

LORENA FERREIRA GOMES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
ENZIMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Miconia chamissois* Naudin

Brasília, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORENA FERREIRA GOMES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
ENZIMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Miconia chamissois* Naudin

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Yris Maria Fonseca-Bazzo

Brasília

2017

LORENA FERREIRA GOMES

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
ENZIMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Miconia chamissois* Naudin

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dâmaris Silveira (presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Christopher William Fagg

Universidade de Brasília

---

Dr.<sup>a</sup> Paula Monteiro de Souza (suplente)

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, por todo  
incentivo e suporte imensuráveis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter acordado todos os dias desses dois anos com muita saúde. Agradeço a Ele pela oportunidade e por todas as bênçãos a mim concedidas desde sempre.

Agradeço também à Professora Yris Maria Fonseca-Bazzo, por me aceitar como aluna, me apoiar e me orientar. Muito obrigada pela ajuda e dedicação e espero que Deus possa abençoá-la e retribuir sua generosidade.

Agradeço aos meu pais, Maria de Lourdes e Lucídio, pelo encorajamento e suporte durante esse período, pelos conselhos e por não me deixar desanimar. Espero deixá-los mais orgulhosos. Muito obrigada ao meu irmão, Lucas, por me dar exemplos diários de superação e, mesmo sem entender muito bem, sempre me apoiou e demonstrou carinho do seu jeito.

Muito obrigada à Professora Pérola de Oliveira Magalhães pela empolgação, suporte e por mover montanhas por nós, seus alunos. À Professora Dâmaris Silveira pela imensa ajuda e orientação. Ao Professor Christopher Fagg pela disponibilidade, bom humor e por me ajudar no reconhecimento e na coleta da espécie vegetal. À Doutora Paula Souza por aceitar meu convite e fazer parte da banca examinadora e por me ajudar sempre. À professora Yanna Nóbrega e aos seus alunos do Laboratório de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônico-degenerativas e à professora Eliete Guerra do Laboratório de Histopatologia Bucal pela ajuda com os ensaios envolvendo células.

À toda equipe do Laboratório de Produtos Naturais e aos amigos Marcela Freitas, Samuel Cardoso, Larizza Matos, Manuel Mera e Julia Muller, por todo companheirismo, ajuda, disponibilidade e por tornar o laboratório um lugar leve e muito bom de trabalhar. Muito obrigada por todas as aventuras! Patrícia Marques, a pessoa mais paciente e solícita do mundo, muito obrigada por me ajudar e me aturar!

Agradecimento especial para os companheiros e amigos “Filhos de Yris” Diegue Henrique, Amanda Carneiro e Yuri Yabu. Muito obrigada ao “coorientador”, Diegue, por toda ajuda e paciência. Amanda, sempre disposta a me ajudar com o CLAE e sempre com seu jeitinho calmo e sorridente, muito obrigada! Yuri, que

incontáveis vezes me ajudou com as células e vários ensaios e por sempre me ouvir, meu sincero agradecimento.

Agradeço à Márcia Mazutti pela ajuda e companhia nas incontáveis horas nos fluxos de células e de microrganismos. Obrigada pela disponibilidade e por todas as comidas deliciosas que levou para gente. Tenho imenso carinho por você e torço muito pela sua felicidade e sucesso.

João Victor Dutra e Artur Borges, muito obrigada pela ajuda com as cromatografias. Sem vocês não teria dado certo. Agradeço ao João por todo o animo, empolgação e esperança contagiante.

Agradeço ao Laboratório de Farmacologia Molecular pela ajuda e por disponibilizar o uso do equipamento ELISA.

Às minhas amigas Aline, Lais Emanuelle, Laís Kanashiro, Mariana Curvina e Marina Araújo, por acreditarem em mim, me apoiar e me entender. Aos amigos Renato Gomes e João Paulo Carvalho, grandes presentes de 2016, pela confiança, disponibilidade e suporte. Aos amigos do EJOC por acreditar e confiar em mim. Às amigas Ana Carolina Santos e Giulian Nepomuceno pelo suporte e por ouvir meus desabafos. Agradeço à Tamyres França por ouvir minhas ladainhas intermináveis! Aos amigos que me acompanham desde a graduação e que torcem por mim, obrigada pela alegria, descontração, aventuras e acolhimento.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, agradeço a todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente e contribuíram de alguma forma pra que este momento finalmente chegasse.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.*

*John Ruskin*

## RESUMO

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo. Porém, apesar de tamanha riqueza, muitas espécies vegetais ainda não foram estudadas quimicamente e biologicamente. *Miconia chamissois* (Melastomataceae) é uma espécie frequentemente encontrada no bioma Cerrado e é descrita basicamente pelos benefícios ecológicos. Seu potencial químico e biológico é pouco explorado. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar, preliminarmente, os compostos presentes no extrato aquoso das folhas de *M. chamissois*, sua ação citotóxica e atividades antioxidante, antimicrobiana e de inibição enzimática. O estudo fitoquímico foi realizado pelas técnicas de Cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os teores de polifenóis e flavonoides foram determinados com reagente de Folin e cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH e fosfomolibdênio. Os métodos de microdiluição em caldo e difusão em disco foram utilizados para determinação da atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A atividade de inibição da tirosinase e  $\alpha$ -amilase foram determinadas. A citotoxicidade do extrato foi avaliada frente às linhagens celulares de queratinócito humano (HaCat), fibroblasto de camundongo (L929) e macrófago de camundongo (Raw 264.7) pelo método do MTT. É sugerido a presença de compostos devidos da vitexina. O extrato aquoso de *M. chamissois* apresentou atividade antioxidante, equivalente a 18,35  $\mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico pelo método fosfomolibdênio e  $\text{IC}_{50}$  de 2,91  $\mu\text{g/mL}$  pelo método DPPH. Inibição do crescimento de *S. aureus* foi observado em ambos os métodos e a inibição do crescimento de *C. albicans* foi observada apenas frente ao método de microdiluição. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  encontrados para a inibição da tirosinase e  $\alpha$ -amilase foram de 183,2 e 15,06  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O extrato não apresentou citotoxicidade frente às linhagens avaliadas. Os resultados encontrados sugerem potencial biológico do extrato aquoso de *M. chamissois*, sendo necessários mais estudos para a elucidação dos compostos presentes na espécie.

**Palavras-chave:** *Miconia chamissois*; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; inibição de tirosinase e  $\alpha$ -amilase; citotoxicidade; polifenóis.

## ABSTRACT

Brazil has the largest plant biodiversity in the world. However, despite such wealth, many plant species have not yet been studied chemically and biologically. *Miconia chamissois* (Melastomataceae) is a species frequently found in the Cerrado biome and is basically described by its ecological benefits. Its chemical and biological potential is little explored. The aim of this work was to study, preliminarily, the compounds present in the aqueous extract of the leaves of *M. chamissois*, its cytotoxic action and antioxidant, antimicrobial and inhibitory enzymatic activities. The phytochemical study was performed by the techniques of thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The total polyphenols and flavonoids contents were determined with Folin reagent and aluminum chloride, respectively. The antioxidant activity was evaluated by DPPH and phosphomolybdenum methods. Broth microdilution and disk diffusion methods were used to determine the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The extract cytotoxicity was evaluated against human keratinocyte (HaCat), mouse fibroblast (L929) and mouse macrophage (Raw 264.7) cell lines by the MTT method. The presence of due vitexin compounds is suggested. The aqueous extract of *M. chamissois* presented antioxidant activity, equivalent to 18.35 µg/mL of ascorbic acid by the phosphomolybdenum method and presented IC<sub>50</sub> of 2.91 µg/mL by DPPH method. Inhibition of *S. aureus* growth was observed in both methods and inhibition of *C. albicans* was observed only in the microdilution method. The IC<sub>50</sub> values found for tyrosinase and α-amylase were 183.2 and 15.06 µg/mL, respectively. The extract did not present cytotoxicity against cell lines evaluated. The results suggest a biological potential of *M. chamissois* aqueous extract, and further studies are needed to elucidate the compounds present in the species.

**Keywords:** *Miconia chamissois*; antioxidant activity; antimicrobial activity; inhibition of tyrosinase and α-amylase; cytotoxicity; polyphenols.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Espécie <i>Miconia chamissois</i> Naudin. Fruto (A), flor (B) e folha (C).....	22
Figura 2 Arbusto de <i>Miconia chamissois</i> Naudin.....	23
Figura 3 Síntese de DOPA-melanina .....	27
Figura 4 Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides e compostos fenólicos.....	56
Figura 5 Cromatografia em camada delgada para detecção de rutina no extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> .....	57
Figura 6 Cromatografia em camada delgada para detecção de isoquercitrina no extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> .....	58
Figura 7 Perfil cromatográfico do extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> a 354 nm, realizado por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	59
Figura 8 Espectros dos nove picos detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a 354 nm, no extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> . .....	60
Figura 9 Cromatogramas e espectros dos pontos mistos da amostra mais padrão a 354 nm, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	61
Figura 10 Espectros dos padrões avaliados por CLAE a 354 nm.....	63
Figura 11 Reação de captação do radical DPPH• por um doador de hidrogênio (RH). Adaptado de Musa et al, 2016 (81). .....	69
Figura 12 Valores de IC <sub>50</sub> dos padrões ácido ascórbico e BHT e do extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> pelo método de captação do DPPH•. ....	69
Figura 13 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
Figura 14 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente à bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	73
Figura 15 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente ao fungo <i>Candida albicans</i> .....	73

Figura 16 Porcentagem de inibição da tirosinase nas diferentes concentrações de extrato (0,98 a 1000 µg/mL).....	77
Figura 17 Porcentagem de inibição da α-amilase nas diferentes concentrações de extrato (1,96 a 1000 µg/mL).....	79
Figura 18 Viabilidade celular de macrófagos de camundongo (Raw 264.7) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> .....	81
Figura 19 Viabilidade celular para queratinócitos humanos (HaCat) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> . ....	83
Figura 20 Viabilidade celular para fibroblasto de camundongo (L929) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> . ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de eluição para detecção de flavonoides por CLAE.....	40
Tabela 2 - Padrões utilizados nas corridas para detecção de flavonoides e compostos fenólicos.....	40
Tabela 3 - Microrganismos e condições básicas do experimento. ....	45
Tabela 4 - Fatores de retenção (Rf) dos padrões testados e da amostra .....	56
Tabela 5 - Valores de área, tempo de retenção e lambdas dos picos detectados por Cromatografia líquida de alta eficiência a 354 nm.....	59
Tabela - 6 Valores de área, tempo de retenção e lambdas dos padrões avaliados. .	63
Tabela 7 - Resultado dos teste de avaliação antioxidante. ....	70
Tabela 8 - Valores de IC <sub>50</sub> encontrados para as linhagens estudadas (Raw 264.7, HaCat e L929).....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collections

BHT – Hidroxi-Butil Tolueno

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DM – Diabetes Mellitus

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNS – Ácido 3,2-dinitrosalicílico

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

HaCat – Linhagem de queratinócitos humanos

IC<sub>50</sub> – Concentração capaz de inibir 50% da atividade máxima

L929 – Linhagem de fibroblastos de camundongo

MIC – Concentração inibitória Mínima

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolina

NP/PEG – *Natural Product* - Polietilenoglicol

OMS – Organização Mundial da Saúde

RAW 254.7 – Linhagem de macrófagos de camundongo

SUS – Serviço Único de Saúde

tR – Tempo de retenção

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 CERRADO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 FAMÍLIA MELASTOMATACEAE</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 O GÊNERO MICONIA E <i>Miconia chamissois</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	<b>26</b>
2.6.1 Tirosinase .....	26
2.6.2 $\alpha$ -Amilase .....	29
<b>2.7 POLIFENÓIS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.8 CITOTOXICIDADE E TESTES <i>in vitro</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>35</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL DO BOTÂNICO</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Miconia chamissois</i> Naudin</b> .....	<b>36</b>
4.2.1 Produção do extrato aquoso.....	36
4.2.2 Determinação de sólidos totais.....	37
4.2.3 Rendimento do extrato .....	37
<b>4.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA</b> .....	<b>37</b>

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	38
4.3.1.1 Aplicação da amostra e padrões .....	38
4.3.1.2 Preparo da solução eluente – fase móvel .....	38
4.3.1.3 Preparo do revelador .....	38
4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	39
4.3.3 Polifenóis Totais .....	41
4.3.4 Flavonoides Totais.....	41
<b>4.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....</b>	<b>42</b>
4.4.1 Avaliação da Atividade antioxidante.....	42
4.4.1.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método Fosfomolibdênio.....	42
4.4.1.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	43
4.4.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	44
4.4.2.1 Teste de microdiluição com reagente resazurina.....	45
4.4.2.2 Método de difusão em disco .....	46
4.4.3 Inibição de atividade enzimática.....	47
4.4.3.1 Inibição da tirosinase.....	47
4.4.3.2 Inibição da $\alpha$ -amilase.....	49
4.4.3.2.1 Pré-incubado da amostra e controle .....	49
4.4.3.2.2 Pós-incubação .....	49
<b>4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....</b>	<b>50</b>
4.5.1 Linhagens celulares e cultivo <i>in vitro</i> .....	50
4.5.2 Avaliação da citotoxicidade celular do extrato pelo método do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolina (MTT) .....	51
4.5.3 Viabilidade Celular .....	52

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS</b> .....	<b>54</b>
<b>5.2 RENDIMENTO DO EXTRATO</b> .....	<b>54</b>
<b>5.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA</b> .....	<b>54</b>
5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada .....	54
5.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	58
5.3.3 Polifenóis totais.....	65
5.3.4 Flavonoides Totais.....	66
<b>5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS</b> .....	<b>67</b>
5.4.1 Atividade antioxidante .....	67
5.4.1.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do fosfomolibdênio .....	67
5.4.1.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) .....	68
5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana .....	71
5.4.2.1 Teste de microdiluição com reagente resazurina.....	71
5.4.2.2 Método por difusão em disco .....	74
<b>5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	<b>76</b>
5.5.1 Inibição da Tirosinase.....	76
5.5.2 Inibição da $\alpha$ -amilase .....	78
<b>5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE</b> .....	<b>80</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>86</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o homem faz uso da natureza de forma a melhorar a qualidade de vida e sobreviver. As primeiras sociedades tomaram consciência de que certas plantas possuíam substâncias capazes de curar enfermidades e, desde então, durante muito tempo, a utilização de plantas foi a única forma de tratamento de doenças (1,2).

A influência das plantas medicinais na vida das antigas civilizações foi tão significativa, que vários livros foram produzidos descrevendo suas utilizações e indicações para diversas moléstias. Um exemplo é o tratado de medicina interna *Caraka*, produzido na Índia, onde mais de 500 plantas foram descritas, e o *De Materia Medica*, produção dos gregos, com mais de mil compostos ativos, sendo que dentre elas, cerca de 600 eram de plantas. Além disso, há milhares de anos, os egípcios já possuíam conhecimento das propriedades terapêuticas do ópio (*Papaver somniferum*) e hortelã pimenta (*Mentha piperita*), por exemplo, e também produziam diversas preparações com fins medicinais (3).

Nas últimas décadas o assunto alcançou importância global. As plantas medicinais foram reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como parte integrante da Assistência Farmacêutica devido à grande dependência desses recursos naturais por parte da população. Diversos documentos oficiais têm sido produzidos discutindo o potencial da medicina tradicional na prestação de serviços de saúde e a importância da valorização das plantas medicinais a nível sanitário (2,4).

Segundo a OMS, cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso da medicina tradicional (que envolve o uso de plantas) para atenção à saúde. Em países desenvolvidos como Canadá, Alemanha e França, a utilização destes mesmos produtos, chamados por eles de medicina complementar, alternativa ou não convencional, é de cerca de 80% (4–6). No Brasil, entre os anos de 2013 e 2015, a procura por tratamentos a base de plantas medicinais e fitoterápicos oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) aumentou em 161% (7).

Tendo em vista a variedade vegetal, étnica e cultural do Brasil e o conhecimento sobre plantas passado de geração em geração até os dias atuais,

medidas políticas foram elaboradas para introdução das plantas medicinais e seus derivados na rede pública de saúde. Dentre elas, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC). Essas políticas têm como objetivo inserir os fitoterápicos e plantas medicinais no serviço oferecido pelo SUS e promover a saúde por meio da garantia do acesso seguro e uso racional dos produtos e serviços da medicina tradicional (4,5,8–10). Ações como essas são de suma importância para o aprimoramento do serviço de saúde prestado, conservação da biodiversidade do Brasil, fortalecimento da fitoterapia oferecida pelo SUS e reconhecimento da sabedoria oriunda das experiências culturais tradicionais (2,4,5,8).

A terapêutica envolvendo o uso de plantas medicinais é extensamente empregada no Brasil e no mundo, embora a utilização de medicamentos de origem sintética tenha se expandido desde a metade do século XX. Este fato instiga a indústria farmacêutica a investir em pesquisas relacionadas, tornando-se um fator relevante do mundo industrial dos medicamentos, pois, além do movimento financeiro envolvido, uma parcela considerável dos principais produtos são oriundos de plantas ou sintetizadas a partir de compostos de origem natural. Para se ter uma ideia, embora não haja informações oficiais atualizadas, a indústria brasileira de fitoterápicos movimenta cerca de 160 milhões de dólares por ano, estimando-se ainda, um aumento nas vendas de 15% ao ano (2,12,13).

Mesmo com todo o avanço, importância cultural e socioeconômica e com a diversidade natural do Brasil, estudos acerca das propriedades químicas e medicinais de plantas ainda não são suficientes. Das centenas de milhares de espécies de plantas no planeta, a maioria não possui estudo fitoquímico, analítico ou farmacológico. Somente 17% das plantas possuem algum respaldo científico. No Brasil, apenas 8% das 60 mil espécies de vegetais superiores já conhecidas tiveram seus compostos ativos estudados, enquanto que as propriedades medicinais foram investigadas em somente 1.100 espécies (1,2,11,14,15)

Neste contexto, considerando a importância do assunto no Brasil e no mundo, a pesquisa envolvendo plantas e seus compostos são importantes, afim de embasar cientificamente o conhecimento popular, e produzir, direta ou indiretamente, novos medicamentos a partir das espécies vegetais (2,10,11,14,16).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CERRADO

Com mais de 2 milhões de quilômetros quadrados, o Cerrado é o maior bioma da América do Sul, depois da Amazônia. Sua extensão equivale a cerca de 21% do território brasileiro, abrangendo os Estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, São Paulo, Paraná e Distrito Federal. Situam-se também, neste bioma, as nascentes das principais bacias hidrográficas do país: Amazonas/Tocantins-Araguaia, São Francisco e Prata, além de outras seis (15,17–19).

É considerado a savana mais biologicamente diversificada do mundo e é um *hotspot* de conservação ambiental devido a grande variedade de espécies animais e vegetais que chegam a 5% da biodiversidade mundial (17,19,20). Neste bioma, mais de 11 mil espécies de plantas já foram catalogadas, sendo que mais de 4 mil são endêmicas (representando cerca de 44% da flora). São encontrados quase 200 mamíferos conhecidos, 837 espécies de aves, além de peixes, répteis e anfíbios (17,19).

A denominação “Cerrado” designa diferentes fitofisionomias: Campo Limpo, Campo Sujo, Campo Cerrado, Cerrado *sensu stricto*, Cerrado/transição Cerradão, Cerradão e Mata (17,21). A vegetação em sua maioria é composta por árvores pequenas, mas com cascas grossas e profundas raízes que captam água subterrânea, importantes adaptações para proteção contra queimadas e longos períodos de seca (22,23).

O solo é predominantemente caracterizado como latossolo por ser empobrecido de nutrientes, rico em acidez e alumínio e possuir pouca fertilidade e capacidade de retenção de umidade (17,24). Entretanto, são solos antigos, com boa porosidade e profundidade e de relevo relativamente plano (24). O clima é do tipo tropical sazonal e varia de acordo com as estações. O período de seca se estende entre os meses de abril e setembro e o de chuva acontece, geralmente, entre os

meses de outubro e março, com precipitação de cerca de 1500 mm durante o ano e temperaturas entre 22°C e 27°C (17,21).

