

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE**

CURITIBA
2013

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia do Rocio Duarte
Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Stuelp Campelo

CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

Título: ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE CAMPOMANESIA GUAZUMIFOLIA O. BERG, MYRTACEAE

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Prof^a. Dr^a. Márcia do Rocio Duarte
Orientadora

Prof. Dr. Paulo Vítor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 20 de fevereiro de 2013.

À minha família, que torna tudo possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Soeli e Thiophilo que, com amor, alegria, simplicidade, carinho e leveza, sempre me conduziram por um caminho mais belo e transformaram todos os meus sonhos em realidade.

Às minhas irmãs, Alice Maria e Ana Paula, e à minha afilhada Anna Carolina, por aliviar o peso das dificuldades da vida.

Ao meu marido, Marcelo, pelo apoio, incentivo, amor e pela compreensão e por me tornar cada dia mais feliz.

Agradeço à minha orientadora Márcia do Rocio Duarte não só pelos ensinamentos, orientação e aprendizado, mas também pelo incentivo, pela amizade e confiança.

Aos meus coorientadores Obdulio Gomes Miguel e Patrícia Maria Stuelp Campelo pelo grande auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelo companheirismo e pela amizade.

Ao biólogo Luiz Felipe Cavazzani e ao engenheiro florestal Jaime Luiz Cobalchini, funcionários do Horto Municipal da Barreirinha, pelas informações e pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Ao biólogo Osmar dos Santos Ribas, funcionário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, pelas informações, pelo auxílio na identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

À Erika Amano, professora do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda na preparação das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio no processamento do material para realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Ana Luísa Lacava Lordello, professora do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear.

À Escola de Saúde e Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela parceria para realização dos ensaios farmacológicos.

Aos estudantes Diogo, Rodrigo e Aleksandra, do curso de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo auxílio na realização dos experimentos farmacológicos.

Ao professor Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e à Rosimeire Takaki Rosa, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela parceria e colaboração nos ensaios microbiológicos.

Aos professores e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, principalmente dos Laboratórios de Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacotécnica da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e pelo auxílio prestados.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos colegas do curso de mestrado, em especial às amigas Thaís, Daniella, Luciane, Fernanda e Mariana, pelo companheirismo, pela paciência e ajuda na realização da pesquisa e pela grande amizade.

A todos os meus amigos que me acompanham nas jornadas de minha vida, sorrindo ou sofrendo, mas sempre ao meu lado.

“Amor omnia vincit”.

RESUMO

A espécie *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, conhecida comumente como sete-capotes, é uma Myrtaceae nativa do Brasil, que vem sendo empregada na medicina popular em distúrbios gastrointestinais e hepáticos. Este trabalho teve como objetivo estudar a morfoanatomia e a composição química de folha e caule dessa espécie, bem como avaliar as atividades biológicas, como contribuição ao seu conhecimento farmacognóstico e visando respaldar o uso popular. O material vegetal foi coletado, identificado e devidamente preparado para as respectivas análises. No estudo morfoanatômico, verificou-se que a folha possui estômatos paracíticos na face abaxial, tricomas tectores unicelulares, mesofilo dorsiventral, cavidades secretoras e nervura central com um único feixe vascular bicolateral em arco aberto e circundado por uma bainha esclerenquimática contínua. O caule, em secção transversal, apresenta epiderme persistente e felogênio originado na região mediana do córtex. Há colênquima angular, parênquima cortical e grupos de fibras. O cilindro vascular constitui-se de floema externo, xilema e floema interno, percorridos por raios estreitos. Idioblastos contendo drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio, além de compostos fenólicos estão presentes em folha e caule. Na prospecção fitoquímica foliar e caulinar foram observados glicosídeos flavônicos, iridoides, esteroides e/ou triterpenoides e saponinas. Adicionalmente, o extrato de folha revelou taninos, enquanto que o de caule exibiu leucoantocianidinas. O composto miricitrina foi identificado na fração acetato de etila proveniente de folha. Em relação à atividade antioxidante, a fração acetato de etila tanto de folha como de caule foi a mais efetiva na redução do radical DPPH e pelo método do fosfomolibdênio, porém pelo método TBARS, o extrato etanólico bruto e frações de caule exibiram maior inibição da peroxidação lipídica do que as amostras provenientes de folha. Na avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato etanólico bruto e as frações acetato de etila e hidroalcoólica de folha reduziram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sendo que a fração hidroalcoólica de folha também foi eficaz contra *Salmonella Typhimurium*. Para as amostras provenientes de caule, o extrato etanólico bruto reduziu o crescimento de *Candida albicans* e a fração acetato de etila apresentou-se eficiente contra *Staphylococcus epidermidis*. Em testes preliminares de toxicidade, os extratos e as frações de folha e caule não apresentaram atividade frente a *Artemia salina* e não demonstraram atividade hemolítica. Pelo ensaio de avaliação da motilidade gastrointestinal *in vivo*, constatou-se que o extrato etanólico bruto de folha reduziu o esvaziamento gástrico nas doses de 500, 100 e 20 mg/kg, e aumentou o trânsito intestinal na dose de 500 mg/kg. Com a avaliação da atividade protetora gástrica *in vivo*, verificou-se ação antiulcerogênica do extrato bruto de folha na dose de 100 mg/kg, que parece não estar relacionada à inibição de peroxidação lipídica na mucosa gástrica, avaliada pelo método TBARS. Os dados obtidos são relevantes e complementares ao estudo morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas dessa planta medicinal e potencial droga vegetal, e confirmam o uso terapêutico indicado pela medicina popular.

Palavras-chave: Atividade antiulcerogênica, farmacobotânica, farmacognosia, miricitrina, planta medicinal, sete-capotes.

ABSTRACT

The species *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, commonly known as sete-capotes in Portuguese, is a Brazilian native Myrtaceae, which has been used in folk medicine for gastrointestinal and liver disorders. This work has investigated the morpho-anatomy, chemical composition and biological activities of the leaf and stem of this medicinal plant, aiming to contribute to its pharmacognostical knowledge and to justify the popular use. The plant material was collected, identified and properly prepared for the respective analyses. Concerning the morpho-anatomical study, it was found that the leaf has paracytic stomata on the abaxial surface, unicellular non-glandular trichomes, dorsiventral mesophyll, secretory cavities and midrib with one bicollateral vascular bundle in open arc and encircled by a continuous sclerenchymatic sheath. The stem, in cross section, has remaining epidermis and phellogen originated in the medium region of the cortex. There are angular collenchyma, cortical parenchyma and groups of fibers. The vascular cylinder consists of external phloem, xylem and internal phloem traversed by narrow rays. Idioblasts containing druses and prismatic crystals of calcium oxalate, as well as phenolic compounds are present in the leaf and stem. In the phytochemical screening of both leaf and stem, it was observed flavone glycosides, iridoids, steroids and/or triterpenoids and saponins. Additionally, the leaf extract showed tannins, while the stem extract exhibited leucoanthocyanidins. The myricitrin compound was identified in the ethyl acetate fraction from the leaf. Regarding the antioxidant activity, the ethyl acetate fraction of both leaf and stem was the most effective in reducing DPPH radical and in the phosphomolybdenum method, however the stem crude ethanolic extract and fractions exhibited greater inhibition of lipid peroxidation than the leaf samples in TBARS assay. In the antimicrobial activity evaluation, the leaf crude ethanolic extract and the ethyl acetate and hydroalcoholic fractions reduced the growth of *Staphylococcus aureus*, besides the leaf hydroalcoholic fraction was also effective against *Salmonella Typhimurium*. For the stem samples, the crude ethanolic extract reduced the growth of *Candida albicans* and the ethyl acetate fraction appeared to be effective against *Staphylococcus epidermidis*. In preliminary toxicity tests, leaf and stem extracts and fractions showed no effect on *Artemia salina* and revealed no hemolytic activity. In the gastrointestinal motility assay *in vivo*, the leaf crude ethanolic extract decreased the gastric emptying at 500, 100 and 20 mg/kg doses, and increased intestinal transit at 500 mg/kg. With the protective gastric activity assessment *in vivo*, it was found antiulcer action of the leaf crude extract at 100 mg/kg, which seems to be not related to the inhibition of lipid peroxidation in the gastric mucosa, as assessed by the TBARS method. These results are relevant and complementary to the morpho-anatomy, phytochemistry and biological activities of this medicinal plant and potential vegetal drug, and corroborate the therapeutic use by folk medicine.

Keywords: Antiulcerogenic activity, medicinal plant, myricitrin, pharmacobotany, pharmacognosy, sete-capotes.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH	59
GRÁFICO 2	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH	59
GRÁFICO 3	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	60
GRÁFICO 4	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	60
GRÁFICO 5	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	61
GRÁFICO 6	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	61
GRÁFICO 7	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	62
GRÁFICO 8	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	62
GRÁFICO 9	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	63

GRÁFICO 10	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	63
GRÁFICO 11	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	64
GRÁFICO 12	- CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH	64
GRÁFICO 13	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE	65
GRÁFICO 14	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	67
GRÁFICO 15	- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELO MÉTODO TBARS	68
GRÁFICO 16	- AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA, METOCLOPRAMIDA E ATROPINA SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE SEMISSÓLIDOS	75
GRÁFICO 17	- AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA, NEOSTIGMINA E ATROPINA SOBRE O TRÂNSITO INTESTINAL	76

GRÁFICO 18	- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA GÁSTRICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA E OMEPRAZOL	78
GRÁFICO 19	- AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DO CONTROLE OMEPRAZOL SOBRE ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS TECIDOS GÁSTRICOS ORIUNDOS DO EXPERIMENTO DE ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS 1-4	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE: 1. ASPECTO DO HÁBITO; 2. DETALHE DO TRONCO DESCAMANTE; 3, 4. PORMENOR DE FLOR E FRUTOS, RESPECTIVAMENTE	26
ORGANOGRAMA 1	- ESQUEMA DOS ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS COM FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE	41
FIGURAS 5-7	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE: 5. RAMO REPRODUTIVO APICAL; 6. FOLHA - FACE ADAXIAL; 7. FOLHA - FACE ABAXIAL	42
FIGURAS 8-13	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, FOLHA EM VISTA FRONTAL: 8. FACE ADAXIAL DA EPIDERME; 9, 10. FACE ABAXIAL DA EPIDERME; 11. PORMENOR DE TRICOMA E ESTÔMATOS (MEV); 12. DETALHE DA CUTÍCULA RUGOSA DE TRICOMA (MEV); 13. ESTÔMATO COM CRISTA CUTICULAR EXTERNA (MEV)	43
FIGURAS 14-17	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, LIMBO DA FOLHA EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 14-16. REGIÃO INTERNERVURAL, MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL, FEIXE VASCULAR DE MÉDIO PORTE E CRISTAIS PRISMÁTICOS DE OXALATO DE CÁLCIO; 17. DETALHE DE ESTÔMATO	45
FIGURAS 18-23	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, NERVURA CENTRAL EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 18. ILUSTRAÇÃO DO CONTORNO PLANO-CONVEXO E DA PRESENÇA DE UM ÚNICO FEIXE VASCULAR BICOLATERAL; 19. PORMENOR DE PARTE DO FEIXE VASCULAR; 20, 21, 23. CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO; 22. DETALHE DE CAVIDADE SECRETORA COM CONTEÚDO LIPOFÍLICO EM REAÇÃO COM SUDAN	46

FIGURAS 24-27	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PECÍOLO EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 24. FEIXE VASCULAR BICOLATERAL EM ARCO FECHADO; 25, 26. CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO; 27. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR BICOLATERAL	47
FIGURAS 28-31	- <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 28, 29. ORGANIZAÇÃO PERIFÉRICA CAULINAR, COM DESTAQUE PARA SÚBER E SISTEMA VASCULAR; 30, 31. DETALHE DA PARTE CENTRAL CAULINAR, INDICANDO FLOEMA INTERNO E MEDULA	49
FIGURA 32	- ESTRUTURA QUÍMICA DA MIRICITRINA	54
FIGURA 33	- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H PARA O COMPOSTO ISOLADO MIRICITRINA (200 MHz, CD3OD)	55
FIGURA 34	- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C PARA O COMPOSTO ISOLADO MIRICITRINA (200 MHz, CD3OD)	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOGNÓSTICOS DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE	53
TABELA 2	- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C CORRESPONDENTES À MIRICITRINA	57
TABELA 3	- ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AMOSTRAS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, QUE EXIBIRAM REDUÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	70
TABELA 4	- AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, FRENTE A <i>Artemia salina</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>d</i>	- Dupleto
<i>dd</i>	- Duplo dupleto
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
<i>m</i>	- Múltiplo
<i>s</i>	- Simpleto
A	- Absorbância
AAR	- Atividade antioxidante relativa
ABAP	- Cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- <i>Brain heart infusion</i>
BHT	- 3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxitolueno
CBM	- Concentração bactericida mínima
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CD3OD	- Metanol deuterado
CIM	- Concentração inibitória mínima
DL ₅₀	- Dose letal para 50% dos animais
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
FAA	- Formaldeído/ácido acético/etanol
FB	- Farmacopeia Brasileira
Hz	- Hertz
IA	- Índice antioxidante
IC ₅₀	- Concentração da amostra capaz de reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade

MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MHz	- Mega-hertz
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBS	- Tampão fosfato-salino
ppm	- Parte por milhão
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
rpm	- Rotações por minuto
SC	- Subcutânea
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
VO	- Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVO GERAL	21
1.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	FAMÍLIA MYRTACEAE	22
2.2	GÊNERO <i>Campomanesia</i> RUIZ et PAV.	23
2.3	<i>Campomanesia guazumifolia</i> (CAMBESS.) O. BERG	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	MATERIAL BOTÂNICO	28
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	28
3.2.1	Lâminas semipermanentes	28
3.2.2	Lâminas permanentes	29
3.2.3	Testes microquímicos	29
3.2.4	Microscopia eletrônica de varredura	29
3.3	ESTUDO FITOQUÍMICO	30
3.3.1	Prospecção fitoquímica	30
3.3.2	Parâmetros farmacognósticos	32
3.3.3	Isolamento e identificação de compostos químicos	33
3.3.4	Avaliação da atividade antioxidante	34
3.4	ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	35
3.4.1	Avaliação da atividade antimicrobiana	35
3.4.2	Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	36
3.4.3	Análise da atividade hemolítica <i>in vitro</i>	36
3.4.3.1	Atividade hemolítica em placas	36
3.4.3.2	Atividade hemolítica em tubos	37
3.4.4	Avaliação da motilidade gastrointestinal <i>in vivo</i>	37
3.4.4.1	Animais	37
3.4.4.2	Método para a avaliação da motilidade gastrointestinal <i>in vivo</i>	38
3.4.4.3	Esvaziamento gástrico de semissólidos	38
3.4.4.4	Trânsito intestinal	39
3.4.5	Avaliação da atividade protetora gástrica <i>in vivo</i>	39
3.4.5.1	Animais	39

3.4.5.2	Lesão gástrica induzida por etanol	39
3.4.5.3	Determinação do índice de peroxidação lipídica em modelo de úlcera induzida por etanol	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	ESTUDO MORFOANATÔMICO	42
4.2	ESTUDO FITOQUÍMICO	52
4.2.1	Prospecção fitoquímica	52
4.2.2	Parâmetros farmacognósticos	53
4.2.3	Isolamento e identificação de composto químico	54
4.2.4	Avaliação da atividade antioxidante	58
4.2.4.1	Método do DPPH	58
4.2.4.2	Método do complexo fosfomolibdênio	66
4.2.4.3	Método TBARS	68
4.3	ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS	70
4.3.1	Avaliação da atividade antimicrobiana	70
4.3.2	Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	72
4.3.3	Análise da atividade hemolítica <i>in vitro</i>	73
4.3.3.1	Atividade hemolítica em placas	73
4.3.3.2	Atividade hemolítica em tubos	73
4.3.4	Avaliação da motilidade gastrointestinal <i>in vivo</i>	74
4.3.4.1	Esvaziamento gástrico de semissólidos	74
4.3.4.2	Trânsito intestinal	76
4.3.5	Avaliação da atividade protetora gástrica <i>in vivo</i>	77
4.3.5.1	Determinação do índice de peroxidação lipídica em modelo de úlcera induzida por etanol	79
5	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que a medicina tradicional, incluindo o uso de plantas medicinais, foi e continua sendo usada em todos os países ao redor do mundo. Em grande parte dos países em desenvolvimento, 70-95% da população depende desses medicamentos tradicionais como cuidado primário à saúde (ROBINSON; ZHANG, 2011).

Um estudo de revisão das edições da Farmacopeia Brasileira, publicadas em 1926, 1959, 1977 e 1988-2005, realizado por Brandão *et al.* (2006), relatou que plantas medicinais e produtos nativos do Brasil tiveram uma intensa substituição por produtos sintéticos e plantas estrangeiras. Essa análise mostrou como a biodiversidade de plantas nativas e seus produtos estariam sendo progressivamente excluídos da medicina oficial do Brasil ao longo dos anos. Entretanto, a atual tendência global de uma preocupação com a preservação da biodiversidade e as ideias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos ares ao estudo das plantas medicinais brasileiras, que acabaram reacendendo um interesse geral na fitoterapia (LORENZI; MATOS, 2008).

A validação de novas drogas vegetais por meio da pesquisa é, assim, o caminho para o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados à fitoterapia (LORENZI; MATOS, 2008). Talvez o principal fator a contribuir consideravelmente para o crescimento em questão consista na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam cada vez mais a eficácia das plantas empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas. Em nosso país, os trabalhos científicos envolvendo produtos naturais ativos, suas indicações e contraindicações podem proporcionar aos fitofármacos um maior nível de aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica em experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica), caracterização macro e microscópica da parte usada (botânica estrutural), isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica), investigação farmacológica de extratos e constituintes químicos isolados (farmacologia), transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética), estudo da relação estrutura/atividade e dos

mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente o desenvolvimento de formulações para a produção de fitoterápicos (farmacotécnica). A Farmacognosia é a ciência que trata da história, do tratamento, da conservação, da identificação, da avaliação e do emprego das drogas e se preocupa ainda com a seleção, cultura e colheita de plantas destinadas a produzir drogas. A integração dessas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA; AKISUE, 2009).

A família Myrtaceae é relevante no estudo de plantas medicinais, pois muitas de suas espécies são empregadas popularmente no tratamento de diversos processos patológicos, como em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas (BRACK; KINUPP; SOBRAL, 2007). Dentre as pesquisas com plantas do gênero *Campomanesia*, têm-se destacado os resultados obtidos a partir de extratos de folha de *C. xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, conhecida popularmente como gabirobeira, apresentando efeitos hipoglicemiantes (BIAVATTI *et al.*, 2004; VINAGRE *et al.*, 2010) e antiulcerogênico (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004) e a espécie *C. adamantium* (Cambess.) O. Berg, conhecida pelo nome de guavira, por ter alta atividade antioxidante (COUTINHO *et al.*, 2008; 2010). A espécie *C. guazumifolia* (Cambess.) O. Berg é popularmente denominada sete-capotes e utilizada na medicina popular no tratamento de diarreia e enfermidades hepáticas (BRANDÃO, 1991; DORIGONI *et al.*, 2001) e na cultura indígena como tônico (MARQUESINI, 1995), porém são raras as análises que relatam os constituintes químicos da planta e sua correlação com o uso medicinal.

Devido à importância da espécie e aos escassos estudos realizados até o presente, este trabalho tem como objetivo investigar *C. guazumifolia* sob diversos aspectos, com a finalidade de fornecer dados acerca da morfologia, da composição química e das atividades biológicas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae.

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfoanatomia (macro e microscopia);
- Realizar prospecção fitoquímica;
- Determinar parâmetros farmacognósticos: perda por dessecação, cinzas totais e resíduo dessecado;
- Isolar e identificar as substâncias químicas das frações de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica) obtidas do extrato etanólico bruto;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações; e
- Pesquisar as atividades biológicas do extrato etanólico bruto e das frações: ação antimicrobiana, toxicidade frente a *Artemia salina*, atividade hemolítica *in vitro*, avaliação da atividade sobre a motilidade gastrointestinal *in vivo* e avaliação da atividade protetora gástrica *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae Juss. pertence à ordem Myrtales e consiste de aproximadamente 150 gêneros e 3.600 espécies, preferencialmente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo (LEGRAND; KLEIN, 1978; CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1984; JOLY, 1985). No Brasil, as Myrtaceae aparecem entre as mais comuns na maioria das formações vegetais, com destaque para a Floresta Atlântica e para a restinga, sendo frequentemente a família com maior número de espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

Constitui-se de plantas lenhosas em forma de arbustos e árvores altas, com folhas simples, inteiras, opostas ou raramente alternas, sem estípulas. O limbo apresenta pontos glandulosos translúcidos, contendo óleo essencial, característicos para os diversos gêneros (LAWRENCE, 1977; LEGRAND; KLEIN, 1978; PEREIRA; AGAREZ, 1980). As flores são actinomorfas, hermafroditas, diclamídeas, raramente monoclamiídeas, tetra ou pentâmeras, polistêmones, com pétalas frequentemente caducas, ovários ínferos, raramente súperos, pentacarpelares, uni ou pentaloculares. Os frutos são do tipo baga, drupa, cápsula ou secos e indeiscentes (PEREIRA; AGAREZ, 1980; JOLY, 1985). As Myrtaceae brasileiras caracteristicamente possuem tronco de casca lisa, sendo o ritidoma descartado e renovado anualmente, em cada estação de crescimento (JOLY, 1985).

Muitos dos membros da família possuem grande interesse econômico. Com o uso da madeira destacam-se as espécies exóticas de *Eucalyptus* (LEGRAND; KLEIN, 1978), que também são empregadas como matéria-prima para a fabricação de produtos de limpeza e aromatizantes. O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et L.M. Perry), outra espécie cultivada, é uma especiaria amplamente utilizada na culinária brasileira (SOUZA; LORENZI, 2008). Existe ainda um grande número de espécies importantes por apresentar frutos comestíveis com teor vitamínico expressivo (LEGRAND; KLEIN, 1978), como goiabeira (*Psidium guajava* L.), jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg e outras espécies deste gênero), pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), cabeludinha (*Plinia glomerata* (O. Berg) Amshoff), cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), gabirobeira

(*Campomanesia* spp.), araçazeiro (*Psidium cattleianum* Afzel. ex Sabine) e cerejeira-nacional (*Eugenia cerasiflora* Miq.) (SOUZA; LORENZI, 2008). Tais frutos são consumidos *in natura*, utilizados na produção de geleias, doces, sucos, licores e aguardentes, em fermentações para obtenção de vinho ou ainda empregados como medicinais (LORENZI, 2002; FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004; DUARTE *et al.*, 2010).

As folhas e as cascas de muitos representantes são utilizadas na medicina popular como, por exemplo, da gabirobeira no combate a diarreia, câimbras, gripe e inflamações da bexiga e do útero; da pitangueira como excitante, febrífugo, antirreumático e antidisentérico; e da goiabeira contra diarreia, tosse, bronquite, doenças de pele e estomacais (KÖRBES, 1990; FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; LORENZI; MATOS, 2008), despertando a comunidade científica para a investigação dos compostos e das atividades biológicas. Ishikawa *et al.* (2008) demonstraram a atividade antiulcerogênica do cambucá (*Plinia edulis* (Vell.) Sobral), promovendo suporte científico ao uso tradicional dessa espécie.

