente o ácido gálgico e ácido cafeico, quer na forma livre, quer combinada (Figura 11 e Tabelas 5 e 6), predominando, em ambos os extratos, o ácido cafeico.

Alguns ácidos fenólicos, nomeadamente ácido cafeico e seus derivados são conhecidos por apresentarem uma variedade de funções biológicas, para além da sua capacidade antioxidante, demonstrada tanto *in vitro* como *in vivo* (NARDINI *et al.*, 1995; JUNG *et al.*, 2006; NORATA *et al.*, 2007; RAO, *et al.*, 1990; LEU e MAA, 2002). De entre os comuns na natureza e mais estudados, encontra-se o ácido cafeico, ao qual tem sido conferido uma enorme gama de atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-tumoral, antiviral, anti-inflamatória e anti-tumoral (NARDINI *et al.*, 1995; CHUNG *et al.*, 2004). Este ácido hidroxicinâmico pode atuar como antioxidante em células endoteliais, o que lhe confere um papel importante na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, para além da sua influência em mediadores inflamatórios, comprovada, nomeadamente, na inibição da síntese dos leucotrienos (KOSHIHARA *et al.*, 1984). Tem-lhe sido igualmente atribuído um importante papel na prevenção da hiperglicemia.

A hidrólise ácida dos extratos da aroeira permitiu verificar, através da presença de ácido gálgico em quantidades significativamente superiores às existentes nos extratos brutos, a presença de derivados deste ácido fenólico, eventualmente na forma de galhatos. Por outro lado, é também representativa a presença de ácido elágico e seus derivados. Estes resultados sugerem a presença de taninos do tipo hidrolisável, nomeadamente galhotaninos e elagitaninos.

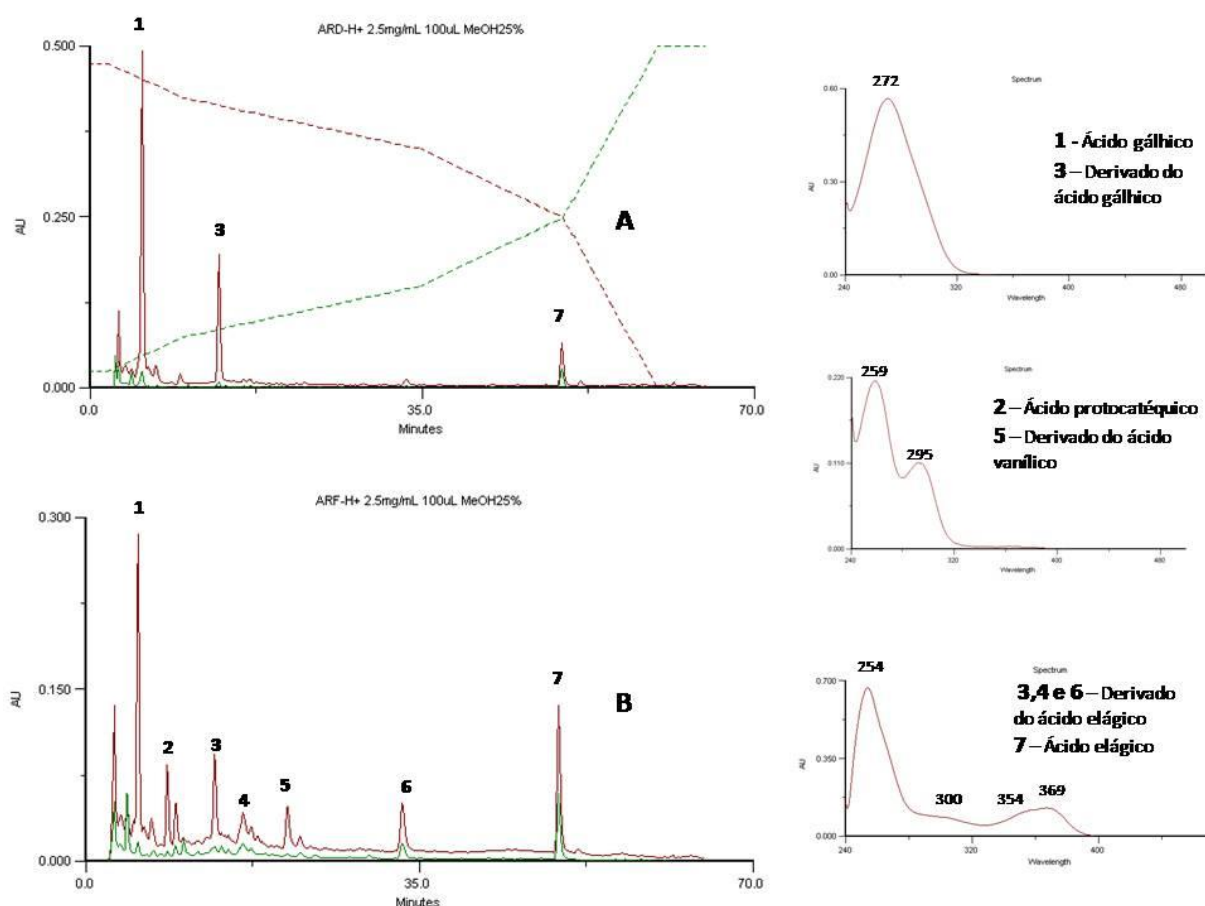


Figura 12: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente I, para os extratos da aroeira sujeitos à hidrólise ácida: A – ARD_H; B – ARF_H. Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos (picos de 1 a 7).

Transcreve-se, de seguida, o comportamento cromatográfico (R_i) e espectral, no UV, para os compostos maioritários presentes no hidrolisado da aroeira, ácidos fenólicos e/ou seus derivados, para o decocto (Tabela 7) e o macerado (Tabela 8).

Tabela 7: Identificação dos compostos maioritários do hidrolisado ácido da ARD, no gradiente I.

Pico	R_i (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Composto
1	5,45	271	Ácido gálgico
3	13,55	272	Derivado do ácido gálgico
7	49,68	254, 302sh, 354sh, 369	Ácido elágico

sh – valores de absorvência correspondentes a inflexões no espectro de UV.

Tabela 8: Identificação dos compostos maioritários do hidrolisado ácido da ARF, no gradiente I.

Pico	R _t (min)	λ _{máx} (nm)	Composto
1	5,43	270	Ácido gálgico
2	8,52	259, 295	Ácido protocatéquico
3	13,50	261, 361sh, 378	Derivado do ácido elágico
4	16,46	261, 361sh, 378	Derivado do ácido elágico
5	21,12	260, 295	Derivado do ácido vanílico
6	33,18	256, 361sh, 366	Derivado do ácido elágico
7	49,57	255, 361sh, 366	Ácido elágico

sh – valores de absorvência correspondentes a inflexões no espectro de UV.

Tabela 9: Comportamento de padrões de ácidos fenólicos em HPLC-PDA nas mesmas condições cromatográficas usadas para as amostras ARD e ARF, no gradiente I.

Nome	R _t (min)	λ _{máx} (nm)
Ácido gálgico	5,30	270
Ácido protocatéquico	8,10	259, 292sh
Ácido vanílico	17,17	258, 290sh
Ácido clorogénico	17,98	244, 298sh, 326
Ácido cafeico	19,47	244, 298sh, 325
Ácido elágico	49,43	255, 299sh, 355sh, 370

sh – valores de absorvência correspondentes a inflexões no espectro de UV.

Nos extratos do angico, os compostos fenólicos presentes consistem, essencialmente, de proantocianidinas. Esta identificação foi feita com base no comportamento destes compostos em sistemas para HPLC, constituídos por uma fase reversa e eluentes acidificados de metanol:água (elevação da linha de base), assim como nos espectros de UV característicos de 3-flavanóis condensados, com um máximo de absorção a cerca de 279 nm (Figura 13, Espectro 1).