Com relação aos estudos realizados com plantas oriundas do Cerrado, apesar da rica biodiversidade, se comparado a sua dimensão territorial, são poucos os estudos que apontam a identificação de espécies vegetais com potencial farmacológico. Esse aspecto é dificultado pela grande devastação que o Cerrado sofre, principalmente em decorrência da agricultura e por apenas 8,21% de seu território possuir proteção legal (15). Estima-se que cerca de 40% deste território já foi devastado, colocando em risco toda a sua vegetação e o fornecimento de plantas medicinais (25). Cerca de 20% das espécies nativas e endêmicas já são ameaçadas de extinção (19)

As plantas medicinais provenientes desse bioma são de grande importância social e cultural, também movimentam a economia do país e são utilizadas por toda a população. O conhecimento popular sobre o uso das plantas oriundas do Cerrado, bem como as cerca de 220 espécies utilizadas medicinalmente, fazem parte do patrimônio nacional do país (19). Embora não haja registros do movimento financeiro envolvido no uso de plantas oriundas do bioma Cerrado, é possível observar que existe um potencial na produção de compostos importantes neste bioma. Para isso, pesquisas e estudos devem ser estimulados, não só para futura produção de fitoterápicos a partir das plantas do Cerrado, mas também para a preservação da biodiversidade deste bioma (26).

## 2.2 FAMÍLIA MELASTOMATACEAE

A família Melastomataceae pertence à ordem Myrtales e é composta por cerca de 166 gêneros, com um total de cerca de 5.000 espécies presentes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (27–31). No Brasil é possível encontrar 68 gêneros (onde 17 são endêmicos) e 1393 espécies, que se distribuem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (32). É a sexta família de maior relevância do Cerrado com 492 espécies e também é encontrada em outros biomas como Mata Atlântica, Caatinga e Amazônia. A região leste do Brasil possui grande variedade em espécies dessa família (28,32).

A família é representada principalmente por árvores e arbustos, mas é possível encontrar outras formações como trepadeiras, epífitas, ervas anuais e perenes. Suas folhas decussadas com nervação acródroma, estames falciformes, sem estípulas e anteras poricidas facilitam sua distinção entre outras espécies (33,34). As flores, em sua maioria, se encontram nas inflorescências terminais ou auxiliares, onde principalmente abelhas coletam pólen. Os frutos, presentes em algumas espécies, são pequenos, carnosos e arredondados, consumidos por algumas comunidade de pessoas e por pássaros. Além disso, podem ser utilizados para ornamentação (35). Como estratégia de sobrevivência, suas espécies possuem elevada taxa de dispersão de propágulos, germinação e crescimento, com numerosa produção de sementes que são disseminadas com a ajuda de aves e do vento (34).

Algumas espécies da família são utilizadas popularmente para o tratamento de resfriados, febre, dores de garganta e de cabeça, ulcerações, infecções intestinais causadas por vermes, e outras doenças. Além disso, a família é descrita também pelo uso ornamental de suas espécies e por favorecer principalmente o reflorestamento devido ao seu rápido crescimento e dispersão de sementes (35,36).

A literatura a certa da família Melastomataceae é escassa. A relevância da família no âmbito industrial ou medicinal ainda não foi bem definida, embora algumas espécies sejam usadas popularmente e alguns estudos têm sido descritos. Alguns compostos ativos como triterpenos, fitoesteroides e flavonoides já foram isolados a partir de extrato hexânico e etanólico das partes aéreas de *Tibouchina candolleana* (36). Em estudo realizado por Vasconcelos et. al (2010) também foi reportada a presença de taninos e flavonoides no extrato metanólico de *Mouriri pusa*, avaliado por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Neste mesmo estudo foi demonstrado que extrato desta planta possui ações contra úlceras gástricas (39). Na espécie *Bellucia dichotoma* Cogn., utilizada popularmente para tratamento de picadas de cobras, foi detectada a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, além de flavonoides (40). Na espécie *Clidemia rubra* (Albl.) foi determinada a presença de derivados de quercetina, miricetina e cianidinas (41) e a espécie *Antherotoma naudinii* foi descrita por possuir flavona, compostos fenólicos e antocianinas (42).

A riqueza de compostos relevantes com potencial farmacológico e o uso popular das plantas desta família, tornam a família Melastomataceae um alvo para pesquisas.

### 2.3 O GÊNERO MICONIA E *Miconia chamissois*

O gênero *Miconia* é constituído por 1057 espécies presentes na região tropical das Américas, indo desde o México até o norte da Argentina e Uruguai e é um dos maiores gêneros da família Melastomataceae (43). No Brasil, são conhecidas 282 espécies (122 endêmicas) distribuídas nos biomas Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia, encontradas em florestas úmidas, principalmente (32,44,45).

Os representantes desse gênero, geralmente são arbustos ou pequenas árvores, sendo que algumas espécies podem variar de 10 a 30 metros de altura (35). Os frutos são pequenos, carnudos e arredondados e são consumidos por aves e, algumas espécies, por humanos (34). É possível identificar o gênero por meio de suas folhas e inflorescências terminais, hipanto sem constrição no ápice arredondado e frutos bacáceos (46).

Quanto aos estudos com o gênero, há registros evidenciando a presença de fitoesteróis, flavonoides e triterpenos (47–49). Em relação às atividades biológicas, é descrito atividade analgésica de extratos da espécie *M. rubiginosa* (31,50) e atividade contra *Trypanosoma cruzi* pela ação de triterpenos e ácido oleanólico obtidos das espécies de *M. sellowiana* Naud. e *M. ligustroides* (47). A espécie *M. myriantha* possui compostos fenólicos capazes de inibir a secreção de proteases aspárticas produzidas por *Candida albicans* (31), *M. albicans* possui considerável atividade antioxidante e *M. cabucu* e *M. stenostachya* apresentam potencial de redução de mutagenicidade do DNA (31). Algumas espécies do gênero *Miconia* são tradicionalmente utilizadas como alternativa para o tratamento de Diabetes Mellitus (51).

A espécie *Miconia chamissois* (Figura 2 e 3), conhecida popularmente como folha-de-bolo, sabiazeira, ou pixirica é um arbusto lenhoso que pode alcançar 3

metros de altura e é mais comumente encontrada em terrenos úmidos como Campo Úmido e Mata de Galeria. Possui ramos obtusos, tetrágonos e glabros, folhas simples, opostas cruzadas, curto-pecioladas, ovado-elípticas, base arredondada, aguda ou atenuada, nervuras acródomas supra-basais e glabras que auxiliam na sua identificação. As flores são brancas pequenas, de cálice viscoso, arranjadas em panículas terminais grandes e piramidais. O fruto se apresenta na forma de baga subglobosa, carnuda e atropurpurea, de aproximadamente um centímetro de diâmetro, que amadurecem de setembro a outubro (52,53).

Embora seja uma espécie abundante nos biomas, ainda é pouco explorada cientificamente. Somente um estudo avaliando a atividade biológica da espécie é registrado, descrevendo a ação antimicrobiana do extrato metanólico de *Miconia chamissois* frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (54). Os trabalhos mais descritos são basicamente sobre seu potencial na restauração ecológica (34). Portanto, este estudo com a espécie *Miconia chamissois* Naudin contribui para mais achados da família Melastomataceae, podendo ser uma fonte de compostos com ações biológicas e com potencial de uso no tratamento de doenças.

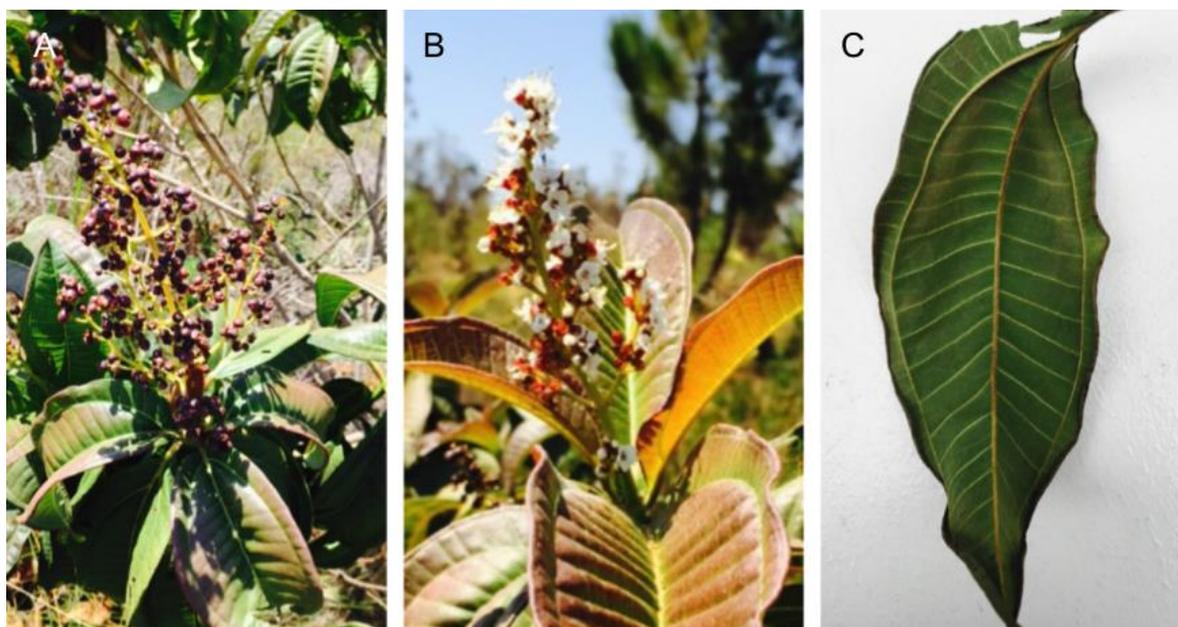


Figura 1 Espécie *Miconia chamissois* Naudin. Fruto (A), flor (B) e folha (C). Espécime encontrado em Lago do Cedro, Park Way - Brasília.



Figura 2 Arbusto de *Miconia chamissois* Naudin. Espécime encontrado em Lago do Cedro, Park Way - Brasília.

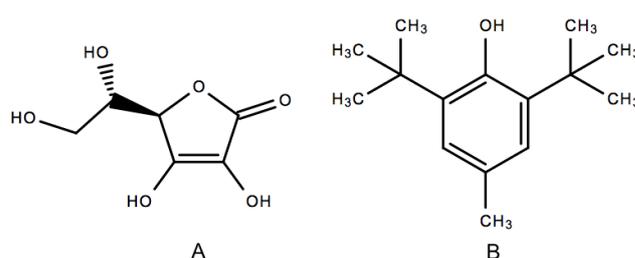
#### 2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O metabolismo celular promove a produção de energia essencial para o funcionamento básico das células, formando subprodutos como radicais livres. Caso haja produção exacerbada desses radicais, sem a presença de agentes antioxidantes para neutralizar essa ação, doenças e danos celulares podem ocorrer. Exemplo desses radicais formados são: radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), bem como espécies reativas a nitrogênio, como óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) (55–57).

Os processos oxidativos são reportados por favorecerem a oxidação de lipídios, membranas e proteínas, bem como induzirem processos inflamatórios e danos ao DNA (58). Estudos indicam que doenças como Alzheimer, Parkinson, aterosclerose, Diabetes Mellitus, bem como processos de envelhecimento estão envolvidos com o estresse oxidativo (56,57).

Compostos antioxidantes controlam a produção de radicais livres, estabilizando-os ou desativando-os antes que alcancem os alvos nas células. São substâncias capazes de inibir ou retardar os processos oxidativos por meio de diferentes mecanismos que envolvem redução dos radicais e quelamento de metais (55,59). A origem destes compostos pode ser endógena ou através da alimentação, no consumo de frutas, legumes e verduras. Vitaminas (como ácido ascórbico e tocoferóis), carotenoides e polifenóis são os grandes grupos com conhecida atividade antioxidante. Outro composto comumente encontrado, porém de origem sintética e amplamente utilizado pela indústria é o BHT (hidroxitolueno de butila) (55,60).

O ácido ascórbico ou vitamina C (Estrutura 1A), amplamente relacionado com prevenções de certas doenças, é um antioxidante considerado importante por ser hidrossolúvel e possuir alta atividade em pequenas concentrações. Sua ação recai sobre as espécies reativas a oxigênio, doando hidrogênios de sua estrutura e formando produto pouco reativo que impede o prosseguimento das reações oxidativas (60,61). O BHT (Figura 1B) é um antioxidante sintético muito utilizado pela indústria de alimentos e atua também doando hidrogênio e formando produto menos reativo, porém é descrito por ser tóxico. (60).



Estrutura 1 Ácido ascórbico (A) e BHT (B) (60).

Diversas metodologias *in vitro* são utilizadas para determinação do potencial antioxidante de plantas, sendo os testes baseadas em métodos colorimétricos, eletroquímicos e biológicos (59,62). Um dos métodos utilizados é o DPPH, que é barato, rápido e sensível, envolve condições brandas de temperatura e de oxigênio e

utiliza os valores das absorvâncias medidas em espectrofotômetro para determinação de atividade (62). Outro método colorimétrico utilizado é o fosfomolibdênio, que visa determinar a capacidade antioxidante total do composto a partir da inibição da formação do complexo fosfomolibdênio (63,64).

Neste sentido, pesquisas com espécies vegetais apresentam potencial de descoberta de compostos com ação antioxidante que apresentem menos efeitos adversos e que ofereçam alternativas para tratamento de doenças e substituição dos antioxidantes sintéticos (55).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Um problema atualmente preocupante relacionado à saúde é o uso não racional de antibióticos. Esta ação tem causado o desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos aos medicamentos disponíveis, aumentando o risco de complicações clínicas e morte, bem como aumento dos gastos públicos com tratamentos. Além disso, antimicrobianos sintéticos são reportados por induzirem efeitos colaterais, sendo interessante a procura por compostos de origem vegetal (65).

Dentre os mecanismos envolvidos na resistência microbiana, estão mutações na bagagem genética dos microrganismos, que passam a adquirir resistência a um tipo de antimicrobiano, sendo essas mutações transferidas por mecanismos de recombinação genética durante a reprodução (66).

Antibióticos são substâncias de diferentes origens que possuem capacidade de inibir, completa ou parcialmente, o crescimento de bactérias. Nos casos de inibição parcial do crescimento, são chamados bacteriostáticos e quando inibem completamente, são chamados bactericidas. Os mecanismos envolvidos nessa atividade, possuem como alvo principalmente a parede celular e impedimento da síntese ou alterações do material genético (67).

Na pesquisa, existem diferentes métodos para determinar a atividade antimicrobiana de compostos e extratos vegetais. O objetivo em todos eles é descobrir a menor concentração em que ocorre morte dos microrganismos, a

concentração inibitória mínima (MIC). As metodologias mais comumente encontradas são as de difusão em disco, realizado em ágar, e micro e macro diluição, realizados em caldo (68).

No método de difusão em disco, certa quantidade de microrganismo é inoculada no ágar e discos impregnados com amostra em diferentes concentrações são adicionados. A atividade é avaliada pela medida do halo de inibição. É um método rápido e barato, mas que necessita que os microrganismos em estudo cresçam rapidamente (68,69).

No teste de microdiluição são utilizados placas de 96 poços, sendo o volume máximo de trabalho de 0,2 mL. Quantidade determinada de microrganismo é inoculada e diferentes concentrações da amostra são adicionadas. A concentração inibitória mínima é determinada por espectrofotômetro ou por reveladores como resazurina. Esta técnica tem como vantagem a necessidade de pouca quantidade de amostra, baixo custo, ser facilmente reproduzida e possuir sensibilidade que chega a ser trinta vezes maior em relação a outros métodos (69).

Nesse sentido, o estudo de plantas para obtenção de compostos com ação antimicrobiana é uma alternativa que desperta o interesse da pesquisa. Além disso, compostos de origem vegetal podem induzir menos efeitos adversos (70,71).

## 2.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 2.6.1 Tirosinase

Melanina é um biopolímero, heterogêneo, polifenólico e pigmento responsável por dar cor à pele e aos cabelos. Sua produção ocorre nos melanossomas, estruturas presentes nos melanócitos, na região basal da epiderme (72). Eumelanina e feomelanina são os dois principais tipos de melanina descritos e são diferenciados pela cor do pigmento formado (73).

A síntese da melanina (melanogênese) ocorre por sucessivas oxidações, tendo como importante integrante no processo, a enzima tirosinase. Primeiro, L-

tirosina (monofenol) é oxidada a L-Dopa (o-difenol) pela ação da tirosinase, que em seguida também oxida a L-Dopa a o-dopaquinona (o-quinona). Após sua ciclização, a o-dopaquinona forma o leucodopacromo que rapidamente é oxidado a dopacromo e forma a melanina após sua polimerização (Figura 3) (72,73).

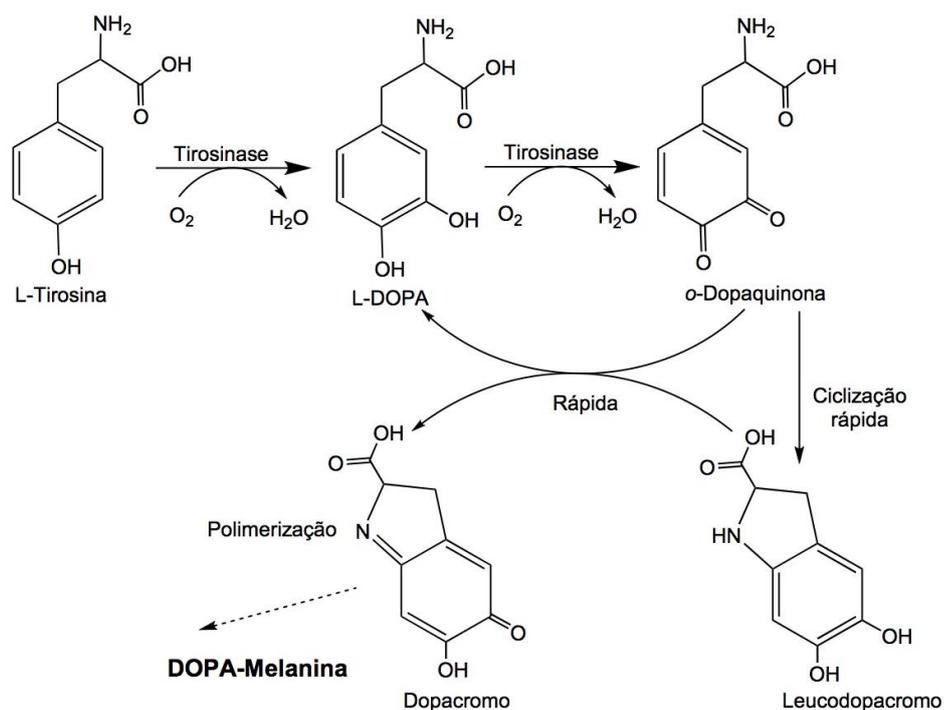


Figura 3 Síntese de DOPA-melanina. Adaptado de Souza, 2011 (74).

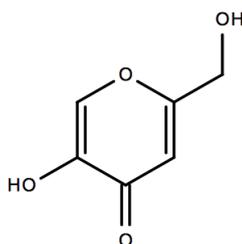
A tirosinase (EC 1.14.18.1, polifenol oxidase) é uma enzima multifuncional presente em animais, plantas e fungos e possui papel crucial na síntese de melanina, atuando nas duas primeiras oxidações que ocorrem, utilizando oxigênio molecular. Possui atividade monofenolase (ou cresolase) na oxidação do monofenol a o-difenol e atividade difenolase (ou catecolase) na oxidação do o-difenol a o-quinona (73,75,76).

Embora a melanina possua papel fundamental na proteção contra raios UV, sua produção em excesso pode causar prejuízos (77). A hiperpigmentação é uma desordem cutânea comum, caracterizada pela produção exacerbada de melanina, podendo ser em decorrência do aumento de melanócitos ou da atividade de enzimas

envolvidas na sua produção. Fatores ambientais, como alta exposição a radiação solar, bem como fatores genéticos estão envolvidos no desenvolvimento deste distúrbio que afeta diretamente a autoestima dos pacientes que a desenvolvem (78). Um grande alvo nesse tratamento é a inibição da enzima tirosinase (72).