Em um estudo recente de revisão bibliográfica, Stefanello, Pascoal e Salvador (2011) indicaram que relativamente poucas espécies americanas de Myrtaceae foram analisadas em relação à sua composição química e a maioria dos trabalhos têm sido limitados ao estudo dos componentes do óleo essencial de folha. Concluíram que tais óleos obtidos de plantas dessa família podem exibir atividades importantes como antimicrobiana, larvicida, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica.

2.2 GÊNERO *Campomanesia* RUIZ et PAV.

O gênero *Campomanesia* Ruiz et Pav. pertence à subfamília Myrtoideae, tribo Myrteae, subtribo Myrtinae, e muitas de suas espécies são relevantes por possuírem potencial comercial madeireiro, ornamental, no reflorestamento, nutritivo e medicinal (LEGRAND; KLEIN, 1977; KAWASAKI; LANDRUM, 1997; LANDRUM; KAWASAKI, 1997; LORENZI, 1998; 2002; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

A composição do óleo obtido de folha de algumas espécies já foi estudada. Em *C. sessiliflora* (O. Berg) Mattos os principais constituintes foram sesquiterpenos (CARDOSO; KATAOKA; RÉ-POPPI, 2010b); em *C. pubescens* (Mart. ex DC.)

O. Berg a maioria dos compostos isolados foram monoterpenos (SILVA; CARDOSO; RÉ-POPPI, 2009); *C. adamantium* (Cambess.) O. Berg apresentou como constituintes principais os monoterpenos durante seu estágio reprodutivo (floração) e os sesquiterpenos durante o estágio vegetativo (COUTINHO *et al.*, 2009); e em *C. aurea* O. Berg, *C. guazumifolia*, *C. rhombea* O. Berg e *C. xanthocarpa* os principais compostos presentes foram sesquiterpenos (LIMBERGER *et al.*, 2001). Os compostos voláteis provenientes de flor de *C. sessiliflora* e *C. xanthocarpa* foram identificados e também apresentaram sesquiterpenos como principais constituintes (CARDOSO; KATAOKA; RÉ-POPPI, 2010a).

Extratos de folha de *C. adamantium* demonstraram alta atividade antioxidante (COUTINHO *et al.*, 2008; 2010), que pode estar relacionada aos compostos fenólicos presentes na planta (COUTINHO *et al.*, 2008). O óleo essencial coletado durante os estágios de floração e frutificação exibiu alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, e efeito moderado em *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, enquanto que o óleo essencial do estágio vegetativo apresentou atividade muito fraca contra esses micro-organismos (COUTINHO *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Vallilo *et al.* (2006) a respeito da composição química de fruto dessa planta revelou alta quantidade de ácido ascórbico (vitamina C), além disso, a fração acetato de etila do extrato mostrou atividade promissora contra *Mycobacterium tuberculosis* (PAVAN *et al.*, 2009).

O ácido ascórbico também está presente em alta concentração em fruto de *C. pubescens*, cujo teor de cerca de 0,6% de vitamina C é considerável em comparação com outros frutos como goiaba, laranja e limão (SILVA *et al.*, 2009). Vinhos produzidos com o fruto dessa espécie foram analisados e exibiram muitos dos compostos presentes nos vinhos convencionais produzidos com uvas, indicando potencial para a produção de fermentados com características organolépticas aceitáveis (DUARTE *et al.*, 2010).

A análise fitoquímica de semente de *C. lineatifolia* Ruiz et Pav. revelou como principal constituinte as β -tricetonas (BONILLA *et al.*, 2005; OSORIO *et al.*, 2006), as quais são consideradas uma classe de metabólitos secundários relativamente rara e que mostraram leve atividade antimicrobiana (BONILLA *et al.*, 2005).

A avaliação da composição química de fruto de *C. xanthocarpa* demonstrou a presença de pectinas constituídas principalmente por ácido urônico, arabinose, galactose e ramnose (SANTOS *et al.*, 2010). Vallilo *et al.* (2008) mencionaram que a

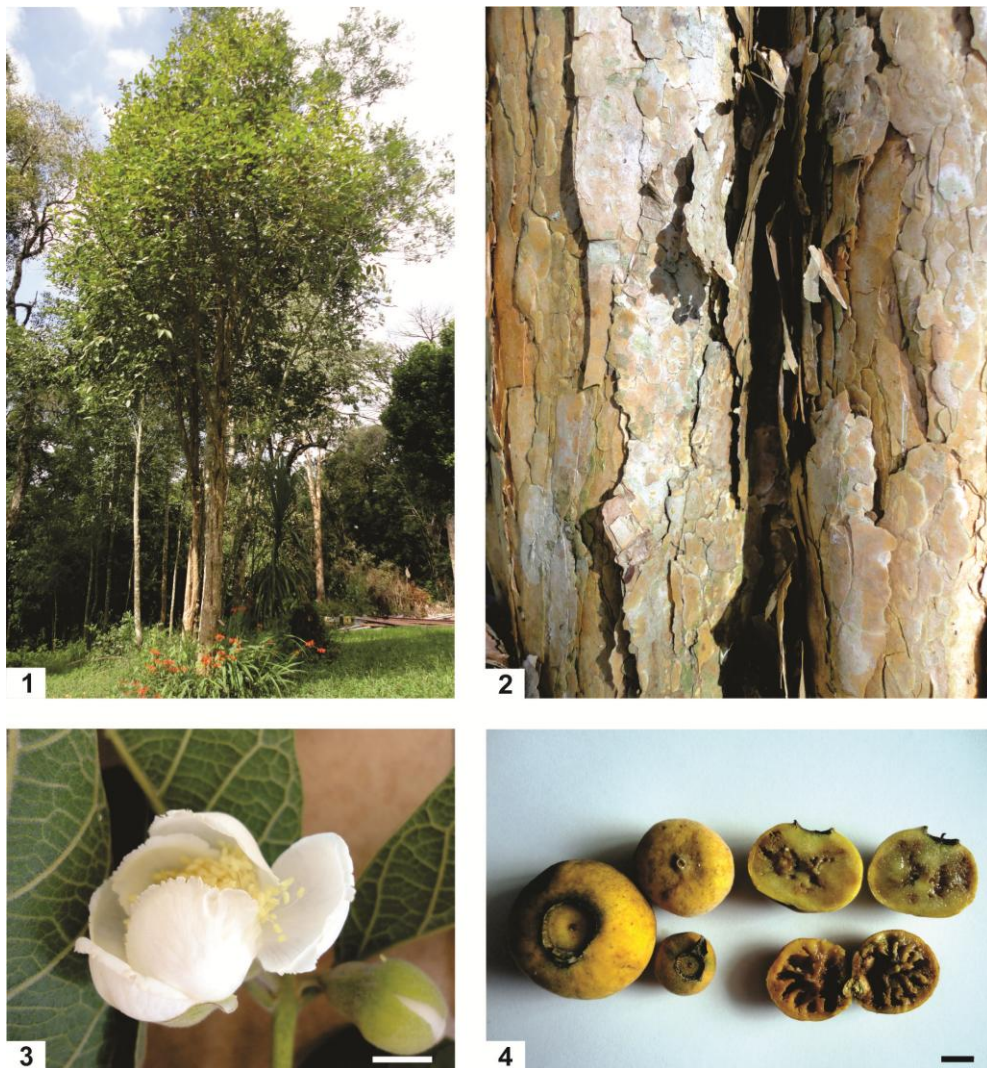
utilização desse fruto mostra-se promissora como complemento nutricional na dieta de vertebrados, devido ao seu teor de lipídios, carboidratos totais, fibra alimentar, vitamina C e minerais essenciais. Souza-Moreira *et al.* (2011) identificaram flavonoides, saponinas e taninos no fruto e o extrato etanólico foi avaliado quanto aos efeitos antidiarreico e antimicrobiano, porém, não houve resultado significativo na redução da motilidade intestinal. A atividade antimicrobiana foi detectada, mas os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) não puderam ser determinados por serem mais altos do que a concentração máxima testada do extrato do fruto para a maioria dos micro-organismos utilizados. Segundo análises realizadas com extratos de folha, *C. xanthocarpa* possui atividade antiulcerogênica (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004), hipoglicemiante (BIAVATTI *et al.*, 2004; VINAGRE *et al.*, 2010), na redução dos níveis sanguíneos de triglicerídios e LDL, e do estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos (KLAFKE *et al.*, 2010), confirmando seu uso popular com o propósito de emagrecimento (DICKEL; RATES; RITTER, 2007).

2.3 *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG

Campomanesia guazumifolia (Cambess.) O. Berg possui a seguinte sinonímia botânica: *Abbevillea rugosa* O. Berg, *Britoa guazumifolia* (Cambess.) D. Legrand, *B. sellowiana* O. Berg, *Campomanesia albiflora* Rojas Acosta, *C. guazumifolia* var. *grisea* (Cambess.) O. Berg, *C. guazumifolia* var. *rubiginosa* O. Berg, *C. itanarensis* Kiaersk., *Lacerdalea luschnathiana* O. Berg, *Psidium guazumifolia* Cambess., *P. guazumifolium* Cambess., *P. guazumifolium* var. *griseum* Cambess. (THE PLANT LIST, 2012).

A espécie *C. guazumifolia* é nativa do Brasil (SOBRAL *et al.*, 2012) e conhecida popularmente pelos nomes de sete-capotes, sete-capas, capoteira, setecasacas (LEGRAND; KLEIN, 1977), araçazeiro-grande e araçá-do-mato (LORENZI, 2002). É encontrada de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, em quase todas as formações vegetais (LORENZI, 2002), ocorrendo tanto no interior da mata pluvial da encosta atlântica e submata dos pinhais, como na mata latifoliada da bacia do Rio Uruguai, sem contudo ser frequente (LEGRAND; KLEIN, 1977).

Árvore de porte mediano, de 8-12 m de altura, com tronco de 20-30 cm de diâmetro, dotada de copa piramidal, possui casca densamente descamante e o tronco geralmente tortuoso, com ramos menores, pecíolos, face inferior das folhas, inflorescências e frutos pubescentes ou velutinos (FIGURAS 1-4). As folhas medem 6-14 cm de comprimento por 3-6 cm de largura, são simples e opostas, oblongas, oval-oblongas até ovais, sendo o contorno elíptico até ovado-oblongo a forma mais comum no sul do Brasil, com nervuras secundárias e terciárias bem evidentes. Possui flores brancas e grandes, geralmente solitárias ou reunidas em pequenos grupos nas axilas foliares. Os frutos são do tipo baga, subglobosos e possuem cerca de 2 cm de diâmetro (LEGRAND; KLEIN, 1977; LORENZI, 2002).



FIGURAS 1-4 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE: 1. ASPECTO DO HÁBITO; 2. DETALHE DO TRONCO DESCAMANTE; 3, 4. PORMENOR DE FLOR E FRUTOS, RESPECTIVAMENTE. BARRA = 1 cm (3,4). FONTE: A autora (2012)

É uma planta decídua, mesófila quanto à exigência de luz e higrófila quanto ao solo. Ocorre em baixa densidade e de maneira isolada. Floresce durante os meses de outubro, novembro e dezembro, e a maturação dos frutos é verificada nos meses de março, abril e maio (LEGRAND; KLEIN, 1977; LORENZI, 2002).

A madeira é empregada em carpintaria e para a obtenção de lenha e carvão (LEGRAND; KLEIN, 1977; LORENZI, 2002; BOTREL *et al.*, 2006). Os frutos são comestíveis, geralmente apreciados *in natura* e na forma de doces caseiros. São também avidamente consumidos por várias espécies de pássaros, por essa razão constituindo-se em uma planta indispensável nos reflorestamentos heterogêneos visando áreas degradadas (LEGRAND; KLEIN, 1977; LORENZI, 2002; FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004; BRACK; KINUPP; SOBRAL, 2007). A árvore também é conhecida pelo seu potencial ornamental e medicinal (SANQUETTA *et al.*, 2010), sendo as partes aéreas empregadas em enfermidades hepáticas (DORIGONI *et al.*, 2001), no tratamento de diarreia (BRANDÃO, 1991) e como tônico (MARQUESINI, 1995).

Estudos referentes à constituição química do óleo essencial de folha de *C. guazumifolia* mostram que este é rico em sesquiterpenos, entre eles destacam-se (E)-nerolidol (28,8%) e espatulenol (27,7%) (LIMBERGER *et al.*, 2001), entretanto são poucos os trabalhos relativos às propriedades farmacológicas dessa espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados ramos foliares de *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg no Horto Municipal da Barreirinha, localizado em Curitiba/PR (aproximadamente nas coordenadas de 25° 21' S e 49° 15' W, altitude de 950 m), no período de junho a agosto de 2011. A planta foi identificada e um exemplar depositado no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba/PR sob o registro MBM 372274.

O material coletado foi devidamente preparado para a realização dos estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas, os quais estão sumarizados no ORGANOGRAMA 1.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O estudo morfoanatômico foi realizado com folhas desenvolvidas, obtidas a partir do quarto nó caulinar, e com caules jovens, obtidos entre 5-30 cm do ápice caulinar. As dimensões foliares foram estabelecidas medindo-se pelo menos 20 folhas e expressas como amplitude. Para a determinação da morfologia externa foliar foi adotada a classificação de Hickey (1974). O material foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e posteriormente estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

3.2.1 Lâminas semipermanentes

Foram feitos cortes transversais e longitudinais, incluindo-se paradérmicos, à mão livre, do material vegetativo fixado. Para as folhas, foram analisados o pecíolo e o terço inferior do limbo. A coloração foi feita com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972) e verde malaquita (KRAUS; ARDUIN, 1997). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina a 50% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor (BEÇAK; PAULETE, 1976).

3.2.2 Lâminas permanentes

As lâminas permanentes foram confeccionadas a partir do material fixado, desidratado em série etanólica crescente e emblocado em glicol-metacrilato. Os cortes obtidos em micrótomo de rotação foram corados com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). As lâminas foram montadas com Entellan[®] (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias em microscópio fotônico.

3.2.3 Testes microquímicos

Para a realização dos testes microquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado, utilizando-se os seguintes reativos: floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Wagner para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981), Sudan III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e ácido sulfúrico para cristais de cálcio (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura - MEV) (SOUZA, 1998) foi realizada em lâmina foliar de amostras fixadas e desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico de CO₂. Estas foram aderidas a suporte, metalizadas com ouro, submetidas a alto vácuo e observadas em microscópio eletrônico de varredura.

3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

Folhas e caules foram secos à temperatura ambiente por sete dias e posteriormente triturados, em um moinho de facas e martelos, para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração (SONAGLIO *et al.*, 2010).

Os procedimentos realizados referem-se a prospecção fitoquímica, determinação de parâmetros farmacognósticos (perda por dessecação, cinzas totais e resíduo dessecado), isolamento e identificação de compostos químicos, bem como à determinação da atividade antioxidante.

3.3.1 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com Moreira (1979), adaptado por Miguel (2003), com extratos obtidos pelo método de maceração, preparando-se extratos hidroalcoólico a 20% (m/v) e aquoso a 20% (m/v), separadamente de folha e caule.

O extrato hidroalcoólico a 20% (m/v) foi feito com o material vegetal triturado, macerado em álcool etílico a 70% (v/v) em banho-maria a 60 °C por 1 h e filtrado, mantendo-se posteriormente o extrato sob refrigeração. Foi feito o fracionamento deste por meio de gradiente de polaridade, a partir do qual foram obtidas as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica. Nessas frações pesquisaram-se alcaloides, leucoantocianidinas, glicosídeos flavônicos, cumarinas, iridoides, antraquinonas e esteroides e/ou triterpenoides.

O extrato aquoso a 20% (m/v) foi preparado com o material vegetal triturado colocado em contato com água destilada em banho-maria a 60 °C por 1 h. O macerado foi filtrado e mantido sob refrigeração. Nesse extrato foi pesquisada a presença de glicosídeos antocianicos e cianogênicos, saponinas, taninos (hidrolisáveis e condensados) e ácidos fixos. Para a investigação de ácidos voláteis, utilizou-se extrato aquoso a 20% (m/v), obtido por meio de maceração sob refrigeração por cerca de 72 h. As técnicas empregadas foram as seguintes:

- Pesquisa de alcaloides

Foram utilizados os reativos Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), Bouchardat (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico) para detectar a presença de alcaloides por meio de turvação a precipitação.

- Pesquisa de leucoantocianidinas

As frações provenientes do extrato hidroalcoólico foram levadas à secura e aquecidas à ebulição com ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração vermelha representa reação positiva para leucoantocianidinas.

- Pesquisa de glicosídeos flavônicos

A pesquisa de glicosídeos flavônicos foi realizada por meio das reações de Shinoda, Taubock e Pacheco, as quais indicam a presença de flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis e derivados antociânicos pela formação de diferentes colorações.

- Pesquisa de cumarinas

O material foi depositado em papel de filtro e alcalinizado e a formação de fluorescência azul ou verde-amarelada sob luz ultravioleta é indicativa de cumarinas.

- Pesquisa de iridoides

A pesquisa de iridoides foi realizada por reação com floroglucinol, ácido sulfúrico concentrado e vanilina.

- Pesquisa de antraquinonas

Realizou-se a reação de Bornträger, em que antraquinonas livres em meio básico são evidenciadas pela coloração vermelha.

- Pesquisa de esteroides e/ou triterpenoides

Foi efetuada a reação de Liebermann-Burchard para a detecção de esteroides e/ou triterpenoides e, diante da positividade desta, a reação de Keller-Kiliani para desoxiaçúcares.

- Pesquisa de glicosídeos antociânicos

Alíquotas do extrato foram ajustadas a pH neutro, ácido e alcalino e a presença de glicosídeos antociânicos é detectada pela mudança de coloração.

- Pesquisa de glicosídeos cianogênicos

Após acidificação e aquecimento do extrato, a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos é responsável pela formação de ácido cianídrico, o qual é revelado pela cor vermelha em contato com papel picro-sódico.

- Pesquisa de saponinas

Agitando-se energicamente o extrato aquoso, a formação de espuma persistente indica a presença de saponinas.

- Pesquisa de taninos

A pesquisa de taninos (hidrolisáveis e condensados) foi efetuada com cloreto férrico, e no caso de reação positiva ocorre desenvolvimento de coloração azul ou verde.

- Pesquisa de ácidos fixos

O desenvolvimento de coloração alaranjada após adição de reagente de Nessler determina reação positiva para ácidos fixos.

- Pesquisa de ácidos voláteis

O extrato acidificado foi levado ao banho-maria a 60 °C e o desenvolvimento de coloração vermelha em papel indicador revela a presença de ácidos voláteis.

3.3.2 Parâmetros farmacognósticos

Como parâmetros farmacognósticos foram determinados perda por dessecação, cinzas totais e resíduo dessecado, sendo os ensaios realizados em triplicata (FB 5, 2010).

A determinação da perda por dessecação, para quantificar o teor de água e substâncias voláteis presentes no vegetal seco e triturado, foi conduzida pelo método gravimétrico a 100 °C até peso constante. O resultado foi calculado em porcentagem de água e substâncias voláteis em relação ao material vegetal original.

O método gravimétrico também foi empregado para a determinação do teor de cinzas totais, conduzido em mufla a 600 °C por 6 h. O resultado foi calculado em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original.

Para a análise do resíduo dessecado foi utilizado o extrato etanólico bruto, obtido conforme descrito a seguir, e o teor foi estabelecido pela diferença de peso da alíquota antes e após a evaporação em estufa a 100 °C, até peso constante.

- Extrato etanólico bruto

A preparação do extrato etanólico bruto foi feita separadamente de folha e caule, com etanol a 96 °GL, em refluxo contínuo por 6 h, a 50 °C, em aparelho de Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001).

3.3.3 Isolamento e identificação de compostos químicos

Para o isolamento e identificação de compostos químicos, foram utilizadas as frações obtidas do extrato etanólico bruto de folha e caule, em aparelho de Soxhlet modificado, pelo método de partição líquido-líquido que ocorreu em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila), sendo a fração remanescente a hidroalcoólica (CARVALHO, 2001). As frações foram submetidas a métodos de separação por cromatografia em coluna e a análises por cromatografia em camada delgada e ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C).

O extrato etanólico bruto e as frações foram levados à secura em rotaevaporador e banho-maria a 60 °C para o armazenamento e foram utilizados para realizar os testes das atividades antioxidante e biológicas.

3.3.4 Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações, foram utilizados os métodos do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR, 2001), do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999) e das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (MORAIS *et al.*, 2006).

Para o método do DPPH, o extrato etanólico bruto e as frações foram ressuspensos em etanol. Vitamina C (Merck®) e rutina (Merck®) foram utilizados como padrões. A porcentagem da atividade antioxidante das amostras testadas foi obtida com os valores de absorbância (A) em espectrofotômetro a 518 nm por meio da fórmula: % inibição DPPH = $100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / A_{\text{controle}}]$.

Por regressão linear foi determinada a concentração inibitória média (IC₅₀), que corresponde às médias de três repetições ± desvio padrão. Para verificar a diferença estatística entre as amostras foi aplicado o teste estatístico ANOVA e para a localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR, 2001).

No método de formação do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), as amostras foram ressuspensas em metanol a uma concentração de 200 µg/mL. Foram utilizados como padrões vitamina C (Merck®) e rutina (Merck®). Após adição da solução reagente do complexo fosfomolibdênio, realizaram-se as leituras de absorbância (A) em espectrofotômetro a 695 nm. Para a determinação da atividade antioxidante relativa à vitamina C em porcentagem (AAR%) foi utilizada a fórmula: $AAR\% = (A_{\text{amostra}} / A_{\text{vitamina C}}) \times 100$.

A atividade antioxidante da rutina foi calculada dividindo-se o seu valor de absorbância pelo valor de absorbância da atividade padrão da vitamina C, utilizando a fórmula anterior.

O método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizado segundo Morais *et al.* (2006) com modificações. Ao extrato etanólico bruto e às frações, solubilizados em etanol (70 µg/mL), foram adicionados água, gema de ovo a 5% (m/v) em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,55% (m/v), cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano (ABAP) 0,035 M, ácido acético a 20% (v/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,4% (m/v) em SDS a 0,55% (m/v). As amostras foram aquecidas em banho-maria a 95 °C por 1 h. Após resfriamento foi adicionado

1-butanol, os tubos foram centrifugados e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância (A) do sobrenadante em espectrofotômetro a 532 nm. Como branco foi utilizado o 1-butanol, como controle negativo foi utilizada a mesma solução, onde a amostra foi substituída por metanol, e como padrão positivo foi utilizado 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroxitolueno (BHT, Merck®). O teste foi realizado em quintuplicata. Obteve-se o índice antioxidante das amostras testadas em porcentagem (IA%) por meio da fórmula: $IA\% = [1 - (A_{amostra} / A_{controle\ negativo})] \times 100$.

