

WALDEMAR DE PAULA JÚNIOR

**Atividades Biológicas *in vitro* de Extratos Hidroetanólicos
de Folhas e do Mesocarpo Interno de
Caryocar brasiliense Cambess**

CURITIBA
2004

WALDEMAR DE PAULA JÚNIOR

**Atividades Biológicas *in vitro* de Extratos Hidroetanólicos
de Folhas e do Mesocarpo Interno de
Caryocar brasiliense Cambess**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração em Análises Clínicas do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Almeriane M. Weffort-Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Cyntia M. T. Fadel-Picheth

CURITIBA
2004

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, em especial a (ao)...

Deus, pela condução e amparo em todos os momentos;

Profa. Almeriane, pela paciência, disposição e pela grandiosa orientação;

Profa. Cyntia, pela atenção, apoio e ilustre co-orientação;

Prof. Cid, pela imensurável ajuda em todo o tempo de desenvolvimento deste;

Minha família, pelo apoio e orações;

Todos os meus amigos, em especial, Leandro, Carla Cilene, Rosivaldo, Luciano, Adângela, Sarah e Rodrigo, pela força e amizade;

Fabiana, pela contribuição na realização dos experimentos;

Drogaria Minas-Brasil, pela inestimável amizade e ajuda financeira;

Rosângela, pela imprescindível colaboração nos ensaios antifúngicos;

Profa. Lucélia Donatti, pela indispensável e brilhante colaboração nos ensaios de microscopia eletrônica;

Irene, Celene, Geni e D. Maria, pela atenção e valiosíssima ajuda;

Laboratório de Leishmania do René Rachou, em BH, pela doação da cepa de Leishmania;

Serviço de Análises Clínicas do HCUFPR, pelo espaço cedido, bem como, todos os laboratórios que me emprestaram ou cederam material;

Pessoal do laboratório de farmacognosia, pela acolhida e solução de alguma dúvida;

Prof. Rogério, pelo empréstimo do equipamento fotográfico;

Professores do Programa, pela oportunidade e ensinamentos;

Colegas do Programa, pelo companheirismo e amizade;

UNIMONTES e FUNORTE, pela viabilização da minha ausência;

Dra. Libera, pelas cepas bacterianas e antibióticos;

Farmacêutica Maria Matilde ZraiK e Dr. Flávio Telles, pela doação da anfotericina B e do fluconazol;

CEMEPAR, pela doação do glucantime;

Maria Luiza, pela doação de meio de cultura;

Prof. Fontana e pessoal do laboratório, pelas liofilizações;

Meus alunos, pela compreensão e paciência na modulação das aulas;

Laboratório de botânica da UNIMONTES, pela ajuda na confecção da exsicata;

Prof. Olavo, pela identificação botânica;

Profa. Maria Suely, pelo acesso aos equipamentos;

Profa. Ruth Schadeck, pela utilização do Centro de Microscopia Eletrônica;

Muito obrigado!

“A pomba que, por medo do gavião, se recusasse a sair do ninho, já se teria perdido no próprio ato de fugir do gavião. Porque o medo lhe teria roubado aquilo que de mais precioso existe num pássaro: o vôo. Quem, por medo do terrível, prefere o caminho prudente de fugir do risco, já nesse ato estará morto. Porque o medo lhe terá roubado aquilo que de mais precioso existe na vida humana: a capacidade de se arriscar para viver o que se ama.”

Rubem Alves

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Compostos fenólicos.....	4
1.1.1. Flavonóides.....	4
1.1.2. Lectinas.....	5
1.1.3. Óleos essenciais.....	6
1.1.4. Saponinas.....	7
1.1.5. Taninos.....	7
1.2. <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess, Caryocaraceae.....	8
1.2.1. Posição taxonômica e distribuição geográfica.....	8
1.2.2. Importância e constituintes nutricionais.....	9
1.2.3. Utilização na medicina tradicional e atividades biológicas.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICOS.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Equipamentos, reagentes e soluções.....	17
3.1.1. Equipamentos.....	17
3.1.2. Reagentes.....	17
3.1.3. Soluções.....	17
3.2. Material botânico.....	18
3.3. Extratos.....	19
3.4. Abordagem fitoquímica.....	19
3.4.1. Pesquisa de alcalóides.....	20
3.4.2. Pesquisa de flavonóides.....	20
3.4.3. Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos.....	20
3.4.4. Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos.....	20
3.4.5. Pesquisa de óleos essenciais.....	21