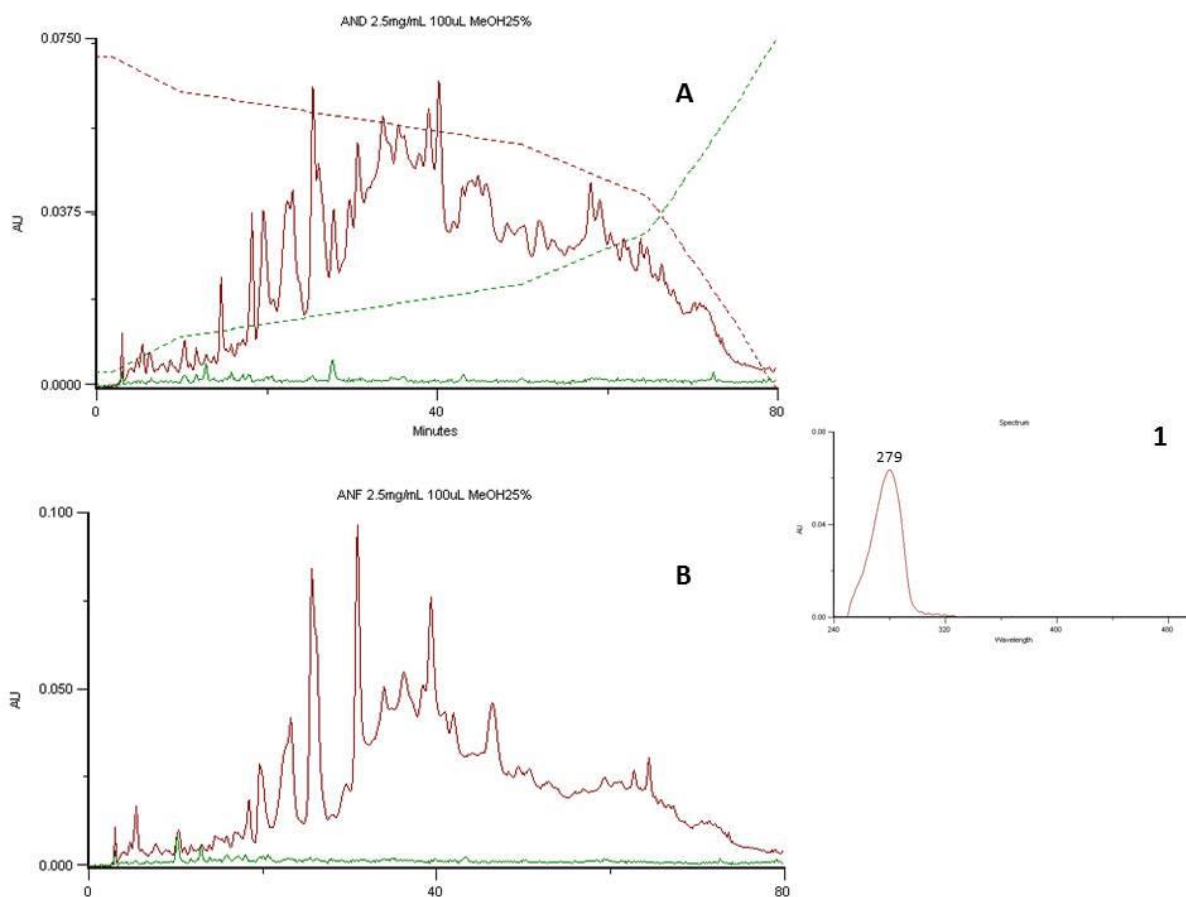


Figura 13: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente II, para os extratos do angico: A – AND; B – ANF). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos.

O tratamento, dos extratos do angico, pelo ácido clorídrico, a quente, permitiu confirmar a presença predominante de proantocianidinas. Como se pode verificar na Figura 14, o perfil cromatográfico não apresenta a elevação da linha de base que se verificou no perfil cromatográfico do extrato, e isto devido à degradação das proantocianidinas e consequente formação das antocianidinas (Figura 14, espetro 5). Para além desta constatação detetou-se o composto 4, com máximos de absorvência de 278 e 314 nm e um tempo de retenção de 19 min, o que sugere poder tratar-se de um derivado de um 3-flavanol esterificado por um ácido fenólico.

O ácido gálico, provavelmente resultante da hidrólise de derivados deste ácido fenólico, foi também detetado nesta planta, apesar de apresentar uma representatividade inferior àquela verificada na aroeira (Figura 14). Tal facto corrobora que a composição dos extratos das duas plantas, apesar de ser marcadamente constituída por taninos, integra um tipo distinto destes polifenóis.

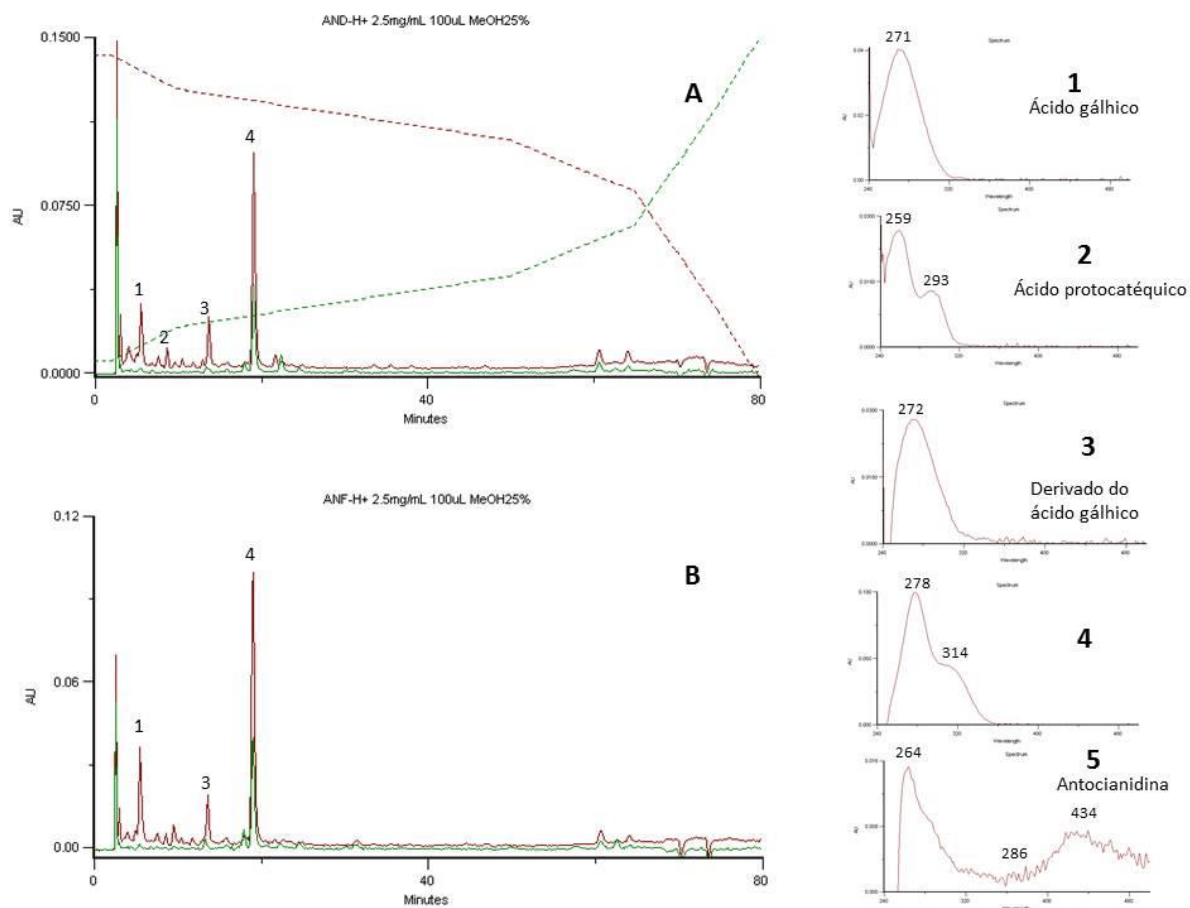


Figura 14: Cromatogramas de HPLC-PDA, no gradiente II, para as soluções resultantes do tratamento ácido dos extratos de angico: A – AND_H; B – ANF_H). Perfil espectral no UV dos compostos mais representativos.

A tabela 10 resume o comportamento cromatográfico (R_t) e espectral, no UV, para os compostos maioritários presentes nas soluções resultantes dos tratamentos ácidos do angico; ácidos fenólicos e seus derivados, e uma antocianidina.

Tabela 10: Identificação dos compostos maioritários resultantes do tratamento ácido da AND e ANF, no gradiente II.

Pico	R _t (min)	λ _{máx} (nm)	Composto
1	5,48	271	Ácido gálgico
2	8,63	259, 293	Ácido protocatéquico
3	13,64	272	Derivado do ácido gálgico
4	19,03	278, 314	3-Flavanol esterificado por um ácido fenólico
5	71,97	264, 286, 434	Antocianidina

3. Quantificação dos compostos fenólicos

3.1. Fenóis totais

Os teores de fenóis totais (FT) das duas plantas em estudo, determinados pelo método de Folin-Ciocalteu modificado (JULKUNEN-TITTO, 1985; WANG *et al.*, 1997), foram expressos em mg equivalentes a ácido gálgico / g de extrato, por recurso à equação da reta

$$y = 0,0735x + 0,0188 \quad R^2 = 0,9942$$

Este é um método de quantificação sensível que se baseia numa reação de oxidação-redução, nomeadamente oxidação do ião fenolato e redução do complexo fosfomolibdotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu) a um composto corado de azul, em condições alcalinas.

A planta que apresentou maior conteúdo de fenóis totais foi a aroeira, sendo o ARD o extrato mais rico (387,1 mg FT / g liofilizado), seguido do macerado (196,8 mg FT/ g liofilizado), o que pode estar relacionado com o facto da extração decorrer à temperatura de ebulição da água, proporcionando extrações mais enérgicas. No angico, cujos teores de fenóis totais foram inferiores, registaram-se 193,4 e 187,2 mg FT / g liofilizado, para o decocto e o macerado, respetivamente.

Tendo em conta o rendimento de cada extrato, a figura 15 ilustra a percentagem de fenóis totais nas cascas das duas plantas estudadas.