3.4 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, o teste de toxicidade frente a *Artemia salina* e as análises de atividade hemolítica foram conduzidos com o extrato etanólico bruto e frações, obtidos separadamente de folha e caule, enquanto que para a avaliação da motilidade gastrointestinal e da atividade protetora gástrica *in vivo* foi utilizado apenas o extrato etanólico bruto de folha. O extrato bruto e as frações foram preparados como descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

3.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANVISA, 2003) adaptado. Foram inoculadas bactérias em caldo BHI (*brain heart infusion*), sendo a concentração de microorganismos ajustada em comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para padronização dos inóculos de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *S. epidermidis* ATCC® 12228, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027 e *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028. A mesma metodologia foi utilizada com o fungo *Candida albicans* SC5314, substituindo-se o meio de cultura por caldo Sabouraud.

Microplacas contendo os inóculos em contato com o extrato etanólico bruto e as frações de folha e caule, nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C e o crescimento microbiano foi observado a olho nu após 24 e 48 h de incubação. A presença de

turbidez nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório do extrato etanólico bruto ou das frações. O conteúdo do poço onde a mínima concentração da amostra inibiu o crescimento microbiano foi transferido para uma placa de Petri contendo ágar BHI ou Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 h. A detecção de presença microbiana na placa indica que a amostra possui capacidade de inibição do crescimento, enquanto que ausência microbiana indica que a amostra possui capacidade de provocar a morte celular dos micro-organismos.

3.4.2 Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

O teste foi realizado em triplicata com o extrato etanólico bruto e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, separadamente de folha e caule, diluídos nas concentrações de 1000, 100 e 10 ppm. O controle positivo foi feito com sulfato de quinidina (Merck®) e o negativo com etanol. Após a eclosão dos ovos de *Artemia salina*, 30 náuplios foram colocados em contato com cada uma das diluições do extrato etanólico bruto e das frações por 24 h (MEYER, 1982). Os dados de contagem de náuplios vivos e mortos foram analisados pelo método estatístico Probit, sendo determinados a dose letal média (DL₅₀) e o intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas com atividade tóxica quando a DL₅₀ foi menor que 1000 ppm (FINNEY, 1956; MEYER, 1982).

3.4.3 Análise da atividade hemolítica *in vitro*

3.4.3.1 Atividade hemolítica em placas

A avaliação da atividade hemolítica em placas pela difusão em ágar sangue foi realizada conforme Flach, Karnopp e Corção (2005) com modificações.

O extrato etanólico bruto e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica, separadamente de folha e caule, foram ressuspensos em etanol na concentração de 50 mg/mL. Discos de papel estéreis foram impregnados com 20 µL de cada solução e foram secos para a evaporação do solvente. Os discos

preparados foram posicionados em placas de ágar sangue comerciais, as quais permaneceram em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período foi observada a formação de halos de hemólise. Saponina (Merck®) foi utilizada como controle e discos impregnados com o solvente utilizado também foram submetidos ao teste para descartar a influência deste.

3.4.3.2 Atividade hemolítica em tubos

O teste de atividade hemolítica em tubos foi realizado conforme metodologia descrita na FB 5 (2010) em triplicata.

Ao extrato etanólico bruto e às frações de folha e caule, nas concentrações de 1000, 500, e 200 µg/mL em tampão salina-fosfato (PBS), alternativamente adicionado de dimetilsulfóxido (DMSO), foi acrescentado 1 mL de sangue de carneiro comercial lavado. Após leve agitação e centrifugação observa-se a ocorrência de hemólise, caracterizada pela coloração avermelhada do líquido sobrenadante em cada tubo. Como controle foi utilizada saponina (Merck®).

3.4.4 Avaliação da motilidade gastrointestinal *in vivo*

3.4.4.1 Animais

Os testes foram realizados com camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com acesso livre à água e ração.

Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e receberam registro de aprovação CEUA/PUCPR nº 674.

3.4.4.2 Método para a avaliação da motilidade gastrointestinal *in vivo*

A avaliação da motilidade gastrointestinal *in vivo* consistiu na administração oral de um marcador colorido semissólido (vermelho de fenol em carboximetilcelulose) a camundongos (8 animais por grupo) em jejum de 12 h, que foram tratados de acordo com os seguintes grupos: atropina subcutânea (3 mg/kg), solução salina (veículo), e as doses do extrato etanólico bruto de folha (500, 100 e 20 mg/kg) por via oral, além de um grupo controle tempo zero que foi eutanasiado logo após a administração do marcador colorido. Após 1 h dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido e após 15 min os animais foram eutanasiados por injeção intracardíaca de quetamina em associação com xilazina.

Pela quantificação do marcador que permanece no estômago durante um período de tempo determinou-se o perfil do esvaziamento gástrico de semissólidos e pela observação do trajeto do mesmo no intestino delgado durante um período de tempo foi possível avaliar o trânsito intestinal, conforme metodologias descritas a seguir. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão, a análise de variância foi feita pelo método ANOVA e os grupos foram comparados utilizando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) (STICKNEY; NORTHUP, 1959; SCARPIGNATO; CAPOVILLA; BERTACCINI, 1980).

3.4.4.3 Esvaziamento gástrico de semissólidos

A avaliação do esvaziamento gástrico foi realizada conforme metodologia de Scarpignato, Capovilla e Bertaccini (1980) com adaptações, com os grupos citados anteriormente, além de um grupo controle tratado com metoclopramida (30 mg/kg) por via oral.

Após realização dos procedimentos descritos, a cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago retirado com seu conteúdo, aberto, raspado e lavado com água destilada. O material estomacal foi centrifugado e ao sobrenadante adicionou-se hidróxido de sódio 1 N (NaOH). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560 nm, e expressos em quantidade de marcador colorido por mililitro de conteúdo gástrico.

3.4.4.4 Trânsito intestinal

A avaliação do trânsito intestinal foi realizada conforme metodologia de Stickney e Northup (1959). O teste foi realizado com os grupos mencionados além de um grupo controle tratado com neostigmina (20 µg/kg) subcutânea.

Após os procedimentos descritos, o intestino delgado foi removido e estendido. Com auxílio de uma régua, determinou-se o comprimento total do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador. Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

3.4.5 Avaliação da atividade protetora gástrica *in vivo*

3.4.5.1 Animais

Os testes foram realizados com ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) adultos, fêmeas, pesando entre 150-200 g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com acesso livre à água e ração.

Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e receberam registro de aprovação CEUA/PUCPR nº 674.

3.4.5.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol

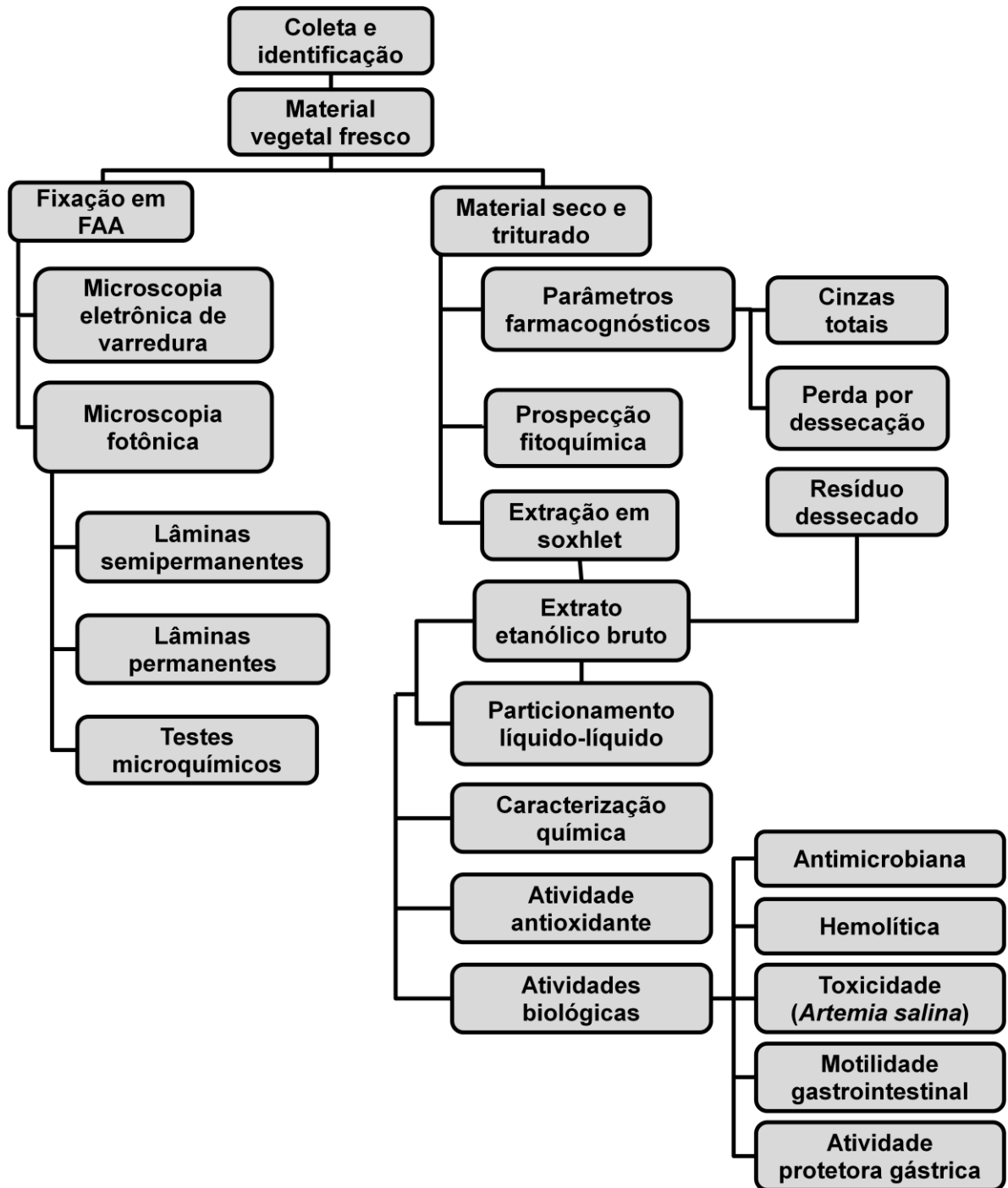
No modelo de lesão gástrica induzida por etanol (ROBERT *et al.*, 1979), ratas (8 animais por grupo) foram tratadas com: solução salina (veículo), omeprazol (40 mg/kg), e com o extrato etanólico bruto de folha nas doses de 500, 100 e 20 mg/kg por via oral, 1 h antes da administração oral de etanol absoluto (0,5 mL). Os animais foram eutanasiados, por injeção intracardíaca de quetamina e xilazina, 1 h após a

indução da lesão por etanol. Os estômagos foram removidos e a extensão da lesão gástrica hemorrágica foi mensurada com auxílio do programa Image-Pro Plus. As análises estatísticas foram feitas pelo método ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4.5.3 Determinação do índice de peroxidação lipídica em modelo de úlcera induzida por etanol

O índice de peroxidação lipídica nos estômagos submetidos à indução de úlcera por etanol foi determinada pela quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), presentes no tecido lesionado. O teste visou avaliar se a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto de folha foi determinante para a atividade protetora gástrica observada, reduzindo os danos teciduais pela prevenção da peroxidação lipídica induzida por etanol.

Os estômagos foram triturados individualmente e a 1500 μ L do homogenato foram acrescentados: 500 μ L de cloreto de potássio (0,15 M), 0,2 mL de SDS (8,1% m/v); 1,5 mL de ácido acético (20% v/v, pH 3,5) e 1,5 mL de TBA (0,8% m/v). As amostras foram mantidas em banho-maria, a 95 °C, por 1 h e após resfriamento, foram acrescentados 2 mL de 1-butanol. O material foi agitado e centrifugado a 9700 rpm, por 10 min. A absorbância da camada orgânica foi obtida a 532 nm. Como controle foi utilizado BHT. Os resultados foram expressos em relação à quantidade de proteínas presente na amostra e expressos em porcentagem de TBARS por μ g de proteína (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979, modificado). As análises estatísticas foram feitas pelo método ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

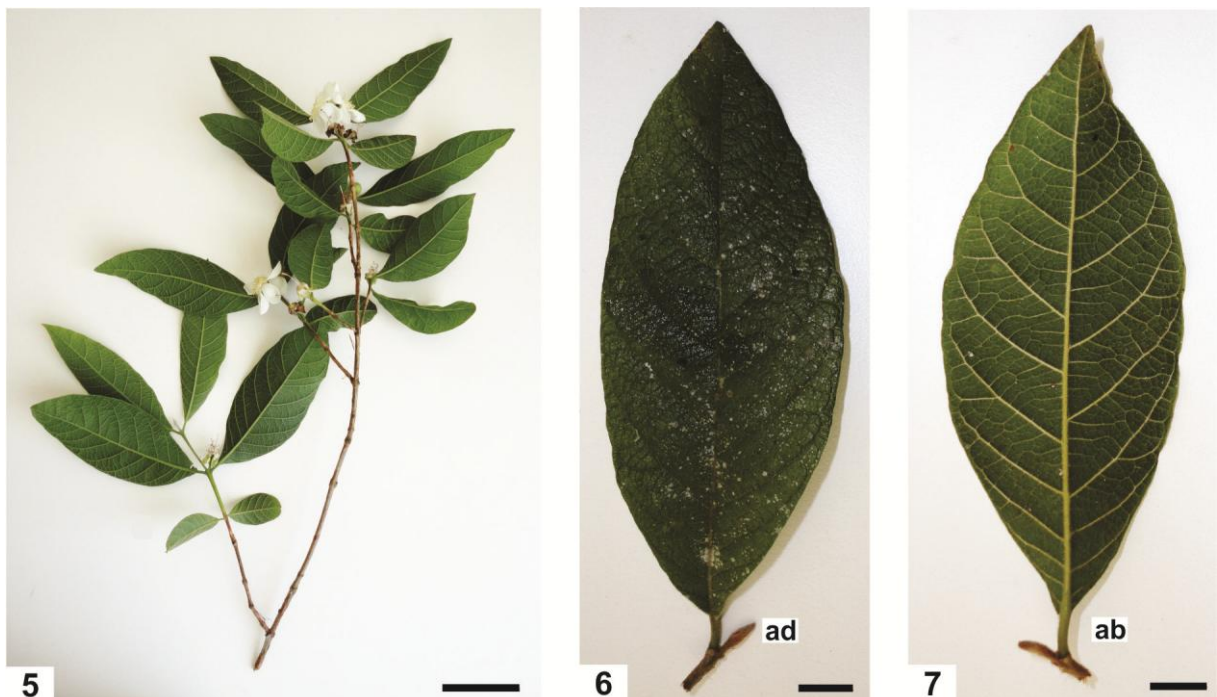


ORGANOGRAMA 1 - ESQUEMA DOS ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS COM FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

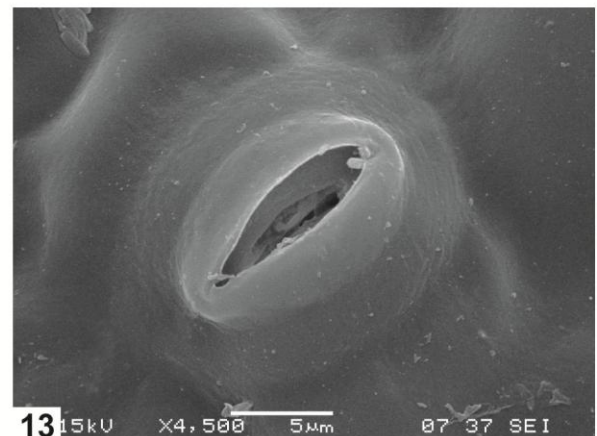
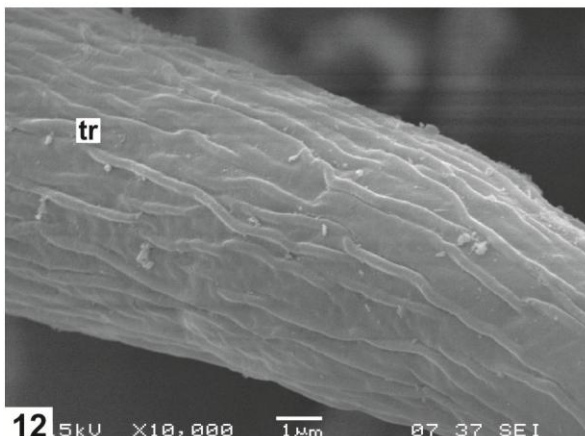
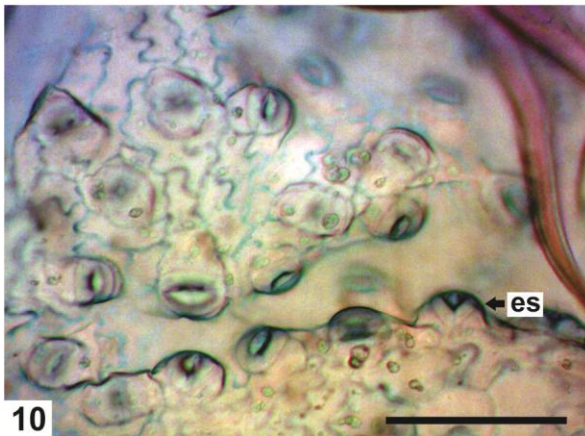
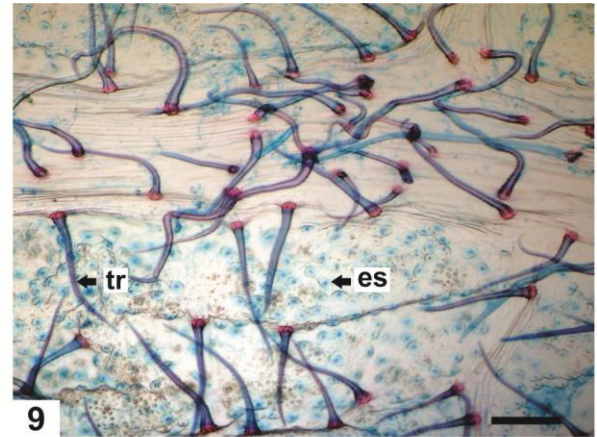
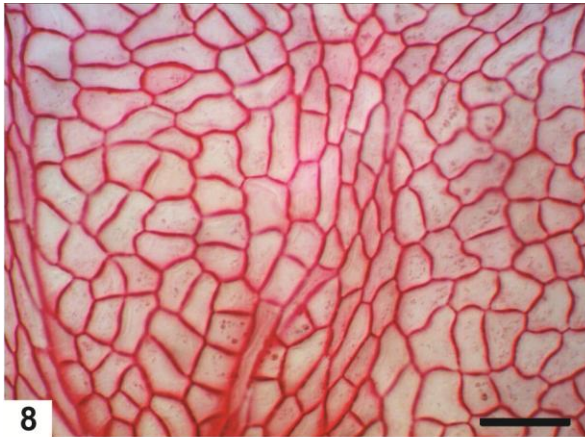
As folhas de *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae, apresentam filotaxia oposta e coloração verde-escuro, medindo 5-12 cm de comprimento por 2-4 cm de largura. São simples, simétricas, oblongas a ovadas, possuem ápice e base agudos, margem inteira e textura subcoriácea. Os pecíolos são normais, ou seja, sem engrossamentos ou bordas, e curtos com 0,3-0,8 cm de comprimento. A nervação é reticulada do tipo camptódromo-broquidódromo, em que as nervuras secundárias não terminam nas margens, algumas formando arcos com as terminações das nervuras vizinhas (FIGURAS 5-7).



FIGURAS 5-7 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE: 5. RAMO REPRODUTIVO APICAL; 6. FOLHA - FACE ADAXIAL (ad); 7. FOLHA - FACE ABAXIAL (ab). BARRA = 5 cm (5), 1 cm (6, 7)

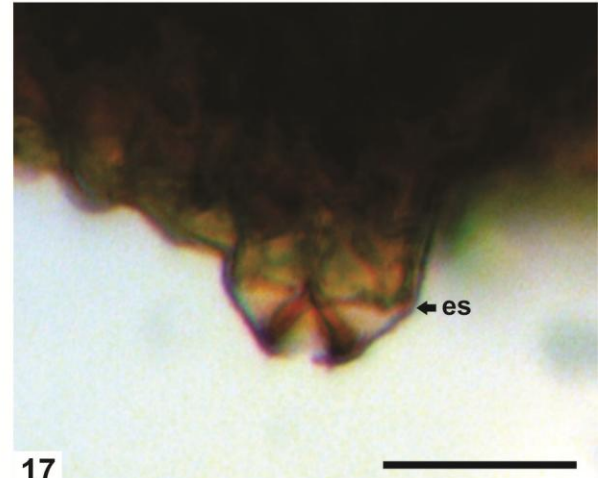
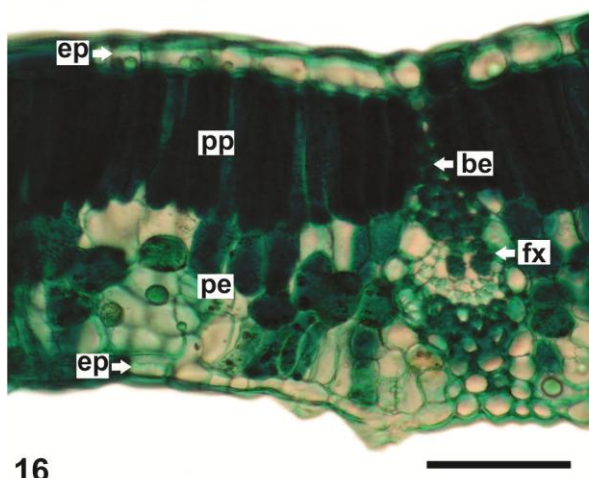
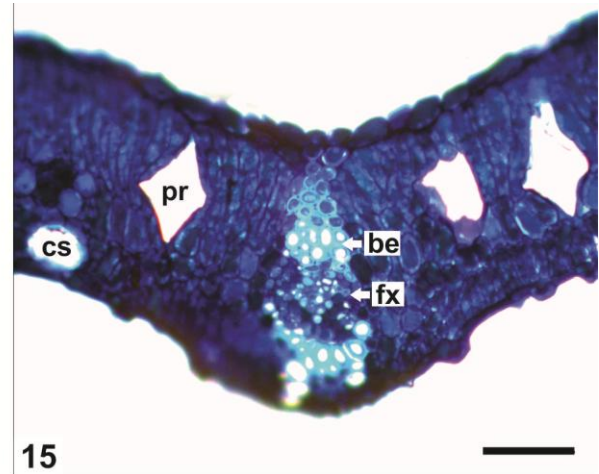
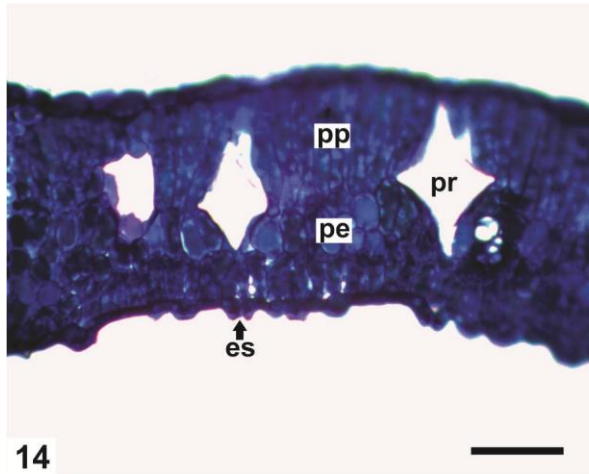
Em vista frontal, a epiderme foliar é revestida com uma cutícula lisa (FIGURA 11), as células epidérmicas são levemente onduladas na face adaxial (FIGURA 8) e sinuosas na superfície abaxial (FIGURA 10). Tricomas tectores unicelulares (FIGURAS 9, 11) com cutícula estriada (FIGURA 12), paredes espessadas e ápice agudo são encontrados principalmente na face abaxial, onde estão inseridos

preferencialmente sobre as nervuras (FIGURA 9). A folha é hipoestomática (FIGURAS 8, 10), os estômatos são paracíticos e possuem uma crista cuticular externa nítida (FIGURAS 13, 17).