3.4.6. Pesquisa de saponinas.....	21
3.4.7. Pesquisa de taninos.....	21
3.4.8. Pesquisa preliminar de compostos com potencial antioxidante.....	21
3.5. Ensaio para determinação da capacidade antioxidante.....	22
3.5.1. Inibição da formação de metahemoglobina induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina em eritrócitos humanos	22
3.5.1.1. Determinação da concentração de hemoglobina.....	22
3.5.1.2. Determinação dos fatores FA, FB e FD.....	23
3.5.1.3. Obtenção das amostras.....	24
3.5.1.4. Determinação de metahemoglobina.....	24
3.5.2. Redução do radical DPPH*.....	25
3.5.3. Redução do complexo fosfomolibdênio.....	25
3.5.4. Poder redutor.....	26
3.6. Atividade sobre o crescimento bacteriano.....	26
3.6.1. Reativação da viabilidade e competência dos microrganismos.....	26
3.6.2. Teste de difusão em ágar.....	27
3.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	27
3.7. Influência no crescimento de células fúngicas.....	28
3.8. Atividade sobre o crescimento <i>in vitro</i> de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
3.8.1. Manutenção dos microrganismos.....	29
3.8.2. Viabilidade dos microrganismos.....	29
3.8.3. Atividade leishmanicida.....	29
3.8.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
3.9. Estudo estatístico.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Rendimento e solubilidade dos extratos.....	31
4.2. Abordagem fitoquímica.....	32
4.3. Capacidade antioxidante.....	33
4.3.1. Inibição da formação da metahemoglobina.....	33
4.3.1.1. Determinação da metahemoglobina.....	33
4.3.2. Redução do radical DPPH*.....	35
4.3.3. Redução do complexo fosfomolibdênio.....	38
4.3.4. Poder redutor.....	38

4.4. Atividade sobre a proliferação de bactérias.....	40
4.5. Influência no crescimento de células fúngicas.....	43
4.6. Atividade sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	49
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAR	- Atividade antioxidante relativa
Abs	- Absorvância
ADN	- Ácido desoxiribonucléico
ANOVA	- Análise de variância
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CH ₃ CO ₂ H	- Ácido acético
Cu(AcO) ₂	- Acetato de cobre
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DO	- Densidade óptica
DOA	- Densidade óptica A
DOB	- Densidade óptica B
DOD	- Densidade óptica D
DOP	- Densidade óptica do padrão
DOT	- Densidade óptica do teste
DPPH [•]	- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
E1	- Extrato de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess a 1mg/ml
E1,5	- Extrato de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess a 1,5mg/ml
E2	- Extrato de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess a 2mg/ml
EDTA-K ₃	- Etilenodiaminotetracetato tripotássico
ELISA	- <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FA	- Fator A
FB	- Fator B
FD	- Fator D
FeCl ₃	- Cloreto férrico
GAP31	- <i>Gelonium anti-HIV protein of 31 kDa</i>
GATI	- Gatifloxacina
Hb	- Hemoglobina
HCl	- Ácido clorídrico
HIV	- <i>Human immunodeficiency virus</i>
K ₂ HPO ₄	- Fosfato de potássio dibásico
K ₃ [Fe(CN) ₆]	- Ferricianeto de potássio