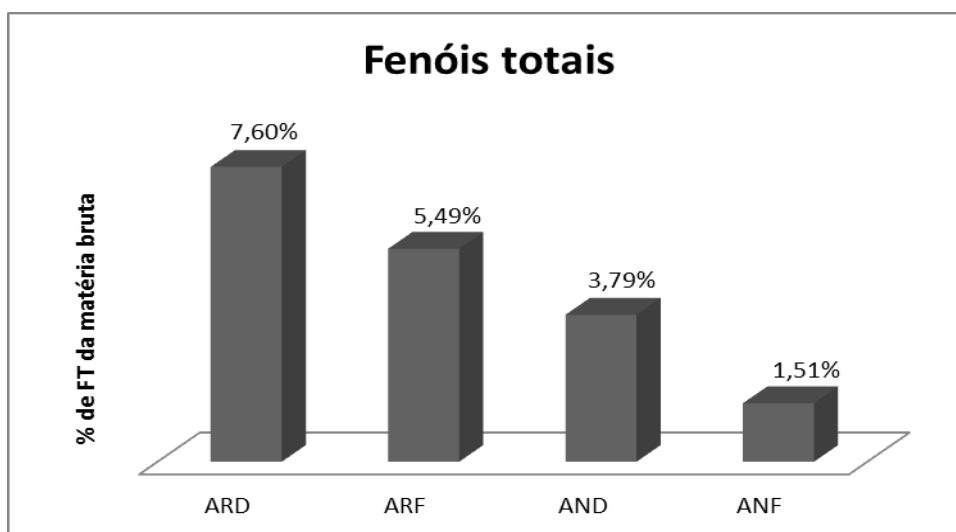


Figura 15: Concentração de fenóis totais nas cascas da aroeira e do angico, em função do método extrativo.

Queiroz *et al.* (2002) obtiveram, com a aroeira pulverizada e para extratos de acetona-água e metanol-água teores de FT de 19,1% e 20,2%, respetivamente. Contudo, os solventes utilizados por estes autores são tóxicos, para além de não serem utilizados na medicina tradicional.

Nas condições extrativas usadas neste trabalho, e que correspondem ao modo de preparação dos extratos na medicina popular, é possível inferir que, em relação à quantidade de fenóis totais, o método de extração com água a quente se mostrou mais eficiente, estando esta eficácia correlacionada com as atividades biológicas que estudamos, como se poderá ver nos itens posteriormente abordados.

3.2. Quantificação de Taninos

Dois métodos foram utilizados para a quantificação dos taninos presentes nas amostras da aroeira e do angico; o método da vanilina, comumente usado para a quantificação de taninos condensados e o método da Farmacopeia Portuguesa, para a dosagem de taninos totais (taninos hidrolisáveis e taninos condensados), que recorre ao ácido fosfomolibdotúngstico.

Os valores apresentados para o método da vanilina foram expressos em mg equivalentes à catequina / g de de extrato, por recurso à equação da reta

$$y = 1,108x - 0,016 \quad R^2 = 0,9942$$

Estes valores, assim como a concentração de taninos totais, expressa em g equivalentes de pirogalhol / 100 g de extrato, encontram-se transcritas na tabela 11.

Tabela 11: Concentração de taninos condensados e totais nos extratos analisados.

Extrato	Método da vanilina*	Método do fosfomolibdotúngstico**
ARD	136,12	26,15
ARF	150,60	24,94
AND	137,84	18,57
ANF	144,38	18,30

* mg de catequina/g de extrato; ** g de pirogalhol/100g de extrato

Atendendo ao rendimento de cada extrato, a figura 16 evidencia a percentagem de taninos totais e de taninos condensados nas cascas das duas plantas estudadas. É possível notar a maior quantidade de taninos na aroeira, sendo o decocto a amostra com maior concentração quer de taninos totais (7,28%), quer de taninos condensados (4,98%).

O método extrativo que originou um menor teor de taninos foi a maceração, resultando em quantidades inferiores para as duas plantas, voltando a ser o angico a amostra que apresentou menor percentagem de taninos.

Os resultados obtidos mostram a predominância de taninos em ambas as plantas, corroborando dados de outros autores (VIANA *et al.*, 1997; CHAVES *et al.*, 1998; LEITE, 2002; QUEIROZ *et al.*, 2002).

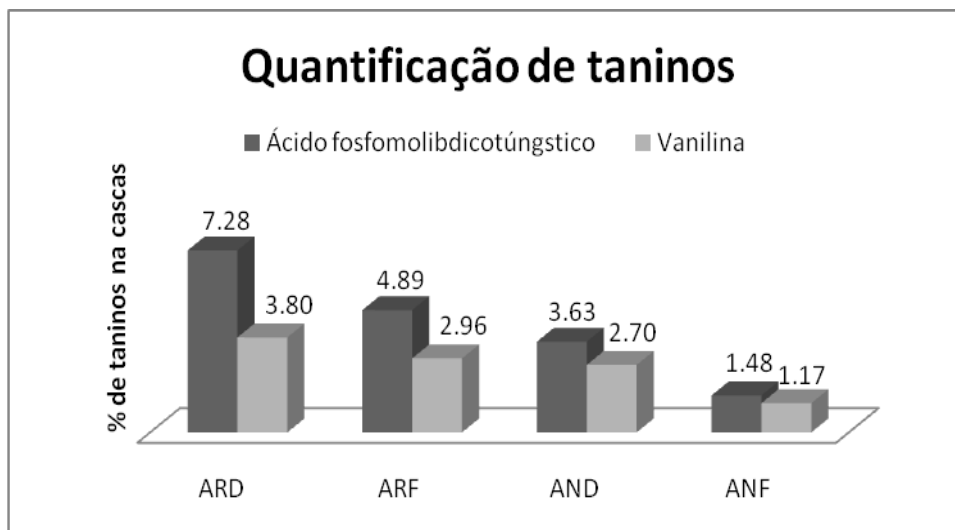


Figura 16: Concentração de taninos totais e de taninos condensados nas cascas da aroeira e do angico, em função do método extrativo.

O ensaio da vanilina é específico para uma classe limitada de compostos constituídos por unidades estruturais do tipo flavonóide, nomeadamente para os que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxilo em posições alternadas no anel A (AGOSTINI-COSTA, 2003). Consequentemente, é um método que permite quantificar, tanto flavanóis monoméricos, quanto oligo- e poliméricos (taninos condensados).

Por recurso a esta técnica foi possível confirmar a predominância de taninos condensados no angico, para o qual as amostras são maioritariamente constituídas por estes compostos, se compararmos estes valores com o teor de fenóis totais observado (Figuras 15 e 16).

4. Atividade Biológica

4.1. Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante utilizando duas metodologias distintas permitiu avaliar a capacidade sequestrante dos extratos relativamente a duas espécies radicalares, uma, que representa um radical *in vitro* (DPPH) e outra, que corresponde a radicais produzidos *in vivo* (anião superóxido – $O_2^{\bullet-}$).

O DPPH foi o primeiro teste a ser realizado, uma vez que apresenta alta sensibilidade, é de simples execução e orientador em ensaios de rastreio da atividade

anti-radical/antioxidante. Entretanto, o facto do anião superóxido ter papéis cruciais nos processos de dano celular e, assim, atuar na gênese e propagação dos estados inflamatórios agudos e crónicos, torna-se importante a sua avaliação, permitindo uma maior aproximação à atividade que pode ocorrer *in vivo*, e das potencialidades anti-inflamatórias dos constituintes dos extratos.

Para qualquer um dos radicais, a aroeira demonstrou ser mais ativa do que o angico, tendo sido o decocto (ARD), o extrato que apresentou melhor atividade no teste do DPPH, $IC_{50} = 3,52 \mu\text{g/mL}$. Para o teste do anião superóxido, o ARF ($IC_{50} = 3,40 \mu\text{g/mL}$) apresentou uma atividade ligeiramente melhor do que o ARD ($IC_{50} = 3,70 \mu\text{g/mL}$) (Figura 17).