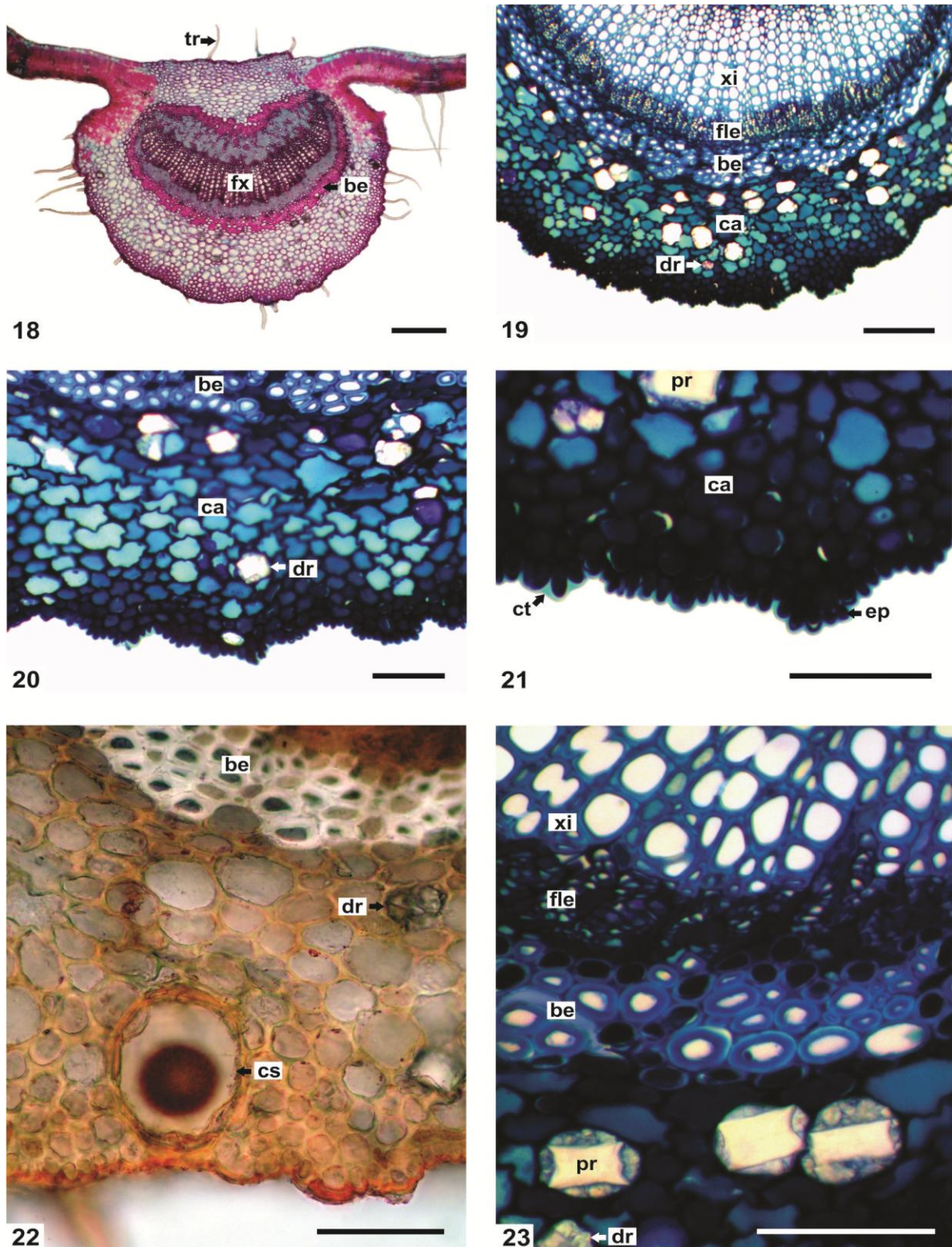
FIGURAS 8-13 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, FOLHA EM VISTA FRONTAL: 8. FACE ADAXIAL DA EPIDERME; 9, 10. FACE ABAXIAL DA EPIDERME; 11. PORMENOR DE TRICOMA E ESTÔMATOS (MEV); 12. DETALHE DA CUTÍCULA RUGOSA DE TRICOMA (MEV); 13. ESTÔMATO COM CRISTA CUTICULAR EXTERNA (MEV). ABREVIATURAS: ab- FACE ABAXIAL, ad- FACE ADAXIAL, es- ESTÔMATO, tr- TRICOMA. BARRA = 50 µm (8, 10), 100 µm (9)

Em secção transversal da região internervural, a epiderme é uniestratificada (FIGURAS 14-16), com células alongadas periclinalmente e aquelas da face adaxial possuem as paredes anticlinais comparativamente maiores que as da face abaxial (FIGURA 16). Os estômatos se inserem levemente acima das células circunvizinhas (FIGURAS 14, 15, 17). O mesofilo é dorsiventral (heterogêneo assimétrico), consistindo de um estrato de parênquima paliçádico, que compreende 50% do clorênquima, e cerca de três camadas de parênquima esponjoso (FIGURAS 14-16). Estão presentes feixes vasculares colaterais de médio porte com bainha esclerenquimática transcurrente (FIGURA 15), feixes vasculares colaterais de pequeno porte com bainha parenquimática e cavidades secretoras, as quais são usualmente encontradas junto à face abaxial (FIGURA 15) e possuem conteúdo de natureza lipofílica. São encontrados, ainda, idioblastos contendo grandes cristais prismáticos de oxalato de cálcio, inseridos usualmente no parênquima paliçádico, mas que podem atingir toda a altura do mesofilo (de uma face à outra da epiderme) (FIGURAS 14,15).



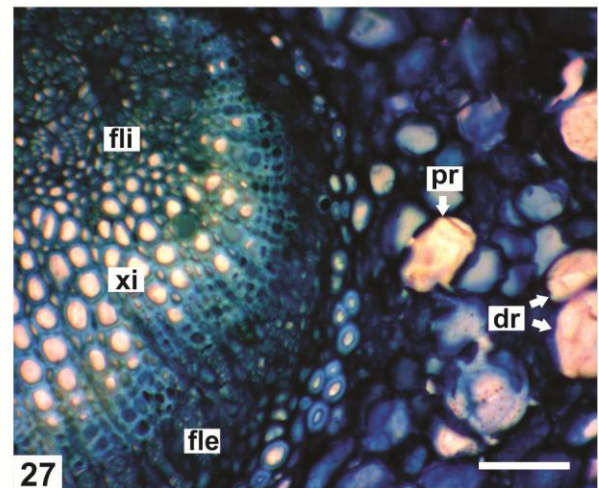
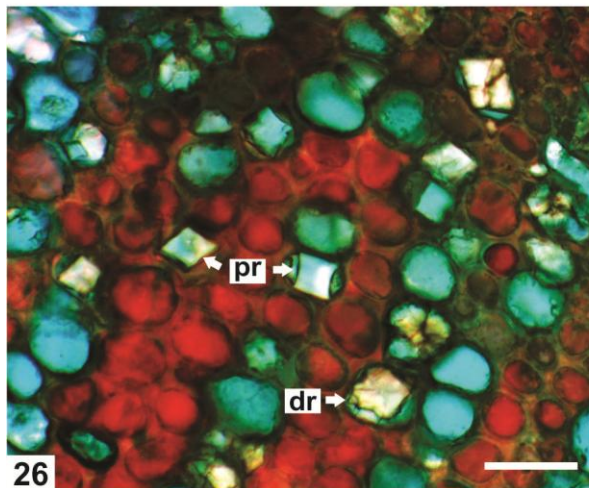
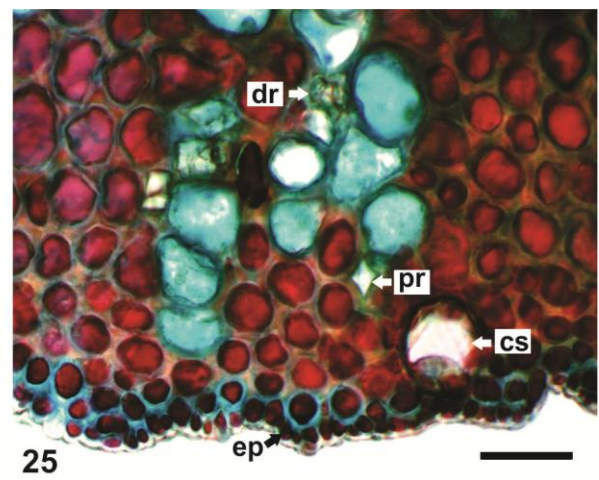
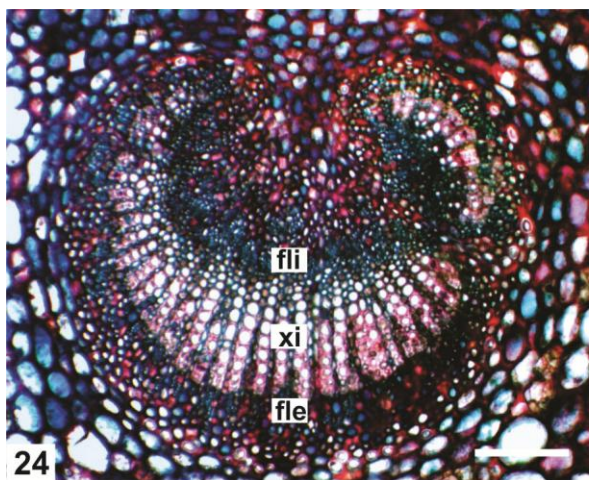
FIGURAS 14-17 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, LIMBO DA FOLHA EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 14-16. REGIÃO INTERNERVURAL, MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL, FEIXE VASCULAR DE MÉDIO PORTE E CRISTAIS PRISMÁTICOS DE OXALATO DE CÁLCIO; 17. DETALHE DE ESTÔMATO. ABREVIATURAS: be- BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, cs- CAVIDADE SECRETORA, ep- EPIDERME, es- ESTÔMATO, fx- FEIXE VASCULAR, pe- PARÊNQUIMA ESPONJOSO, pp- PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, pr- CRISTAL PRISMÁTICO. BARRA = 50 μ m (14-16), 20 μ m (17)

A nervura central, em secção transversal, apresenta contorno plano-convexo (FIGURA 18), epiderme uniestratificada, com células alongadas anticlinalmente e de paredes periclinais externas convexas (FIGURAS 20, 21), e na sequência é observado colênquima angular. Possui um único feixe vascular em arco aberto, biclateral, circundado por uma bainha esclerenquimática contínua (FIGURAS 18, 19). Idioblastos contendo drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio e cavidades secretoras estão presentes (FIGURAS 21-23).



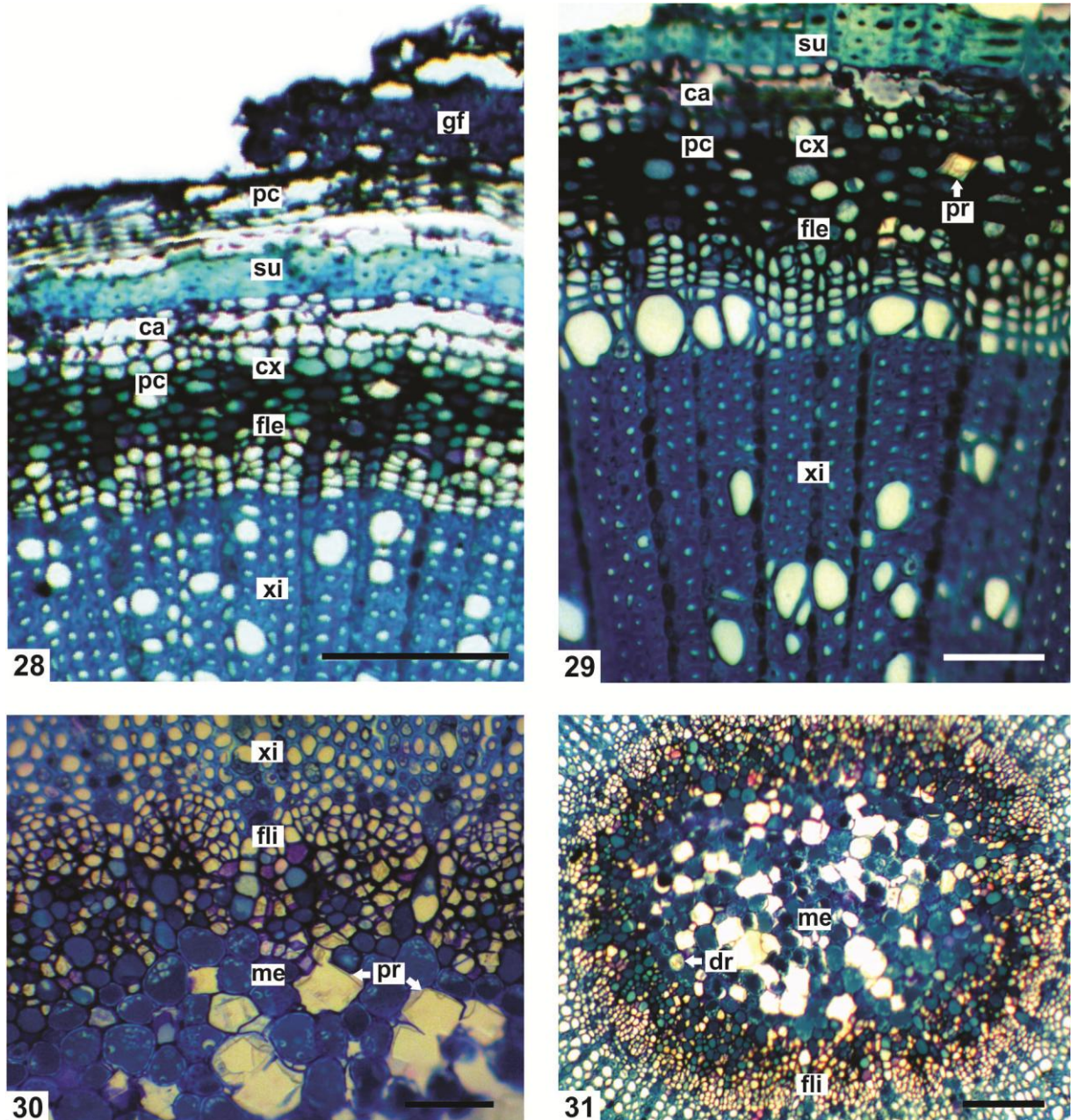
FIGURAS 18-23 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, NERVURA CENTRAL EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 18. ILUSTRAÇÃO DO CONTO RNO PLANO-CONVEXO E DA PRESENÇA DE UM ÚNICO FEIXE VASCULAR BICOLATERAL; 19. PORMENOR DE PARTE DO FEIXE VASCULAR; 20, 21, 23. CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO; 22. DETALHE DE CAVIDADE SECRETORA COM CONTEÚDO LIPOFÍLICO EM REAÇÃO COM SUDAN. ABREVIATURAS: be- BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, cs- CAVIDADE SECRETORA, ct- CUTÍCULA, dr- DRUSA, ep- EPIDERME, fle- FLOEMA EXTERNO, ca- COLÊNQUIMA ANGULAR, fx- FEIXE VASCULAR, pr- CRISTAL PRISMÁTICO, tr- TRICOMA, xi- XILEMA. BARRA = 200 μ m (18), 100 μ m (19), 50 μ m (20-23)

Em secção transversal, o pecíolo apresenta formato praticamente circular, sendo levemente achatado na face adaxial. O aspecto do sistema de revestimento é semelhante ao da nervura central. Há a presença de grandes cavidades secretoras junto à face abaxial e numerosos idioblastos contendo cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio (FIGURAS 25-27). O feixe vascular é biclateral, em arco fechado, algumas vezes apresentando-se subdividido, circundado por uma bainha perivascular constituída de células parenquimáticas e esclerenquimáticas (FIGURAS 24, 27). Compostos fenólicos foram encontrados em diferentes partes da folha.



FIGURAS 24-27 – *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PECÍOLO EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 24. FEIXE VASCULAR BICLATERAL EM ARCO FECHADO; 25, 26. CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO; 27. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR BICLATERAL. ABREVIATURAS: cs- CAVIDADE SECRETORA, dr- DRUSA, ep- EPIDERME, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, pr- CRISTAL PRISMÁTICO, xi- XILEMA. BARRA = 100 μ m (24), 50 μ m (25-27)

O caule, em estrutura secundária incipiente, possui secção transversal circular. A epiderme persiste, encontrando-se em fase de destacamento em algumas áreas. Nas camadas subepidérmicas, são observados parênquima cortical e grupamentos de fibras (FIGURA 28). O felogênio tem origem nos estratos de posição mediana do córtex, formando para a periferia súber, que consiste de células pouco achatadas e de paredes evidentemente espessadas, suberizadas e lignificadas (FIGURAS 28, 29). Na sequência, observam-se colênquima angular e parênquima cortical. O cilindro vascular constitui-se de floema externo, xilema e floema interno (FIGURAS 28-31), sendo esses sistemas de condução percorridos por raios estreitos. O xilema é totalmente lignificado e possui elementos traqueais de pequeno diâmetro (FIGURAS 28, 29). A medula é parenquimática (FIGURAS 30, 31) e apresenta amiloplastos. Idioblastos contendo cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio ocorrem no córtex, no floema externo e na medula (FIGURAS 29-31). Foram detectados compostos fenólicos em diversos tecidos caulinares.



FIGURAS 28-31– *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, CAULE EM SEÇÃO TRANSVERSAL: 28, 29. ORGANIZAÇÃO PERIFÉRICA CAULINAR, COM DESTAQUE PARA SÚBER E SISTEMA VASCULAR; 30, 31. DETALHE DA PARTE CENTRAL CAULINAR, INDICANDO FLOEMA INTERNO E MEDULA. ABREVIATURAS: ca- COLÊNQUIMA ANGULAR, cx- CÓRTEX, dr- DRUSA, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, gf- GRUPAMENTO DE FIBRAS, me- MEDULA, pc- PARÊNQUIMA CORTICAL, pr- CRISTAL PRISMÁTICO, su- SÚBER, xi- XILEMA. BARRA= 100 μ m (28, 31), 50 μ m (29, 30)

A morfologia foliar externa observada é condizente com os aspectos descritos para a espécie por Legrand e Klein (1977) e Lorenzi (2002). Segundo Klucking (1988 *apud* Oliveira *et al.*, 2011), margens raramente denteadas e que se apresentam onduladas podem ocorrer em *C. guazumifolia* e *C. aromatica* (Aubl.) Griseb., sendo também observadas por Oliveira *et al.* (2011) em *C. eugenioides* var. *desertorum* (Mart. ex DC.) D. Legrand ex Landrum. O padrão de nervação foliar constatado,

denominado camptódromo-broquidódromo, já foi relatado por Cardoso e Sajo (2006) e Oliveira *et al.* (2011), os quais consideraram-no comum para a maioria das espécies de *Campomanesia*, e acrescentaram que o gênero apresenta essas nervuras geralmente impressas na face adaxial e proeminentes na face abaxial. Essa característica confere secção plano-convexa à nervura central, como relatado no presente estudo. Segundo esses autores, as nervuras terciárias da espécie *C. guazumifolia* apresentam organização reticulada ortogonal, na qual seus ângulos de conexão são predominantemente retos, característica que é típica de algumas espécies da subtribo Myrtinae. As aréolas, menores áreas formadas por nervuras terciárias e nervuras de ordens menores, mostram-se imperfeitas quanto ao desenvolvimento, irregulares quanto à forma e com as vênulas ramificadas e distribuídas ao acaso, diferentemente do que ocorre em *C. schlechtendaliana* (O. Berg) Nied. e *C. sessiliflora* (O. Berg) Mattos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Cardoso, Proença e Sajo (2009), em estudo morfoanatômico foliar da subfamília Myrtoideae, relataram sucintamente características comuns entre as espécies da subfamília e que foram também observadas no presente trabalho. Tais autores descreveram a bainha esclerenquimática que circunda o feixe vascular da nervura central como descontínua na região mediana de folha de *C. guazumifolia*. No presente estudo, esta apresentou-se contínua no terço inferior da folha.

Gomes *et al.* (2009) analisaram características morfoanatômicas de folha de *C. adamantium* (Cambess.) O. Berg, constatando a presença de estômatos anomocíticos e paracíticos, cavidades secretoras junto tanto à face abaxial quanto à face adaxial, distribuídas ao longo de toda a lâmina foliar, idioblastos secretores, uma a três camadas subepidérmicas e descontínuas de células maiores do que as células epidérmicas simulando uma hipoderme e nervura central biconvexa com feixe vascular em arco quase plano, e ausência de drusas no mesofilo, o que distingue essa espécie de *C. guazumifolia*.

A presença de cavidades secretoras foi descrita por Metcalfe e Chalk (1950) como uma característica notável da família Myrtaceae e foi constatada no presente estudo no mesofilo junto à face abaxial da região internervural, da nervura central e do pecíolo, apresentando conteúdo de natureza lipofílica. Heskes *et al.* (2012) avaliaram o conteúdo de cavidades secretoras de espécies de Myrtaceae e identificaram oleuropeína esterificada com glicose, comum em *Eucalyptus* spp., que

pode estar relacionada com a defesa da planta e, por ser um composto biologicamente ativo, pode ser de interesse em produtos naturais.

A presença de cristais prismáticos e drusas também é comum na família (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981) e na subfamília Myrtoideae (CARDOSO; PROENÇA; SAJO, 2009), porém ainda não foram relatados em literatura cristais prismáticos como os observados na espécie analisada, os quais são de natureza de oxalato de cálcio e podem atingir toda a espessura do mesofilo.