KH_2PO_4	- Fosfato monobásico de potássio
MAP30	- <i>Momordica anti-HIV protein of 30 kDa</i>
MERO	- Meropenem
MetaHb	- Metahemoglobina
MIC	- Concentração inibitória mínima
Na_2HPO_4	- Fosfato dissódico
NaCl	- Cloreto de sódio
NaCN	- Cianeto de sódio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	- Fosfato monossódico di-hidratado
NaOH	- Hidróxido de sódio
NCCLS	- <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
p/v	- Peso por volume
$\text{Pb}(\text{AcO})_2$	- Acetato de chumbo
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
pH	- Potencial hidrogeniônico
rpm	- Rotações por minuto
RPMI	- <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SUT	- Sulfametoxazol e trimetoprima
TICA	- Ticarcilina e ácido clavulônico
TSA	- <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	- <i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	- Unidades formadoras de colônias
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
v/v	- Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.....	10
FIGURA 2 – Influência do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre a formação de metahemoglobina induzida pela fenil-hidrazina em eritrócitos humanos.....	33
FIGURA 3 – Influência do extrato do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre a formação de metahemoglobina induzida pela fenil-hidrazina em eritrócitos humanos.....	35
FIGURA 4 – Capacidade antioxidante da vitamina C avaliada pela redução do radical DPPH*.....	37
FIGURA 5 – EC ₅₀ da vitamina C avaliada pela redução do radical DPPH*.....	38
FIGURA 6 – Atividade antioxidante dos extratos das folhas e do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess avaliada pelo teste de redução do complexo fosfomolibdênio.....	39
FIGURA 7 – Atividade antioxidante dos extratos das folhas e do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess avaliada pelo teste de redução do Fe ³⁺	39
FIGURA 8 – Ensaio da concentração inibitória mínima do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess frente <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	42
FIGURA 9 – Atividade do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i>	44
FIGURA 10 – Atividade do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre o crescimento de <i>Cryptococcus neoformans</i>	46
FIGURA 11 – Atividade do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre o crescimento de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	48
FIGURA 12 – Atividade do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> cultivadas <i>in vitro</i>	50
FIGURA 13 – Efeito do extrato das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre a viabilidade de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> <i>in vitro</i>	51
FIGURA 14 – Efeito do extrato das folhas de <i>Cayocar brasiliense</i> Cambess sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após 24h de cultivo.....	52

FIGURA 15 – Efeito do extrato das folhas de *Cayocar brasiliense* Cambess sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 72h de cultivo.....53

FIGURA 16 – Análise topográfica de *Leishmania amazonensis*.....55

FIGURA 17 – Efeito do extrato das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess na topografia de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.....56

FIGURA 18 – Efeito do extrato das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess na topografia de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.....57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Avaliação da integridade do sistema para análise de crescimento/inibição bacteriano.....	27
TABELA 2 – Rendimento e solubilidade dos extratos hidroetanólicos das folhas e do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.....	31
TABELA 3 – Perfil fitoquímico parcial de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.....	32
TABELA 4 – Potencial antioxidante dos extratos das folhas e do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess avaliado pela redução do radical DPPH*.....	36
TABELA 5 – Desempenho do ágar Mueller Hinton sobre o crescimento bacteriano frente a agentes antimicrobianos.....	40
TABELA 6 – Atividade dos extratos das folhas e do mesocarpo interno de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess sobre o crescimento bacteriano.....	41