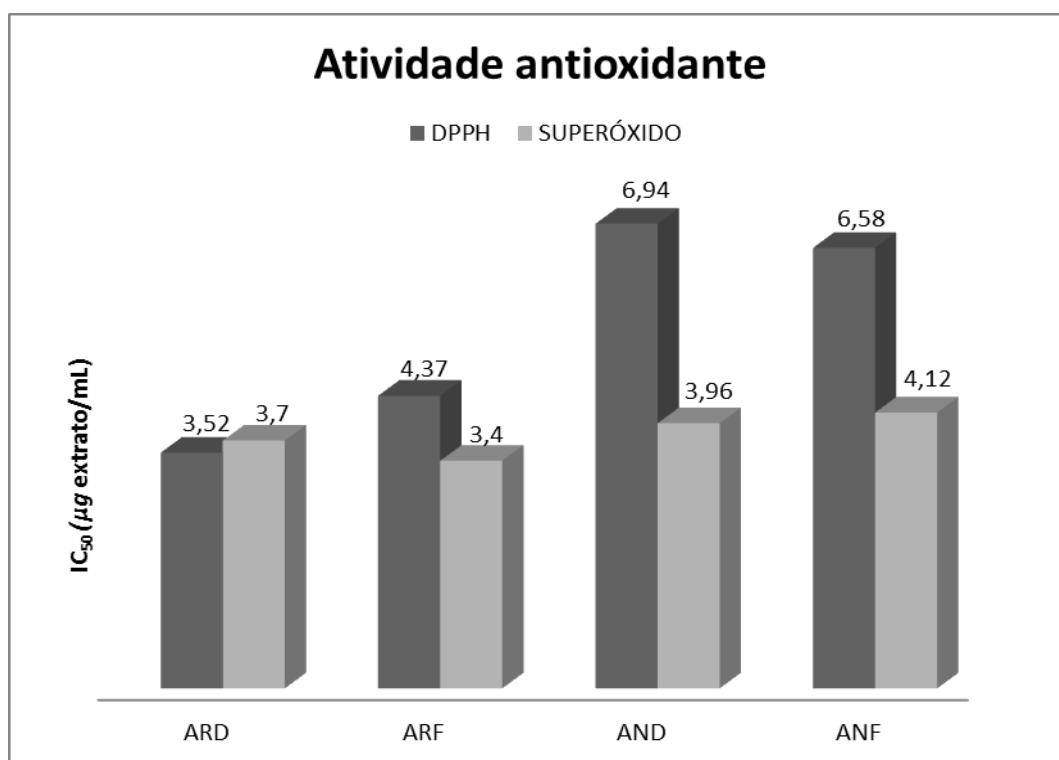


Figura 17: Atividade antioxidante dos extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) para os radicais DPPH e anião superóxido, expressa no valor de IC_{50} .

Os compostos fenólicos apresentam importante função como antioxidantes, devido à presença dos grupos hidroxilo, os quais permitem estes compostos capturar radicais livres (COSTA *et al.*, 2012). Nas nossas amostras registou-se uma correlação direta entre a concentração de fenóis totais e a atividade antioxidante, apesar dessa correlação não ser proporcional, o que pode estar relacionado com a natureza química dos compostos fenólicos existentes em cada amostra. De facto, tal como na atividade

antioxidante, também os perfis fenólicos, por HPLC, mostraram-se idênticos para os dois extratos da mesma amostra.

Foi possível constatar, também que, para o DPPH, a atividade da aroeira, evidenciada neste estudo, é melhor do que a de padrões sintéticos normalmente utilizados como antioxidantes industriais; butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT), para os quais os IC₅₀ foram de 3,71 µg/mL e 4,67 µg/mL, respetivamente, ou seja, superiores aos do decoto da aroeira. Além disso, apesar do angico ter uma capacidade anti-radical para o DPPH inferior à da aroeira, esta planta pode ter também um importante potencial antioxidante a nível biológico, relativamente à capacidade sequestrante do anião superóxido. De facto, para qualquer dos extratos testados, os IC₅₀ situaram-se, para este radical, entre 3,4 e 4,12 µg/mL (Figura 17).

As plantas estudadas apresentam-se consideravelmente ricas em taninos, fitoconstituintes aos quais tem sido atribuída uma significativa capacidade antioxidante, devido, quer ao facto de apresentarem estruturas poliméricas e oligoméricas de flavonóides (taninos condensados / proantocianidinas), e, conseqüentemente, possuírem um elevado número de hidroxilos fenólicos, quer às frequentes esterificações com o ácido gálgico e/ou elágico ocorridas nos taninos hidrolisáveis (CAI, *et al.*, 2006). Curioso foi observar que os taninos constituem os principais compostos fenólicos destes extratos, embora com predominância de tipos diferentes. Assim, enquanto no angico os compostos fenólicos correspondem essencialmente aos taninos, sendo estes quase exclusivamente do tipo condensado (proantocianidinas) (Figuras 13, 14, 15 e 16), na aroeira ocorrem os dois tipos de taninos, hidrolisáveis e condensados, encontrando-se igualmente, na sua constituição fenólica, ácidos fenólicos, maioritariamente do tipo hidroxicinâmico, e, em concreto, o ácido cafeico, livre e combinado (Figuras 11 e 12 ; Tabelas 5 - 7). A representatividade do ácido cafeico e seus derivados nos extratos da aroeira, assim como a presença de derivados do ácido gálgico e do ácido elágico (Figuras 11 e 12), provavelmente sob a forma de taninos hidrolisáveis; galhotaninos e elagitaninos, respetivamente, podem justificar a ligeira supremacia na atividade anti-radicalar/antioxidante da aroeira.

Os taninos, devido ao seu alto peso molecular e elevado grau de hidroxilação são referidos como detentores de significativa atividade antioxidante (KOLECKAR *et al.*, 2008). A atividade biológica dos taninos tem sido atribuída, pelo menos em parte, à concentração de grupos hidroxilo na posição *orto* do anel B, sendo que nos taninos hidrolisáveis, esta atividade está associada principalmente com resíduos de ácido

gálico e ácido elágico (SCHOFIELD e MBUGUA, 2001). Por fim, talvez devido ao anteriormente referido a aroeira apresenta melhores atividades antioxidantes, uma vez que apresenta uma maior concentração de taninos hidrolisáveis e estes apresentam-se como agentes biológicos mais potentes por unidade de massa, do que os taninos condensados (HASLAM, 1974).

Quanto aos taninos condensados / proantocianidinas têm também sido largamente referidos como detentores de atividade anti-radicalar para radicais como o superóxido, atividade esta que se supõe estar estritamente dependente da sua estrutura, e especificadamente relacionada com o grau de polimerização (SERRANO, *et al.*, 2009).

Deste estudo, podemos inferir que todos os extratos preparados de acordo com a recolha etnofarmacológica realizada apresentam uma apreciável atividade anti-radicalar/antioxidante, o que suporta a sua eficácia no tratamento ou alívio das patologias relatadas por praticantes da Medicina Tradicional, onde a aroeira e o angico são as primeiras e as principais plantas escolhidas para o tratamento de diversas doenças, nomeadamente de inflamações (CARTAXO *et al.*, 2010).

Nos processos de dano celular, o anião superóxido é um radical importante no início dos processos de produção de outras espécies reativas de oxigénio (ROS), pelo que, a sua captação por antioxidantes se reveste de extrema importância para minimizar a subsequente formação das ROS mais nocivas para as células (IMLAY, 2003). Como a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada com a capacidade de sequestro de radicais livres formados durante o processo inflamatório (COSTA *et al.*, 2012), o comportamento de todas as amostras pode sugerir uma possível contribuição, por este mecanismo, para a atividade anti-inflamatória.

4.2. Atividade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica foram determinados os valores de concentração mínima inibitória (MIC), que correspondem à concentração de extrato para a qual não se observa crescimento fúngico, e os da concentração mínima letal (MLC), ou seja, a concentração de extrato que se mostra letal para os fungos. As concentrações dos extratos, para estas duas avaliações, podem ou não ser coincidentes, traduzindo cada uma delas dois modos de ação distintos: fungistático, o MIC ou fungicida, o MLC.

Para os diferentes extratos foi verificada atividade antifúngica para os fungos dermatófitos filamentosos avaliados; *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum* (Tabela 12) e, maioritariamente, apresentaram ação fungicida para as concentrações fungistáticas.

Dentre os fungos testados, o fungo que está associado à doença do “pé de atleta” e a problemas da pele na região inguinal, o *E. Floccosum* foi o que se mostrou mais sensível para os quatro extratos, tendo a aroeira mostrado um MIC e MLC de 100 µg/mL. Apesar de serem fungicidas, os extratos de angico têm notavelmente menor atividade também para este fungo.

Tabela 12: Atividade antifúngica dos extratos da aroeira e angico.

	Atividade Antifúngica (µg/mL)					
	<i>T. rubrum</i> CECT 2794		<i>M. gypseum</i> CECT 2908		<i>E. floccosum</i> FF9	
	MIC*	MLC*	MIC	MLC	MIC	MLC
ARD	400	400	400	400 – 800	100	100
ARF	400	400	800	800	100	100
AND	-	-	800	800	400	400
ANF	-	-	>800mg/mL	>800mg/mL	800	800

*MIC e MLC foram determinados por um método de macrodiluição e expresso em µg/mL (p/v)

Os fungos dermatófitos são responsáveis por uma série de infecções patogênicas no homem e, embora existam inúmeros fármacos antifúngicos no mercado, trata-se de uma das principais causas de micoses mórbidas superficiais, de tratamento refratário e de reincidência comum; além disto, alguns medicamentos antifúngicos apresentam diversos efeitos adversos, tais como hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações hematológicas, etc. (ZUZARTE *et al.*, 2011). É neste cenário que os produtos naturais surgem como possível alternativa como agentes antifúngicos devido à segurança e baixo custo em que se configuram.