O pecíolo, em secção transversal, apresentou algumas características divergentes daquelas descritas por Oliveira *et al.* (2011), pesquisadores que relataram o contorno côncavo-convexo comum para o gênero, pois observou-se no presente estudo contorno praticamente circular, levemente achatado na face adaxial. Além disso, os autores citam o feixe vascular como aberto e indiviso, ao contrário do observado, fato de análise relevante já que a configuração do arco vascular no pecíolo representa importante parâmetro de diferenciação e divisão de espécies em taxons. Oliveira *et al.* (2011) descreveram a extremidade do arco vascular fletida em *C. guazumifolia* similar à das espécies *C. guaviroba* (DC.) Kiaersk., *C. laurifolia* Gardner e *C. xanthocarpa* (Mart.) O. Berg. Adicionalmente, revelaram a presença de uma bainha perivascular constituída de células mistas (parenquimáticas e esclerenquimáticas), ausente apenas em *C. ilhoensis* Mattos e *C. velutina* (Cambess.) O. Berg.

Características estruturais podem estar sujeitas a variações ambientais (CUTTER, 1986) e, a título de ilustração, Krupek e Lima (2012), visando avaliar a influência do fator luminosidade sobre folhas de *C. xanthocarpa*, constataram diferenças quantitativas entre folhas de diferentes ambientes, como desenvolvimento e tamanho do limbo foliar e densidade de estômatos.

A organização estrutural do caule de *C. guazumifolia* corresponde à descrição geral de Metcalfe e Chalk (1950) para a família Myrtaceae, sendo o felogênio originado na porção mediana do córtex, como em espécies de *Psidium*, cilindro vascular formado por cilindros contínuos de floema externo, xilema e floema interno percorridos por raios estreitos e abundante presença de cristais nos tecidos não lignificados. Não foram encontrados em literatura estudos referentes aos aspectos morfoanatômicos de caule do gênero *Campomanesia*, tornando sua investigação de grande importância para a determinação de parâmetros para identificação da espécie por meio de material caulinar.

4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.2.1 Prospecção fitoquímica

Na prospecção fitoquímica do extrato aquoso a 20% (m/v) e das frações do extrato hidroalcoólico a 20% (m/v), tanto de folha quanto de caule, foi observada a presença dos seguintes compostos: glicosídeos flavônicos, iridoides, esteroides e/ou triterpenoides e saponinas. Adicionalmente, o extrato de folha revelou taninos, enquanto que o de caule exibiu leucoantocianidinas.

Metcalfe e Chalk (1950) descreveram a abundância de taninos nos tecidos de Myrtaceae como algo comum para a família. Como observado na presente análise, Müller *et al.* (2012) também demonstraram a presença de taninos e saponinas em folha de *C. guazumifolia* mas, em contraposição, relataram ausência de glicosídeos flavônicos. Em estudo de triagem fitoquímica, Adati (2001) revelou a presença de taninos, flavonoides, saponinas e óleo essencial em folha de *C. phaea* (O. Berg) Landrum, na qual o teor de taninos foi de 13,31% no extrato hidroalcoólico bruto e de 13,62% em folha pulverizada. Madalosso *et al.* (2012) identificaram flavonoides e taninos em folha de *C. lineatifolia* Ruiz et Pav., sendo os flavonoides mais abundantes na fração acetato de etila e os taninos mais abundantes no extrato etanólico bruto. Barbosa (2009) doseou os compostos fenólicos presentes em folha de *C. lineatifolia* e constatou uma maior proporção de taninos em relação aos flavonoides, sendo que o extrato etanólico bruto, obtido por percolação com etanol 96 °GL, apresentou concentrações bem mais elevadas dessas substâncias do que o pó da planta, mostrando que a metodologia empregada foi eficiente na extração desses componentes. Coutinho *et al.* (2010) relataram a presença de flavonoides em folha de *C. adamantium* e demonstraram que ocorre uma variação sazonal nos teores de tais compostos que pode estar relacionada com o desenvolvimento da planta ao longo das estações do ano. Markman, Bacchi e Kato (2004) evidenciaram a presença de flavonoides, saponinas e taninos no extrato etanólico de folha de *C. xanthocarpa*. Dessa forma, os resultados obtidos para *C. guazumifolia* são condizentes ao previamente relatado.

4.2.2 Parâmetros farmacognósticos

Os valores dos parâmetros farmacognósticos determinados (perda por dessecação, cinzas totais e resíduo dessecado) estão expressos pelas médias \pm desvio padrão e sumarizados na TABELA 1.

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOGNÓSTICOS DE FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE

AMOSTRA	PARÂMETRO		
	Perda por dessecação (g%)	Cinzas totais (g%)	Resíduo dessecado do extrato etanólico bruto (g%)
FOLHA	9,08 \pm 0,15	8,33 \pm 0,08	13,81 \pm 0,32
CAULE	9,20 \pm 0,33	3,41 \pm 0,15	1,53 \pm 0,02

A determinação da perda por dessecação permite avaliar a quantidade de água e substâncias voláteis presentes no material vegetal, sendo que o teor máximo estabelecido nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, pois o excesso de umidade em matérias-primas vegetais pode causar a degradação de constituintes químicos pela ação enzimática, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. O teor de cinzas totais determina a porcentagem de substâncias inorgânicas intrínsecas do vegetal e extrínsecas (não fisiológicas), sendo um parâmetro importante na detecção de impurezas inorgânicas e contaminantes. No presente estudo, o alto teor de cinzas totais observado em folha de *C. guazumifolia* está relacionado à presença abundante de cristais de oxalato de cálcio. O resíduo dessecado do extrato etanólico bruto permite avaliar o rendimento obtido pelo método de extração e apresenta-se reduzido no material proveniente de caule devido à presença de substâncias não extraíveis pelo método, como lignina e celulose. Dessa maneira, tais parâmetros constituem análises fundamentais ao controle de qualidade de drogas vegetais (WHO, 1998; FARIAS, 2010; FB 5, 2010).

4.2.3 Isolamento e identificação de composto químico

Um composto químico de aspecto amorfo, cor amarelada e aroma cítrico foi isolado da fração acetato de etila de folha de *C. guazumifolia* e identificado. Tal composto foi selecionado para identificação por ter cristalizado durante a evaporação lenta do solvente. O composto foi identificado como miricitrina (FIGURA 32) pela comparação dos resultados da análise por RMN ^1H e ^{13}C com a literatura.

Para a purificação da miricitrina, a fração acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna de sílica-gel 60 e como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetato de etila e hexano 70:30 (v/v), seguindo-se concentrações de polaridade crescente na ordem de 5% até chegar a 100% de acetato de etila. Utilizou-se então uma mistura de acetato de etila e metanol 95:5 (v/v), e posteriormente empregaram-se concentrações de polaridade crescente na ordem de 5% até chegar a 100% de metanol. As alíquotas foram recolhidas em frascos numerados. As porções foram submetidas à cromatografia em camada delgada e as semelhantes foram reunidas. Os conteúdos dos frascos 42-53, coletados com a utilização das fases móveis acetato de etila e metanol 95:5 e 90:10 (v/v), foram reunidos, concentrados em banho-maria e submetidos à separação em coluna Sephadex LH20. As alíquotas foram reunidas por similaridade de composição visualizada em CCD. O conteúdo dos frascos 6-11 foi reunido e filtrado, obtendo-se 0,1069 g de um pó amarelado, o qual foi submetido à análise por RMN ^1H e ^{13}C (FIGURAS 33, 34) e identificado como miricitrina ou miricetina-3-O- α -ramnosídeo (FIGURA 32) pela comparação com a literatura (TABELA 2).

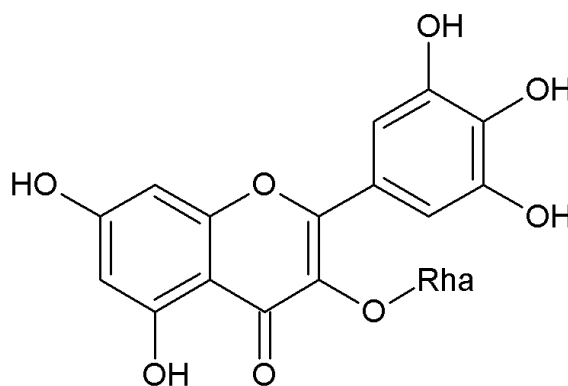


FIGURA 32. ESTRUTURA QUÍMICA DA MIRICITRINA
LEGENDA: Rha- RAMNOSE

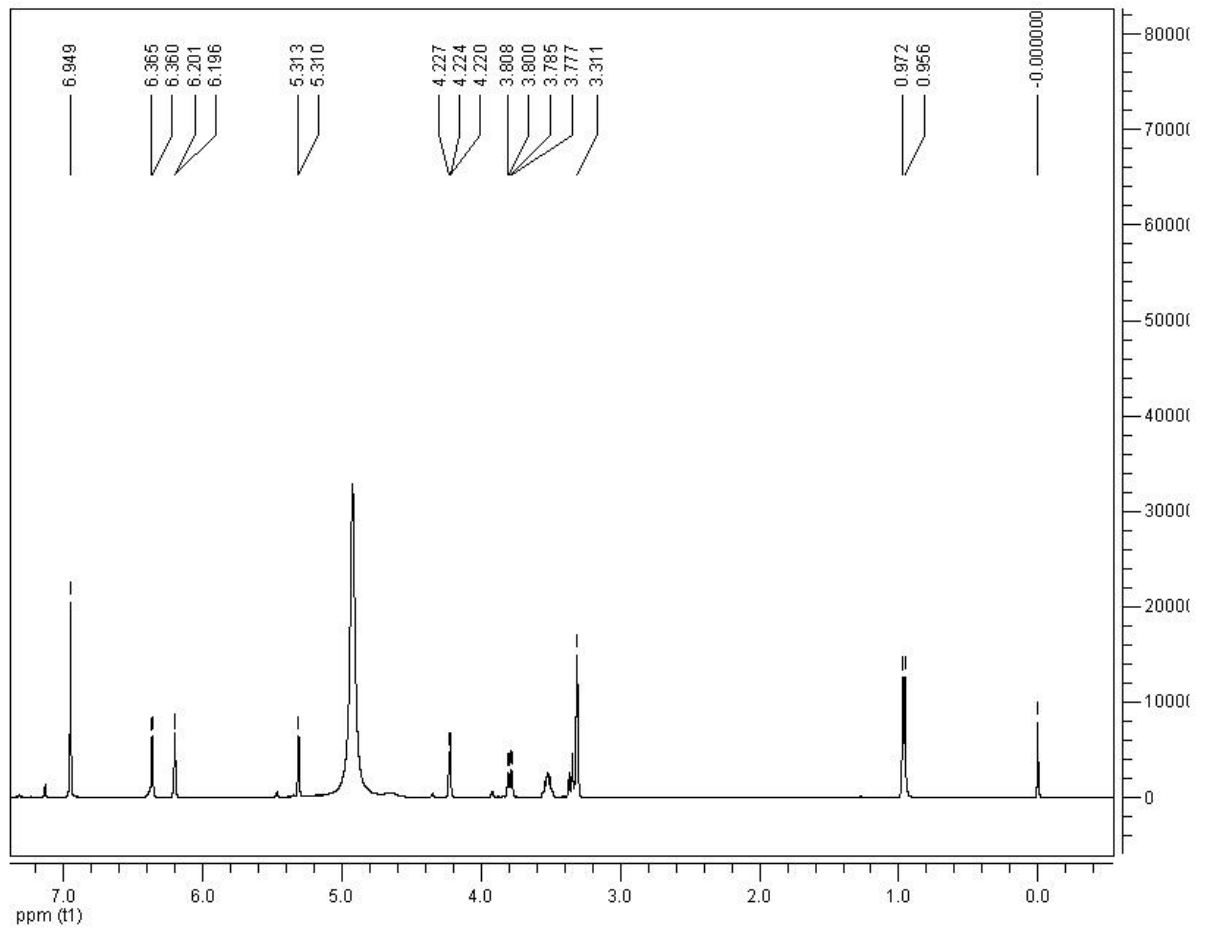


FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^1H PARA O COMPOSTO ISOLADO MIRICITRINA (200 MHz, CD₃OD)

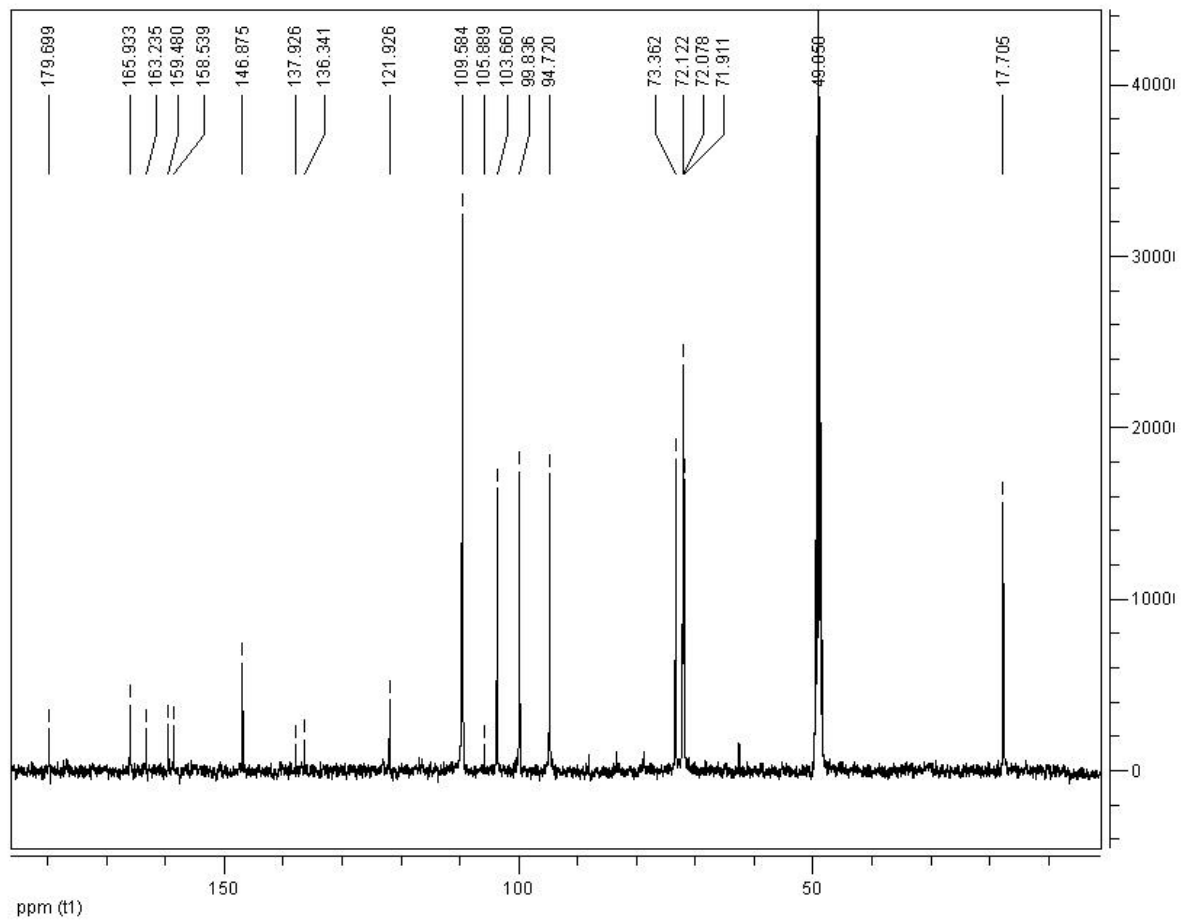


FIGURA 34. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C PARA O COMPOSTO ISOLADO MIRICITRINA (200 MHz, CD $_3$ OD)

TABELA 2. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^1H E ^{13}C CORRESPONDENTES À MIRICITRINA

POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)			
	^1H		^{13}C	
	Isolado	Shen, Chen e Lee (2009)	Isolado	Shen, Chen e Lee (2009)
2	-	-	159,5	159,4
3	-	-	136,3	136,3
4	-	-	179,7	179,4
5	-	-	163,2	163,1
6	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	6,18 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,1 Hz)	99,8	99,8
7	-	-	165,9	165,9
8	6,36 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	6,34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	94,7	94,7
9	-	-	158,5	158,4
10	-	-	105,9	105,8
1'	-	-	121,9	121,8
2'	6,95 (<i>s</i>)	6,94 (<i>s</i>)	109,6	109,2
3'	-	-	146,9	146,8
4'	-	-	137,9	137,8
5'	-	-	146,9	146,8
6'	6,95 (<i>s</i>)	6,94 (<i>s</i>)	109,6	109,2
1''	5,31 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,2 Hz)	5,30 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,5 Hz)	103,7	103,6
2''	4,22 (<i>d</i> , <i>J</i> =3,2 Hz)	-	71,9	71,8
3''	3,80 (<i>dd</i> , <i>J</i> =9,2; 3,2)	-	72,1	72
4''	3,78-3,77	-	73,4	73,3
5''	3,34-3,36 (<i>m</i>)	-	72,1	72
6''	0,97 (<i>d</i> , <i>J</i> =6,4 Hz)	0,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)	17,7	17,6

LEGENDA: *d*- DUBLETO, *dd*- DUPLO DUBLETO, *J*- CONSTANTE DE ACOPLAMENTO, *m*- MULTIPLETO, *s*- SINGLETO

Raros estudos direcionados ao isolamento e à identificação de compostos presentes em espécies de *Campomanesia* são encontrados. Madalosso *et al.* (2012) identificaram os compostos catequina e quercitrina na fração acetato de etila de folha de *C. lineatifolia* e Ferreira *et al.* (2013) identificaram os compostos miricitrina, miricetina e quercetina no extrato acetato de etila de folha de *C. adamantium*.

Em estudo preliminar de identificação de flavonoides em espécies pertencentes aos gêneros *Campomanesia*, *Calycorectes*, *Eugenia* e *Hexachlamys*,

Schmeda-Hirschmann (1995) relatou a presença de quercitrina em *C. xanthocarpa* e *C. guazumifolia*, rutina em *C. xanthocarpa*, miricetina-3-O-ramnoglicosídeo em *C. guazumifolia* e miricitrina nas duas espécies e em *C. pubescens* (Mart. ex DC.) O. Berg.

A miricitrina, identificada na fração acetato de etila de folha de *C. guazumifolia*, é um flavonoide altamente antioxidante e tem sido empregada em experimentos a fim de avaliar sua atuação em diversos estados patológicos. Como exemplo disso, já foram comprovados para essa substância os efeitos antipsicótico (PEREIRA *et al.*, 2011), antinociceptivo (CÓRDOVA *et al.*, 2011), antígeno-tóxico (HAYDER *et al.*, 2008) e anti-hiperglicêmico (MANAHARAN *et al.*, 2012), entre outros.

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.4.1 Método do DPPH

A porcentagem de redução do radical DPPH pelo extrato etanólico bruto e pelas frações de folha e caule foi calculada para a avaliação da atividade antioxidante e, por regressão linear, foi possível determinar a IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. As curvas da atividade antioxidante dos padrões constam nos GRÁFICOS 1 e 2 e aquelas exibidas pelas amostras constam nos GRÁFICOS 3-12, os valores de IC₅₀ estão sumarizados no GRÁFICO 13.

As frações acetato de etila obtidas do extrato etanólico bruto de folha e caule demonstraram os melhores resultados.