Não só em nível clínico dermatológico a inibição da tirosinase desperta interesse. A inibição dessa enzima pode favorecer o tratamento de Parkinson, devido ao seu envolvimento na produção de dopamina, neurotransmissor chave da doença (79). Outra aplicabilidade é na indústria alimentícia evitando o escurecimento de frutas, vegetais e bebidas (72,75) e também pode ser uma via de controle de insetos (80).

Vários inibidores da tirosinase são descritos, porém há relatos de efeitos adversos como sensibilidade, alergias e toxicidade considerável. Estes inibidores podem ser de origem natural ou sintética. O ácido kójico (Estrutura 2) é o inibidor mais citado em trabalhos e também é comercializado. Seu mecanismo envolve o quelamento do cobre presente no sítio ativo da enzima (81). Extratos vegetais também são descritos por possuir atividade inibitória sobre a enzima tirosinase, sendo que compostos fenólicos são os mais reportados por desempenhar essa função (72,82).



Estrutura 2 Ácido kójico.

Devido à grande aplicabilidade, a busca de compostos com capacidade de inibição da enzima é importante afim de possibilitar diversos benefícios em diferentes âmbitos, sendo o estudo com plantas crucial para que este objetivo seja alcançado.

### 2.6.2 $\alpha$ -Amilase

Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico em que se observa resistência das células à ação da insulina e defeitos na secreção deste hormônio pelo pâncreas. Possui como características hiperglicemia e alterações na metabolização de carboidratos, gorduras e proteínas (83). Dentre as causas da doença estão a genética, sedentarismo, má alimentação e obesidade. Estima-se que 415 milhões de pessoas possuem Diabetes no mundo inteiro, sendo previsto aumento para 624 milhões no ano de 2040. Os gastos com a doença em 2015, no Brasil, chegou a USD 21,8 milhões. Observa-se, portanto, o impacto dessa doença epidêmica global (84,85).

A glicose é fundamental para o funcionamento celular. O hormônio insulina é responsável por auxiliar a entrada de glicose nas células. Porém, na diabetes, as células desenvolvem resistência a insulina, impedindo sua entrada e função celular, podendo ocorrer também deficiência na insulina e sua secreção. A grande quantidade de glicose no sangue, chamada hiperglicemia, traz prejuízo aos tecidos a longo prazo (85,86).

Sintomas como poliúria, perda de peso e polifagia acompanham os quadros de hiperglicemias desenvolvidos. Além disso, portadores da doença possuem risco de desenvolverem complicações como nefropatia, perda da visão e risco de desenvolvimento de pé diabético que pode resultar em amputações (87).

Dois tipos de Diabetes Mellitus são descritos: a tipo 1 e a tipo 2. A tipo 1 se caracteriza pela completa deficiência na secreção da insulina. Geralmente tem precedência genética ou ocorre devido a uma reação autoimune sobre as células beta produtoras de insulina. Este tipo de Diabetes é mais comum em crianças e jovens e, neste caso, necessita-se de aplicações diárias de insulina (86).

A tipo 2 é a mais comum variação da Diabetes. É caracterizada por problemas na secreção da insulina e resistência das células a este hormônio. Geralmente levam-se anos para seu diagnóstico devido aos sintomas serem brandos. Dieta e exercícios podem controlar a glicemia dos pacientes, porém, na maioria dos casos, ainda é necessário a administração de insulina ou de hipoglicemiantes orais (86).

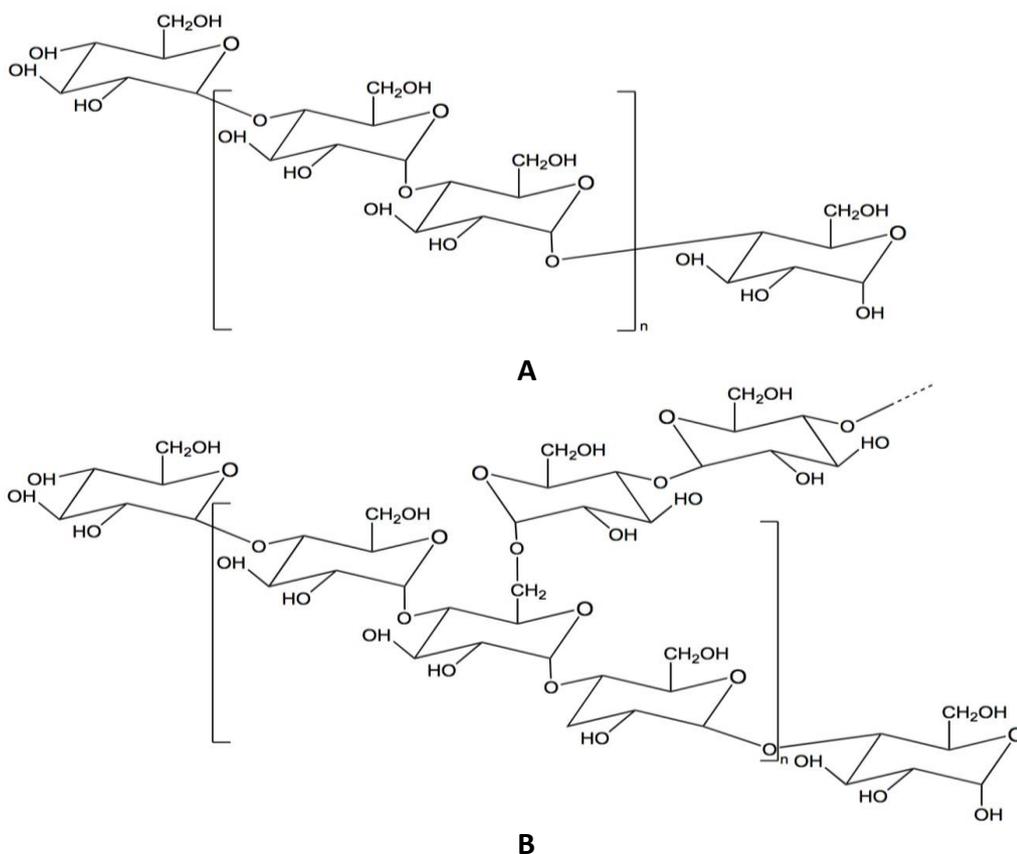
Além dos medicamentos já conhecidos, como metformina e glibenclamida, fora a própria insulina, outra forma de tratamento é a diminuição da glicemia pós-prandial por meio da inibição de enzimas envolvidas na quebra de carboidratos. Exemplo dessas enzimas são a  $\alpha$ -amilase e a  $\alpha$ -glicosidase (88). Ao inibir estas enzimas, é possível retardar a absorção do açúcar (89).

A enzima  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1,  $\alpha$ -1,4 glucano-4 glucanohidrolase) é uma metaloenzima de cálcio vastamente presente na natureza em plantas, animais e microrganismos. É uma endoglicosidase, uma enzima hidrolase que possui capacidade de quebrar ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas do amido. Ademais, participa do metabolismo do glicogênio e maltodextrinas, formando oligossacarídeos menores, como a maltose e glicose (90,91). No seres humanos, o pâncreas e as glândulas salivares secretam principalmente esta enzima (90). É uma proteína monomérica com cerca de 50 kDa e que possui três domínios em sua estrutura (A, B e C). No domínio A se encontra o sítio ativo e é formado por um barril  $\alpha/\beta$ ; o domínio B possui uma estrutura que se destaca do domínio A, onde está presente o sítio de ligação do cálcio e o domínio C possui estrutura no terminal C do tipo  $\beta$ -barril de oito cadeias (92).

Esta enzima atua na quebra do amido que é formado por dois polímeros: amilose e amilopectina (Estrutura 3). A amilose é uma cadeia linear formada por repetidas moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, enquanto que a amilopectina, maior constituinte da molécula de amido, possui cadeias lineares unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, assim como a amilose, porém possui ramificações a cada 15-45 repetições de glicose, sendo essas ramificações ligadas a cadeia linear por ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas. Além de aplicações fisiológicas,  $\alpha$ -amilase é utilizada pela indústria de pães, cervejas e detergentes (91,92).

Os inibidores clinicamente utilizados atualmente são a acarbose, miglitol e voglibose, obtidos de microrganismos (93). Porém, efeitos adversos como hepatotoxicidade e desconfortos gastrointestinais são associados ao uso (90), sendo contraindicado especificamente o uso da acarbose por pacientes com problemas renais (84).

As plantas medicinais são uma alternativa para a descoberta de compostos com ação inibidora sobre a  $\alpha$ -amilase, podendo apresentar menor indução de efeitos adversos e aumentar as opções de tratamento para Diabetes 2, por exemplo.



Estrutura 3 Amilose (A) e amilopectina (B) (94).

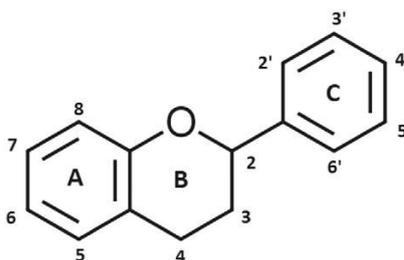
## 2.7 POLIFENÓIS

Metabólitos secundários são compostos produzidos pelas plantas, os quais desempenham papel fundamental na adaptação, sobrevivência e defesa das espécies vegetais. As atividades antimicrobiana, antiviral e de proteção contra raios UV são desempenhadas por esses compostos a favor das plantas. São distribuídos em três grandes grupos: fenólicos, terpenos e alcaloides, sendo esta classificação dependente das vias de síntese (95).

O grupo dos fenólicos é o mais representativo, presente em toda planta, podendo variar de estruturas mais simples às mais complexas. Atribuem cor, odor, e sabor a alimentos como frutas e vegetais. São representantes desse grupo: flavonoides, ácidos e álcoois fenólicos, estilbenos e lignanos. A estrutura

característica dos compostos fenólicos apresenta um ou mais anéis fenólicos (polifenóis) com hidroxilas ligadas (60,96).

Os flavonoides são os mais abundantes dentro do grupos dos fenólicos. São subdivididos em: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanas, antocianidinas e isoflavononas, geralmente com estrutura básica C3-C6-C3, podendo ser classificados de acordo com grupos metil, hidroxil e metoxi, alterações no anel B e anéis heterocíclicos de oxigênio (60,75). A estrutura básica de um flavonoide é apresentada na Estrutura 4.



Estrutura 4 Flavonoide (60).

O polifenóis são descritos por desempenhar importantes atividades biológicas como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e ação sobre enzimas, e por isso desperta grande interesse da pesquisa. O fato de que frutas, vegetais e certas bebidas possuem polifenóis, evidenciando a facilidade de se obter estes compostos, aumenta o interesse (97).

A atividade antioxidante, extensivamente estudada e evidenciada, é garantida pela ação de polifenóis devido a estrutura desses compostos e a alta propensão de doar um hidrogênio ao elétron desemparelhado do radical livre. Estudo realizado por Sirat et al (2010), por exemplo, determinou a atividade do extrato etanólico de *Tibouchina semidecandra* L., bem como compostos isolados dessa planta. Tanto o extrato bruto, quanto os compostos isolados como quercetina e quercitrina apresentaram alta atividade antioxidante (98). Outra espécie do mesmo gênero, *Miconia albicans* (Sw.), apresentou os polifenóis rutina, quercetina e seus derivados, sendo atividade antioxidante também observada (48). Outra atividade intimamente

relacionada com ação antioxidante é a atividade anti-inflamatória, observada em vários estudos como o de Shaikh et al (2015), no qual foi estudado diferentes extratos de cinco plantas, bem como seus compostos isolados, avaliando atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH, além da capacidade de inibição de mecanismos inflamatórios *in vivo*. Neste estudo foi discutido a associação positiva entre a presença de polifenóis e atividades antioxidante e anti-inflamatória. (99).

Atividade antimicrobiana também é relatada em testes com polifenóis. O meio pelo qual agem na inibição do crescimento de microrganismos parece estar relacionado com inibição de enzimas como proteases e carboidrolases (100). Um exemplo de estudo relacionando a atividade antimicrobiana com polifenóis é o trabalho realizado por Rashd et al (2014), no qual o extrato metanólico de *Diospyros virginiana* L. apresentou atividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos. Esta atividade foi associada aos polifenóis quercetina, miricetina e luteolina, isolados da planta. O mesmo teste foi realizado para cada um desses polifenóis, apresentando atividade antimicrobiana positiva (101).

Em relação a atividade enzimática, flavonoides e outros polifenóis são poderosos inibidores das enzimas tirosinase e  $\alpha$ -amilase, sendo a classe com mais representantes que desempenham essa função. Exemplos são quercetina, miricetina, kaempferol, galangina e morina, na inibição da tirosinase. O mecanismo de inibição na maioria das vezes ocorre por inibição competitiva da atividade difenolase da enzima (75). Quanto às enzimas  $\alpha$ -amilase, é reportado potente ação inibitória pelos compostos quercetina, kaempferol e miricetina (102,103).

## 2.8 CITOTOXICIDADE E TESTES *in vitro*

Ensaio *in vitro* são utilizados e empregados como os primeiros passos para futuros testes *in vivo*. Porém, com o forte controle de uso de animais e todo o envolvimento ético, muitos destes testes têm sido utilizados para substituir os testes *in vivo*. As grandes vantagens de se empregar ensaios *in vitro* é a rapidez na obtenção de resultados, maior precisão, menor custo após a validação do método, menos variáveis interferentes e claro, questões éticas são evitadas (104).

Testes com células envolvendo este tipo de metodologia apresentam boa reprodutibilidade, sensibilidade, são mais rápidos e baratos e justificam seu uso, sendo importante instrumento de pesquisa. Uma das formas de avaliar a citotoxicidade celular é através da viabilidade celular, no qual é determinado a porcentagem de células que permaneceram viáveis após exposição à amostra. O uso de substâncias cromogênicas auxiliam na obtenção dos resultados, que são dados por espectrofotômetro (104).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades biológicas do extrato aquoso de folhas de *Miconia chamissois* Naudin.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de polifenóis e flavonoides totais presente no extrato;
- Determinar os compostos presentes no extrato por meio de técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso pelas técnicas de redução do radical DPPH e pelo método fosfomolibdênio;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato aquoso pelas técnicas de difusão em disco e microdiluição frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*;
- Avaliar a inibição da atividade enzimática do extrato aquoso frente às enzimas tirosinase e  $\alpha$ -amilase;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato frente às linhagens de queratinócito humano (HaCat), fibroblasto de camundongo (L929) e macrófagos de camundongo (Raw 264.7).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL DO BOTÂNICO

As folhas de cinco espécimes de *Miconia chamissois* foram identificadas pelo botânico Christopher Wilian Fagg e coletadas em março de 2015, no período da tarde, na Área de Proteção Ambiental Gama e Cabeça de Veado, Lago do Cedro, coordenadas 15.53.54S 47.56.38W, Brasília, Brasil. Uma exsicata do espécime foi depositada no herbário da Universidade de Brasília (UB), com o voucher Fagg CW 2358.

### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Miconia chamissois* Naudin

As folhas coletadas foram secas à temperatura ambiente durante cerca de duas semanas. Após esse período, foram submetidas a processo de catação e determinação da umidade em analisador de umidade por infravermelho (GEHAKA® IV 200). Uma média de 8,2% de umidade foi alcançada, sendo as folhas consideradas secas. O pulverizado das folhas foi produzido através de moinho de facas (Marconi®) e armazenado em recipiente de vidro abrigado da luz e do calor.

#### 4.2.1 Produção do extrato aquoso

Para a obtenção do extrato aquoso foi preparada uma infusão a partir das folhas pulverizadas de *M. chamissois*, na proporção de 1:5. Água destilada foi aquecida à ebulição, arrefecida até 70°C, quando foi imediatamente vertida sobre o pulverizado com agitação mecânica. Após a mistura arrefecer atingindo 50°C, a solução resultante foi filtrada e armazenada em potes de vidro envoltos em papel

alumínio e depositados em freezer a -20°C. Após o congelamento, a solução extrativa foi liofilizada a vácuo de 15 mTorr e a -70°C, em liofilizador VirTis SP Scientific Advantage Plus XL-70.

#### 4.2.2 Determinação de sólidos totais

A determinação do teor de sólidos totais foi realizada analisando, em detector de umidade por infravermelho (GEHAKA® IV 200), três amostras de 2 mL do material. A média das três amostras foi calculada, resultando na porcentagem de sólidos totais presente no extrato.

#### 4.2.3 Rendimento do extrato

O rendimento do processo de produção do extrato foi calculado a partir da Equação 1.

$$RF (\%) = \frac{Pf (g)}{Pi (g)} \times 100$$

**Equação 1**

Onde:

RF: rendimento final;

Pf : peso final;

Pi: peso inicial.

### 4.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

### 4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

#### 4.3.1.1 Aplicação da amostra e padrões

Para esta técnica, cromatofolhas de alumínio revestidas de sílica em gel (Sobernt Technologies<sup>®</sup>, 200 µm, 20x20) foram utilizadas como fase estacionária. Os padrões empregados foram soluções metanólicas de ácido cafeico, rutina, isovitexina, vitexina e isoquercitrina, adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e hiperosídeo (Merk<sup>®</sup>). Cerca de 10 mg/mL da amostra (solubilizada em metanol) foi esgotada duas vezes sobre a placa com o auxílio de uma capilar, enquanto que o padrão foi esgotado uma única vez. Os pontos foram aplicados a 1 cm de distância da base da placa e cerca de 7 mm entre eles.

#### 4.3.1.2 Preparo da solução eluente – fase móvel

A solução eluente para detecção de compostos fenólicos foi preparada minutos antes das cromatofolhas serem inserida na fase móvel. Os constituintes da solução eluente foram acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água deionizada, na proporção de 100:11:11:26 (v/v/v/v) (105). Após aplicação da amostra e dos padrões, a cromatoplaça foi transferida para uma cuba previamente saturada com a fase móvel.

#### 4.3.1.3 Preparo do revelador

O reagente *Natural product* - Polietilenoglicol (NP/PEG) foi utilizado como revelador por intensificar a fluorescência emitida pelas bandas. Duas soluções formaram este reagente: solução metanólica de difenolboriloxietilamina 2%, denominada solução A e solução etanólica de polietilenoglicol 4000 5%, denominada solução B. Ao término da eluição, as placas foram secas com ajuda de secador elétrico e reveladas com revelador NP/PEG (primeiro solução A e, em seguida, solução B). Após secadas novamente, foram visualizadas em câmara de UV a 365

nm (105). Por fim, o fator de retenção ( $R_f$ ) de cada banda foi calculado (Equação 2) para posterior comparação com  $R_f$  dos padrões e definição dos compostos encontrados.

$$R_f = \frac{ds}{dfm}$$

**Equação 2**

Onde:

$R_f$ : fator de retenção;

$ds$ : deslocamento do soluto;

$dfm$ : deslocamento da fase móvel.

#### **4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As análises por CLAE foram realizadas utilizando o cromatógrafo Hitashi LaChrom Elite<sup>®</sup> HPLC System acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD). Constituem o cromatógrafo: bomba L-2130, injetor L-2200, coluna L-2300 e detector DAD L-2455. A coluna utilizada foi C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm – LiChroCART<sup>®</sup> 150-4.6 Purospher<sup>®</sup> RP-18) acoplada à pré-coluna de mesmas características, mantidas a 25°C e fluxo de 0,6 mL/min durante 55 minutos de análise. Os dados foram coletados a 280 e 354 nm, sendo os cromatogramas extraídos a 354 nm.

Os constituintes da fase móvel, com foco para detecção de flavonoides e compostos fenólicos, foram ácido fosfórico 1% e acetonitrila (Tabela 1), obtidos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e Tédia<sup>®</sup>, respectivamente, e utilizados em sistema de eluição por gradiente.

Para fins de triagem, a amostra foi solubilizada a 5 mg/mL e analisada a fim de detectar algum composto fenólico. Em seguida, novas corridas foram realizadas com soluções metanólicas da amostra (4,75 mg/mL) adicionadas de cada um dos padrões (50  $\mu$ g/mL) listados na Tabela 2.

Tabela 1 - Sistema de eluição para detecção de flavonoides por CLAE.