A aroeira e o angico, por requererem concentrações relativamente baixas, quando comparadas, por exemplo, com extratos etanólicos das folhas de *Eugenia uniflora* (SOUZA *et al.*, 2002), para os mesmos fungos dermatófitos, tornam-se plantas promissoras na luta contra estes fungos. Para inibir o crescimento do *M. gypseum*, estes autores referem concentrações superiores às necessárias para as plantas em estudo (500-1.000 µg/mL) e para o *T. rubrum* (500 µg/mL). Tantos outros exemplos se podem dar,

nomeadamente, a semente de *Moringa oleifera* cujos extratos foram avaliados por Chuang *et al.* (2007), tendo estes autores verificado que, para inibir o *T. rubrum* e o *E. floccosum* eram necessários 625 µg/mL. Comparando com os resultados evidenciados nestes estudos, é possível afirmar que, especialmente para o *T. rubrum* e *E. floccosum* os extratos da aroeira e angico são mais ativos. É importante enfatizar que, relativamente ao sucesso de tratamento das dermatofitoses se tem de atender não somente ao conhecimento da sintomatologia da doença, como também, de outros fatores, como o padrão clínico, severidade da infeção e do agente causador (GUPTA *et al.*, 2004).

Além das atividades antimicrobianas que possam ser úteis para tratamento de diversas patologias, os compostos fenólicos são de elevada importância para as plantas, atuando no crescimento normal, desenvolvimento e defesa contra infecções e danos (JEREZ *et al.*, 2007). Vários autores (OLIVEIRA, *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011, SILVA, 2009) sugerem os polifenóis, nomeadamente os taninos, como compostos com atividade antimicrobiana, devido à propriedade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos, inativando enzimas essenciais para o crescimento e desenvolvimento de fungos.

A ação antifúngica que registamos pode estar, portanto, correlacionada com a presença de taninos, através da capacidade que estes apresentam de inibir enzimas e complexar com iões metálicos, com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos microorganismos, resultando, esta propriedade, numa ação antimicrobiana (MELO e SANTOS, 2002).

Ambas as plantas têm comprovada atividade contra fungos que causam doenças em plantas e infestam a madeira (OLIVEIRA, *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011, SILVA, 2009). Contudo, a atividade frente a dermatófitos ainda não havia sido avaliada, apesar dos relatos de eficácia de ambas as plantas na Medicina Tradicional para o tratamento de doenças de pele e como anti-séptico.

A capacidade do extrato hidro-alcóolico da casca do angico para diminuir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, quando utilizado separadamente ou em associação com fungicidas foi descrito recentemente por Silva *et al.* (2009), bem como a atividade antifúngica contra a *Alternaria alternata*, do extrato metanólico da casca (CARVALHO *et al.*, 2011). Esta atividade pode estar relacionada com os taninos presentes nos extratos, uma vez que este tipo de compostos conferem

atividade antimicrobiana aos extratos de plantas que os contêm, como comprovado por Oliveira *et al.* (2010), ao analisar a durabilidade da madeira do angico.

Os taninos apresentam propriedades não específicas, resultante da sua ligação a enzimas, o que está diretamente relacionado com o metabolismo de agentes patogénicos através da inibição da fosforilação oxidativa, ou devido à sua capacidade de complexar com iões metálicos essenciais para o crescimento de microorganismos patogénicos (KOLECKAR, *et al.*, 2008).

Os taninos hidrolisáveis são, em geral, agentes biológicos mais potentes do que os taninos condensados (HASLAM, 1974), pelo que, a menor atividade antifúngica do angico pode estar relacionada com a presença maioritária dos taninos condensados nos extratos desta planta (AND e ANF), enquanto a aroeira, que possui taninos hidrolisáveis, se mostra mais ativa.

4.3. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória tem sido correlacionada com a capacidade antioxidante, e esta, com os compostos fenólicos presentes num determinado extrato, embora existam outros mecanismos pelos quais estes compostos podem atuar.

O recurso a linhas celulares para avaliar a produção e inibição de distintos mediadores químicos envolvidos nos vários tipos de resposta inflamatória permite determinar, *in vitro*, o efeito protetor de amostras em análise. Neste estudo, a avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos da aroeira e angico foi realizada pelo método de *Griess*, que permitiu determinar a produção de monóxido de azoto (NO) em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS, na presença e ausência dos extratos em variadas concentrações.

Os extratos utilizados no presente estudo exibiram a capacidade de reduzir a produção de NO, de forma dependente da dose, tendo sido o decocto da aroeira, ARD, que, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentou melhor atividade anti-inflamatória, reduzindo a concentração de NO, relativamente ao LPS, para 60,66% ($p < 0,05$). O extrato que apresentou segunda melhor atividade foi o decocto do angico, AND, com uma redução de NO para 70% (Figura 18). Para iguais concentrações, os macerados das duas plantas apresentaram uma atividade inferior à dos decoctos, o que sugere que o tratamento das cascas com a água, a quente, favorece a extração dos compostos que mais contribuem para a atividade anti-inflamatória. Como, em ambas as plantas, a

decocção foi o método extrativo que conduziu a extratos mais ricos em taninos, quer totais, quer do tipo condensado, pode-se inferir que é provável que estes polifenóis serem responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade anti-inflamatória observada nos extratos analisados.

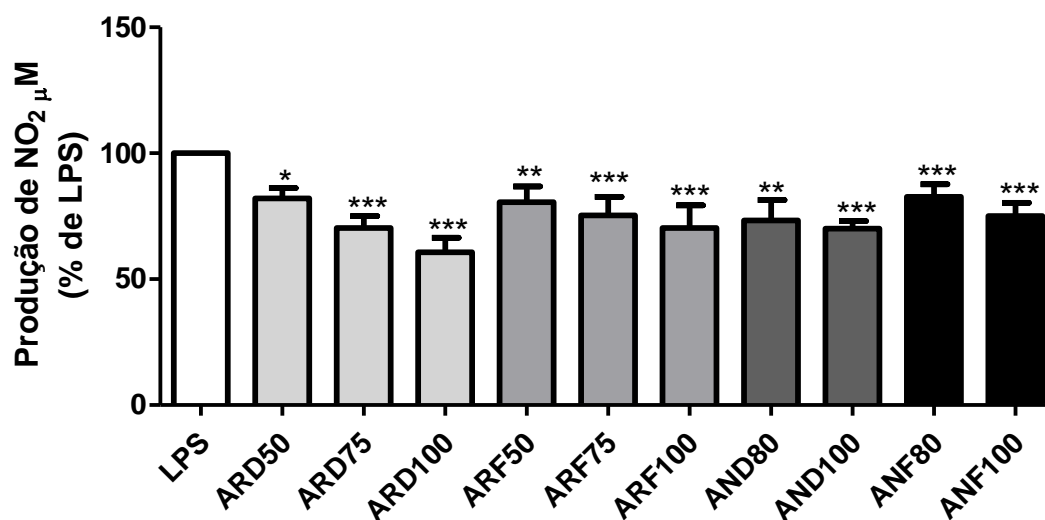


Figura 18: Atividade anti-inflamatória dos extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) para as diferentes concentrações dos extratos (em $\mu\text{g}/\text{mL}$), expressas em percentagem de produção de NO, extrapolada da curva padrão de nitritos, pelo método de Griess (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

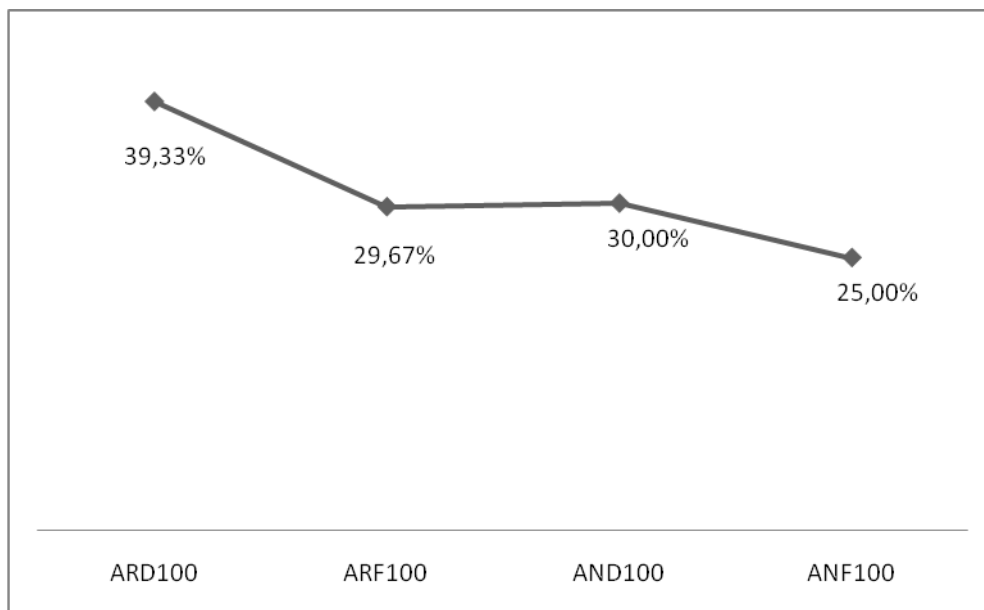


Figura 19: Percentagem de inibição do NO para os extratos de aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF) na concentração de 100 µg/mL.