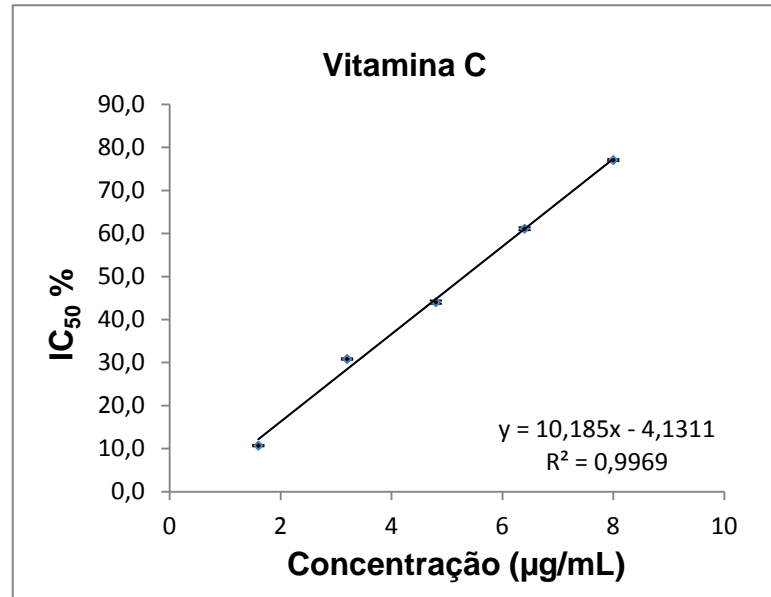


GRÁFICO 1. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH

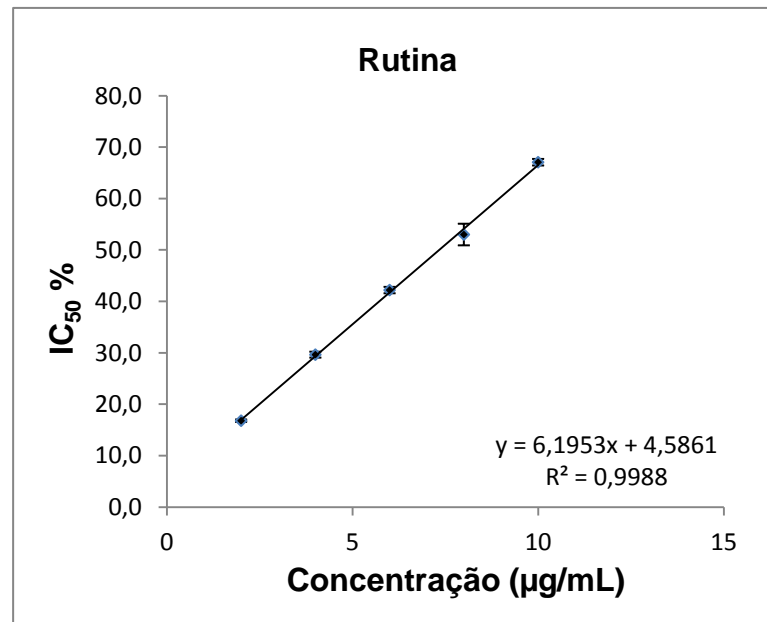


GRÁFICO 2. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH

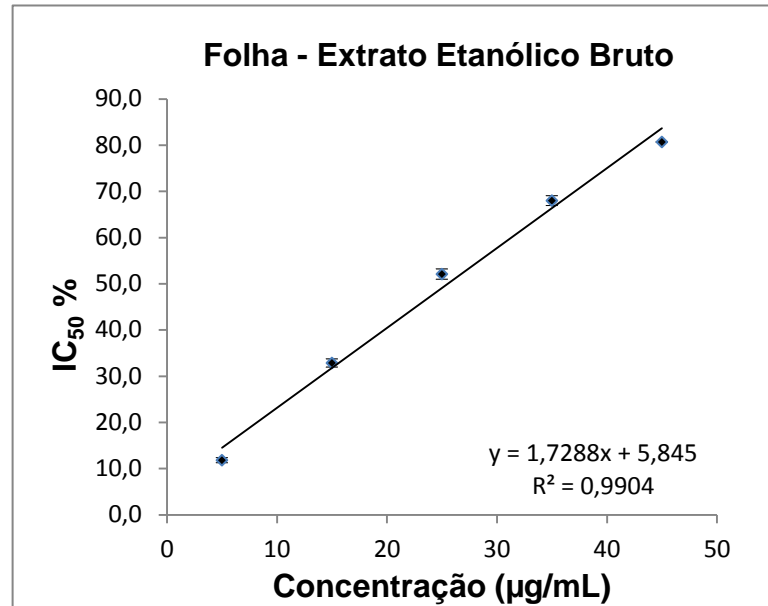


GRÁFICO 3. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

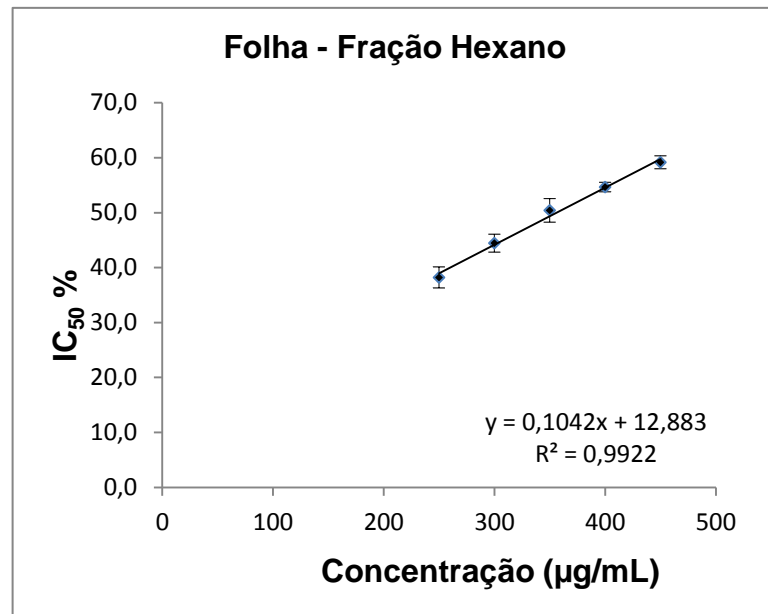


GRÁFICO 4. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

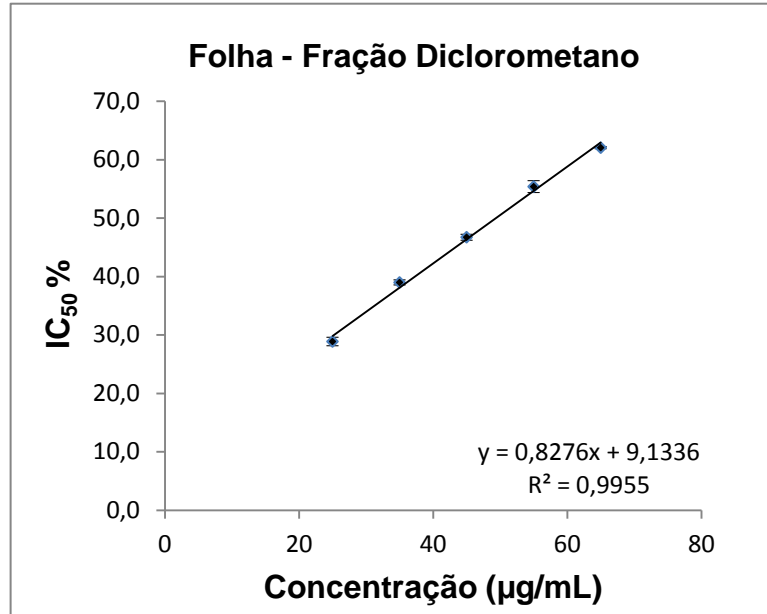


GRÁFICO 5. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

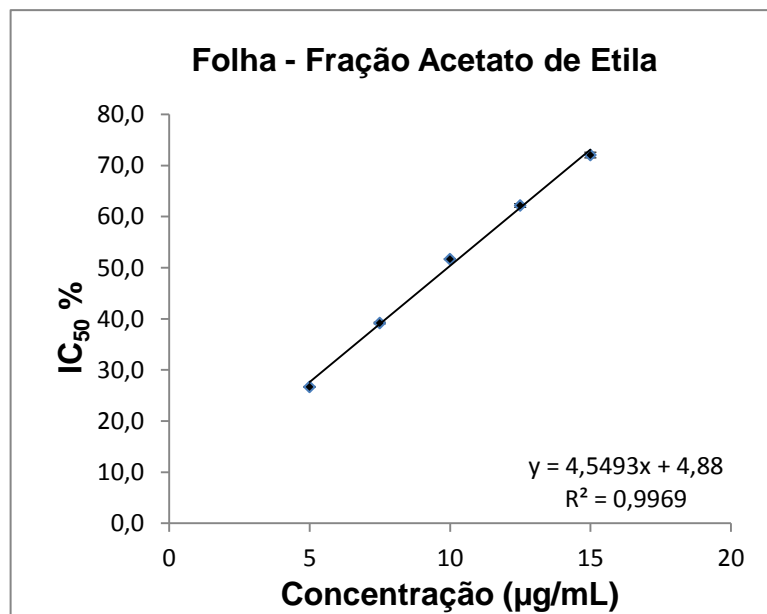


GRÁFICO 6. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

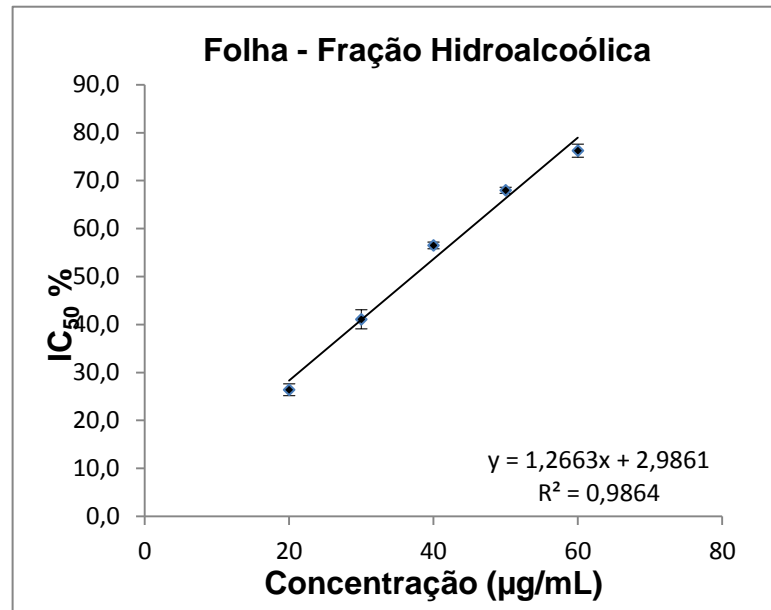


GRÁFICO 7. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

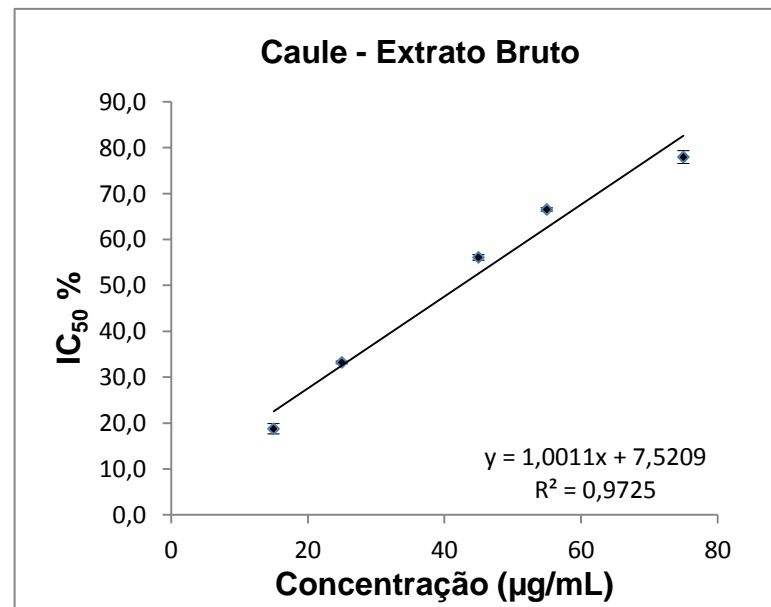


GRÁFICO 8. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

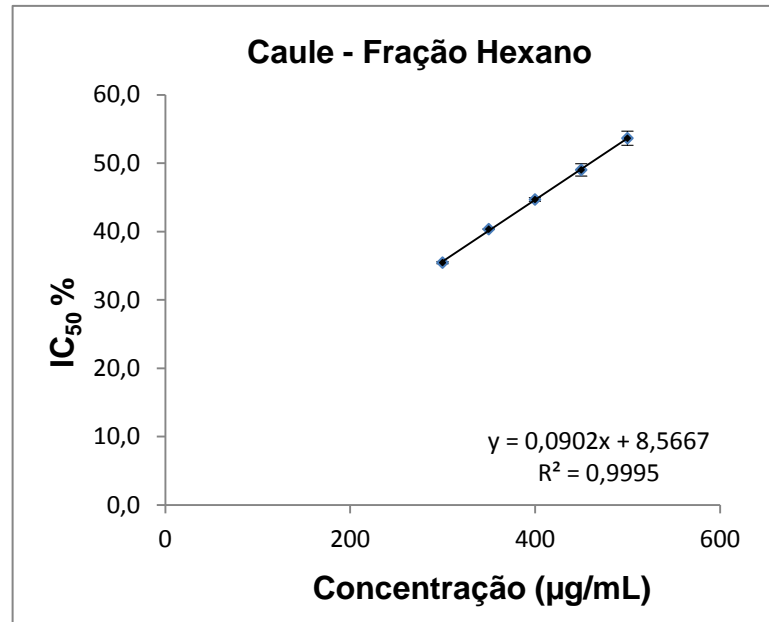


GRÁFICO 9. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

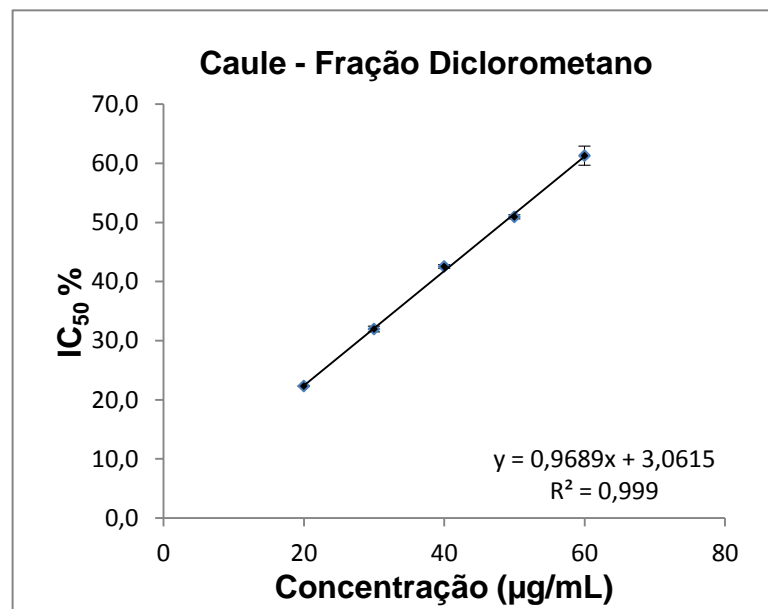


GRÁFICO 10. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

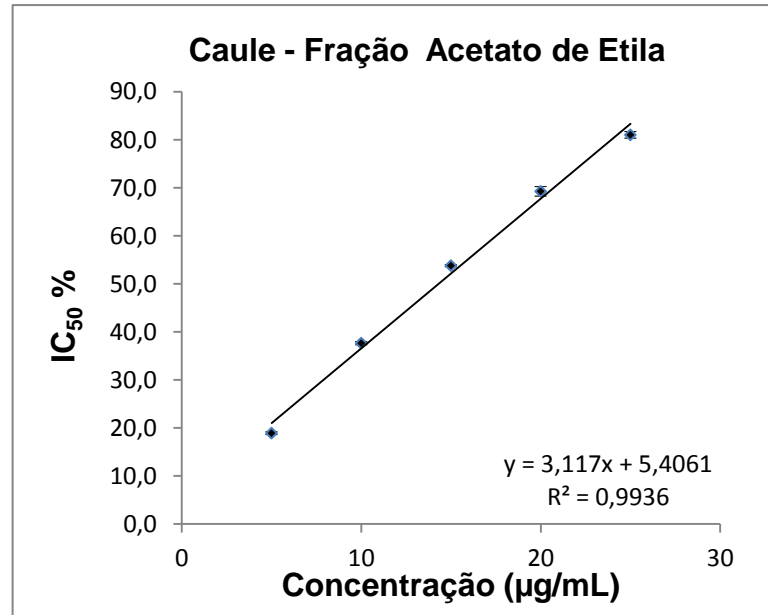


GRÁFICO 11. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

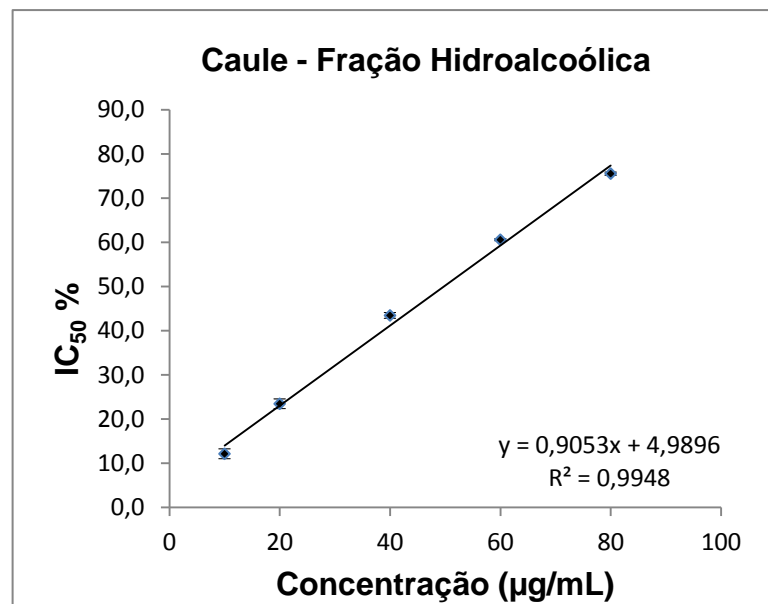


GRÁFICO 12. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELA REDUÇÃO DO DPPH

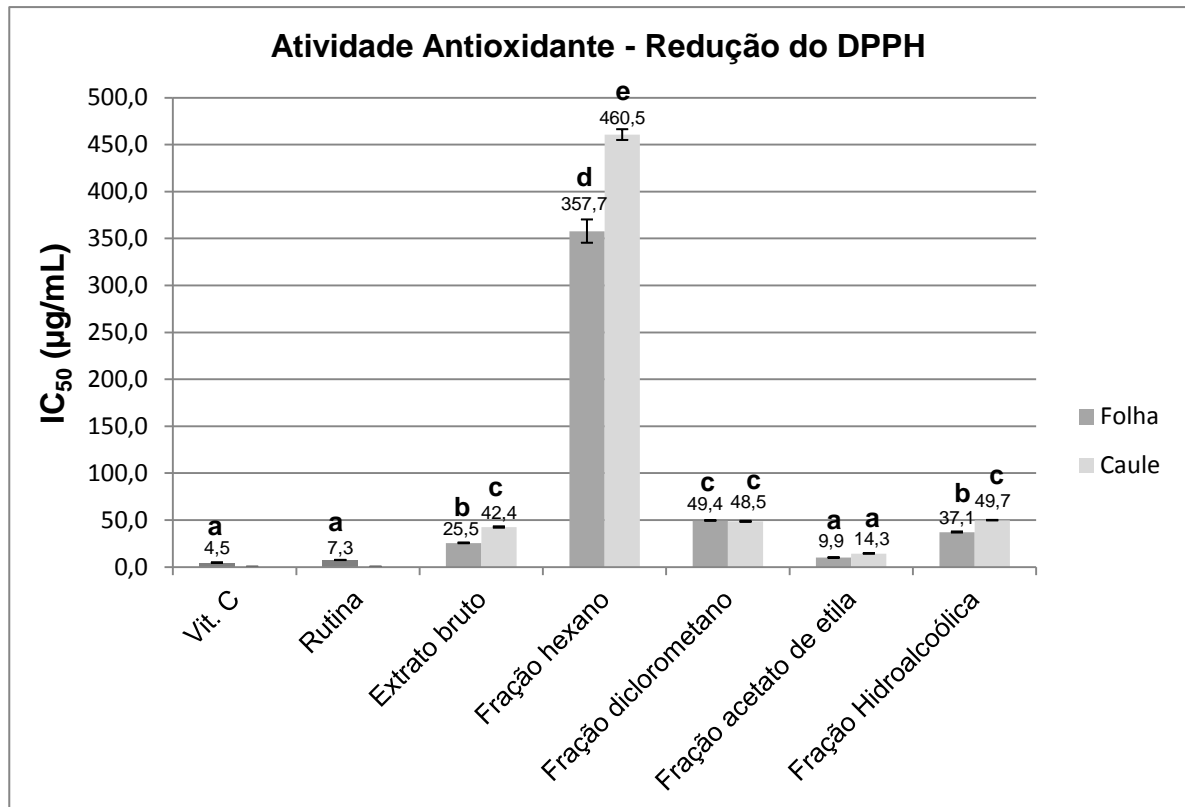


GRÁFICO 13. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE. LEGENDA: VIT. C- VITAMINA C. LETRAS IGUAIS INDICAM RESULTADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

Observando-se os dados estatísticos dos resultados obtidos (GRÁFICO 13), constatou-se que a atividade antioxidante das frações acetato de etila de folha e de caule é similar à dos padrões vitamina C e rutina. A fração acetato de etila de folha foi a que apresentou valor de IC_{50} mais próximo ao dos padrões. No entanto, as frações hexano tanto de folha como de caule foram as que apresentaram os valores de IC_{50} mais elevados, sendo suas atividades antioxidantes pelo método do DPPH as menos expressivas, isso ocorre porque compostos dissolvidos no hexano não liberam prótons para interagir com o DPPH. A atividade antioxidante do extrato etanólico bruto de folha foi estatisticamente igual à da fração hidroalcoólica de folha e essas amostras revelaram valor de IC_{50} maior que a dos padrões e das frações acetato de etila de folha e de caule. O extrato etanólico bruto de caule e as frações diclorometano de folha e de caule e hidroalcoólica de caule apresentaram valor de IC_{50} entre 42,4-49,7 $\mu\text{g/mL}$ e estatisticamente similar.

Barbosa (2009) detectou a atividade antioxidante do extrato e das frações de folha de *C. lineatifolia* e constatou a fração hexano como a menos ativa, e a fração

acetato de etila como a mais ativa na redução do radical DPPH, semelhantemente ao observado no presente trabalho. Madalosso *et al.* (2012) também constataram maior efetividade na redução do DPPH pela fração acetato de etila de folha da mesma espécie e, por tal motivo, conduziram um estudo para avaliar a atividade gastroprotetora *in vivo* dessa fração. Ambos os trabalhos descrevem a presença de flavonoides nos extratos, que podem ser os compostos responsáveis pela ação antioxidante.

Nesta investigação, a fração que apresentou melhor capacidade de redução do DPPH foi a fração acetato de etila de folha, da qual foi isolado o flavonoide miricitrina, uma substância antioxidante.

4.2.4.2 Método do complexo fosfomolibdênio

Para a determinação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio foram utilizados o extrato etanólico bruto e as frações de folha e caule, além dos padrões rutina e vitamina C. O potencial antioxidante das amostras testadas e da rutina foi calculado em relação à vitamina C, cuja atividade foi considerada 100%.

A fração acetato de etila de folha apresentou atividade antioxidante relativa melhor do que a exibida pelo padrão rutina (GRÁFICO 14).

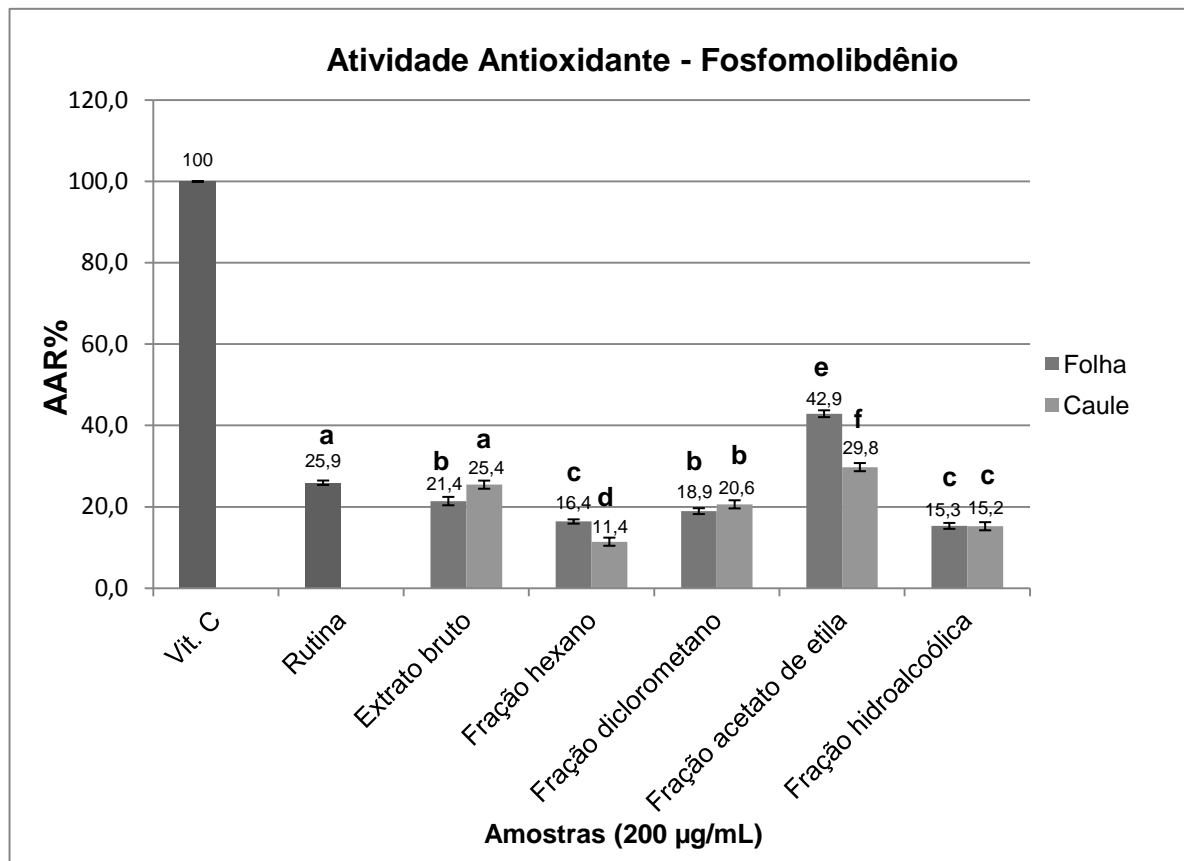


GRÁFICO 14. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO. LEGENDA: AAR%-PORCENTAGEM DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA À VITAMINA C. LETRAS IGUAIS INDICAM RESULTADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

A atividade antioxidante relativa à vitamina C do padrão rutina e do extrato etanólico bruto de caule não apresentaram diferença estatística e, semelhantemente aos resultados obtidos para a redução do DPPH, a atividade antioxidante das frações acetato de etila, tanto de folha como de caule, mostrou-se a mais efetiva no método do complexo fosfomolibdênio. O extrato bruto de caule apresentou resultado similar ao do padrão rutina. O extrato etanólico bruto de folha e as frações diclorometano de folha e de caule apresentaram resultados estatisticamente iguais e atividade antioxidante ligeiramente menor do que o padrão rutina e o extrato bruto de caule. A fração hexano de caule foi a que apresentou menor desempenho antioxidante por esse método e as frações hexano de folha e hidroalcoólica, tanto de folha como de caule, mostraram-se estatisticamente iguais, com a porcentagem de atividade antioxidante relativa à vitamina C entre 15,2-16,4% (GRÁFICO 14).