Tempo (min)	Ácido fosfórico 1% (%)	Acetonitrila (%)
0	90	10
40	70	30
50	50	50
51	90	10
55	90	10

Uma curva padrão com vitexina nas concentrações de 8, 15, 30, 50, 75 e 100 µg/mL foi construída e a equivalência a vitexina foi determinada por regressão linear obtida por meio das áreas do pico do padrão e amostra.

Tabela 2 - Padrões utilizados nas corridas para detecção de flavonoides e compostos fenólicos.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Marca
Hiperosídeo	50	Merk
Isoquercitrina	50	Sigma-Aldrich
Isovitexina	50	Sigma-Aldrich
Quercetina	50	Sigma-Aldrich
Quercetina 3-O- $\alpha$ -L- arabinopiranosídeo	50	Sigma-Aldrich
Quercitrina	50	Sigma-Aldrich
Rutina	50	Sigma-Aldrich
Vitexina	50	Sigma-Aldrich
Vitexina 2-O- raminosídeo	50	Sigma-Aldrich

### 4.3.3 Polifenóis Totais

O teor de polifenóis totais foi avaliado por meio de teste colorimétrico, seguindo o proposto por Kumazawa et. al (2004) (106) com adaptações.

Ácido gálico foi solubilizado em metanol e utilizado para construção de curva padrão analítica nas concentrações de 3, 9, 12, 15, 18, 21 e 27  $\mu\text{g/mL}$ . O ensaio foi realizado em triplicata, adicionando 0,5 mL de ácido gálico nas concentrações da curva, 0,5 mL de  $\text{NaCO}_3$  10% e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 1N (Dinâmica®). No branco, o reagente de Folin-Ciocalteu foi substituído pelo respectivo solvente no qual foi solubilizado (metanol). Água destilada foi utilizada para zerar o aparelho.

Sob as mesmas condições o extrato foi testado, sendo o ponto de 15  $\mu\text{g/mL}$  escolhido para a análise. Água destilada foi utilizada no branco da amostra, no lugar do reagente de Folin-Ciocalteu.

Após adição do reagente de Folin-Ciocalteu, a mistura de reação foi mantida em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente, abrigado da luz. Em seguida, por meio de espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800), as absorbâncias foram obtidas a 760 nm e utilizadas para obtenção da equação da reta, pela qual foi possível determinar a concentração equivalente a ácido gálico na amostra. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  equivalente de ácido gálico por mg de extrato ( $\mu\text{g}$  EAG/mg).

### 4.3.4 Flavonoides Totais

Para a detecção do teor de flavonoides totais, foi utilizada a metodologia proposta por Kumazawa et. al (2004) (106) com adaptações. Quercetina, solubilizada em metanol, foi utilizada para construção da curva padrão nas concentrações de 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78  $\mu\text{g/mL}$ . No ensaio, 0,5 mL de cloreto de alumínio 2% ( $\text{AlCl}_3$ ) solubilizado em etanol 40%, foi adicionado a 0,5 mL de quercetina nas respectivas concentrações determinadas para formação da curva. O branco foi constituído de 0,5 mL de quercetina e 0,5 mL do solvente utilizado para

sua solubilização (metanol). O ponto avaliado da amostra foi 12,5 µg/mL, sendo testado da mesma forma a qual o padrão foi testado. No branco da amostra foi utilizada água destilada no lugar de metanol.

Após uma hora de reação a temperatura ambiente, as absorvâncias foram determinadas por espectrofotômetro (Shimadzu® UV-1800) a 420 nm e aplicadas para obtenção da equação da reta, utilizada para determinação da concentração na amostra equivalente a quercetina. Os resultados foram expressos em µg equivalente de quercetina por mg de extrato (µg EQ/mg).

#### 4.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

##### 4.4.1 Avaliação da Atividade antioxidante

###### 4.4.1.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método Fosfomolibdênio

A determinação da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio seguiu o descrito por Pietro et al. (1999) (64). Uma solução reagente foi preparada imediatamente antes do ensaio a partir de 20 mL de solução de fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 28 mM, 20 mL de solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,6 M e 20 mL de solução de molibdato de amônio  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  4 mM.

Ácido ascórbico nas concentrações de 4,5, 9, 13, 18, 23, 27, 36 e 45,50 µg/mL e BHT a 13,60, 18, 22, 27, 36, 45, 54, e 74 µg/mL foram utilizados para construção de curva padrão.

Para a construção das curvas padrão, foi adicionado 0,1 mL do padrão nas concentrações avaliadas e 1,0 mL de solução reagente. Ao controle foi adicionado 0,1 mL do solvente utilizado para solubilizar o padrão e 1,0 mL de solução reagente. Para o branco, 0,1 mL do padrão foi adicionado a 1,0 mL do solvente de solubilização. Para zerar o aparelho, 0,1 mL de solvente do padrão e 1,0 mL de solução reagente, foram utilizados. A amostra foi avaliada seguindo a mesma condição, sendo o ponto de 13,64 µg/mL avaliado. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

Após adição de todos os componentes, os microtubos foram transferidos para banho-maria a 95°C durante 90 minutos. Ao término do tempo, a leitura das absorvâncias (Shimadzu® UV-1800) foi realizada a 695 nm. As equações da reta ( $y = ax + b$ ) foram utilizadas para calcular a equivalência da amostra, onde “y” corresponde aos valores das absorvâncias do extrato e “x” o valor equivalente à concentração do padrão.

#### 4.4.1.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante por redução do radical DPPH• foi avaliada seguindo o método descrito por Blois (1958) (107). Foram utilizados como controle positivo ácido ascórbico (1,15, 1,92, 2,69, 3,08, 3,46, 3,85, 4,63 e 5,38 µg/mL) e BHT (1,92, 3,84, 7,69, 11,53, 19,23, 26,93 e 38,46 µg/mL). O ensaio foi realizado em triplicata.

Em tubos de ensaio foram acrescentados 0,1 mL do padrão nas variadas concentrações determinadas para a curva, 1 mL de etanol 95% e 1 mL de tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 5,5. Para o branco do padrão foram adicionados 1 mL de tampão, 1,5 mL de etanol 95% e 0,1 mL de padrão. No controle, 1 mL de tampão e 1,1 mL de etanol 95% foram acrescentados. Tampão foi utilizado para zerar o aparelho. Por último, no controle e nos pontos do padrão, foram adicionados 0,5 mL de DPPH• 250 mM, de tal forma que todos os tubos tiveram 15 minutos de reação antes da determinação das absorvâncias em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 517 nm.

A amostra foi avaliada nas concentrações de 1,54, 3,08, 3,46, 3,85, 4,23, 4,62 e 5 µg/mL, sendo submetida a mesma metodologia apresentada para os padrões. A porcentagem de inibição foi determinada utilizando os valores das absorvâncias na Equação 3.

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \frac{100 - (\text{absorvância da amostra} - \text{absorvância do branco}) \times 100}{\text{Absorvância controle}}$$

**Equação 3**

A equação da reta obtida com as absorbâncias foi utilizada para determinar a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) dos controles e do extrato (108). A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 5.0® aplicando one-way ANOVA e pós teste de Tukey. Foi considerado diferente estatisticamente quando  $p < 0,05$ .

#### 4.4.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada seguindo o método descrito no guia proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS) (109), com modificações. Os microrganismos foram obtidos na *America Type Culture Collection* (ATCC). Foram utilizados *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 40277). As condições básicas dos ensaios estão resumidas na Tabela 3.

##### - Preparação dos inóculos

Os inóculos *S. aureus* e *E. coli* foram reativados em meio líquido Mueller-Hinton (Himedia®) durante 24 horas a 35 °C. As bactérias, então, foram suspensas em solução salina estéril 0,9% para posterior padronização do inóculo em espectrofotômetro a 625 nm, avaliando a turbidez comparada à escala de 0,5 da solução padrão de McFarland, correspondente a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia UFC/mL para bactérias.

O fungo *C. albicans* foi preparado de forma semelhante, utilizando Sabouraud Dextrose (Himedia®) como meio de cultivo. A temperatura da estufa de incubação foi de 28°C. Para padronização do inóculo foi utilizada solução salina 0,85% com leitura em espectrofotômetro a 530 nm. A turbidez avaliada foi comparada à escala de 0,5 de solução padrão de McFarland, correspondente a 10<sup>7</sup> UFC/mL para leveduras.

Tabela 3 - Microrganismos e condições básica do experimento.

Microrganismo	Meio	Incubação (°C)	Inóculo (UFC/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Muller-Hinton	35	1 x 10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Muller-Hinton	35	1 x 10 <sup>7</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 40277	Sabouraud Dextrose	28	1 x 10 <sup>6</sup>

#### 4.4.2.1 Teste de microdiluição com reagente resazurina

##### - *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O ensaio foi realizado em triplicata, em placas de 96 poços, tendo como controle positivo ampicilina (Laborclin®) e oxacilina (Sigma-Aldrich®) a 1250 µg/mL para *S. aureus* e apenas ampicilina 1250 µg/mL para *E. coli*. A concentração de extrato variou entre 5000 e 0,04 µg/mL, em diluição seriada. Foi adicionado em cada poço 0,1 mL de inóculo contendo 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL (Tabela 3). No primeiro poço foi adicionado 0,1 mL do extrato/padrão, seguido de diluição seriada nos oito poços verticais da placa. Foi inoculado 0,2 mL de bactérias no controle de crescimento, 0,1 mL de inóculo e 0,1 mL de padrão no controle positivo e 0,2 mL de meio sem microrganismos no controle estéril. A densidade final de microrganismos em cada poço foi de 5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL. Finalizado este processo, a placa foi incubada em estufa a 35°C.

Após 24 horas de incubação, 30 µL de resazurina (Sigma-Aldrich®) na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em todos os poços e a placa foi novamente incubada durante 4 horas. O resultado é dado em concentração inibitória mínima (MIC), que corresponde à menor concentração em que a amostra e o padrão foram capazes de matar as bactérias. Essa ação é indicada pela variação de cor da resazurina de roxo para rosa fluorescente.

Após identificação do MIC pela reação com resazurina, 20 µL dos poços correspondentes foram semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia®), bem como as concentrações imediatamente acima e abaixo do MIC.

- *Candida albicans*

Para o fungo, o teste foi realizado sob as mesmas condições, tendo fluconazol 800 µg/mL (Galena®) como controle positivo e  $1 \times 10^6$  UFC/mL por poço inoculadas (Tabela 3). A densidade final de microrganismo em cada poço foi de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. Porém, a determinação do MIC ocorreu 24 horas após a adição da resazurina. Apenas as duas concentrações acima do MIC foram semeadas em placas de meio ágar Sabouraud Dextrose.

#### 4.4.2.2 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco foi determinada seguindo o descrito no guia proposto pelo NCCLS (109), em triplicata em placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton (Acumedia®) para as bactérias e Sabouraud Dextrose para o fungo (Acumedia®). Os discos utilizados no ensaio foram produzidos manualmente com papel filtro e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos, junto com os demais materiais. Atividade antimicrobiana foi considerada significativa quando o halo se apresentou igual ou superior a 10 mm (110).

- *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A amostra foi pesada e 10 mg de extrato foi solubilizado em 0,2 mL de água estéril (50 mg/mL). Os discos com amostra foram produzidos adicionando-se 20 µL de extrato nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg e mantidos isolados em placa de Petri durante 24 horas para completa absorção da amostra. Foi inoculado, em ágar Mueller-Hinton, 0,1 mL de bactérias contendo  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

Os cinco discos com as respectivas concentrações foram dispostos sobre as placas inoculadas, que foram incubadas em estufa a 35°C durante 24 horas. Uma placa com três discos de controle positivo (ampicilina 10 µg) foi preparada para cada bactéria. Os halos formados foram medidos com auxílio de paquímetro. Os resultados são expressos pela medida do diâmetro do halo da triplicata, incluindo o disco, mais desvio padrão.

- *Candida albicans*

Foi inoculado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose, 0,1 mL da solução de fungos a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. O controle positivo utilizado foi fluconazol 32 µg em três discos distribuídos sobre o meio inoculado. Os discos com amostra foram produzidos pela adição de 20 µL de extrato nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg. As placas permaneceram em estufa (28°C) durante 48 horas e a medida do halo foi determinada com uso de paquímetro. Os resultados são expressos pela medida do diâmetro do halo da triplicata, incluindo o disco, mais desvio padrão.

#### **4.4.3 Inibição de atividade enzimática**

##### 4.4.3.1 Inibição da tirosinase

Para determinação da capacidade de inibição da tirosinase, foram produzidas as seguintes soluções: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, solução de tirosinase de cogumelo (Sigma-Aldrich, T3824-25KU) 25 U/mL, solução de L-tirosina (T3754-50G) 2 mM e solução de ácido kójico (037K1501) 20 mg/mL. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

O ensaio ocorreu segundo Khatib et al (2005) (111) com modificações. Ácido kójico foi utilizado como controle positivo, avaliado em curva dose-resposta nas concentrações de 1000 a 0,98 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata, em placa

de 96 poços, adicionando 60 µL de tampão em cada poço e 10 µL de padrão nas concentrações determinadas. Por último, foram acrescentados 30 µL de tirosinase de cogumelo 25 U/mL, sendo a reação incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. No branco do padrão foram adicionados 90 µL de tampão e 10 µL de ácido kójico. O controle da enzima foi formado por 70 µL de tampão e 30 µL de enzima e também foi mantido incubado. Apenas 100 µL de tampão constituiu o branco do substrato. A avaliação da atividade do extrato foi determinada da mesma forma, sendo utilizadas as mesmas concentrações do padrão para construção da curva dose-resposta.

Ao término do tempo de incubação, 100 µL do substrato L-tirosina foram adicionados a todos os poços e após 20 minutos de reação em temperatura ambiente, as absorbâncias foram obtidas por meio de equipamento ELISA (Multimode detector DTX 800, Beckman Coulter®) a 475 nm.

A porcentagem de inibição da enzima foi calculada comparando-se as absorbâncias do controle negativo, onde a atividade da enzima foi 100%, e as absorbâncias da amostra e do padrão nas diferentes concentrações. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a Equação 4.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(C - A) \times 100}{C}$$

#### Equação 4

Onde:

C: absorbância do controle da enzima menos a absorbância do branco do substrato;

A: absorbância da amostra menos a absorbância do branco da amostra.

Os valores de IC<sub>50</sub> da amostra e do padrão foram determinados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0®, também utilizado para realização de análise estatística, aplicando teste t. Foi considerado diferente estatisticamente quando p<0,05.

#### 4.4.3.2 Inibição da $\alpha$ -amilase

O teste para determinação da atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase seguiu proposto por Bernfeld (1995) (112), adaptado por Sigma-Aldrich (113)

Para realização do ensaio foram preparadas as seguintes soluções: tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,9 com cloreto de sódio 0,0067 M, solução de  $\alpha$ -amilase pancreática suína 40 UI/mL, solução de amido 1% e solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

##### 4.4.3.2.1 Pré-incubado da amostra e controle

Em microtubos de 2 mL, o pré-incubado do controle foi formado pela adição de 950  $\mu$ L de tampão e 50  $\mu$ L de solução de  $\alpha$ -amilase 40 UI/mL. O pré-incubado da amostra foi formado pela adição de 930  $\mu$ L de tampão, 20  $\mu$ L de extrato nas concentrações de 1000, 500, 250, 126, 62,5, 31,3, 15,6, 7,81, 3,90 e 1,96  $\mu$ g/mL e 50  $\mu$ L de enzima que foram adicionados por ultimo. Acarbose foi utilizada como controle positivo nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 31,25, 15,63, 7,81, 3,91 e 1,96  $\mu$ g/mL. Os pré-incubados permaneceram em temperatura ambiente durante 30 minutos antes de prosseguir o ensaio.

##### 4.4.3.2.2 Pós-incubação

Em tubos de ensaio, o teste foi realizado em triplicata, adicionando no controle 250  $\mu$ L de tampão, 500  $\mu$ L de solução de amido 1% e 250  $\mu$ L do pré-incubado do controle (após os 30 minutos de incubação). A amostra foi constituída de 250  $\mu$ L de tampão, 500  $\mu$ L de solução de amido 1% e 250  $\mu$ L do pré-incubado da amostra de cada uma das diluições determinadas. Branco do amido foi feito incorporando 500  $\mu$ L de tampão e 500  $\mu$ L de solução de amido 1%, o branco da amostra foi preparado com 5  $\mu$ L de amostra não incubada previamente e 955  $\mu$ L de tampão. Para zerar o aparelho foram utilizados 1000  $\mu$ L de tampão.

Após adição de todos os componentes, os tubos foram transferidos para banho-maria a 40°C durante 20 minutos. Finalizado o tempo, 500 µL de DNS foram adicionados a todos os tubos e os mesmos foram transferidos para banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Por fim, 4,5 mL de água destilada foram acrescentados em todos os tubos após arrefecimento e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV – 1800) a 540 nm. Com os valores das absorvâncias, a porcentagem de inibição foi calculada utilizando a Equação 5.

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{C - A}{C} \right) \times 100$$

#### Equação 5

Onde:

C: absorvância do controle menos do branco do amido;

A: absorvância da amostra menos o branco da amostra.

A partir da porcentagem de inibição e com o log da concentração do inibidor, foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> do padrão e do extrato com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0®, também utilizado para realização de análise estatística, no qual foi aplicado teste t. Foi considerado diferente estatisticamente quando p<0,05.

## 4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

### 4.5.1 Linhagens celulares e cultivo *in vitro*

Neste teste foram utilizadas células não neoplásicas de macrófagos de camundongo (Raw 264.7), queratinócito humano (HaCat) e fibroblastos de camundongo (L929). As células Raw 264.7 (ATCC TIB-71) foram obtidas do Banco de Células do Instituto Adolf Lutz e as células L929 e HaCat foram obtidas na ATCC. Todas as linhagem foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo com vermelho de fenol (GIBCO®), pH 7, enriquecido com 10% de

soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina-estreptomicina. As células foram cultivadas em garrafas específicas de 75 cm<sup>2</sup> com filtro, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>

#### **4.5.2 Avaliação da citotoxicidade celular do extrato pelo método do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolina (MTT)**

- Linhagens HaCat e L929

O teste foi realizado em placas de 96 poços seguindo o proposto por Mosmann (1983) (114) e Hansen et al. (1989) (115). As células cultivadas foram removidas da garrafa de cultivo utilizando tripsina 0,5%/EDTA 10 mM e contadas a partir de 10 µL da solução de células em meio DMEM de fenol, em câmara de Neubauer. O número de células almejado por poço foi de  $1,5 \times 10^4$  células. Para isso, foi calculado quantos microlitros de células deveriam ser adicionados nos poços da placa para que o número de células fosse alcançado, levando em consideração que o volume final no poço era de 200 µL. Dessa forma, 200 µL de células em DMEM a  $1,5 \times 10^4$  foram depositadas em cada poço. Após o plaqueamento das células, a placa foi transferida para incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.

Após este período, o meio DMEM com vermelho de fenol 10% foi retirado e adicionados 200 µL de tratamento, que consistia em extrato nas suas respectivas concentrações, diluído em DMEM fenol 10%. A ação do extrato sobre a linhagem HaCat foi avaliada nas concentrações de 500, 250, 125, 62,2, 31,25 e 15,63 µg/mL. Para a linhagem L929 as concentrações de extrato foram 1250, 1000, 625, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Os poços correspondentes ao controle de crescimento celular não tiveram tratamento com o extrato adicionado. Apenas o meio foi retirado e repostado por meio novo. Novamente a placa foi transferida para incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 24 horas das células em contato com o tratamento, o meio DMEM fenol foi retirado e foram adicionados 50 µL de MTT (Sigma-Aldrich®) a 1 mg/mL diluído em meio DMEM incolor 10% (GIBCO®), enriquecido com D-glicose 25 mM, L-

glutamina 4 mM e hepes 25,03 mM. O controle do reagente MTT foi realizado adicionando apenas 50  $\mu$ L de MTT em três poços. A placa novamente foi incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Em seguida, 150  $\mu$ L de isopropanol acidificado (26 mL de isopropanol mais 104  $\mu$ L de HCl) foram adicionados em todos os poços e homogeneizado com auxílio de pipeta, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. Após completa solubilização, a leitura da placa foi realizada em ELISA (Multimode detector DTX 800, Beckman Coulter®) a 570 nm.