A eficácia dos extratos destas espécies; aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e angico (*Anadenanthera colubrina*), na Medicina Tradicional, para o tratamento de dores de garganta e inflamações em geral, pode ser preliminarmente validada pelos resultados que obtivemos.

Araújo *et al.* (2008), ao estudar a comunidade do Carão, no Brasil, sugeriu que o critério de seleção das plantas para o tratamento de inflamações pode estar relacionado com os constituintes químicos nelas encontrados, tendo estes autores referido a concentração de taninos como critério dessa seleção. Este facto, observado noutros estudos de etnomedicina, suporta a prevalência na utilização da aroeira e do angico pelas populações locais.

A inflamação consiste num processo complexo e de evolução variável, porém normal, quando ocorre dano ao tecido. Pode ser desencadeada por um vasto número de estímulos de diversa natureza: química, física ou biológica, e manifesta-se de forma intensa ou de forma mais limitada ao longo do tempo, como na inflamação aguda ou crónica, respetivamente (FERREIRA, 2011).

São vários os processos de ativação de eventos celulares a partir do dano ocasionado ao tecido, dependendo, da ativação de fatores de transcrição e do agente agressor. O lipopolissacarídeo (LPS) é um PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), ou seja, constituinte de um agente infeccioso, sendo reconhecido pelo sistema imunitário. Este reconhecimento é feito através da interação do PAMP e os receptores

específicos (PRRs – Pattern Recognition Receptors) localizados na membrana de diversas células, como os macrófagos. Os macrófagos exercem funções de fagocitose e segregam fatores solúveis, com funções imunoreguladoras. De acordo com diferentes situações podem proliferar na presença de um fator de crescimento específico, ou serem ativados (pelo LPS, por exemplo) para desempenhar funções especializadas, por exemplo, desencadeando a secreção de vários mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e o monóxido de azoto (NO) (FIGUEIRINHA, 2011).

As plantas estudadas encontram-se num ambiente de estresse constante, nomeadamente o estresse hídrico, uma vez que a Caatinga consiste de um ambiente de florestas sazonalmente secas (CASTELLETTI *et al.*, 2003; PRADO, 2003). Em geral, quando submetidas a estresses ambientais, as plantas investem em estratégias químicas, aumentando a acumulação dos compostos fenólicos (BUSSOTTI *et al.*, 1997). São eventualmente estas condições que favorecem a biossíntese de metabolitos secundários bioativos, nomeadamente, de compostos fenólicos, os quais parece contribuir para uma larga utilização da aroeira e do angico na medicina tradicional, tal como é relatado por diversos autores (FERREIRA-JUNIOR, 2011; CARTAXO *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002).

4.4. Viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade foi feita visando analisar a viabilidade celular dos extratos. Na figura 20, que ilustra os resultados obtidos, é possível demonstrar que nenhum dos extratos apresenta citotoxicidade nas concentrações avaliadas, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para a aroeira e 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para o angico.

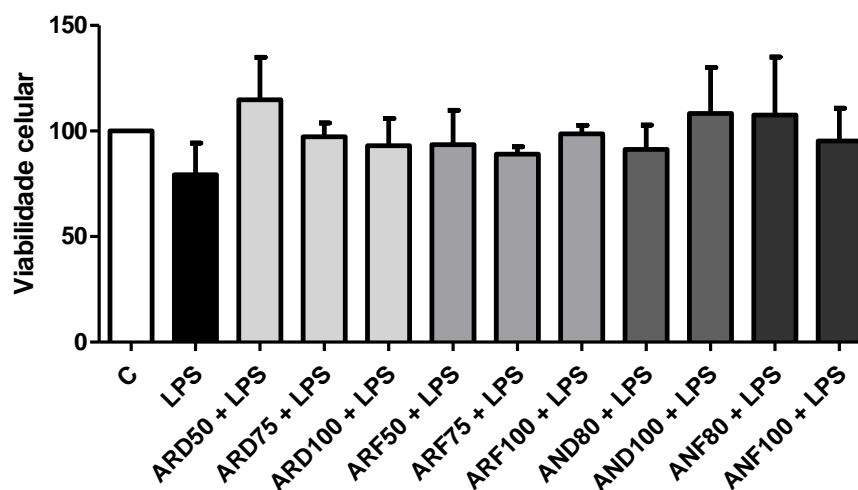


Figura 20: Viabilidade celular dos extratos da aroeira (ARD e ARF) e angico (AND e ANF), nas concentrações indicadas (μg de extrato/mL), avaliada pelo teste do MTT.

Estes resultados corroboram o relato da medicina tradicional (FERREIRA-JUNIOR, 2011; CARTAXO *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002), uma vez que estes afirmam que a aroeira e o angico são plantas medicinais da Caatinga de utilização mais frequente, não somente pela sua eficácia no tratamento, mas também por não apresentar efeitos adversos. No entanto, é de salientar que alguns autores (MEDEIROS *et al.*, 2000; AMORIM, 2005; BRITO 2010) têm relatado a toxicidade das folhas do angico, devido à presença de glicosídeos cianogénicos, o que justifica o uso das cascas desta planta e não das folhas na medicina tradicional.

V.
CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Resultados de um levantamento etnofarmacológico sobre duas plantas medicinais da Caatinga brasileira – *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Allemão (aroeira) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico) foram orientadores dos processos extrativos seleccionados para a realização deste estudo; decocção e maceração com água. Além de utilizarem um solvente inócuo para a saúde, estes métodos são favoráveis à extração dos compostos que nos propusemos estudar, os compostos fenólicos. A caracterização estrutural destes fitoconstituintes e a sua avaliação quantitativa, assim como o estudo de atividades biológicas permitiram correlacionar a composição fenólica com as atividades e inferir sobre as potencialidades biológicas dos extratos.

Os constituintes fenólicos dos extratos obtidos por decocção da *M. urundeuva* correspondem a taninos hidrolisáveis, galhotaninos e elagitaninos, a taninos condensados / proantocianidinas de elevado peso molecular, e a ácidos fenólicos do tipo benzóico (ácido gálhico), mas maioritariamente, do tipo hidroxicinâmico (ácidos cafeico e clorogénico). No macerado registaram-se constituintes semelhantes aos identificados no decocto, para além do ácido protocatéquico e eventualmente, um derivado do ácido vanílico.

Relativamente aos extratos de *A. colubrina*, os compostos fenólicos identificados foram quase exclusivamente taninos, e dentro destes, maioritariamente os taninos do tipo condensado, estando, no entanto, também presentes ácidos fenólicos do tipo benzóico, nomeadamente os ácidos gálhico e protocatéquico.

Os extratos que apresentaram maior quantidade de fenóis totais foram os decoctos, sendo o da *M. urundeuva* o extrato com o maior teor, seguido do respetivo macerado. O mesmo padrão de quantificação foi observado para os taninos, independentemente do método utilizado, onde o decocto de *M. urundeuva* apresenta maior teor de taninos, seguido do macerado, seguindo-se o decocto de *A. colubrina* e, com o menor teor, o macerado do angico.

Quanto às atividades biológicas avaliadas; atividade antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória; os extratos exibiram, de modo geral, significativas atividades, apresentando-se, no entanto, a *M. urundeuva* como a mais ativa, e, particularmente, o decocto.

Quanto à atividade anti-radicalar/antioxidante total, o decocto da aroeira apresentou uma eficácia superior à de antioxidantes sintéticos usados industrialmente (BHA e BHT), tendo-se registado para todos os extratos das duas plantas uma importante atividade sequestrante para o anião superóxido, espécie reativa de oxigénio que induz o dano celular e que intervém na cascata do processo inflamatório.

Dos três dermatófitos testados, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*, o que se mostrou mais sensível aos extratos e, particularmente ao decocto da aroeira foi o *E. floccosum*, um dos fungos que está associado à doença do “pé de atleta” e a problemas da pele na região inguinal.

No que concerne à atividade anti-inflamatória, verificou-se uma redução do monóxido de azoto de cerca de 40% para o decocto da *M. urundeuva*, que dos extratos analisados foi igualmente o mais ativo.

Verificou-se também que as atividades descritas se evidenciaram para concentrações não tóxicas de extrato.

Atendendo à diferente eficácia das duas plantas, é de realçar que a *M. urundeuva* foi a planta que se mostrou mais ativa e na qual também ocorrem maiores concentrações de taninos, essencialmente do tipo hidrolisável, aos quais tem sido atribuído atividades superiores às dos taninos condensados. No entanto, é possível concluir que as duas plantas estudadas são promissoras na procura de novos produtos com atividade biológica, configurando-se, estes extratos, como seguros e eficientes no tratamento de processos inflamatórios e de doenças de pele referenciado na Medicina Tradicional da região da Caatinga, Brasil.

VI.
REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. *Informações sobre os fitoterápicos brasileiros*, 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 20 novembro 2009.

ADAMS, L.; SEERAM, N.; AGGARWAL, B.; TAKADA Y.; SAND D.; HEBER D. Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 980-985, 2006.

AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C.; REED, J.; MUKHTAR H. Anthocyanin- and Hydrolyzable Tannin-Rich Pomegranate Fruit Extract Modulates MAPK and NF- κ B Pathways and Inhibits Skin Tumorigenesis in CD-1 Mice. *Int. J. Cancer.* 113, 423-433, 2005.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*, São Paulo. 26: 5, 763-765, 2003.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N. ; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 18: 3, 472-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P. A jurema nas práticas dos descendentes culturais do africano no Brasil. In: Mota, C. N. & Albuquerque, U. P. (Orgs.), **As muitas faces da Jurema: De espécie botânica a divindade afro-indígena**. Recife, PE: Bagaço. 2002.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L. De H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciência.* 27: 7, 336 – 346, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, T. A. S.; RAMOS, M. A.; NASCIMENTO, V. T.; LUCENA, R. F. P. ; MONTEIRO, J.M.; ALENCAR, N.L.I; ARAÚJO, E. L. How

ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. *Biodiversity and Conservation*. 18, 127-150, 2009.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (Supl). 678-689, 2006.

ALBUQUERQUE, U.P., MONTEIRO, J.M., RAMOS, M.A., AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 76-91, 2007.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): Um estudo de caso. *Interciência*. 27: 6, 276 – 285, 2002.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L., AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments*. 62, 127-142, 2005.

ALVES, R. R. N. **Uso e comércio de animais para fins medicinais e mágico-religiosos no Norte e Nordeste do Brasil**. Tese de doutorado – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. From cnidarians to mammals: The use of animals as remedies in fishing communities in NE Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 107: 2, 259-76, 2006.

ALVES, R. R. N.; SILVA, A. A. G.; SOUTO, W. M. S.; BARBOZA, R. R. D. Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 4: 2, 2007.

AMANCIO ALVES, J. J. Geocologia da Caatinga no SemiÁrido do Nordeste Brasileiro. *Climatologia e Estudos da Paisagem*. 2: 1, 58-51, 2007.

AMORIM, S. L. **Intoxicação experimental por *Manihot glaziovii* em caprinos na Paraíba.** Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 51f. (Dissertação de Mestrado), 2005.

AMORIM, S. L.; MEDEIROS, R. M. T.; RIETCORREA, F.; OLIVEIRA, A. C. P. Estudo experimental com plantas cianogênicas em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24, 5-6, 2004.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids – Chemistry, biochemistry and applications.** Boca Raton: Taylor and Francis. 2006.

ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas Dominion. *Revista Brasileira de Botânica*. 4: 2, 149-163, 1981.

ARRUDA, M. B. **Conservação, ecologia humana e sustentabilidade na caatinga: estudo da região do Parque Nacional da Serra da Capivara (PI)** 1 st. ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Série Meio Ambiente em Debate. 96 p, 1997.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plantas and agroindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203. 2006.

BOTELHO, M. A.; RAO, V.S.; CARVALHO, C. B.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G.; VALE, M. L.; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol*. 113: 471-478. 2007.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste:** especialmente do Ceará. 4.ed. Natal: Escola Superior de Agricultura de Mossoró. 315 p, 1990.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.G.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 28: 1. 25-30. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, p.148, 2006.

BRITO, S. C. D. **Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** Fundação universidade federal do Tocantins, Palmas. (Dissertação de Mestrado), 2010.

CAI, Y. [*et al.*] – Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 78, 2872-2888. 2006.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 131: 2, 326-342, 2010.

CARVALHO, D. D.; ALVES, E.; CAMARGOS, R. B.; OLIVEIRA, D. F.; SCOLFORO, J. R. S.; de CARVALHO, D. A.; BATISTA, T. R. S. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2011.

CAMPOS, M. D. O. Etnociência ou etnografia de saberes, técnicas e práticas. In: **Métodos de Coleta e Análise de dados em Etnobiologia, Etnoecologia e Disciplinas Correlatas.** Editado por Amorozo, M. C. M.; Ming, L. C.; Silva, S. P. Rio Claro: UNESP/ CNPq. 2002.

CASTELLETTI, C. H. M.; SANTOS, A. M. M.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.;

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE. 719-734, 2003.

CHAVES, M. C. et al. Experimental evaluation of *Myracrodruon urundeuva* bark extract for antidiarrhoeal activity. *Phytotherapy Research*.12, 549 -552, 1998.

CHUNG, K. T.; MOON, S. K.; CHANG, Y. C. ; KO, J. H.; LEE, Y. C.; CHO, G., KIM, S. H.; KIM, J. G.; KIM, C. H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J*. 18, 1670-1681, 2004.

CHUANG *et al.* Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*. 98, 232-236, 2007.

CHRÉTIEN, C. **A ciência em ação**. Campinas: Papirus. 1994,

CONFESSOR, M. V. A. Flora e fauna utilizada na Medicina Etnoveterinária em áreas rurais do município de Pocinhos, Paraíba, Brasil. Monografia de Licenciatura. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil, 2009.

CONFESSOR, M. V. A.; MENDONÇA, L. E. T.; MOURÃO, J. S.; ALVES, R. R. N. Animals to heal animals: ethnoveterinary practices in semi-arid region, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 5, 37, 2009.

CONFORTI, F.; MENICHINI, F. FORMISIANO, C.: RIGANO, D.: SENATORE, F.: ARNOLD, N. A. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of *Stachys* species from different regions of the Mediterranean area. *Food Chem*. 116, 898 - 905, 2009.

CORREIA, H. S. N. ***Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh. Perfil polifenólico e captação de espécies reativas de oxigênio**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2005.

- COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. *Curr Med Chem*.19: 18, 2876-900. 2012.
- COTTON, C.M. **Ethnobotany**: principles and applications. New York: J. Wiley, p. 320. 1996.
- COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; AMARAL, F. M. M. do. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. *Visão Acadêmica*. 3: 1, 7-12, 2002.
- CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. Retirado de <http://www.antoniopcunha.com.sapo.ptTH>. [Acesso em 15 de maio de 2006]. Degáspari CH, Waszczynskyj N, Santos RJ. 2004. Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*. 5: 2, 83-90, 2006.
- DAVID, J.P. & ANDERSON, L.A.. Ethnopharmacology and western medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 25, 61-72, 1969.
- DIEGUES, A. C. S. **O mito moderno da natureza intocada**. HUCITEC. São Paulo. 1996.
- DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411, 843-847. 2001.
- DREYFUS, M. M.; CHAPELA, I. H. **Discovery of natural products with therapeutic Potential. Boston** : Butterworth – Heiemann, Boston., p.30-58, 1994.
- EIRAS, C.; SANTOS, A. C.; ZAMPA, M. F.; BRITO, A. C.; CONSTANTINO, C. J. L.; ZUCOLOTTI, V.; dos SANTOS, J.R. Jr. Natural polysaccharides as active biomaterials in nanostructured films for sensing. *Journal of Biomaterials Science*. 21, 1533–1543, 2010.

ELISABETSKY E, SOUZA GC. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: **Farmacognosia-da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC. p. 107-122. 2004.

ELISABETSKY, E. & WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 38, 131-143, 1993.

ESCRIBANO-BAILÓN, T.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, Y. ; RIVAS-GONGONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *J.Agric Food Chem*. 40, 1794 – 1799, 1992.

FERNANDEZ, L. R; ANTUNES, A. S. **Informações Estratégicas sobre Plantas Medicinais obtidas a partir de Base de Dados em Linha Memeo**. Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

FERREIRA-JÚNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE , U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *Journal of Ethnopharmacology*. 138, 238-252, 2011.

FIGUEIRINHA, A. M. B. M. ***Cymbopogon citrates*. Cmposição fenolica e actividade anti-inflamatoria**. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmacia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

GIULIETTI, A. M.; DU BOCAGE NETA, A. L.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (Ed.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente. p. 48-90, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 30, 374-381, 2007.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol.* 3, 353-358, 2005.

GREEN, L. C. [et al]. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.* 126, 131-138, 1982.

GUPTA, A. K.; RYDER, J. E.; SKINNER, A. R. Treatment of onychomycosis: Pros and cons of antifungal agents. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery.* 8, 25-30, 2004.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med.* 70, 263-, 2003.

HARVEY, A. L.; WATERMAM, P. G. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. *Current opinion in drug discovery and development.* 1: 1, 71-76, 1998.

HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochem J.* 139, 255 – 288, 1974.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/flora/divs/plantasextincao.pdf>> Acesso em: 20 de novembro de 2008.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. *Annual review of Microbiology.* 57, 395-418, 2003.

IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research.* 287-299, 2000.

JULKUNEN-TITTO R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213-217, 1985.

JUNG, W. [et al] – Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF- κ B pathways. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40: 11, 2572 - 2582, 2006.

KIM, G. N.; SHIN, J. G.; JANG, H.D. Antioxidant and antidiabetic activity of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) extract treated with *Aspergillus saiti*. *Food Chem* 117, 35-41, 2009.