4.2.4.3 Método TBARS

Pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foi possível determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações de folha e caule, verificando-se sua capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

Constatou-se que o extrato etanólico bruto e as frações de folha apresentaram potencial antioxidante abaixo daquele obtido pelo padrão BHT. Porém, diferentemente dos testes com DPPH e fosfomolibdênio, o extrato bruto e as frações de caule mostraram os melhores resultados (GRÁFICO 15).

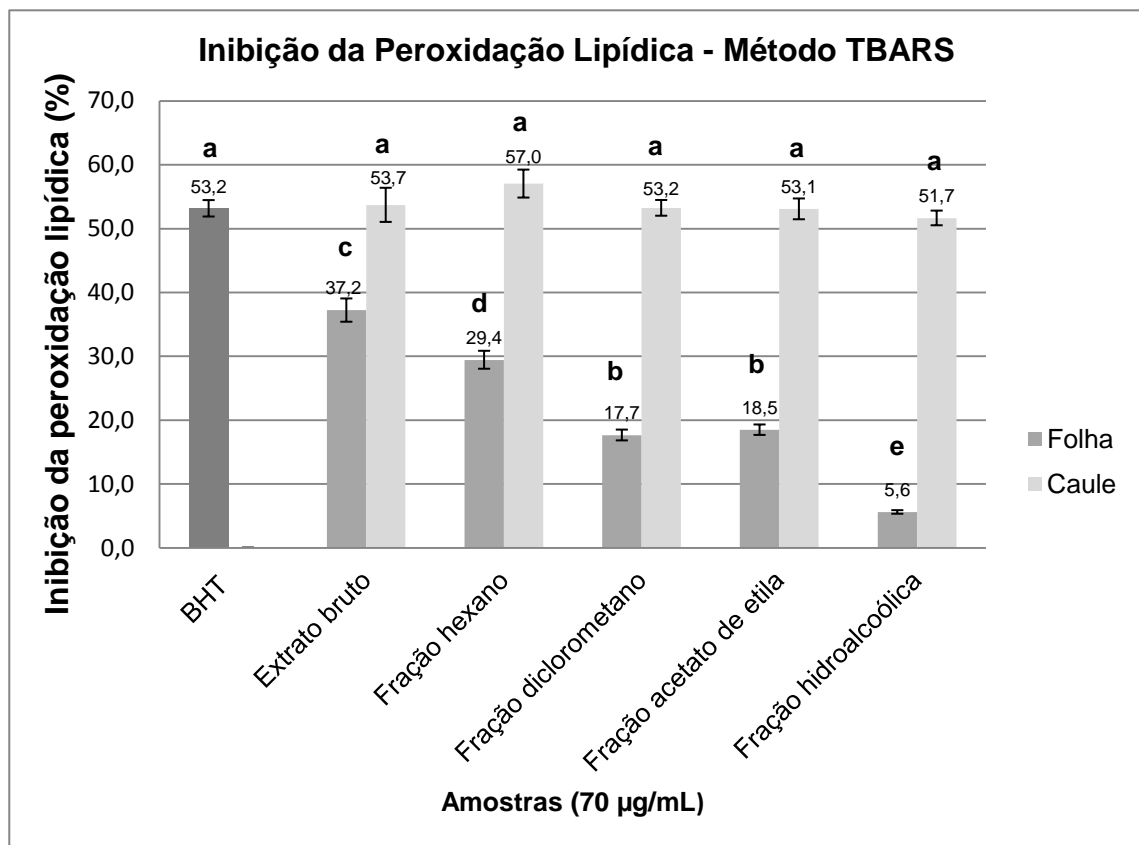


GRÁFICO 15. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULÉ DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, PELO MÉTODO TBARS. LEGENDA: BHT- 3,5-DI-*TERC*-BUTIL-4-HIDROXITOLUENO. LETRAS IGUAIS INDICAM RESULTADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

As análises estatísticas revelaram que a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica das frações diclorometano e acetato de etila de folha é similar. Observou-se no extrato etanólico bruto e nas frações de folha um decréscimo da inibição da peroxidação lipídica proporcional ao aumento de polaridade da fração.

Em contrapartida, para as amostras provenientes de caule, não houve diferença estatística entre o extrato bruto, as frações e o padrão BHT.

Em estudo com extratos de folha de *C. adamantium*, Coutinho *et al.* (2010) avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e da peroxidação lipídica empregando o sistema β -caroteno/ácido linoleico e constataram, para o último método, uma maior atividade da fração acetato de etila. Porém, semelhantemente ao que ocorreu no presente estudo, os extratos hexano apresentaram melhor atividade sobre a peroxidação lipídica do que pelo método do DPPH.

Theodoluz *et al.* (1988) avaliaram diversas espécies de Myrtaceae em relação ao potencial de inibir a enzima xantina oxidase que, durante o processo de conversão de xantina a ácido úrico, produz radicais superóxido, e descreveram *C. guazumifolia* como uma das espécies mais ativas na inibição dessa enzima, confirmando sua indicação popular no combate à gota.

A espécie *C. guazumifolia* foi avaliada para constatação do seu potencial antioxidante empregando-se três métodos: pela redução do DPPH, que permite a avaliação da quantidade de amostra necessária para neutralizar uma determinada quantidade do radical livre DPPH (NIKI, 2010); pela formação do complexo fosfomolibdênio, que determina a capacidade antioxidante total de uma amostra frente a uma reação de oxirredução, permitindo avaliar componentes tanto lipofílicos como hidrofílicos (PRIETO *et al.*, 1999); e pelo método TBARS, determinando-se a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica induzida por um agente oxidante (LIU *et al.*, 1997). Os ensaios determinaram que esta espécie possui grande potencial antioxidante frente a todos os métodos utilizados e sugere-se que tal perfil, ao menos em parte, está relacionado à presença do antioxidante miricitrina, identificado na fração acetato de etila de folha, e de outros compostos fenólicos ainda não identificados nos órgãos vegetativos analisados.

4.3 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato etanólico bruto e as respectivas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule, nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, foram testados pelo método de microdiluição em caldo com os micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *S. epidermidis* ATCC® 12228, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028 e *Candida albicans* SC5314.

Nenhuma das amostras, nas concentrações testadas, mostrou atividade microbicida, porém algumas delas demonstraram uma redução do crescimento microbiano. Os resultados positivos constam na TABELA 3.

TABELA 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AMOSTRAS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, QUE EXIBIRAM REDUÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

AMOSTRA / CONCENTRAÇÃO	MICRO-ORGANISMO / TEMPO DE INCUBAÇÃO								
	<i>S. aureus</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>C. albicans</i>		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
FEB 200 µg/mL	+								
FEB 400 µg/mL		+							
FACE 200 µg/mL	+								
FACE 400 µg/mL	+								
FHID 200 µg/mL	+								
FHID 400 µg/mL		+		+					
CEB 200 µg/mL								+	
CEB 400 µg/mL								+	
CACE 200 µg/mL							+		
CACE 400 µg/mL							+		

LEGENDA: FEB- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA, FACE- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA, FHID- FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA, CEB- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE, CACE- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE, *S. aureus*- *Staphylococcus aureus*, *S. Typhimurium*- *Salmonella Typhimurium*, *S. epidermidis*- *Staphylococcus epidermidis*, *C. albicans*- *Candida albicans*

O extrato etanólico bruto de folha apresentou atividade contra *S. aureus* após 24 h de incubação na concentração de 200 µg/mL e após 48 h na concentração de 400 µg/mL, reduzindo o crescimento celular. Em relação a esse micro-organismo, a fração acetato de etila de folha, nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, reduziu o crescimento bacteriano após 24 h. A fração hidroalcoólica de folha reduziu o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 200 e 400 µg/mL após os períodos de 24 e 48 h respectivamente, além disso, essa fração foi eficaz contra *S. Typhimurium*, diminuindo o crescimento bacteriano na concentração de 400 µg/mL após 48 h.

Em relação às amostras provenientes de caule, o extrato etanólico bruto reduziu o crescimento de *C. albicans* nas concentrações de 200 e 400 µg/mL após 24 h e a fração acetato de etila, nessas mesmas concentrações, reduziu o crescimento de *S. epidermidis* após 48 h de incubação.

Em estudos com outras espécies de *Campomanesia*, Adati (2001) demonstrou a atividade antimicrobiana do extrato bruto de folha de *C. phaea* pelo método de microdiluição em caldo, o qual inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* na concentração de 125 µg/mL e de *C. albicans* na concentração de 250 µg/mL. Pelo método de difusão em ágar, Silva (2011) relatou a atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila de folha de *C. xanthocarpa* para o micro-organismo *Salmonella* Typhi na dose de 30 µg. Desoti *et al.* (2011) estudaram extratos metanólico, hexano e acetato de etila de folha dessa espécie frente a outros micro-organismos, a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), e reportaram atividade bacteriostática com $CIM \leq 62,5$ µg/mL para *S. aureus* e *Micrococcus luteus* dos extratos hexano e acetato de etila, além disso, o extrato metanólico apresentou atividade contra *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans*. Moura-Costa *et al.* (2012) descreveram a atividade antimicrobiana de extratos de folha de *C. eugenioides* (Cambess.) D. Legrand ex Landrum contra *S. aureus* e três espécies de *Candida*, além de reportarem sua atividade antiviral. Essa espécie também apresentou alta citotoxicidade *in vitro* para células VERO, uma linhagem celular derivada do rim de macaco. O óleo essencial de *C. adamantium* pesquisado por Coutinho *et al.* (2009), extraído de folha durante os estágios de floração e frutificação, demonstrou alta atividade contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho e os estudos publicados com espécies do gênero *Campomanesia*, verificou-se que *C. guazumifolia* apresenta atividade antimicrobiana, sendo necessários estudos complementares empregando-se diferentes concentrações e metodologias para elucidação do potencial antimicrobiano.

4.3.2 Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

O extrato etanólico bruto e as respectivas frações de folha e caule foram submetidos ao teste de toxicidade frente a *Artemia salina*. Os resultados estão resumidos na TABELA 4, na qual se observa que não houve mortalidade significativa, indicando a ausência de toxicidade do extrato etanólico bruto e frações tanto de folha como de caule, para náuplios do microcrustáceo.

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, FRENTE A *Artemia salina*

AMOSTRA	MORTALIDADE / CONCENTRAÇÃO *			DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança de 95% (µg/mL)
	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL		
FEB	1	5	0	> 1000	-
FHEX	0	1	0	> 1000	-
FDIC	8	6	0	> 1000	-
FACE	4	5	4	> 1000	-
FHID	3	2	0	> 1000	-
CEB	0	9	3	> 1000	-
CHEX	0	0	2	> 1000	-
CDIC	9	3	1	> 1000	-
CACE	3	6	3	> 1000	-
CHID	3	4	1	> 1000	-
Etanol (controle -)	0	0	0	> 1000	-
Sulfato de quinidina (controle +)	3	26	85	177,38	139,9 - 229,9

LEGENDA: * n= 30 NÁUPLIOS EM TRIPLICATA, FEB- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA, FHEX- FRAÇÃO HEXANO DE FOLHA, FDIC- FRAÇÃO DICLOROMETANO DE FOLHA, FACE- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA, FHID- FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA, CEB- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE CAULE, CHEX- FRAÇÃO HEXANO DE CAULE, CDIC- FRAÇÃO DICLOROMETANO DE CAULE, CACE- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE, CHID- FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE CAULE

Em pesquisas conduzidas com espécies do gênero *Campomanesia*, os autores Ramos, Cardoso e Yamamoto (2007) demonstraram que o extrato hexano de folha de *C. adamantium* não apresentou toxicidade nesse ensaio. Todavia, segundo Silva (2011), a espécie *C. xanthocarpa* foi testada pelo mesmo método e os extratos hexano e acetato de etila de folha apresentaram-se tóxicos ao microcrustáceo em concentrações acima de 71 µg/mL.

A ausência de toxicidade foi um resultado determinante para a realização dos estudos farmacológicos *in vivo* realizados na sequência, com extratos de *C. guazumifolia*.

4.3.3 Análise da atividade hemolítica *in vitro*

4.3.3.1 Atividade hemolítica em placas

O teste de atividade hemolítica em placas foi realizado com o extrato etanólico bruto e as respectivas frações de folha e caule, exceto com a fração acetato de etila de caule devido ao baixo rendimento na sua obtenção. O controle positivo (saponina) apresentou halo de hemólise de 17 mm de diâmetro, enquanto que as demais amostras não exibiram atividade hemolítica.

4.3.3.2 Atividade hemolítica em tubos

O ensaio de atividade hemolítica em tubos foi realizado com o extrato etanólico bruto e as frações de folha e caule, exceto com a fração hexano de caule, a qual não foi solúvel em tampão salina-fosfato (PBS). A fração hexano obtida de folha foi diluída em DMSO a 2% em PBS e um controle foi realizado apenas com a solução solvente para descartar a interferência da mesma. De modo similar ao ensaio de hemólise em placas, não foi observada atividade hemolítica para as concentrações testadas do extrato etanólico bruto e frações de folha e caule.

Em ensaio conduzido com extratos de folha de *C. xanthocarpa*, Desoti *et al.* (2011) relataram atividade hemolítica significativa, uma vez que o extrato hexano resultou em 25% de hemólise na concentração de 250 µg/mL, o extrato acetato de

etila apresentou 25% de hemólise na concentração de 500 µg/mL e esta mesma porcentagem de atividade hemolítica foi observada para o extrato metanólico na concentração de 1000 µg/mL. Supõe-se que tais ocorrências de atividade hemolítica estejam relacionadas às diferenças na composição química de cada espécie.

Assim como o teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, os testes de atividade hemolítica indicaram segurança na condução de ensaios farmacológicos *in vivo* com amostras provenientes de *C. guazumifolia*.

4.3.4 Avaliação da motilidade gastrointestinal *in vivo*

4.3.4.1 Esvaziamento gástrico de semissólidos

Para avaliar o esvaziamento gástrico, foi determinada a quantidade do marcador colorido que permaneceu no estômago após o período do experimento, pela leitura da absorbância em espectrofotômetro. O conteúdo gástrico de cada animal foi quantificado e os resultados expressos como média \pm desvio padrão de microgramas de marcador colorido por mililitro de conteúdo gástrico (µg/mL conteúdo gástrico) (GRÁFICO 16).

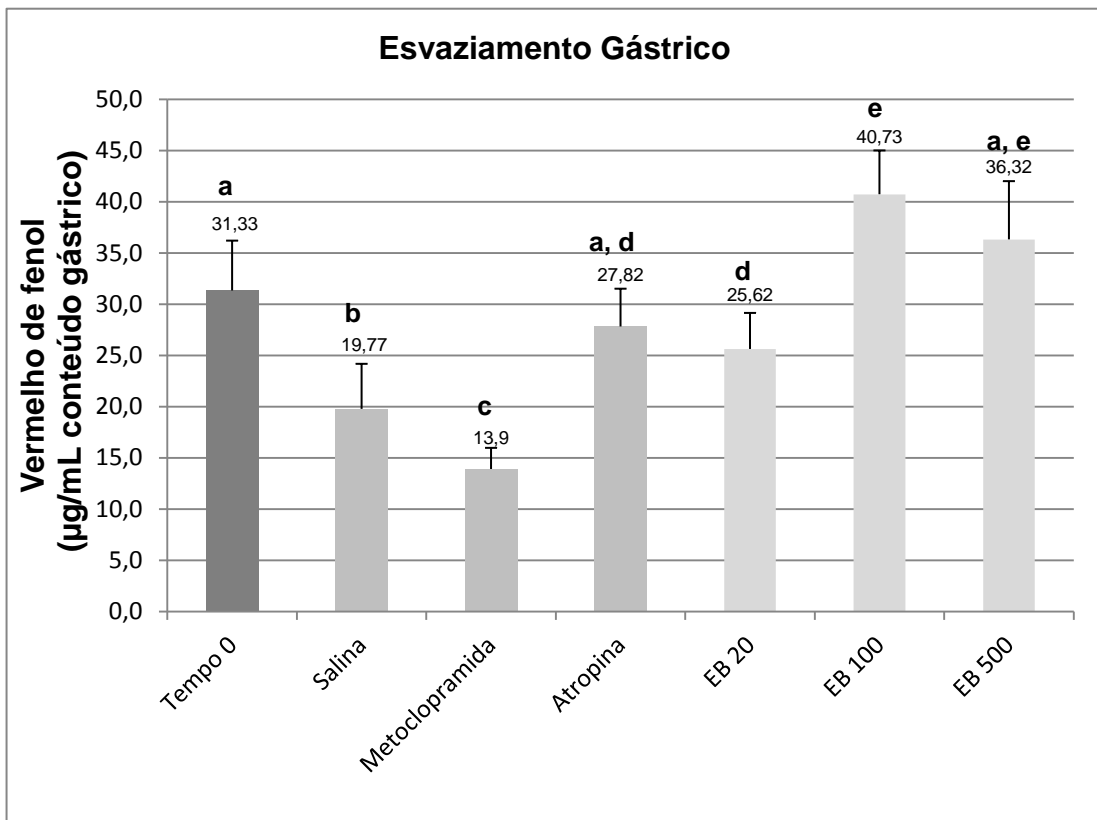


GRÁFICO 16. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA, METOCLOPRAMIDA E ATROPINA SOBRE O Esvaziamento GÁSTRICO DE SEMISSÓLIDOS. LEGENDA: EB 20- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 20 mg/kg, EB 100- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 100 mg/kg, EB 500- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 500 mg/kg. LETRAS IGUAIS INDICAM DADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

De acordo com o esperado, o controle metoclopramida (30 mg/kg, VO) promoveu aumento do esvaziamento gástrico e o grupo controle tratado com atropina (3 mg/kg, SC) teve o esvaziamento gástrico reduzido.

Em relação aos extratos de *C. guazumifolia*, a dose de 20 mg/kg foi capaz de reduzir o esvaziamento gástrico, igualando-se estatisticamente à atropina, sendo que essa redução foi mais expressiva nas doses de 100 e 500 mg/kg, que se assemelharam ao resultado obtido para o controle tempo 0, não havendo diferença estatística. Tal resultado pode significar o suporte ao uso popular da espécie vegetal com o propósito de reduzir a diarreia.

4.3.4.2 Trânsito intestinal

Para a avaliação do trânsito intestinal, foi medida a distância percorrida pelo marcador colorido no intestino delgado, calculando-se sua porcentagem em relação ao intestino delgado total. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (GRÁFICO 17).

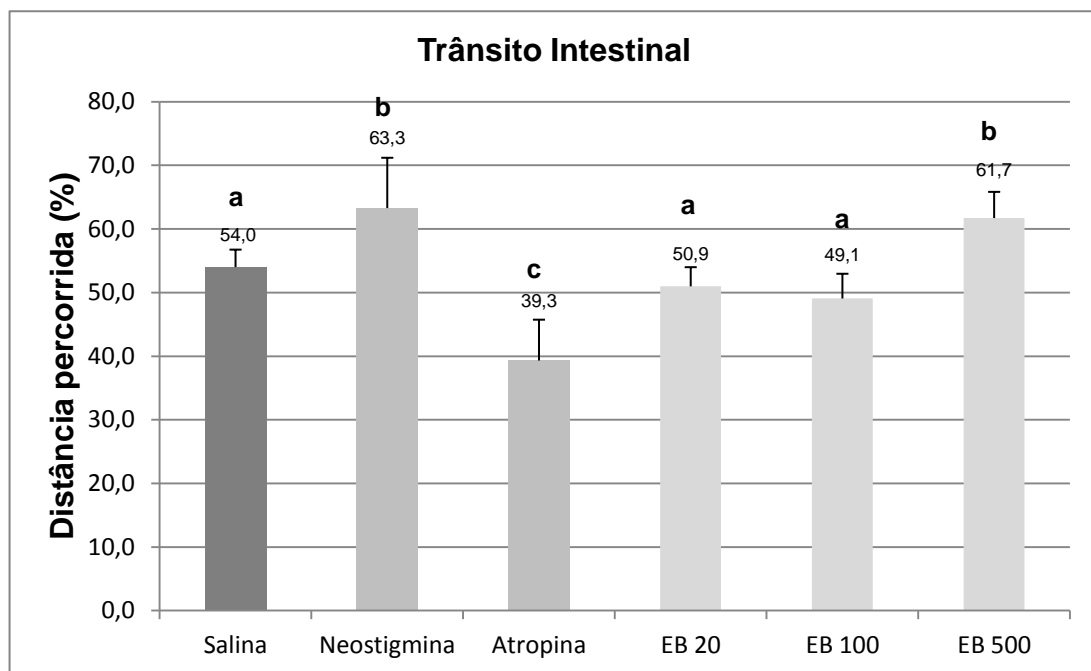


GRÁFICO 17. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA, NEOSTIGMINA E ATROPINA SOBRE O TRÂNSITO INTESTINAL. LEGENDA: EB 20- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 20 mg/kg, EB 100- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 100 mg/kg, EB 500- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 500 mg/kg. LETRAS IGUAIS INDICAM DADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

Como previsto, no grupo controle tratado com neostigmina (20 μ g/kg, SC) ocorreu um aumento do trânsito intestinal e no grupo controle tratado com atropina (3 mg/kg, SC) houve redução da taxa de trânsito intestinal, ambos em comparação com o grupo controle tratado com solução salina.

Os grupos tratados com as doses de 20 e 100 mg/kg do extrato etanólico bruto de folha não apresentaram alteração no trânsito intestinal, sendo a distância percorrida pelo marcador vermelho de fenol no intestino similar estatisticamente àquela observada para o grupo tratado com solução salina. No entanto, o grupo tratado com a dose do extrato de 500 mg/kg demonstrou aumento do trânsito intestinal, em proporção similar ao ocorrido no grupo tratado com neostigmina.