Os valores de IC<sub>50</sub> e a porcentagem de viabilidade celular foram determinados pela média de pelo menos três ensaios independentes, onde cada ensaio foi realizado em triplicata. Foi aceito desvio padrão de até 15% entre os ensaios.

#### - Linhagem Raw 264.7

O teste de citotoxicidade do extrato frente as células Raw 264.7 seguiu o mesmo protocolo utilizado para HaCat e L929. Porém, para esta linhagem, a etapa de remoção da garrada com o uso de tripsina foi excluída, por causar modificações nas células que podem interferir nos resultados. Para a remoção foi utilizado cell scraper. As concentrações de extrato utilizadas para esta linhagem para construção de curva dose-resposta foram 1500, 1250, 1000, 800, 600, 500, 400 e 300  $\mu$ g/mL e a quantidade de células inseridas em cada poço foi de  $2 \times 10^4$ .

#### **4.5.3 Viabilidade Celular**

A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir de cálculo no qual são comparadas as absorbâncias dos poços do controle de crescimento, onde não houve tratamento com o extrato, com os poços com as diferentes concentrações do tratamento. A média das absorbâncias obtidas no controle de crescimento corresponderam à quantidade máxima de formazan formado pelas células, produção proporcional à quantidade de células viáveis, sendo considerada, nos poços do

controle de crescimento, viabilidade celular igual a 100%. A Equação 6 foi utilizada para determinação de células viáveis.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A \times 100}{C}$$

**Equação 6**

Onde:

A: absorvância da amostra menos a absorvância do branco do reagente;

C: absorvância do controle de crescimento menos a absorvância do branco do reagente.

O gráfico representativo da curva de viabilidade celular e a estatística foram produzidos com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>, utilizando a porcentagem de células que resistiram ao tratamento e as concentrações correspondentes. Análise estatística foi realizada aplicando teste one-way ANOVA com pós teste de Tukey. Foi considerado diferente estatisticamente quando  $p < 0,05$ .

Com as concentrações de extrato, foi possível construir uma curva dose-resposta e o valor de IC<sub>50</sub> foi determinado relacionando a porcentagem de células viáveis *versus* o log da concentração do extrato em µg/mL. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS**

A análise para determinação do teor de sólidos totais, realizada por meio de detector de umidade por infravermelho, a partir da análise de três alíquotas de 2 mL amostra, resultou em 6,4% de sólidos totais.

### **5.2 RENDIMENTO DO EXTRATO**

No início do processo, 400 g de folhas foram utilizadas para produção do extrato. Ao término da liofilização, o peso da amostra foi de 51,22 g, indicando rendimento de 12,81% de extrato aquoso liofilizado.

### **5.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA**

#### **5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada**

Cromatografia em camada delgada (CCD) é um método analítico que tem como objetivo a separação (CCD analítica) e purificação (CCD preparativa) de compostos presentes numa mistura. Possui grande aplicação, sendo uma técnica simples e barata, de rápida execução e sem necessidade de purificação prévia da amostra. Além disso, possibilita a triagem de compostos em extratos brutos utilizando pouca amostra, bem como a separação de substâncias de vários extratos numa mesma análise (10,116,117).

A técnica por CCD é uma metodologia embasada na diferença de afinidade da amostra analisada (carregada por uma fase móvel) com a fase estacionária do sistema. Geralmente a fase estacionária é formada por folhas rígidas de alumínio ou placas de vidro minimamente revestidas por sílica em gel, chamadas cromatofolhas

e cromatoplasmas, respectivamente. A fase móvel é formada geralmente por eluente contendo solventes orgânicos.

Na técnica, uma pequena quantidade de amostra é aplicada sobre a placa a cerca de 1 cm de distância de sua base. Ao final da aplicação, a placa é inserida em uma cuba contendo a fase móvel escolhida que, por capilaridade, vai ascendendo a fase estacionária. Assim, os compostos presentes na amostra migram junto à fase móvel e à medida que interagem com a fase estacionária em diferentes pontos da placa, formam bandas, sendo que cada banda possui um tempo de retenção que é calculado pela divisão da distância percorrida pelo soluto pela distância percorrida pela fase móvel. Para fins de confirmação da presença de um determinado composto na amostra, é necessário comparar os fatores de retenção do soluto e do padrão, bem como a cor apresentada por cada banda (116,118).

Na CCD para detecção de flavonoides e compostos fenólicos, no extrato aquoso de *M. chamissois* foi observado semelhança entre a banda do composto rutina e uma banda do extrato (Figura 4, Letra D). Além disso, os valores dos fatores de retenção e coloração encontrados para essas bandas também foram similares (Tabela 4).

Os fatores de retenção encontrados para os padrões foram: 0,63 para ácido cafeico (B), 0,6 para hiperosídeo (C), 0,48 para rutina (D), 0,61 para isovitexina (E) e 0,74 para vitexina (F). O extrato apresentou 6 bandas características, sendo seus valores de  $R_f$ : 0,33, 0,48, 0,57, 0,7, 0,83 e 0,91 (Figura 9; Tabela 4).

O  $R_f$  encontrado para rutina e a banda correspondente no extrato foi de 0,48. Portanto, foi realizada nova CCD com três pontos avaliados: rutina, amostra e ponto misto (Figura 5). De acordo com o fator de retenção que foi o mesmo para padrão, amostra e ponto misto ( $R_f = 0,49$ ) foi possível concluir possível presença do flavonoide rutina no extrato.

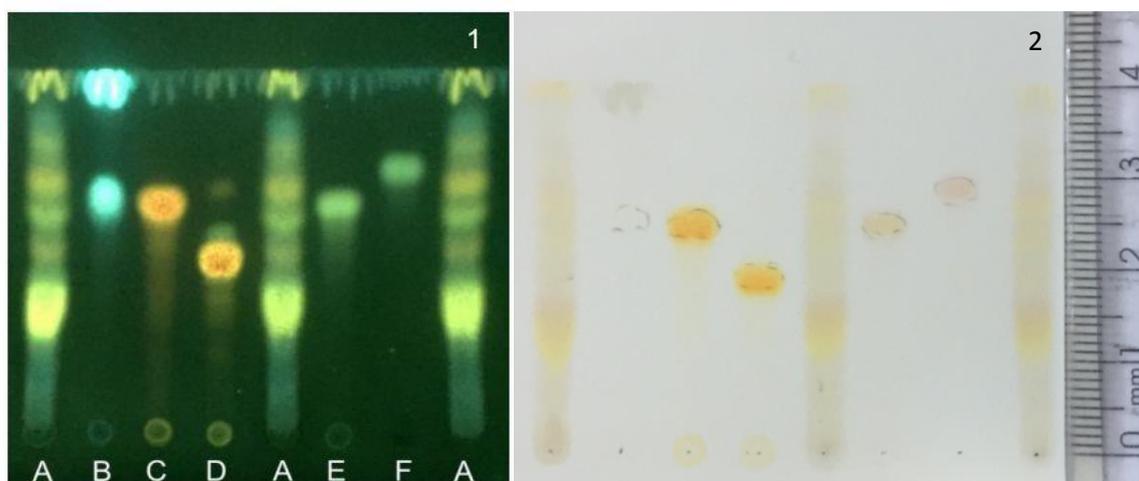


Figura 4 Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonoides e compostos fenólicos. Em 1: CCD UV e em 2: CCD visível. Em A: Extrato de *Miconia chamissois*. B-F: Padrões ácido cafeico, hiperosídeo, rutina, isovitexina e vitexina, respectivamente.

Tabela 4 - Fatores de retenção (Rf) dos padrões testados e da amostra.

Rf	Rf
Padrões	<i>M. chamissois</i>
0,63 (B)	0,91
0,6 (C)	0,83
0,48 (D)	0,7
0,61 (E)	0,57
0,74 (F)	0,48
	0,33

B: Ácido Cafeico; C: Hiperosídeo; D: Rutina; E: Isovitexina e F: Vitexina. Para *Miconia chamissois* os valores correspondem, respectivamente, às bandas no sentido superior ao inferior da placa.

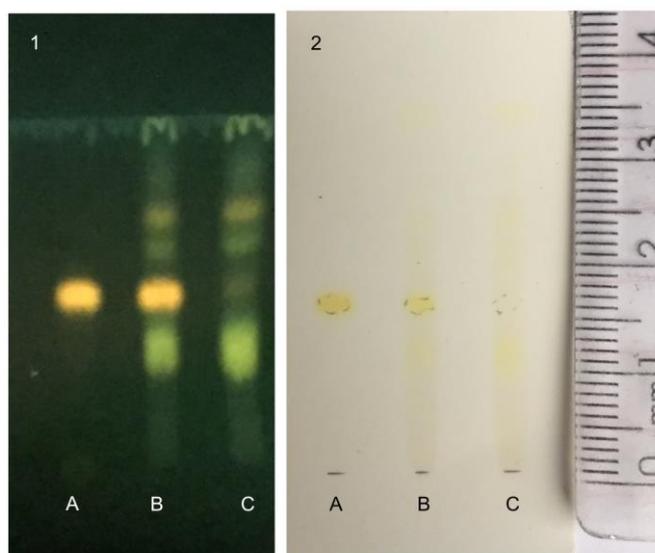


Figura 5 Cromatografia em camada delgada para detecção de rutina no extrato aquoso de *Miconia chamissois*. Em 1: CCD UV e em 2: CCD visível Em A: Padrão rutina (Sigma); em B: Ponto misto extrato e rutina e em C: Extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

Outro fato observado foi o composto rutina produzir duas outras bandas além de sua banda característica (Figura 4, imagem 1, letra D), sendo que uma delas coincide com uma banda da amostra. O fato de ter surgido novas bandas no padrão pode ser em decorrência de uma hidrólise da rutina, formando novas bandas correspondentes a algum de seus derivados. Por isso, foi obtida nova CCD com quercetina 3- $\beta$ -D-glicosídeo (isoquercitrina), um derivado de rutina. Foram aplicados três pontos na cromatofolha: um ponto contendo o padrão isoquercitrina, um ponto contendo o extrato aquoso de *M. chamissois* e um ponto misto contendo uma mistura do padrão e amostra (Figura 6, letras A, C e B, respectivamente).

Fator de retenção semelhante foi encontrado para isoquercitrina ( $R_f = 0,70$ ) e amostra ( $R_f = 0,69$ ), indicando potencial presença do composto. Portanto, foi possível concluir através dessa metodologia que o extrato aquoso de *M. chamissois* possui compostos fenólicos como flavonoides, potencialmente rutina e isoquercitrina. Porém, compostos como ácido cafeico, hiperosídeo, vitexina e isovitexina não estão presentes.

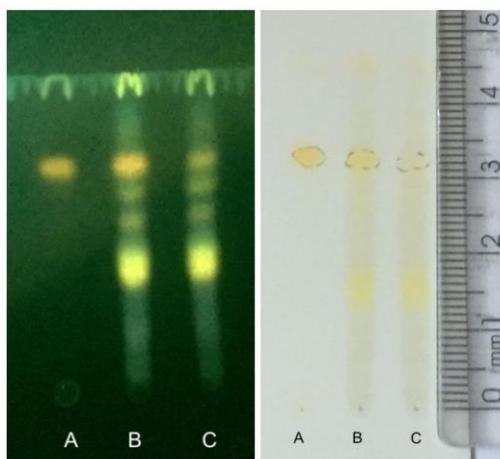


Figura 6 Cromatografia em camada delgada para detecção de isoquercitrina no extrato aquoso de *Miconia chamissois*. Em 1: CCD UV e em 2: CCD visível. Em A: Padrão Isoquercitrina; B: Ponto misto extrato mais isoquercitrina e em C: Extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

### 5.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foi realizada análise de triagem para detecção de flavonoides e compostos fenólicos. O espectro e o tempo de retenção (tR) da amostra foram comparados com a biblioteca presente no equipamento. O perfil cromatográfico do extrato aquoso de *M. chamissois* por análise por CLAE a 354 nm é apresentado na Figura 7. Os espectros obtidos para cada pico detectado são apresentados na Figura 8.

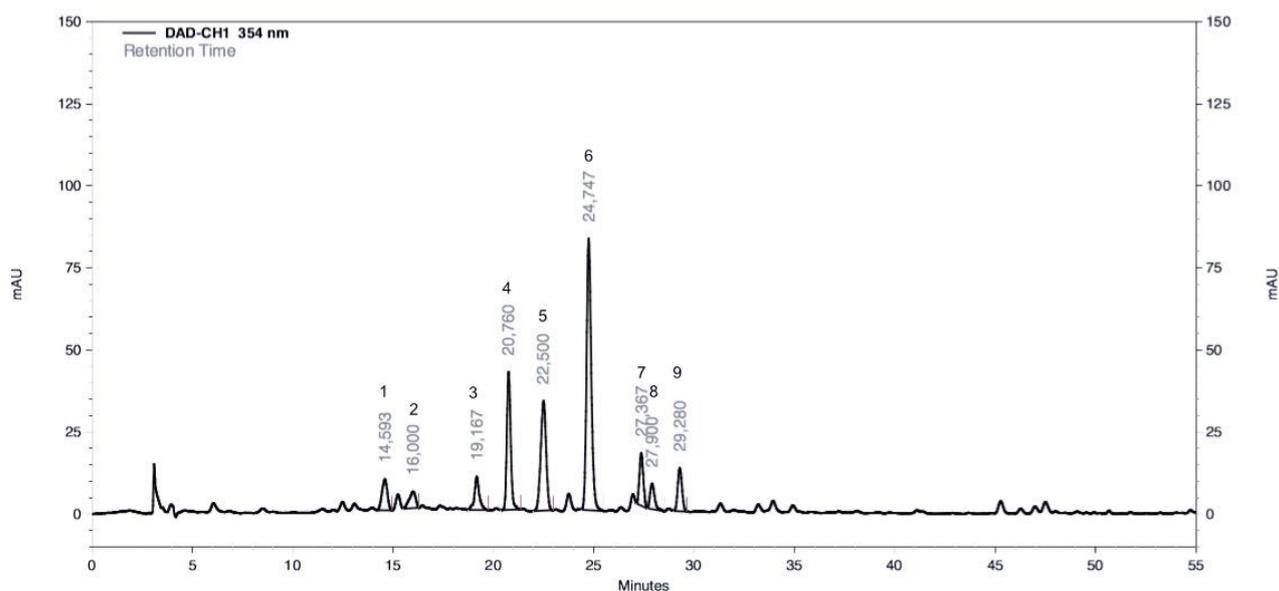


Figura 7 Perfil cromatográfico do extrato aquoso de *Miconia chamissois* a 354 nm, realizado por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tabela 5 - Valores de área, tempo de retenção e lambdas dos picos de *Miconia chamissois* detectados por Cromatografia líquida de alta eficiência a 354 nm.

Pico	Área	Tempo de retenção (min)	$\lambda$ máximo	$\lambda$ mínimo
1	708893	14,593	271	255
2	450709	16,000	268, 391	399, 388
3	688459	19,167	253, 360	399, 331
4	2262209	20,760	270, 349	309, 247
5	2506169	22,500	268, 349	309,246
6	5380125	24,747	270, 338	247, 301
7	858342	27,367	268	249
8	489119	27,900	254, 366	399, 331
9	785116	29,280	258, 356	321, 241

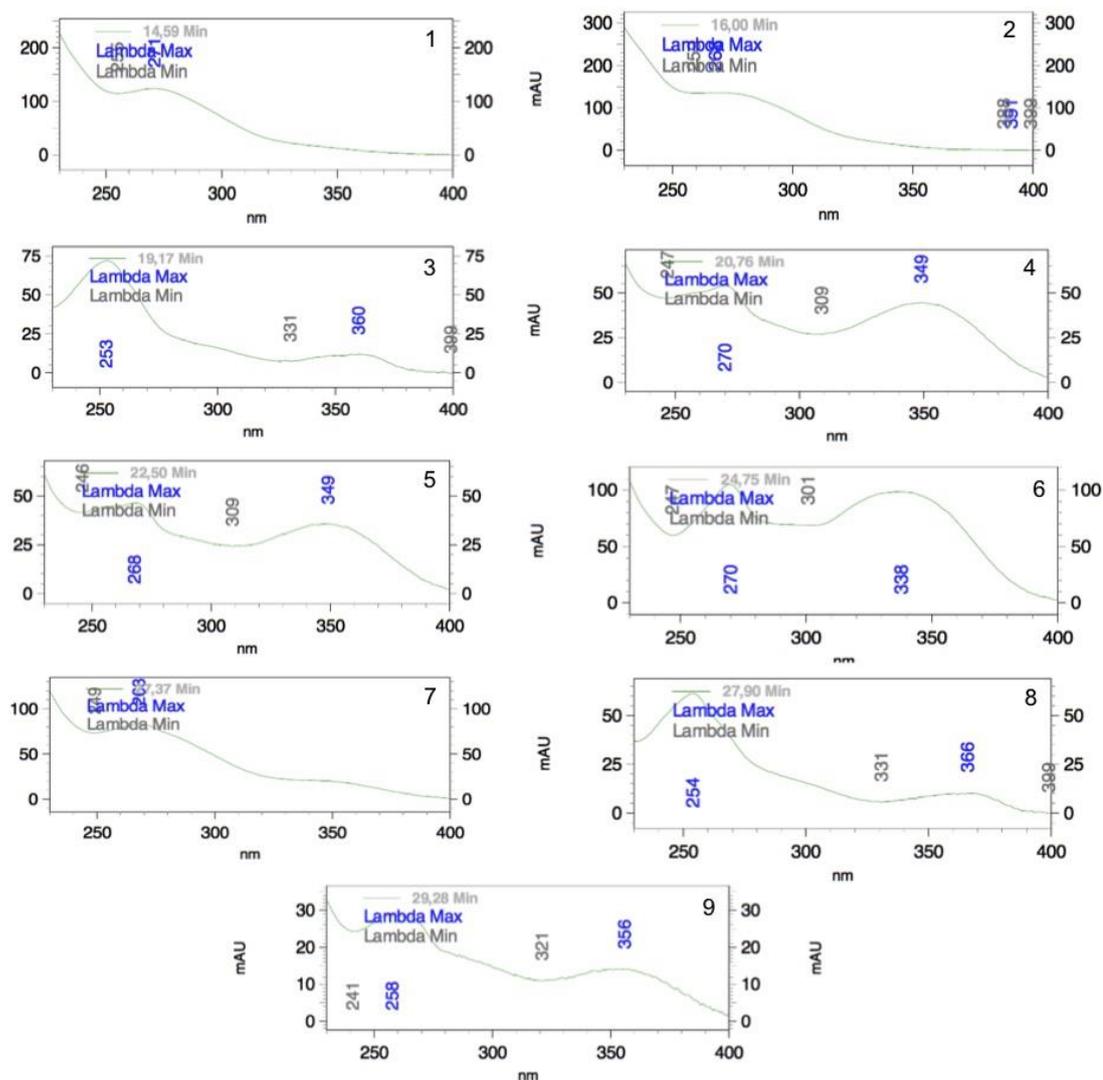


Figura 8 Espectros dos nove picos detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a 354 nm, no extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

Nove picos foram identificados, sendo que o maior pico apresentado pelo extrato (pico 6), com tempo de retenção de 24,75 min, máximos de  $\lambda$  270 e 338 e pureza de 0,95, possuía espectro semelhante aos compostos vitexina e isovitexina, com similaridade de 0,9962 e 0,9959, respectivamente (Figura 9A e 9B). Portanto, nova análise com mistura de extrato e vitexina e extrato e isovitexina foi realizada. O tR obtido para vitexina foi de 26,93 min e máximos de  $\lambda$  337 e 268 e para isovitexina, o tR encontrado foi de 27,41 min e máximos de  $\lambda$  338 e 270. Com base no tempo de retenção e nos espectros (Figura 9A e 9B) adquiridos para o extrato e os padrões,

foi concluído que o extrato não apresenta ambas as substâncias, o que condiz com o resultado encontrado pela técnica de CCD, onde não foi encontrado na amostra banda correspondente a esses padrões (Figura 9).