RESUMO

O contínuo crescimento da incidência de doenças infecciosas e daquelas associadas à produção excessiva de radicais livres, além de serem um grande problema social, é decorrente em muito da ineficácia e dos efeitos adversos da terapia convencional, levando à busca de novos produtos mais efetivos e com maior índice terapêutico. Apesar de pouco estudado, o *Caryocar brasiliense* Cambess, conhecido popularmente como pequi, é uma das principais espécies encontradas no cerrado brasileiro, utilizado principalmente pela população do Brasil central como alimento pelo seu alto valor nutricional e, por outro lado, pelas suas possíveis propriedades medicamentosas. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biológico de extratos hidroetanólicos preparados das folhas e do mesocarpo interno de *C. brasiliense*, enfatizando atividades antioxidantes e antimicrobianas. Para tanto, seu potencial antioxidante foi investigado pelos métodos de inibição da formação da metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina, redução do radical DPPH[•], redução do complexo fosfomolibdênio e pela redução do Fe³⁺. Sua influência sobre o desenvolvimento de colônias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi determinada pelo método de difusão em ágar; sobre os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*, observou-se variações no número de conídios e do meio de cultura, determinado por análise espectrofotométrica. O efeito *in vitro* do extrato das folhas sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi investigado analisando-se o número de células após 24 e 72 horas de cultura em duas concentrações do extrato e pela sua viabilidade, usando-se microscopia de luz convencional e microscopia eletrônica de varredura. Nossos resultados demonstraram que ambos extratos apresentam potencial antioxidante, propriedade pela primeira vez relatada. Entretanto, essa atividade é maior para o extrato das folhas e, dependendo da metodologia empregada, assemelha-se àquelas demonstradas pela vitamina C e rutina, substâncias de notório poder antioxidante. Com relação às atividades sobre microrganismos, somente o extrato das folhas se mostrou eficiente em inibir o crescimento de todas as cepas bacterianas investigadas. Em contraste, esse extrato estimulou significativamente a proliferação de todos os fungos patogênicos estudados. Sua ação sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* demonstrou profundas alterações, não só quanto ao número de parasitas, mas principalmente quanto à sua viabilidade. Estudos mais aprofundados das formas promastigotas por microscopia eletrônica de varredura revelaram alterações no corpo do parasito, ao mesmo tempo em que a estrutura flagelar parece preservada. Embora ensaios mais minuciosos sejam necessários, os resultados contidos neste trabalho confirmam relatos anteriores sobre o pequi, caracterizando-o como uma planta de grande potencial terapêutico. Os resultados aqui contidos servem como uma base preliminar de dados que, com certeza, ajudarão a confirmar a utilidade do pequi e de suas partes para o combate, controle ou mesmo prevenção de doenças.

ABSTRACT

The growing incidence of Infectious diseases and those related to oxidative stress constitute an important problem in public health and may be related to the inadequacy of current therapeutic agents or to their adverse effects, leading to the search for plants with potential medicinal properties. The Caryocar brasiliense Cambess, known popularly as pequi, is one of the commonest species found in the Brazilian cerrado, used mainly by the local folk population as food because of its high nutritional content and medicinal properties. The aim of this work was to investigate the biological potential of the hydroethanolic extracts prepared from the leaves and from the internal mesocarp of the fruits of C. brasiliense, exploring particularly their antioxidant and antimicrobial effects. To achieve this, its antioxidant potential was explored in vitro using the inhibition of metahaemoglobin formation induced by phenylhydrazine in human erythrocytes, the DPPH[•] free radical scavenge capacity, the phosphomolibdenum reduction complex formation, and the ferric reduction. Their influence on the growth and development of Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus colonies was investigated using the agar diffusion test; on Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Paracoccidioides brasiliensis growth, we have analysed the conidia numbers and variations on the culture medium density by spectrophotometry. The in vitro effects of the leaves extract upon promastigotes forms of Leishmania amazonensis was studied by analyzing the number of cells after 24 and 72 hours of culture, and their viability using light and scan electronic microscopies. Our results indicated that both extracts have antioxidant potential, a property described for the first time. However, this effect is higher for the leaves preparation and, according to the methodology employed, comparable to the effects showed by vitamin C and rutin, compounds widely known by their antioxidant power. Concerning to their activity upon microorganisms development, only the leaves extract was effective in inhibiting the bacteria strains tested. In contrast, it has stimulated significantly the proliferation of all pathogenic fungi investigated. The activity of this extract upon L. amazonensis promastigotes forms showed deep alterations, reflected by the significant low number of parasites recovered after incubation, and their poor viability. Further ultra structural studies revealed several alterations on the parasite's body topography, with apparent preservation of the flagellum structure. Although further studies are needed, the results herein presented support previous reports that have characterized the pequi as a plant with relevant therapeutic potential. Also, these results are certainly important as preliminary database to confirm the usefulness of pequi and its parts for the combat, control or even the prevention of infection diseases.