Acredita-se que tal efeito tenha ocorrido devido à possível presença e concentração de substâncias oleosas na amostra, facilitando o trânsito intestinal. Ainda, essa ação de redução do esvaziamento gástrico e aumento da motilidade intestinal pode ter mecanismo semelhante ao da morfina, a qual aumenta o tônus e as contrações rítmicas do intestino mas possui efeito global constipante, devido à contração dos esfíncteres pilórico, ileocólico e anal (RANG *et al.*, 2004). Essas suposições necessitam de estudos adicionais para confirmação.

Souza-Moreira *et al.* (2011) analisaram a atividade sobre a motilidade gastrointestinal do extrato etanólico de fruto de *C. xanthocarpa* e reportaram que na dose testada (1000 mg/kg) não houve alteração do trânsito intestinal.

Na presente análise, a redução do esvaziamento gástrico, promovida pela administração do extrato de *C. guazumifolia* nas doses de 500, 100 e 20 mg/kg, pode estar relacionada com a redução da diarreia, distúrbio para o qual o emprego da planta é indicado popularmente. Porém, são necessários estudos para avaliar o mecanismo de ação dos extratos, bem como sua atuação em estados patológicos, como em modelos de diarreia induzida.

4.3.5 Avaliação da atividade protetora gástrica *in vivo*

As lesões hemorrágicas provocadas pelo álcool foram quantificadas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem de lesões em relação à área total do estômago (GRÁFICO 18).

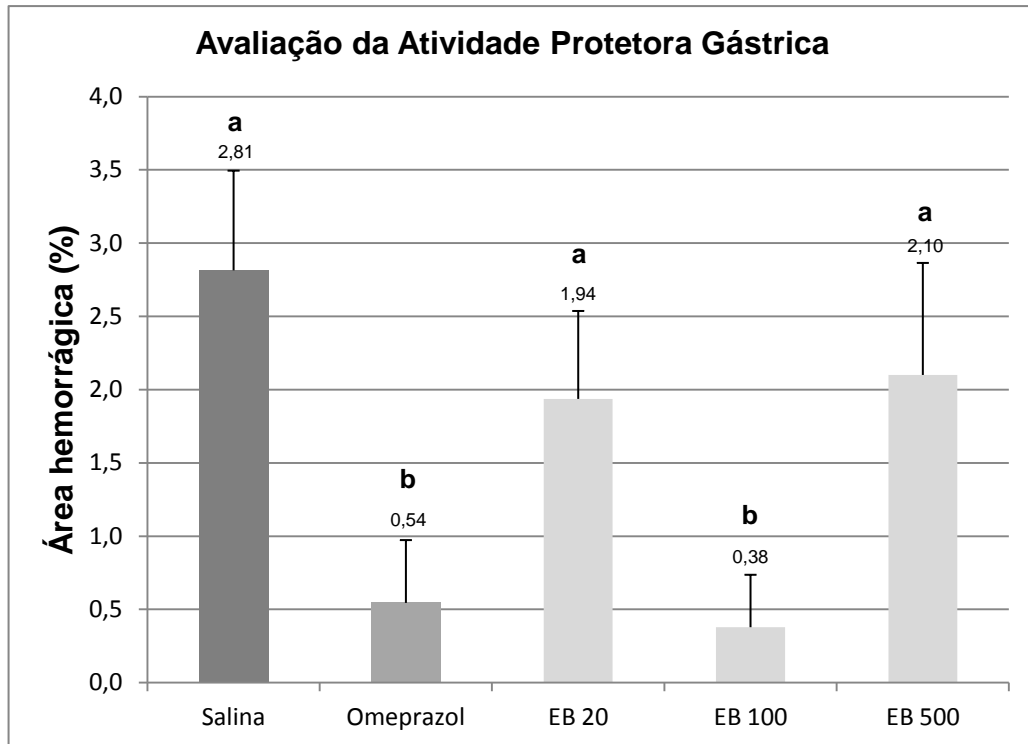


GRÁFICO 18. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE PROTETORA GÁSTRICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DOS CONTROLES SOLUÇÃO SALINA E OMEPRAZOL. LEGENDA: EB 20- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 20 mg/kg, EB 100- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 100 mg/kg, EB 500- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 500 mg/kg. LETRAS IGUAIS INDICAM DADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

Em relação ao grupo controle solução salina, o omeprazol reduziu a porcentagem de lesões hemorrágicas, como era previsto. O extrato etanólico bruto na dose de 100 mg/kg apresentou porcentagem de lesões estatisticamente igual ao controle omeprazol. Em contrapartida, nas doses de 20 e 500 mg/kg a porcentagem de lesões foi estatisticamente similar à da solução salina, não havendo redução do dano tecidual causado pelo etanol.

Markman, Bacchi e Kato (2004) demonstraram o efeito antiulcerogênico do extrato hidroalcoólico de folha de *C. xanthocarpa*, em modelos de úlcera induzida por ácido clorídrico em associação com etanol, em que a dose de 400 mg/kg apresentou índice de proteção gástrica semelhante ao do misoprostol, substância usada no tratamento e prevenção de úlceras gástricas. Adicionalmente, esses autores sugeriram que o efeito observado pode estar relacionado à presença de flavonoides e taninos no extrato utilizado. Madalosso *et al.* (2012) reportaram que o extrato etanólico de folha de *C. lineatifolia* apresentou atividade protetora gástrica em experimentos de indução de úlcera por etanol e por indometacina e

correlacionaram esse efeito à atividade antioxidante do extrato e à presença de compostos fenólicos.

No presente estudo, observou-se potencial atividade protetora gástrica na dose de 100 mg/kg do extrato etanólico bruto de folha de *C. guazumifolia*. Sabendo-se que as propriedades antioxidantes dos flavonoides podem estar intimamente relacionadas à atividade antiulcerogênica (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002), acredita-se que os efeitos observados estejam ligados ao composto antioxidante miricitrina, presente no vegetal juntamente com outros compostos antioxidantes, os quais provavelmente estiveram em baixa quantidade na menor dose e, na maior dose, pela solução apresentar-se muito viscosa, sua disponibilidade foi reduzida.

4.3.5.1 Determinação do índice de peroxidação lipídica em modelo de úlcera induzida por etanol

Para a determinação do índice de peroxidação lipídica nos tecidos gástricos oriundos do experimento de proteção gástrica, utilizou-se o método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados obtidos foram expressos em porcentagem de TBARS por μg de proteínas, em que o grupo controle solução salina foi considerado como 100% de peroxidação lipídica (GRÁFICO 19).

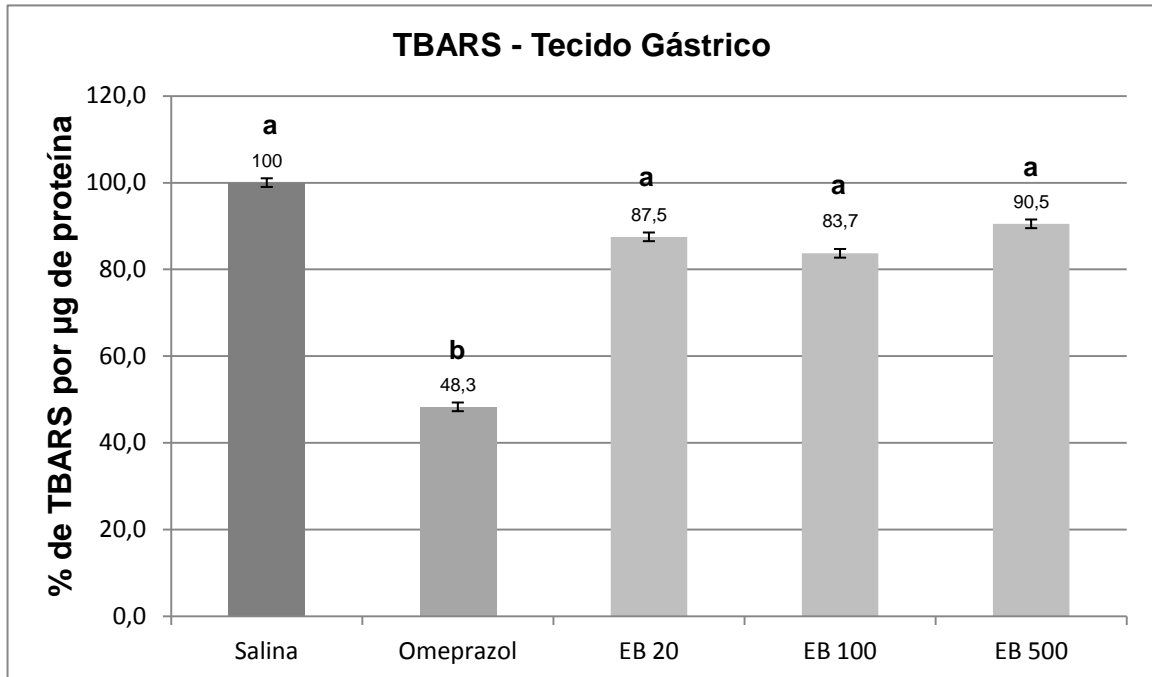


GRÁFICO 19. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. BERG, MYRTACEAE, E DO CONTROLE OMEPRAZOL SOBRE O ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS TECIDOS GÁSTRICOS ORIUNDOS DO EXPERIMENTO DE ÚLCERA INDUZIDA POR ETANOL. LEGENDA: EB 20- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 20 mg/kg, EB 100- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 100 mg/kg, EB 500- EXTRATO ETANÓLICO BRUTO 500 mg/kg. LETRAS IGUAIS INDICAM DADOS ESTATISTICAMENTE IGUAIS (DIFERENÇA ESTATÍSTICA CONSIDERADA PARA $p < 0,05$)

Não houve diferença estatística observada entre o grupo controle solução salina e os grupos que receberam as doses do extrato e, como esperado, o grupo controle tratado com omeprazol apresentou redução na taxa de TBARS.

Embora Naito *et al.* (1998) tenham relatado que o aumento da área das lesões hemorrágicas está intimamente relacionado com a acumulação de TBARS, no presente estudo não foi possível indicar a relação entre a proteção gástrica ocasionada pelo extrato na dose de 100 mg/kg e a porcentagem de TBARS nesse grupo. No ensaio realizado *in vitro*, pelo método TBARS utilizando-se gema de ovo, observou-se que o extrato etanólico bruto e frações de folha apresentaram índice de redução da peroxidação lipídica menos efetivo que aquele constatado para o extrato e as frações provenientes de caule. Com isso, supõe-se que essa atividade protetora gástrica envolva mecanismos de ação diferentes da inibição da peroxidação lipídica, sendo necessários estudos mais específicos.

5 CONCLUSÃO

A espécie *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae, apresentou características morfoanatômicas condizentes àquelas descritas em literatura para a espécie, além dos aspectos comuns ao gênero e à família. Adicionalmente, foram relatadas estruturas ainda não descritas, como a dimensão dos cristais prismáticos de oxalato de cálcio no mesofilo foliar e a organização estrutural do caule. Neste, em estrutura secundária inicial, foi observado que a epiderme é persistente, o felogênio origina-se nos estratos de posição mediana do córtex e o cilindro vascular é constituído de floema externo, xilema e floema interno, sendo percorrido por raios estreitos. Ocorrem idioblastos contendo cristais primáticos e drusas de oxalato de cálcio. Os resultados obtidos a partir do estudo morfoanatômico constituem um parâmetro relevante na identificação e na condução segura para utilização da espécie como droga vegetal.

Na prospecção fitoquímica foram detectados glicosídeos flavônicos, iridoides, esteroides e/ou triterpenoides e saponinas em extratos de folha e caule, bem como taninos em extrato de folha e leucoantocianidinas em extrato de caule. Foi isolado um composto da fração acetato de etila de folha, o qual foi identificado como miricitrina.

Pela análise da atividade antioxidante foi constatado alto potencial para as frações acetato de etila provenientes de folha e caule, que exibiram IC₅₀ similar estatisticamente aos padrões utilizados (vitamina C e rutina) pelo método do DPPH e apresentaram porcentagem de atividade antioxidante relativa à vitamina C, maior do que à do padrão rutina utilizado no método do complexo fosfomolibdênio. Pelo método TBARS, o extrato etanólico bruto e as frações de caule mostraram atividade contra a peroxidação lipídica semelhante à apresentada pelo padrão BHT. Tais resultados demonstraram que o material vegetal possui importante capacidade antioxidante.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato etanólico bruto e as frações acetato de etila e hidroalcoólica de folha reduziram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, a fração hidroalcoólica de folha também foi eficaz contra *Salmonella* Typhimurium. Para as amostras provenientes de caule, o extrato etanólico bruto reduziu o crescimento de *Candida albicans* e a fração acetato de etila apresentou-se eficiente contra *S. epidermidis*.

As amostras tanto de folha como de caule não exibiram toxicidade frente a *Artemia salina* e não apresentaram atividade hemolítica. Os resultados negativos nesses ensaios preliminares de toxicidade foram determinantes para a condução de ensaios farmacológicos *in vivo*.

Em ensaios farmacológicos conduzidos com modelos animais, detectou-se ação do extrato etanólico bruto de folha sobre a motilidade gastrointestinal, o qual exibiu redução do esvaziamento gástrico de semissólidos nas três doses testadas, característica que pode estar relacionada com seu emprego popular no combate à diarreia. Além disso, dando suporte ao uso popular da planta em distúrbios gástricos, o mesmo extrato, na dose de 100 mg/kg, foi capaz de proteger a mucosa gástrica das lesões causadas pela administração de etanol, em experimento para avaliação da atividade antiulcerogênica, numa proporção similar estatisticamente a do controle omeprazol. Pelo método TBARS, empregado nesses tecidos gástricos, constatou-se que tal ação protetora do extrato não está ligada à sua atividade sobre a peroxidação lipídica.

Os resultados morfoanatômicos, fitoquímicos e biológicos obtidos no presente estudo enriquecem o conhecimento científico de forma a contribuir com a identificação e a seleção dessa espécie nativa da flora brasileira como potencial droga vegetal.

REFERÊNCIAS

- ADATI, R. T. **Estudo biofarmacognóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum, Myrtaceae**. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- ANVISA. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.
- BARBOSA, J. ***Campomanesia lineatifolia* Ruiz et Pav.: estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante**. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1984. v. 2.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.
- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 93, n. 2/3, p. 385-389, 2004.
- BONILLA, A.; DUQUE, C.; GARZÓN, C.; TAKAISHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, New York, v. 66, n. 14, p. 1736-1740, 2005.
- BOTREL, R. T.; RODRIGUES, L. A.; GOMES, L. J.; CARVALHO, D. A.; FONTES, M. A. L. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 143-156, 2006.
- BRACK, P.; KINUPP, V. F.; SOBRAL, M. E. G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, p. 1769-1772, 2007.
- BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRANDÃO, M. Plantas medicamentosas do cerrado mineiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 15-20, 1991.

CARDOSO, C. L.; KATAOKA, V. M. F.; RÉ-POPPI, N. Identification of the volatile compounds of flowers of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg and *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 3, p. 254-256, 2010a.

CARDOSO, C. L.; KATAOKA, V. M. F.; RÉ-POPPI, N. Leaf oil of *Campomanesia sessiliflora* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 4, p. 303-304, 2010b.

CARDOSO, C. M. V.; PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Foliar anatomy of the subfamily Myrtoideae (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, East Melbourne, v. 57, p. 148-161, 2009.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 657-669, 2006.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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

CÓRDOVA, M. M.; WERNER, M. F. P.; SILVA, M. D.; RUANI, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 495, p. 173-177, 2011.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; RÉ-POPPI, N.; MELO, A. M.; VIEIRA, M. C.; HONDA, N. K.; COELHO, R. G. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 767-776, 2009.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008.

COUTINHO, I. D.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; COELHO, R. G.; VIEIRA, M. C.; CARDOSO, C. A. L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 322-327, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrate system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DORIGONI, P. A.; GHEDINI, P. C.; FRÓES, L. F.; BAPTISTA, K. C.; ETHUR, A. B. M.; BALDISSEROTTO, B.; BÜRGER, M. E.; ALMEIDA, C. E.; LOPES, A. M. V.; ZÁCHIA, R. A. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil, I – relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 69-79, 2001.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, 2010.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. p. 263-288.

FB 5 - **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acesso em: 21/03/2012.

FERREIRA, L. C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; SOUZA-FILHO, J. D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 145, p. 100-108, 2013.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University, 1956.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 177-190, 2004.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; GOMES-BEZERRA, K. M.; MIRANDA, S. C.; DE-CARVALHO, P. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuição à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

HAYDER, N.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; KADRI, M.; STEIMAN, R.; GUIRAUD, P.; MARIOTTE, A. M.; GHEDIRA, K.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 22, p. 567-581, 2008.

HESKES, A. M.; GOODGER, J. Q. D.; TSEGAY, S.; QUACH, T.; WILLIAMS, S. J.; WOODROW, I. E. Localization of oleuropeyl glucose esters and flavanone to secretory cavities on Myrtaceae. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. 1-9, 2012.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 16, n. 1/2, p. 1-26, 1974.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 139, p. 1-21, 2002.

ISHIKAWA, T.; DONATINI, R. S.; DIAZ, I. E. C.; YOSHIDA, M.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 118, n. 3, p. 527-529, 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985.

KAWASAKI, M. L.; LANDRUM, L. R. A rare and potentially economic fruit of Brazil: Cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae). **Economic Botany**, Lancaster, v. 51, n. 4, p. 403-405, 1997.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, n. 2, p. 299-305, 2010.

KLUCKING, E. P. **Leaf venation patterns: Myrtaceae**. Berlin: J. Cramer, 1988. v. 3.

KÖRBES, C. V. **Manual de plantas medicinais: 6460 receitas botânicas**. 38. ed. Francisco Beltrão: ASSESOAR, 1990.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.

KRUPEK, R. A.; LIMA, A. G. Variação na estrutura foliar de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) sob diferentes condições de luminosidade em um remanescente de floresta ombrófila mista. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 2, p. 293-305, 2012.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, New York, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das plantas vasculares**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1977. v. 2.

LEGRAND, D. C.; KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense: Mirtáceas**. Itajaí: P. Raulino Reitz, 1977/1978.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; SOBRAL, M.; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C. Aromatic plants from Brazil - Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 13, n. 2, p. 113-115, 2001.

LIU, J.; YEO, H. C.; DANIGER, S. J.; AMES, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 245, p. 161-166, 1997.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998. v. 2.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, N. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADALOSSO, R. C.; OLIVEIRA, G. C.; MARTINS, M. T.; VIEIRA, A. E. D.; BARBOSA, J.; CALIARI, M. V.; CASTILHO, R. O.; TAGLIATI, C. A. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz et Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 139, p. 772-779, 2012.

MANAHARAN, T.; APPLETON, D.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, p. 1802-1807, 2012.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil: Guarani, Kaingang, Xokleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayua**. 290 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-130, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, 1950. v. 1, p. 620-631.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS-NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; TEMPONI, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 143, p. 631-638, 2012.

MÜLLER, N. T. G.; FASOLO, D.; BERTÊ, R.; ELY, C. V.; HOLZ, D. T. Análise fitoquímica das folhas de Myrtaceae: *Psidium cattleianum* Sabine e *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg. **Vivências**, Erechim, v. 8, n. 14, p. 65-71, 2012.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; MATSUYAMA, K.; YAGI, N.; ARAI, M.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 24, n. 3, p. 494-502, 1998.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 49, p. 503-515, 2010.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991.

OLIVEIRA, M. I. U.; FUNCH, L. S.; SANTOS, F. A. R.; LANDRUM, L. R. Aplicação de caracteres morfoanatómicos foliares na taxonomia de *Campomanesia* Ruiz et Pav. (Myrtaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 455-456, 2011.

OSORIO, C.; ALARCON, M.; MORENO, C.; BONILLA, A.; BARRIOS, J.; GARZON, C.; DUQUE, C. Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* Ruiz et Pav.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 2, p. 509-516, 2006.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PEREIRA, C.; AGAREZ, F. V. **Botânica: taxonomia e organografia dos Angiospermae: Chaves para identificação de famílias**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1980.

PEREIRA, M.; SIBA, I. P.; CHIOCA, L. R.; CORREIA, D.; VITAL, M. A. B. F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; ANDREATINI, R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 35, p. 1636-1644, 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, p. 337-341, 1999.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L.; YAMAMOTO, N. T. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 774-776, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The world medicines situation 2011** - traditional medicines: global situation, issues and challenges. 3. ed. Geneva: WHO, 2011.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

SANQUETTA, C. R.; FERNANDES, L. A. V.; MIRANDA, D. L. C.; MOGNON, F. Inventário de plantas fornecedoras de produtos não madeireiros da floresta ombrófila mista no Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 5, p. 359-369, 2010.

SANTOS, M. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. H. I.; CÂNDIDO, L. M. B. Polissacarídeos extraídos da gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): propriedades químicas e perfil reológico. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 20, número especial, p. 352-358, 2010.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SCARPIGNATO, C.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, Gent, v. 246, n. 2, p. 286-294, 1980.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, Milan, v. 66, n. 4, p. 373-374, 1995.

SHEN, C. J.; CHEN, C. K., LEE, S. S. Polar constituents from *Sageretia thea* leaf characterized by HPLC-SPE-NMR assisted approaches. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Beijing, v. 56, p. 1002-1009, 2009.

SILVA, E. P.; VILAS-BOAS, E. V. B.; RODRIGUES, L. J.; SIQUEIRA, H. H. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 803-809, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, J. R. M.; CARDOSO, C. A. L.; RÉ-POPPI, N. Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, Moscow, v. 45, n. 4, p. 565-567, 2009.

SILVA, R. O. **Avaliação da toxicidade, atividades antioxidante e antibacteriana e teores de fenóis e flavonoides de extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa***. 26 p. Monografia (Licenciatura em Química) – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2010. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010316>>. Acesso em: 17/12/2012.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010. p. 289-326.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, p. 135-143, 2004.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALVAGNINI, L. E.; SANTOS, E.; SILVA, V. Y. A.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 14, n. 5, p. 528-531, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Review – Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, Zürich, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, n. 3, p. 582-583, 1959.

THEODOLUZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 24, p. 179-183, 1988.

THE PLANT LIST (2010). Version 1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em 17/12/2012.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

VALLILO, M. I., MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA E.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L. Chemical composition of *Campomanesia xanthocarpa* Berg – Myrtaceae fruit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 (supl.), p. 231-237, 2008.

VINAGRE, A. S.; RÖNNAU, A. D. S. R. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WIILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

WHO - **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1998.

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 674 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Atividade gastroprotetora e motilidade gastrointestinal do extrato alcóólico de campomanesia guazumifolia

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patricia Maria Stuelp Campelo

EQUIPE DE PESQUISA:

Patricia Maria Stuelp Campelo, Natan Vinicius Bueno de Meira, Karina Lorena Meira Fernandes, Maria Fernanda Cordeiro

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Farmácia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Camundongos Albinos Suiços	Machos	60 dias / 25-30g	C	127
Ratos	Fêmeas	Jovens / 200-300g	C	24

O colegiado do CEUA em reunião no dia 16/02/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser




ANEXO

mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof.ª Graçinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