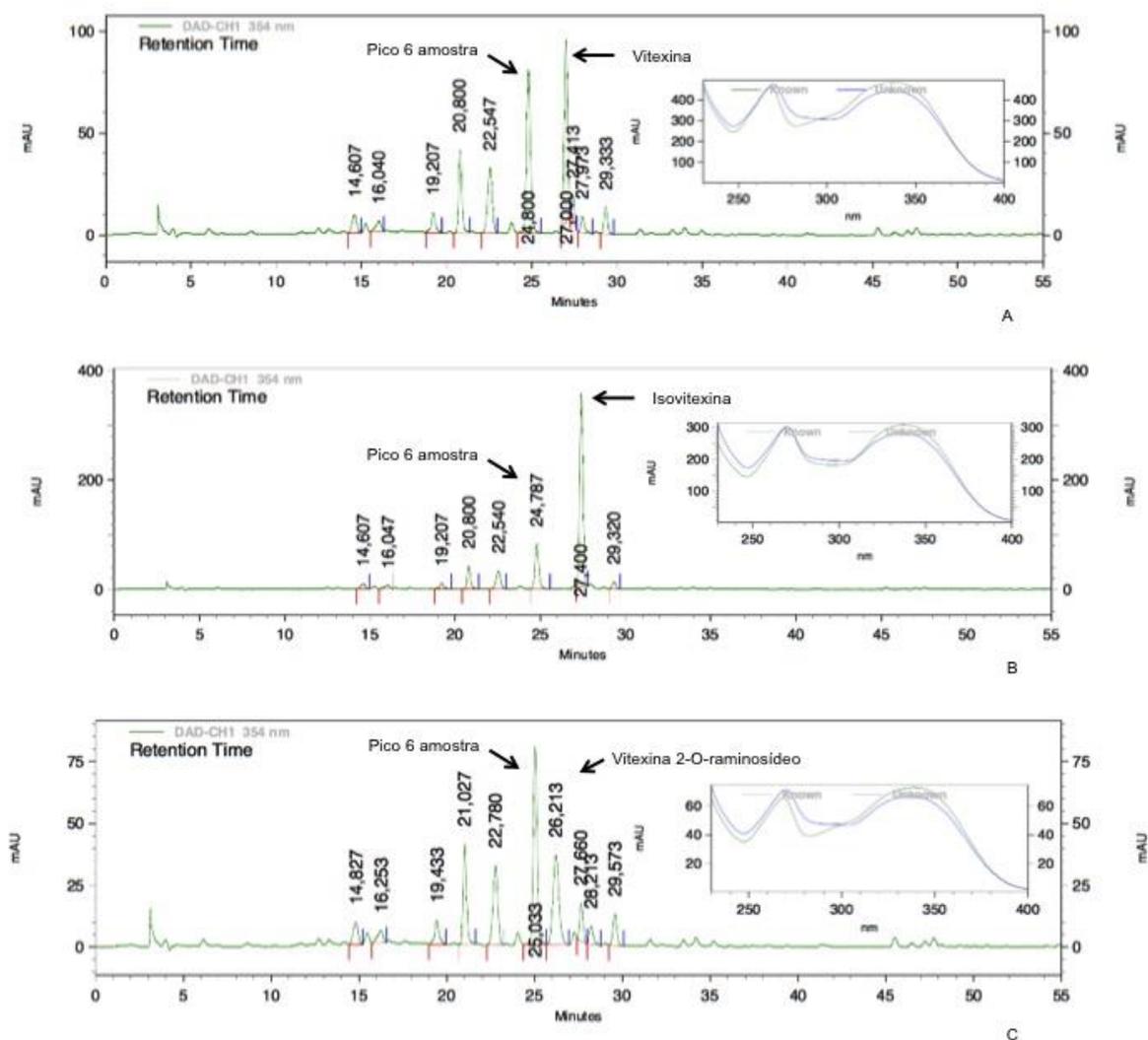


Figura 9 Cromatogramas e espectros dos pontos mistos da amostra mais padrão a 354 nm, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Padrões: vitexina (A); isovitexina (B) e vitexina 2-O-raminosídeo (C). Nos espectros, a linha clara mostra o espectro do padrão e a linha azul mostra o espectro do pico da amostra. É possível notar que embora semelhantes, os espectros são diferentes.

Entretanto, considerando a similaridade entre os espectros da amostra e vitexina, sugere-se que o composto majoritário presente no extrato é um derivado de vitexina. Um derivado, vitexina 2-O-raminosídeo, foi utilizado em nova corrida, avaliado também em ponto misto. O espectro apresentado pelo extrato foi semelhante ao espectro da vitexina 2-O-raminosídeo (Figura 9C) com similaridade de 0,9949. O tempo de retenção do padrão foi de 26,23 min e máximos de  $\lambda$  337 e 268. Embora exista semelhança entre os espectros, quando comparado juntamente com os tempos de retenção, é possível concluir que este composto também não está presente no extrato. Provavelmente outro derivado de vitexina é o composto majoritário.

Considerando a presença de um derivado de vitexina, uma curva desse composto foi construída, nas concentrações de 8, 15, 30, 50, 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , sendo a corrida realizada em triplicata. A partir das médias das áreas dos picos adquiridas de cada concentração, foi obtida a regressão linear, com equação  $y = 104860x - 109129$  e  $r = 0,99$ , onde  $y$  representa a área do pico da amostra e  $x$  o valor equivalente à vitexina. O equivalente à vitexina encontrado foi de  $44,01 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ .

Foi possível observar pela técnica de CCD a possível presença de isoquercitrina e rutina na amostra. Para confirmação do evidenciado pela CCD, foi realizada nova corrida com amostra, isoquercitrina e rutina, avaliados também em ponto misto. O extrato foi avaliado a 4,75 mg/mL e rutina e isoquercitrina a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, na mesma corrida foram adicionados outros derivados disponíveis (quercetina, quercitrina, hiperosídeo e quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo), também nas mesmas concentrações da rutina e isoquercitrina, avaliados de forma independente. Foi observado que não há semelhança entre os espectros do padrões (Figura 10) e os espectros detectados para o extrato (Figura 8).

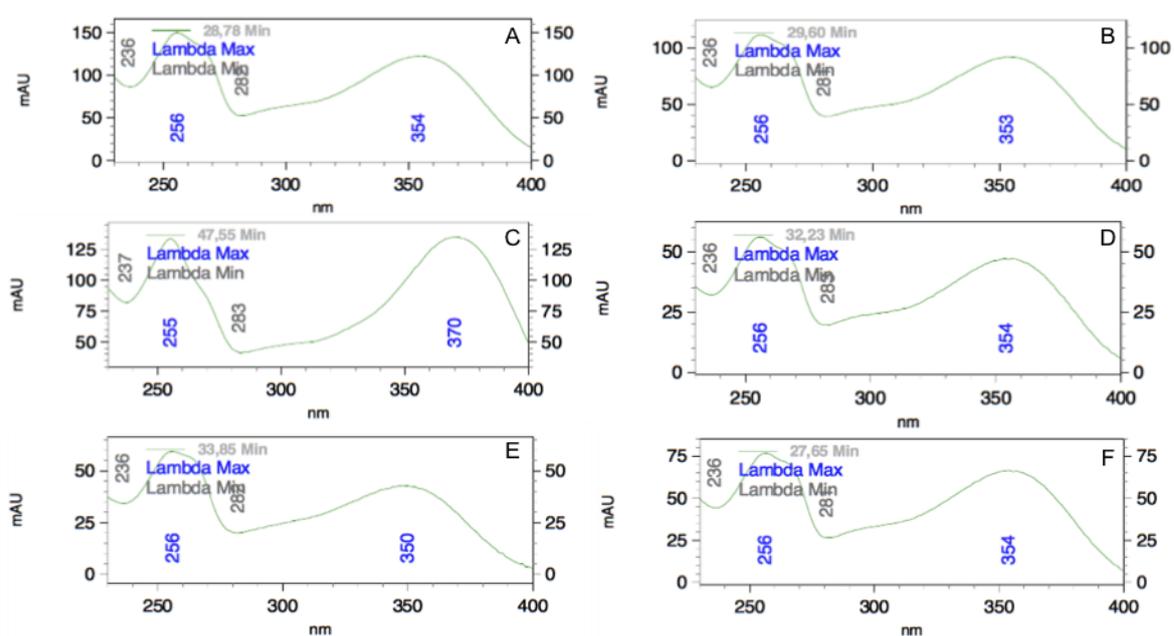


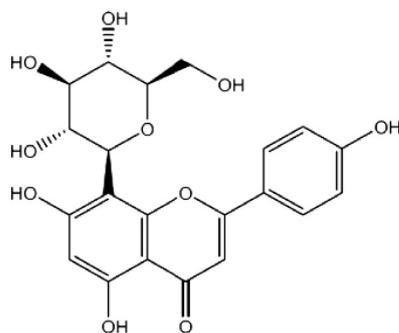
Figura 10 Espectros do padrões avaliados por CLAE a 354 nm. Hiperosídeo (A), isoquercitrina (B), quercetina (C), quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo (D), quercitrina (E) e rutina (F). Os espectros diferem dos encontrados para a amostra.

Tabela - 6 Valores de área, tempo de retenção e lambdas dos padrões avaliados.

Padrão	Área	Tempo de retenção (min)	$\lambda$ (max)	$\lambda$ (min)
Hiperosídeo	7440424	28,780	256, 354	282, 236
Isoquercitrina	5783740	29,600	256, 353	281, 236
Quercetina	7658458	47,547	370, 255	283, 237
Quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo	3003513	32,223	256, 354	283, 236
Quercitrina	2661576	33,847	256, 350	282, 236
Rutina	4100122	27,647	256, 354	281, 236

Sendo assim, foi observada possível presença de rutina e isoquercitrina no extrato pela técnica de CCD. Pela técnica de CLAE nas condições avaliadas, estes compostos não foram detectados. Este fato provavelmente pode ter ocorrido devido à diferença de sensibilidade entre os métodos. Por CLAE são necessárias concentrações maiores de amostra para que os picos sejam detectados, enquanto que na técnica por CCD, a concentração da amostra é mínima para que as bandas apareçam (119). Com os resultados encontrados também é possível sugerir que o composto majoritário do extrato seja um derivado de vitexina. Além disso, dois picos apresentaram apenas um valor máximo de  $\lambda$  (Picos 1 e 7, Tabela 5). O espectro de flavonoides tem como característica a apresentação de dois máximos de absorção no UV, que estão relacionados com a estrutura do composto. Os dois picos em questão, podem ser outros compostos diferentes de flavonóides (120). Esta é a primeira vez que o extrato aquoso de *Miconia chamissois* é avaliado por técnica de CCD e CLAE e este trabalho é uma contribuição para elucidação dos compostos presentes na espécie.

Vitexina (apigenina-8-C-D-glicopiranosídeo) (Estrutura 6) é um flavonoide pertencente ao grupo das flavonas e classificada como flavona C-glicosilada. Alguns estudos sobre suas atividades biológicas e a de seus derivados já foram realizados, e por isso, este composto tem recebido atenção atualmente (121,122). Por exemplo, estudo realizado por Yang et al (2013) evidenciou o potencial da vitexina na indução de vias de apoptose de células cancerígenas bucais (123). A atividade cardioprotetora por regulação de vias inflamatórias foi mostrada em estudo realizado por Dong et al (2013) (124). Atividades anti-inflamatória, antioxidante, hipotensiva e antitumoral foram reportadas em revisão produzida por Aslam et al (2015) e em trabalho realizado por Prabhakar et al (1981) (122,125). Vitexina, isolada da espécie *Piper carpunya*, apresentou atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* (126). Özkay et al (2013) descreveu ação antinociceptiva da vitexina em modelo com ratos (121).



Estrutura 5 Composto vitexina.

A presença de vitexina em algumas espécies de plantas da família Melastomataceae é conhecida. As três espécies mais citadas são *Dissotis rotundifolia* (Sm.) Triana, utilizada para tratamento de tuberculose (127,128), *Melastoma dodecandrum* Lour (129) e *Clidemia sericea*, que também apresentou derivado de isovitexina (130,131). Vitexina e seus derivados são presentes em outras famílias. Estudos com mais espécies da família Melastomataceae podem evidenciar a presença destes compostos. Trabalhos com abordagens diversas são encontrados na literatura, corroborando com o potencial farmacológico da vitexina e instigando o interesse no estudo com outros modelos experimentais.

### 5.3.3 Polifenóis totais

Polifenóis são compostos fenólicos que possuem, em sua estrutura, anéis benzênicos com hidroxilas ligadas a eles. São metabólitos secundários de plantas, atuando em seu funcionamento, proteção e sobrevivência. São amplamente distribuídos no reino vegetal e reportados pelo potencial farmacológico com aplicação em diversas doenças, tornando-se alvo de estudos (97,132).

A metodologia utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu é um ensaio colorimétrico empregado para a quantificação de fenóis em uma amostra. Em meio alcalino, compostos presentes no reagente - ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) – são reduzidos a óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido

de molibdênio ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) pela ação de compostos fenólicos presentes na amostra. Visualmente a reação, que inicialmente é esverdeada, passa a ser azul, sendo que o complexo formado tem intensidade colorimétrica proporcional aos fenóis presentes, bem como grupos com potencial de oxidação. Ácido gálico é o polifenol mais utilizado como padrão para determinação do teor de polifenóis (133).

A partir das absorbâncias determinadas por meio da leitura em espectrofotômetro a 760 nm, foi obtida a regressão linear da curva de ácido gálico, resultando na equação da reta  $y = 0,0943x - 0,0146$  e  $r = 0,99$ , na qual  $x$  corresponde a equivalência da amostra a ácido gálico e  $y$  a absorbância do extrato. O resultado é dado em  $\mu\text{g}$  equivalente a ácido gálico (EAG) por mg de extrato, sendo o teor obtido de  $177,18 \pm 4,96 \mu\text{g EAG/mg}$ .

Este resultado indica que a quantidade de polifenóis encontrada no extrato foi significativa, sendo superior, por exemplo, ao extrato metanólico de *Miconia albicans*, também avaliado pela metodologia com Folin-Ciocalteu em trabalho apresentado por Pieroni et al (2011), no qual foi obtido teor de polifenóis totais de  $70 \pm 0,12 \text{ mg EAG/g}$  (48). Também foi superior ao encontrado para a espécie *Miconia minutiflora*, na qual foi encontrado teor de polifenóis de  $151,4 \mu\text{g EAG/g}$  (134). O extrato etanólico das folhas da espécie *Memecylon pauciflorum* apresentou teor inferior ( $140 \mu\text{g EAG/mg}$ ) (135). Diferentes extratos de *Meriania nobilis* e *Mariania henandoi* apresentaram teores entre 11 e 26 mg EAG/g e entre 120 e 240 mg EAG/g, respectivamente (136). No extrato das folhas da espécie *Melastoma malabathricum* foi determinado teor de  $199,10 \text{ mg EAG/g}$ , superior ao encontrado para o extrato em estudo (137).

#### 5.3.4 Flavonoides Totais

O teste para detecção de flavonoides totais se baseia na complexação do íon alumínio com os grupos hidroxila e carbonila dos flavonoides presentes na amostra, resultando em cor amarela ao final da reação, em resposta ao deslocamento batocrômico induzido pela presença de  $\text{AlCl}_3$ . Neste teste, não ocorrem

interferências causadas por compostos fenólicos que não tenham o mesmo padrão estrutural de flavonoides [C(OH)-C-C(=O) ou C(OH)-C=O] (138,139).

Flavonoides representam o maior grupo dentro dos polifenóis, atuando contra diversas doenças e são alvos de trabalhos (60). Seu estudo, portanto, se torna relevante na busca por alternativas para tratamentos já estabelecidos e, quando de origem vegetal, podem apresentar menos efeitos adversos em relação ao compostos sintéticos. Dos flavonoides, o composto quercetina é o mais citado e estudado (140), além de ser o mais descrito em testes para determinação de fenóis totais.

Com as absorvâncias da curva padrão de quercetina foi possível obter a equação da reta  $y = 0,0654 - 0,0098x$  e  $r = 0,99$ , pela regressão linear. A partir da equação da reta e utilizando a concentração da amostra trabalhada e sua média de absorvância, foi calculado o teor de flavonoides totais presente, que é apresentado em  $\mu\text{g}$  equivalente a quercetina (EQ). O resultado obtido foi de 18,73  $\mu\text{g}$  EQ/mg.

O teor encontrado foi inferior ao descrito para *Miconia minutiflora*, a qual apresentou teor quase quatro vezes maior (58,49  $\mu\text{g}$  EQ/mg) (134), e inferior para o extrato das folhas de *Melastoma malabathricum*, que apresentou teor de 60,20 mg EQ/g (137), os dois únicos trabalhos encontrados com a família Melastomataceae.

## 5.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 5.4.1 Atividade antioxidante

#### 5.4.1.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do fosfomolibdênio

O método fosfomolibdênio é um ensaio colorimétrico que visa determinar a capacidade antioxidante total de um composto. Se baseia na redução do molibdênio VI (MoIV), que possui coloração azul, a molibdênio V (MoV), com posterior ligação do redutor Mo com fosfato, formando o complexo fosfomolibdênio (fosfato-MoV). Esse complexo apresenta coloração esverdeada e absorção a 695 nm (64,100). A atividade antioxidante foi determinada comparando-se as absorvâncias da amostra com as absorvâncias dos padrões.

Os padrões utilizados para a construção das curvas padrão foram ácido ascórbico e BHT. O cálculo da regressão linear resultou nas equações da reta:  $y = 0,0182x - 0,0524$  e  $r = 0,99$  para o ácido ascórbico e  $0,0133x - 0,0137$  com  $r = 0,99$  para o BHT. A equivalência da amostra aos padrões foi obtida substituindo o  $y$  da equação pela absorbância encontrada para a amostra.

A amostra apresentou capacidade de redução do complexo fosfomolibdênio, com atividade antioxidante equivalente a  $18,35 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$  de ácido ascórbico e  $22,21 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$  de BHT. Considerando que o ponto da amostra avaliado foi de  $13,64 \mu\text{g/mL}$ , é possível concluir que é necessário menor concentração da amostra para se obter a mesma atividade antioxidante dos padrões. Nesse sentido, o extrato é mais ativo em relação aos padrões avaliados, na metodologia empregada.

#### 5.4.1.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Polifenóis possuem alta predisposição a sofrer oxidação, sendo oxidados previamente a outras moléculas, atuando como antioxidantes. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua capacidade de doar elétrons, formando produtos mais estáveis e menos reativos (97)

O DPPH absorve a 515-520 nm e possui coloração roxa. Quando um agente doador de hidrogênio (AH) ou uma espécie radicalar ( $R\cdot$ ) reage sobre o DPPH, ele é reduzido a difenil-picril-hidrazina, apresentando coloração amarela e consequente redução da absorbância apresentada. Ao final da reação, pode-se calcular a porcentagem de atividade antioxidante a partir da quantidade de DPPH que foi consumido. O  $IC_{50}$  corresponde a concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50% (141–143).

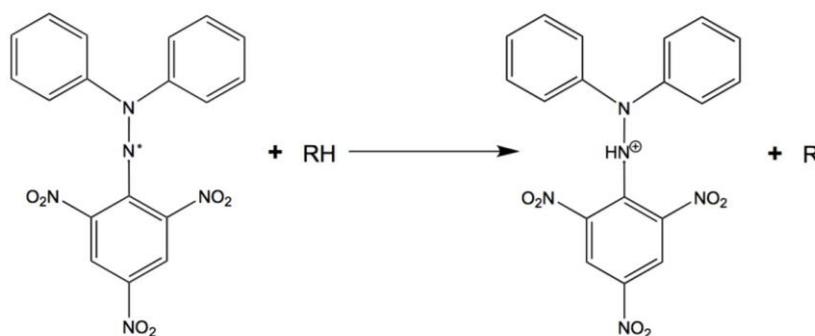


Figura 11 Reação de captação do radical DPPH• por um doador de hidrogênio (RH). Adaptado de Musa et al, 2016 (81).