KOLECKAR V.; KUBIKOVA K.; REHAKOVA Z.; KUCA K.; JUN D.; JAHODAR L.; OPLETAL L. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Min. Rev. Med. Chem.* 8, 436-447, 2008.

KOSHIHARA, Y. [et al]. – Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and lipid metabolism*. 792: 1, 92 – 97, 1984.

KOSTYUK, V. A. POTAPOVICH, A. I., VLADYKOVSKAYA, E. N., HIRAMATSU, M. - Protective effects of green tea catechins against asbestos induced cell injury. *Planta Medica*. 66: 8, 762–764, 2000.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga: Uma Introdução ao Desafio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE. p. XIII-XVI, 2003.

LEITE, I.J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5:3, p.193–206, 2002.

LEU, T. H.; MAA, M.C. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr. Med. Chem., anti canc. Agents* 2, 357-370, 2002.

- LEV, E. Traditional healing with animals (zootherapy): medieval to present-day Levantine practice. *Journal of Ethnopharmacology*. 86, 107-118, 2003.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. Nova Odessa/ São Paulo: Instituto Plantarum, 2002
- LUCENA, M. G. C. **Biological activity of *Teucrium salviastrum* Schreb.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.
- LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C. B. R.; FLORENTINO, A. T. N.; FERRAZ, J. S. F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil—a look at their conservation and sustainable use. *Environ Monit Assess* 125:281–290. doi:10.1007/s10661-006-9521-1, 2007.
- M38-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Vol. 22. N. 16
Disponível em: http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPAS1M38-A.pdf. 2002.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo, D&Z Computação Gráfica e Editora. 2004.
- MANN et al., 1998102- MARES, M. A.; WILLIG, M. R.; LACHER-JR., T. E. The Brazilian Caatinga in South American Zoogeography: Tropical Mammals in a Dry Region. *Journal of Biogeography*. 12: 1, 57-69, 1985.
- MARQUES, J. O Olhar (des)multiplicado. O papel do interdisciplinar e do qualitativo na pesquisa etnobiológica e etnológica. IN: AMOROSO, M.; MING, L. e SILVA, S.. (2002). **Métodos de Coleta e Análise de Dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas Correlatas**: Anais do I Seminário de Etnobiologia e Etnociências do Sudeste – UNESP, Rio Claro, SP. 2002.
- MEDEIROS, R.M.T., NOBRE, V.M.T., TABOSA, I.M; RIET-CORREA, F. Toxic plants for ruminants in the state of Paraíba, northeastern Brazil. *21 st World Buiatrics Uruguay*, 10141-10150, 2000.

MENEZES, A. M. S., RAO, V. L. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21, 531–533. 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica. p.60. Distrito Federal, 2006.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 173– 186, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; FLORENTINO, A. T. N.; OLIVEIRA, R. L. C. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2: 1-18. 2006.

MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M. **Resumos Embrapa - CPAO/Flora Sul**. Dourados – MS (Boletins Informativos). 9, 1997.

MORETÃO, .P., ZAMPRONIO, A. R., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acid icheteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *ImmunologyLetters*. 93,189–197, 2004.

MOURA, F. B. P: **Entre o peixe e o dendê: etnoecologia do povo dos Marimbús (Chapada Diamantina-BA)**. Dissertação de Doutorado Universidade Federal de São Carlos. 2002

MOURÃO, J. S.; ARAUJO, H. F. P.; ALMEIDA, F. S. Ethnotaxonomy of mastofauna as practised by hunters of the municipality of Paulista, state of Paraíba-Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2 :19, 7, 2006.

MOURE, A. [et al.], Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72:2, 145 – 171, 2001.

NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic. Boil. Med.* 19, 541-552, 1995.

NAZAREA, V. D. Introduction: A view from a point: Ethnoecology as situated knowledge. In: NAZAREA, V. D. (Ed.). **Ethnoecology: Situated knowledge/located lives**. Tucson, Arizona, EUA: The University of Arizona Press. 3-20, 1999.

NOBRE-JUNIOR, H. V., MAIA, F. D., OLIVEIRA, R. A., BANDEIRA, M. A. M., PESSOA, C., MORAES, M. O., CUNHA, G. M. A., VIANA, G. S. B. Neuroprotective actions of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants*. 13,41–57, 2008.

NOBRE-JUNIOR, H. V., OLIVEIRA, R. A., MAIA, F. D., NOGUEIRA, M. A. S., MORAES, M. O., BANDEIRA, M. A. M., ANDRADE, G. M., VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat Mesencephalic cells. *Journal Neurochemical Research*. 34, 1066–1075, 2009.

NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PASSAMONTI, S.; PRILLO, A.; VIOLI, F.; CATAPANO, A. L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 191:2, 265 – 271, 2007.

OLIVEIRA, L. S.; SANTANA, A. L. B. D.; MARANHÃO, C. A.; de MIRANDA, R. C. M.; GALVÃO DE LIMA, V. L. A.; da SILVA, S. I.; NASCIMENTO, M. S.; BIEBER, L. Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. doi:10.1016, 711-715, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO). Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997, Document CLT/DEC/PRO. Paris, p. 129. 1996.

PIERONI, A.; QUAVE, C., NEBEL, S., HEINRICH, M. Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbereshe) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia*. 73, 217–241, 2002.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE. 3-73, 2003.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, 26: 4, 485 - 492, 2002.

RAO, V. S.; MENEZES, A. M.; VIANA, G. S. Effect of myrcene on nociception in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 42:12, 877-878, 1990.

RIST, S.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Ethnoscience—A step towards the integration of scientific and indigenous forms of knowledge in the management of natural resources for the future. *Environ Dev Sustain*, v. 8, p. 467–493, 2006.

RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; FIGUEIREDO, M. A. **Manual sobre métodos de estudo florístico e fitossociológico – Ecossistema Caatinga**. 1. ed. Brasília, DF: Sociedade Botânica do Brasil. 24 p, 1992.

RODRIGUES, L. V.; FERREIRA, F. V.; REGADAS, F. S.; MATOS, D.; VIANA, G. S. Morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-do-Sertão). *Phytother. Res.* 16:267-72, 2002

ROSA, R. S.; MENEZES, N. A.; BRITSKI, H. A.; COSTA, W. J. E. M.; GROTH, F. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE, 135-181, 2003.

SÁ, R.A.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 4, 470-7, 2009.

SÁ, R.A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 149: 300-306. 2008.

SAMPAIO, E. V. S. B. **Overview of the Brazilian Caatinga**. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (Ed.). *Seasonally dry forests*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press. 35-58, 1995.

SANTOS, E. **Nossas madeiras**. Belo Horizonte: Itatiaia. 316, 1987.

SANTOS, J.P., ARAÚJO, E.L., ALBUQUERQUE, U.P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments*. 72:5, 652-663, 2008.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M. P. A. N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed science and technology*. 21-40, 2001.

SERRANO, J. [et al]. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*.53: 1 - 20, 2009.

SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE. 237-274, 2003a.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças

de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM. 221- 246, 2005.

SILVA, R. A.; MAURICIO, A.; SANTOS, M.; TABARELLI, M. Riqueza e diversidade de plantas lenhosas em cinco unidades de paisagem da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE, 337-366, 2003b

SOUZA *et al.* *Antifungal properties of Brazilian cerrado plants; Brazilian Journal of Microbiology*. 33, 247-249, 2002.

SOUZA, M. A.; LOPES, R. A.; BATISTA, A. G. U.; KASAI, A.; LOPES, P. E. V. P.; REGALO, S. C. H. ; SALA, M. A. ; PETENUSCI, S. O. . Hepatotoxicidade de plantas medicinais. L. Ação da infusão de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan no camundongo. *Investigação (Franca)*. 7, 7-13, 2007.

STURTEVANT, W.C. Studies in ethnoscience. **American Anthropologist**, v. 66, n.3, p. 99–131, 1964.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. BA, G. N.; MATHE, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*. 56, 200 – 207, 2002.

TEIXEIRA SA; MELO JIM. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, 61: 1-2, 5-11. 2006

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. ; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*. 137, 327-335, 2011.

VALDIR, F.V.Jr.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista brasileira de farmacognosia*. 18: 3 João Pessoa July/Sept. 2008.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006.

VIANA, G.S.B., BANDEIRA, M.A.M., MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine*, 10, 189–195, 2003.

VIANA, G.S.B., BANDEIRA, M.A.M., MOURA, L. C., SOUZA-FILHO, M. V. P., MATOS, F.J.A., RIBEIRO, R. A. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. *All. Phytother Res. 11*: 118-122, 1997.

WANG CHIN-KUN, LEE WEN-HSIU, PENG CHIN-HUI. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *J.Agric.FoodChem*, 45, 1185-1188, 1977.

WATT, J.M., BREYER-BRANDWIJK, M.G. **The Medicinal and Poisonous Plants of the Southern and Eastern Africa**. 2 ed. Edinburgh, Scotland: Livingstone, 1962.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da Caatinga: Biogeografia, Ecologia e Conservação. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE. 75-134, 2003.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Antidermatophytic activity of essential oils. *Formatex*. 1667 – 1178, 2011.