O extrato aquoso de *M. chamissois* apresentou atividade antioxidante comparado aos padrões. O extrato a 5 µg/mL apresentou inibição de  $87,57 \pm 1,44$  % e atingiu  $IC_{50}$  de  $2,91 \pm 0,12$  µg/mL, semelhante ao encontrado para o padrão ácido ascórbico que apresentou  $IC_{50}$  de  $2,80 \pm 0,14$  µg/mL e a 5,38 µg/mL inibiu a atividade em  $90,613 \pm 1,61$  %. BHT, utilizado também como padrão, apresentou  $IC_{50}$  de  $13,55 \pm 0,19$  µg/mL, com inibição de  $87,18 \pm 0,719$  % da atividade a 38,46 µg/mL. Não houve diferença estatística entre amostra e ácido ascórbico (Figura 13).

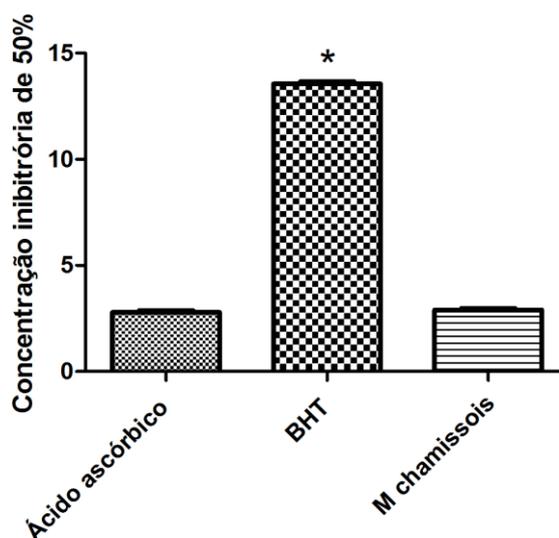


Figura 12 Valores de  $IC_{50}$  dos padrões ácido ascórbico e BHT e do extrato aquoso de *Miconia chamissois* pelo método de captação do DPPH•. BHT se mostrou diferente estatisticamente do ácido ascórbico e da amostra (\* $p < 0,05$ ).

Ácido ascórbico é um antioxidante de referência em alguns modelos experimentais. Considerando que o extrato aquoso de *M. chamissois* apresentou IC<sub>50</sub> semelhante a este padrão e não houve diferença estatística com a amostra, é sugerido que o extrato apresenta atividade antioxidante tão expressiva quanto à do ácido ascórbico. Em relação ao padrão BHT, o extrato apresentou IC<sub>50</sub> significativamente menor, indicando ter maior atividade antioxidante. Os resultados dos testes antioxidantes estão resumidos na Tabela 7.

A atividade antioxidante do extrato aquoso de *M. chamissois* foi superior ao encontrado para o extrato metanólico de *M. albicans* e *Osbeckia parvifolia*, que apresentaram IC<sub>50</sub> de cerca de 49,45 e 10,6 µg/mL, respectivamente (48,145). O extrato acetato de etila das folhas da espécie *Tibouchina semidecandra* apresentou IC<sub>50</sub> de 10,3 µg/mL (98). Atividade semelhante foi determinada para a espécie *M. minutiflora*, com IC<sub>50</sub> de 3,63 µg/mL (129). A fração n-butanol da espécie *Meriania hernandoi*, apresentou atividade antioxidante com IC<sub>50</sub> de 4,22 mg/L, apresentado em estudo realizado por Malaver et al (2015). Com relação à espécie *Meriania nobilis*, o valor de IC<sub>50</sub> encontrado foi de 287 mg/L (136).

Tabela 7 - Resultado dos teste de avaliação antioxidante.

Amostra/ Padrão	DDPH•	Fosfomolibdênio
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) + DP	Concentração do extrato equivalente ao padrão (µg/mL)
Ácido ascórbico	2.80 ± 0.14	18.35 ± 0.084
BHT *	13.55 ± 0.19	22.21 ± 1.1
<i>M. chamissois</i>	2.91 ± 0.12	-

IC<sub>50</sub>: concentração capaz de inibir 50% da atividade máxima. DP: Desvio Padrão.

\*: significância estatística diferente (p<0,05).

Atividade antioxidante é descrita por ter relação com a presença de polifenóis, podendo ser resultado da ação conjunta dos compostos presentes. A atividade apresentada decorre da capacidade desses compostos de doar elétrons e quelar metais. Dentre as classes de polifenóis, os flavonoides são os mais citados por

desempenhar esta atividade, porém taninos também possuem capacidade antioxidante (111,146). A ação antioxidante encontrada para o extrato aquoso de *M. chamissois* foi considerável em ambas as metodologias e observando o valor representativo de polifenóis encontrado, bem como teor de flavonoides, pode ser sugerido que estes compostos colaboram com a atividade antioxidante apresentada pelo extrato.

Retomando ao achado em técnica por CLAE, o composto majoritário do extrato parece ser um flavonoide derivado de vitexina, que é apresentado em alguns estudos por possuir atividade antioxidante. Um estudo realizado por Kim et al (2005) mostrou que vitexina, na concentração de 100 µg/mL, inibiu cerca de 70% do radical superóxido e quando testado na mesma concentração frente ao método por DPPH•, vitexina foi capaz de inibir a atividade em 70% (147). Em outro estudo realizado por Tsai et al (2011) também foi evidenciada a atividade antioxidante deste composto frente ao DPPH• (148). Atividade antioxidante também foi mostrada em trabalho produzido por Zielińska (2011) (149). Neste sentido, o provável derivado de vitexina, pode estar contribuindo com a atividade antioxidante do extrato, assim como outros compostos fenólicos presentes que podem atuar sinergicamente.

## **5.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana**

### **5.4.2.1 Teste de microdiluição com reagente resazurina**

Resazurina (Alamar Blue) é um composto cromogênico, amplamente utilizado na pesquisa para fins de detecção de crescimento celular ou microbiológico, citotoxicidade e apoptose. Sua utilização é explicada por ser um método simples, barato, sensível e não requerer, necessariamente, a utilização de espectrofotômetro. Além disso, a resazurina não induz morte das células e microrganismos ao término do ensaio, como no caso do MTT, sendo possível o prosseguimento do trabalho com outros testes utilizando o mesmo material celular (150–152).

A resazurina possui cor azul, sem emitir fluorescência. Na presença de microrganismos e células viáveis, é reduzida a resofurina, que apresenta cor rosa fluorescente. Ainda não há confirmação do mecanismo pelo qual atua.

Aparentemente enzimas presentes nos microrganismos são responsáveis por reduzir a resazurina. (150).

Frente à bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus*, a amostra apresentou inibição. O MIC encontrado para este microrganismo foi de 312,5 µg/mL. Os controles positivos ampicilina e oxacilina promoveram a morte da bactéria em todas as concentrações testadas, indicando que o microrganismo é resistente a estas substâncias nas concentrações e condições testadas (Figura 14).

Quanto à bactéria Gram negativa, *Escherichia coli*, o extrato aquoso de *Miconia chamissois* não foi capaz de induzir morte nas concentrações avaliadas (Figura 15). Portanto, não foi estabelecido o MIC, pois a bactéria não é sensível ao extrato. O controle positivo ampicilina foi capaz de matar o microrganismo em todas as concentrações testadas, que variaram de 0,009 a 1250 µg/mL.

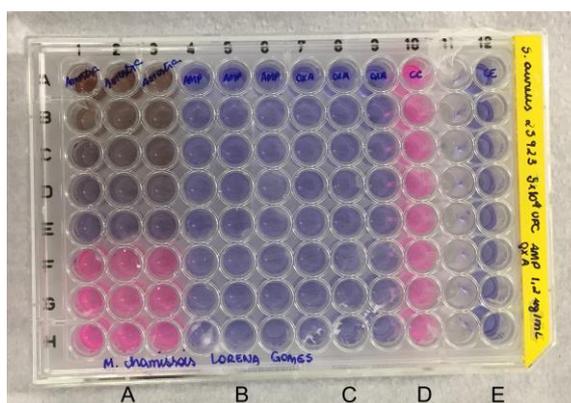


Figura 13 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente a *Staphylococcus aureus*. Em A: Extrato aquoso de *M. chamissois* (concentrações de 5000 a 39,06 µg/mL); B e C: Controle positivo ampicilina e oxacilina nas concentrações de 1250 a 0,0094 µg/mL; em D: Controle de crescimento e em E: Controle de esterilidade.

Quanto ao fungo *Candida albicans*, a amostra foi capaz de provocar morte na maioria das concentrações testadas, sendo a concentração inibitória mínima igual a 78,13 µg/mL (Figura 16). O controle positivo fluconazol induziu morte em todas as concentrações testadas e, por isso, o MIC deste composto não foi determinado neste teste, sendo superior a 800 µg/mL.

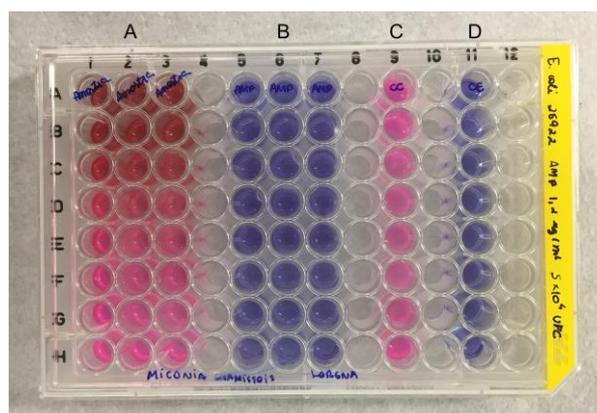


Figura 14 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente à bactéria *Escherichia coli*. Extrato aquoso de *Miconia chamissois* (concentrações de 5000 a 39,06  $\mu\text{g/mL}$ ) (A), controle positivo ampicilina nas concentrações de 1250 a 0,0094  $\mu\text{g/mL}$  (B), controle de crescimento (C) e controle de esterilidade (D).

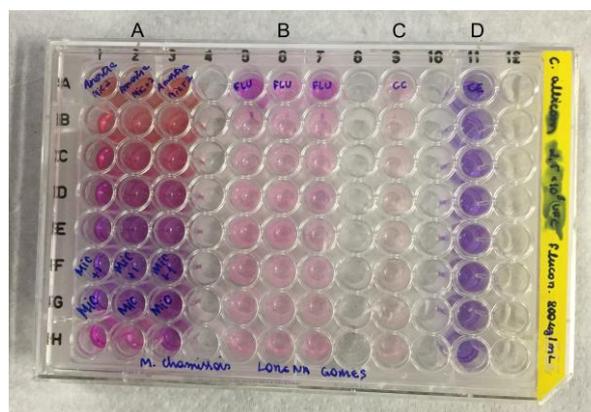


Figura 15 Teste de microdiluição com reagente resazurina frente ao fungo *Candida albicans*. Em A: Extrato aquoso de *Miconia chamissois* (concentrações de 5000 a 39,06  $\mu\text{g/mL}$ ); em B: Controle positivo fluconazol nas concentrações de 800 a 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; em C: controle de crescimento e em D: controle de esterilidade.

Com estes resultados, pode ser observado que o extrato aquoso é mais ativo na inibição do crescimento de *C. albicans* comparado a *S. aureus*, sendo que a bactéria *E. coli* apresentou resistência à ação da amostra e, por isso, seu MIC não foi estabelecido, sendo considerado maior que 5000  $\mu\text{g/mL}$ .

Após a determinação da MIC para *S. aureus*, os poços com concentração imediatamente superior e inferior foram plaqueados em meio ágar correspondente. Essa nova etapa tinha como objetivo aumentar a robustez do ensaio antimicrobiano, confirmando a sobrevivência ou morte do microrganismo. Foi observado que no poço correspondente ao MIC houve crescimento da bactéria, embora reduzido quando comparado com o poço seguinte, no qual houve alteração de cor da resazurina. Este resultado indica que o MIC anteriormente determinada para *S. aureus* é, na verdade, uma concentração bacteriostática. Nos poços imediatamente anteriores, onde a concentração de extrato foi de 625 µg/mL, não houve crescimento da bactéria, representando a concentração inibitória mínima real. Talvez as bactérias presentes nos poços, embora vivas, tenham sofrido alguma alteração metabólica causada pelo extrato e não foram capazes de oxidar a resazurina, que permaneceu colorimetricamente inalterada.

O mesmo procedimento foi realizado para *C. albicans*, porém não foi observado crescimento do fungo nos poços correspondentes ao MIC. Portanto, a concentração indicada pela mudança de cor da resazurina foi corroborada com o resultado do plaqueamento.

#### 5.4.2.2 Método por difusão em disco

A atividade antimicrobiana frente ao método por difusão em disco é expressa pela medida do halo de inibição formado. Foi considerada ação antimicrobiana positiva quando foram observados halos  $\geq 10$  mm (110). Frente ao microrganismo *S. aureus*, o extrato apresentou halo de  $12,03 \pm 0,31$  mm na concentração de 1000 µg e halo de  $10,04 \pm 0,38$  na concentração de 500 µg, indicando atividade antimicrobiana. O controle positivo com ampicilina 10 µg apresentou halo de  $33,64 \pm 0,43$  mm. Em estudo realizado por Barros et al (2006), o extrato metanólico de *M. chamissois* foi capaz de inibir o crescimento deste microrganismo (54). Pelo método de difusão em ágar, as espécies *M. albicans* e *M. rubiginosa*, na concentração de 300 mg/mL, apresentaram halo de inibição significativo para *S. aureus* (16,7 e 19 mm), como mostrado no trabalho realizado por Celotto et al (2003). Neste mesmo

estudo, a espécie *M. stenostachya*, na mesma concentração, não apresentou atividade antimicrobiana frente à bactéria (70).

O crescimento da bactéria Gram negativa *E. coli* não foi impedido com a adição do extrato aquoso, não apresentando halo de inibição em qualquer concentração testada. O controle positivo, ampicilina 10 µg, produziu halo de 26,30 ± 0,12 mm. Assim como evidenciado pela técnica de microdiluição, a amostra não foi ativa frente à *E. coli*. Em estudo realizado Rodrigues et al (2008) não foi observada atividade pela espécie *M. cabucu* (153). Em trabalho descrito por Celotto et al (2003), também não foi observada atividade antimicrobiana das espécies *M. albicans*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya* frente a esta bactéria pelo método de difusão em ágar (70).

Quanto ao fungo *C. albicans*, não houve formação de halo de inibição. O controle positivo fluconazol a 32 µg produziu halo de 24,89 ± 0,02 mm. Ao contrário do encontrado no teste de microdiluição, no teste de difusão em disco não foi observada atividade antimicrobiana. Esta diferença pode ter ocorrido em razão das limitações do ensaio de difusão em disco. Ainda no estudo descrito por Barros et al (2006), os extratos etanólicos de *M. chamissois* e *M. ligustroide* foram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* (ATCC18804) (54). Atividade antimicrobiana pela espécie *M. stenostashya* foi observada no método de difusão em ágar frente à *C. albicans* (70). Os extratos aquoso e metanólico de *M. argyrophylla* apresentaram atividade frente ao fungo, obtendo MIC de 1 e 0,12 mg/mL pelo teste de microdiluição em caldo (154).

Variáveis como natureza química dos compostos, solubilidade e massa molar são fatores que podem influenciar na difusão adequada do extrato no meio utilizado e interferir nos resultados (155). O método por difusão em disco frente ao fungo pode ter mascarado a atividade antimicrobiana, uma vez que compostos presentes em espécies vegetais, como alguns polifenóis, em especial taninos, apresentam peso molecular elevado e conseqüentemente, possuem dificuldade em difundir-se pelo meio (156). Além disso, o método por microdiluição é reportado por ser mais sensível em relação a outros métodos de avaliação (69).

Em estudo realizado por Alves et al (2008) foi observada uma situação semelhante. Foi avaliado a atividade antimicrobiana de *Miconia rubiginosa* (extratos etanólico e diclorometano) frente a diferentes bactérias. As metodologias de difusão

em disco e microdiluição foram utilizadas, bem como outras técnicas de difusão. Foi constatado que o extrato diclorometano não apresentou halo de inibição. Porém, pelo teste de microdiluição apresentou MIC de 400 µg/mL. A discordância entre os métodos foi justificada pelas limitações da difusão do extrato (157). Embora os extratos deste trabalho e o do estudo sejam diferentes, os resultados permitem sugerir que tenha ocorrido alguma inadequação na difusão da amostra no meio utilizado, gerando o resultado apresentado.

Com o crescente problema da resistência dos microrganismos aos tratamentos hoje disponíveis, a busca por novos agentes antimicrobianos se faz necessária, sendo as plantas uma fonte potencial desses agentes. Compostos polifenólicos como flavonoides e taninos são citados por possuir atividade antimicrobiana. O mecanismo envolvido nesta ação é a capacidade de inativação de enzimas e alterações na membrana celular dos microrganismos (146,156). Potencialmente, os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de *M. chamissois* contribuem para atividade antimicrobiana encontrada. O flavonoide vitexina é descrito por desempenhar ação antimicrobiana, como apresentado no trabalho realizado por Das et al (2016) frente ao teste de microdiluição (158) e também apresentado no trabalho de Basile et al (1999) (159). Provavelmente, o suposto derivado de vitexina, esteja contribuindo com a atividade antimicrobiana do extrato.

## 5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 5.5.1 Inibição da Tirosinase

O ensaio enzimático tem como base a ação difenolase da tirosinase. No teste, a L-tirosina sofre ação da tirosinase, sendo convertida a L-Dopa. A L-Dopa é oxidada formando o-dopaquinona, que ao final do processo, gera o dopacromo, um produto de cor alaranja que é lido em espectrofotômetro a 475 nm (111,160).

Para a avaliação da atividade enzimática, o extrato foi diluído de forma seriada, partindo de 1 mg/mL. O mesmo foi realizado para o controle positivo ácido kójico. Foi possível observar que o controle positivo (1 mg/mL) apresentou  $97,97 \pm$

0,11 % de inibição da atividade e o IC<sub>50</sub> determinado pela curva dose-resposta foi de  $3,36 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$ . O extrato aquoso de *M. chamissois*, na mesma concentração, apresentou inibição de  $96,23 \pm 2,12 \%$ . Contudo, o valor de IC<sub>50</sub> encontrado foi de  $183,2 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$ . A inibição apresentada pela amostra foi significativamente diferente da observada para o ácido kójico ( $P < 0,05$ ). Este resultado indica que a amostra, embora possua atividade inibitória da enzima, é muito menos ativa na inibição da tirosinase quando comparada ao ácido kójico. O gráfico representativo da porcentagem de inibição para cada concentração está apresentado na Figura 17.

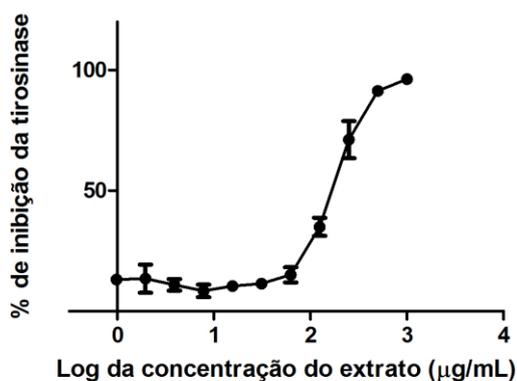


Figura 16 Porcentagem de inibição da tirosinase nas diferentes concentrações de extrato (0,98 a 1000 µg/mL). O gráfico é representado pela média da triplicata mais desvio padrão.

Na família Melastomataceae, atividade inibitória frente à tirosinase foi observada apenas na espécie *Macairea viscosa* que apresentou 17% de inibição a 100 µg/mL (161), e na espécie *Tibouchina semidecandra*, sendo sua atividade atribuída a presença de quercetina, que quando isolada do extrato, apresentou 95% de inibição (concentração de 2700 µg/mL) (98). Este é o primeiro trabalho realizado com uma espécie do gênero *Miconia*.

Estudo realizado por Adhikari et al (2008) mostrou que os extratos etanólicos das folhas de *Azadirachta indica*, do rizoma de *Curcuma longa* e das folhas de *Dolichos lablab* apresentaram 38,3%, 38% e 37% de inibição da tirosinase nas concentrações de 500, 50 e 500 µg/mL, respectivamente (72). No trabalho de Baurin

et al (2002) os extratos das folhas de *Cassia hirsuta* e *Portulaca pilosa* apresentam 10% e 93% de inibição, respectivamente, a 100 µg/mL. No mesmo estudo, o extrato de *Morus alba* foi utilizado como controle positivo apresentando 97% de inibição (161). No estudo de Ohran et al (2015), o extrato etanólico de *Viola odorata* L. na concentração de 100 µg/mL, inibiu atividade da tirosinase em 80% (162). Rutina e vitexina foram encontrados no extrato e, embora a atividade tenha sido atribuída à rutina, vitexina pode ter contribuído, em algum grau, para a inibição. Em estudo realizado por Souza et al (2012) com espécies do Cerrado, os extratos etanólicos de *Genipa americana* (fruto), *Pouteria torta* (folha) e *P. ramiflora* (folha) apresentaram IC<sub>50</sub> superior ao encontrado para *M. chamissois*, de aproximadamente 300, 200 e 200 µg/mL, respectivamente. Os extratos aquosos de *Pouteria camito*, *P. torta* e *Eugenia dysenterica* apresentaram IC<sub>50</sub> de aproximadamente 50, 30 e 11,88 µg/mL, respectivamente, sendo mais ativos na inibição da enzima quando comparado ao extrato aquoso de *M. chamissois* (82). O extrato etanólico de *Morus nigra*, estudado em trabalho realizado por Freitas et al (2016), apresentou IC<sub>50</sub> inferior (entre 5 e 9 µg/mL) ao extrato de *M. chamissois*, sendo mais ativo na inibição (163).

Inibidores da ação da tirosinase possuem potencial no tratamento de distúrbios cutâneos como a hiperpigmentação. Compostos naturais originados de plantas, como polifenóis, são citados por possuírem essa capacidade. Em estudo descrito por Yao et al (2012), a atividade inibitória do composto vitexina, isolado de *Vigna radiatae* L., apresentou IC<sub>50</sub> igual a 6 mg/mL, maior que o apresentado pelo extrato aquoso de *M. chamissois* (164). Considerando este achado, a atividade de inibição apresentada pode ser atribuída a ação sinérgica de compostos ou a outros polifenóis presentes, que também podem contribuir com as demais atividades avaliadas neste estudo.

### 5.5.2 Inibição da α-amilase

O método se baseia na formação de maltose a partir da ação da enzima sobre o substrato (amido). A maltose, então, reduz o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui cor alaranjada detectável em espectrofotômetro a 540 nm (165).

A atividade de inibição sobre a enzima  $\alpha$ -amilase foi testada nas concentrações 1,96, 3,91, 7,81, 15,63, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para amostra e nas concentrações de 1,56, 3,16, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para o padrão acarbose. Na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  a acarbose apresentou inibição de  $89,08 \pm 3,63 \%$  e a amostra, a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou  $87,11 \pm 0,32 \%$ , sendo a inibição de 87% mantida até 125  $\mu\text{g/mL}$ . O valor de  $\text{IC}_{50}$  da amostra foi de  $15,06 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que o  $\text{IC}_{50}$  da acarbose foi de  $9,20 \pm 1,29 \mu\text{g/mL}$ . A inibição apresentada pela amostra foi significativamente diferente da observada para a acarbose ( $P < 0,05$ ). De acordo com os resultados encontrados para  $\text{IC}_{50}$ , foi possível concluir que o extrato, embora menos eficaz em relação ao padrão, é um bom inibidor da enzima, demonstrando grande potencial. O gráfico representativo das porcentagens de inibição para cada concentração está apresentado na Figura 18.

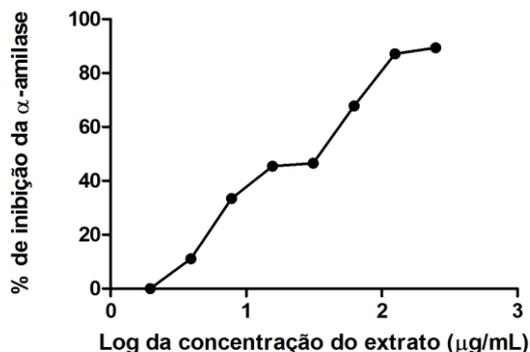


Figura 17 Porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase nas diferentes concentrações de extrato (1,96 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). O gráfico é representado pela média da triplicata mais desvio padrão.

Apenas duas espécies são registradas com a família Melastomataceae frente a atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase: o extrato etanólico de *Memecylon pauciflorum*, que apresentou atividade inibitória com  $\text{IC}_{50}$  de 270  $\mu\text{g/mL}$  (135) e o extrato etanólico de *Miconia* sp., que apresentou  $\text{IC}_{50}$  de 28,23  $\mu\text{g/mL}$  (51). Para os extratos etanólicos das folhas de *Eugenia dysenterica* e *Pouteria ramiflora*, espécies do

Cerrado, o IC<sub>50</sub> alcançado foi cerca de 20 e 40 µg/mL, respectivamente, como apresentado em trabalho de Souza et al (2012) (166). As subfrações isopropanólicas de *Eugenia dysenterica*, em trabalho realizado por Zorzin (2014), apresentaram IC<sub>50</sub> superior (entre 32,14 e 128 µg/mL) ao extrato de *M. chamissois* (167). O extrato aquoso de *Euphorbia hirta* apresentou IC<sub>50</sub> de 180,09 µg/mL (168). *Miconia chamissois* apresenta maior eficácia na inibição, quando comparado a essas espécies. Com relação ao extrato aquoso de casca do caule de *Pouteria caimito* e das folhas de *P. ramiflora* e *P. torta*, espécies também provenientes do Cerrado, apresentaram IC<sub>50</sub> de 13,06, 7,08 e 5,67 µg/mL (166), respectivamente, sendo considerados mais ativos na inibição da enzima, quando comparado ao extrato aquoso de *M. chamissois*.

Estudos mostram relação entre atividade inibitória da α-amilase e a presença de compostos fenólicos (169,170). Um forte correlação entre atividade inibitória e teor de polifenóis foi encontrada para espécie *Aristotelia chilensis* em estudo realizado por Rubilar et al (2010) (171). Em trabalho descrito por Sayed et al (2008), no qual a atividade inibitória foi determinada por outra metodologia, foi apresentada ação inibitória da vitexina e isovitexina. As porcentagens de inibição encontradas para os compostos foram de 65,7% e 30,1%, respectivamente, na concentração de 5 mg/mL (172). Em menor concentração de extrato de *M. chamissois* foi encontrado porcentagem de inibição superior. O provável derivado de vitexina deve auxiliar na ação inibitória, juntamente com outros compostos presentes no extrato.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolina] é um método colorimétrico utilizado para determinação da proliferação e viabilidade celular. É um teste rápido, barato e preciso que permite avaliação de várias amostras devido à leitura ser realizada em equipamento Elisa. O teste é embasado na metabolização enzimática do MTT (que possui cor amarela) pelas mitocôndrias de células vivas, formando um produto de cor roxa, chamado formazan. O formazan é produzido na forma de cristais por ação da respiração de células viáveis e precisa ser solubilizado

(no caso, com solução ácida de isopropanol). É detectado por espectrofotômetro a 570 nm e sua leitura é proporcional ao número de células vivas (114,173).

Este é o primeiro estudo avaliando a citotoxicidade do extrato aquoso de *Miconia chamissois*. O interesse pelas linhagens escolhidas para realização deste ensaio se resume na produção de futuras formulações de uso tópico, por isso as linhagens de fibroblasto e queratinócito, células constituintes da pele, e no interesse de continuar a pesquisa, avaliando a atividade anti-inflamatória, que justifica o uso de Raw 264.7. Para isso, seria interessante que o extrato se apresentasse o menos citotóxico possível. Nesse sentido, foi necessário a determinação do IC<sub>50</sub>, que foi obtido com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0®, com as porcentagens de células viáveis para cada concentração *versus* o log das concentrações em µg/mL (Tabela 8). O gráfico de viabilidade celular (Figuras 19, 20 e 21) foi plotado a partir da porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento e a concentração correspondente.

Para a linhagem de macrófagos de camundongo Raw 264.7, o IC<sub>50</sub> encontrado foi de 977 µg/mL, o que permitiu concluir que o extrato não é tóxico para esta linhagem, pois necessita de alta concentração para que metade das células presentes sejam mortas. As concentrações de 800 a 1500 µg/mL apresentaram viabilidade celular significativamente diferente da observada para o controle (P <0,05). O gráfico da viabilidade celular frente a linhagem Raw 264.7 é apresentado na Figura 19.

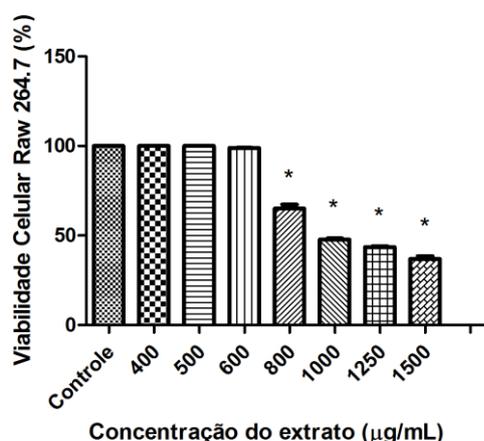


Figura 18 Viabilidade celular de macrófagos de camundongo (Raw 264.7) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

Tabela 8 - Valores de IC<sub>50</sub> encontrados para as linhagens estudadas (Raw 264.7, HaCat e L929).

Linhagem	Descrição	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Raw 264.7	Macrófago de camundongo	977
HaCat	Queratinócito humano	182,7
L929	Fibroblasto de camundongo	414,57

Para a linhagem de queratinócito humano (HaCat), foi obtido IC<sub>50</sub> de 182,7 µg/mL. O gráfico de viabilidade celular é apresentado na Figura 20. A viabilidade celular nas concentrações de 125 a 500 µg/mL foi significativamente diferente da encontrada no controle ( $P < 0,05$ ). Em estudo realizado por Freitas et al (2016), foi observado que o extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* apresentou viabilidade celular inferior a 10%, na concentração de 1000 µg/mL e IC<sub>50</sub> de 324,2 µg/mL (163). Em comparação com o extrato avaliado no trabalho de Freitas, o extrato de *M. nigra* possui citotoxicidade inferior ao extrato para *Miconia chamissois*. No trabalho descrito por Souza et al (2012), 500 µg/mL de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* e *Pouteria torta* apresentaram viabilidade de cerca de 30 e 60%, respectivamente (82). Na mesma concentração, é encontrado cerca de 22% de viabilidade frente ao extrato aquoso de *M. chamissois*, sugerindo que o extrato em estudo seja mais citotóxico frente a esta linhagem, comparado às espécies estudadas por Souza et al.

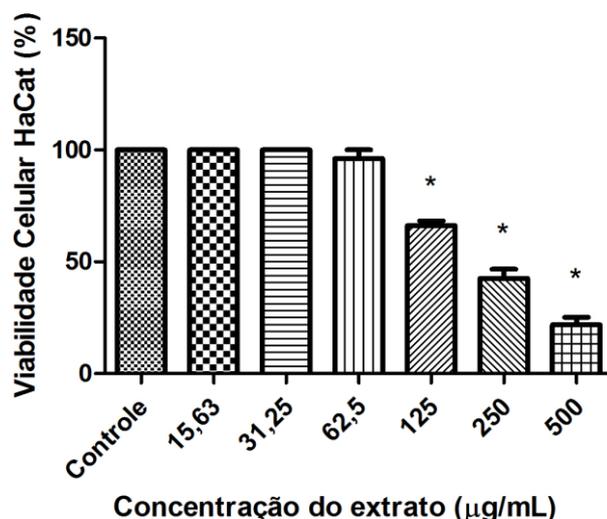


Figura 19 Viabilidade celular para queratinócitos humanos (HaCat) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

Frente à linhagem de fibroblastos de camundongo (L929), o IC<sub>50</sub> encontrado foi igual 414,57 µg/mL. O gráfico de viabilidade para esta linhagem se encontra na Figura 21. A viabilidade celular observada nas concentrações de 125 a 1250 µg/mL foram diferentes da calculada para o controle ( $p < 0,05$ ). Em estudo realizado por Forte (2012), o extrato metanólico de *M. minutiflora*, na concentração de 100 µg/mL, apresentou viabilidade celular para a linhagem L929 inferior a 40%. Em 10 µg/mL, a viabilidade celular observada foi de aproximadamente 70%. Nessas concentrações, o extrato aquoso de *M. chamissois* apresentou citotoxicidade inferior, sendo encontrado 100% de viabilidade celular na concentração de 62,5 µg/mL.

Em estudo descrito por Souza et al (2012), o extrato aquoso das plantas do Cerrado *Eugenia dysenterica* e *Pouteria torta*, na concentração de 500 µg/mL, apresentou viabilidade celular de cerca de 45%. Para o extrato de *M. chamissois*, nessa mesma concentração, foi encontrada viabilidade de cerca de 50% das células, sugerindo que o extrato em estudo é relativamente menos citotóxico nessa concentração, quando comparado à espécie estudada por Souza et al (82). No estudo de Freitas et al (2016) com extrato etanólico de *Morus nigra*, espécie oriunda do Cerrado, foi encontrado IC<sub>50</sub> de 116,3 µg/mL. Além disso, foi observado que na concentração de 1000 µg/mL o extrato etanólico induziu morte de mais de 80% das

células (L929), apresentando viabilidade celular inferior a 10% (163). Na mesma concentração, tendo como tratamento o extrato aquoso de *M. chamissois*, foi observado viabilidade próxima de 50%, indicando que o extrato de *M. chamissois* é menos citotóxico se comparado ao extrato etanólico de *Morus nigra*.

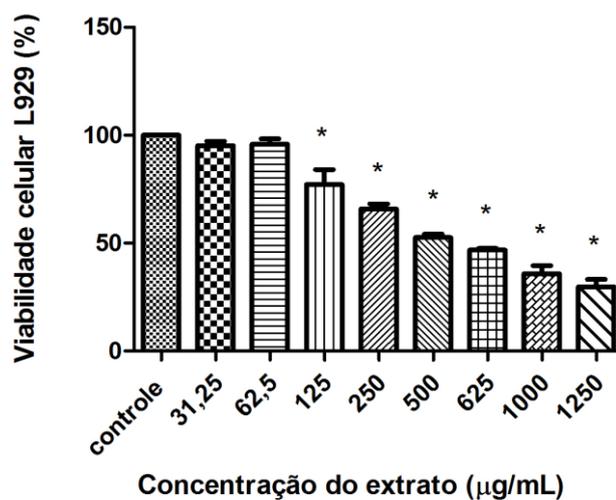


Figura 20 Viabilidade celular para fibroblasto de camundongo (L929) nas diferentes concentrações de extrato aquoso de *Miconia chamissois*.

Portanto, considerando os resultados obtidos neste ensaio, o extrato aquoso das folhas de *Miconia chamissois* não é tóxico para as linhagens de células não neoplásicas avaliadas, sendo um fator positivo para futura produção de formulações de uso tópico, por exemplo.

## 6 CONCLUSÃO

As plantas constituem rica fonte de compostos bioativos. Embora diversos estudos têm sido publicados, muitas espécies ainda não tiveram seus compostos e ações biológicas avaliados. A espécie *Miconia chamissois*, da família Melastomataceae, embora abundante, é pouco descrita quanto ao potencial farmacológico. Este é o primeiro trabalho realizado para esta espécie frente às atividades antioxidante, de inibição enzimática e citotóxica, bem como para elucidação preliminar de compostos presentes.

No estudo fitoquímico, a análise por CCD sugere a presença de rutina e isoquercitrina e a análise por CLAE sugere a presença de um derivado de vitexina como composto majoritário. As atividades biológicas como atividades antioxidante, antimicrobiana e de inibição das enzimas tirosinase e  $\alpha$ -amilase foram observadas pela ação do extrato, sendo este, uma potencial fonte de compostos com ação farmacológica.

O extrato aquoso de *M. chamissois* apresentou boa atividade antioxidante frente aos métodos e padrões testados, sendo comparável ao ácido ascórbico pelo método do DPPH. Atividade antimicrobiana foi observada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, pelo método de microdiluição. Assim como para outras espécies de *Miconia*, o extrato não foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli*.

A inibição das enzimas tirosinase e  $\alpha$ -amilase foi positiva para ambas as enzimas, apresentando o potencial do extrato na aplicabilidade em doenças como hiperpigmentação e Diabetes Mellitus. Os resultados encontrados para as diferentes atividade biológicas são sugeridos por ter relação com os teores de polifenóis e flavonoides encontrados na espécie. Quanto à citotoxicidade, o extrato não se mostrou citotóxico frente às linhagens estudadas (HaCat, L929, Raw 264.7).

Os achados encontrados neste trabalho sugerem o potencial farmacológico da planta, sendo necessários mais estudos para elucidação dos compostos presentes e como estes atuam nas atividade avaliadas. Este trabalho é uma contribuição com o estudo das plantas do gênero *Miconia*, da família Melastomataceae.

## 7 PERSPECTIVAS

Muito ainda pode ser estudado com a espécie *Miconia chamissois* Naudin. Devido ao potencial biológico observado neste trabalho, outras metodologias e diferentes abordagens podem ser investigados, como peroxidação lipídica, atividade anti-inflamatória e citotoxicidade frente a uma linhagem cancerígena.

O estudo fitoquímico da espécie deve ainda ser desenvolvido. Cromatografia em camada delgada preparativa e análises por ressonância magnética nuclear e outros métodos de separação, isolamento e identificação de substâncias, devem ser realizados a fim de direcionar a elucidação dos compostos presentes na espécie, bem como proporcionar padronização e caracterização do extrato. Os compostos isolados podem ser ter suas atividades avaliadas, a fim de determinar para qual substância é atribuída as ações observadas ou se é o sinergismo entre elas.

O estudo com frações e diferentes extratos produzidos com outros solventes, como um extrato etanólico, pode contribuir positivamente para os achados da espécie, assim como um estudo mais aprofundado das atividades encontradas neste trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moura-Costa GF, Nocchi SR, Ceole LF, Mello JCP, Nakamura CV, Dias Filho BP, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(2):631–8.
2. Brasil. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília; 2006. 148 p.
3. Alves LF. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. *Rev Virtual Química.* 2013;5(3):450–513.
4. Brasil. Práticas integrativas e complementares. Vol. 31. Brasília; 2012. 156 p.
5. Brasil. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília; 2006. 1-60 p.
6. WHO. Monographs on selected medicinal plants. 1999;1:295.
7. Portal Brasil. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161% [Internet]. Portal Brasil. 2016 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>
8. Brasil. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: uma ação de inclusão. Vol. 11, *Ciência & Saúde Coletiva.* 2006. 92 p.
9. Badke MR, Budó MDLD, Silva FM, Ressel LB. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Esc Anna Nery.* 2011;15(1):132–9.
10. Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Brazilian J Pharmacogn.* 2010;20(3):435–40.
11. Santos RL, Guimaraes GP, Nobre MSC, Portela AS. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev Bras Plantas Med.* 2011;13(4):486–91.

12. Foglio MA, Queiroga CL, Sousa MIDO, Rodrigues RAF. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. MultiCiências. 2006;7(1):1–8.
13. Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(2):314–9.
14. Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do Cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. Rev Bras Plantas Med. 2013;15(4):692–707.
15. ICMBio MMA. Cerrado [Internet]. [cited 2017 Jan 10]. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/cerrado>
16. Lima J, Silva MP, Teles S, Silva F, Martins G. Avaliação de diferentes substratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [*Sicana odorifera* (Vell.) Naudim]. Rev Bras Plantas Med. 2010;12(2):163–7.
17. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade. 2005;1(1).
18. Sano EE, Rosa R, Luís J, Brito S, Ferreira G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. Pesqui Agropecuária Bras. 2008;43(1):153–6.
19. MMA. O Bioma Cerrado [Internet]. [cited 2017 Jan 10]. Available from: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>
20. Santos MA, Barbieri AF, Guedes GR, Machado CJ, Carvalho JAM. Dinâmica demográfica e uso da terra no cerrado brasileiro: reflexões a partir da experiência do Padap. Rev Econ e Sociol Rural. 2012;50(2):319–31.
21. Huete AR, Peccinini A, Ferreira ME, Guimar L. Análise Comparativa dos Produtos Modis Ecologia para o Monitoramento Biofísico Ambiental do Bioma Cerrado. Rev Bras Geofísica. 2006;24:251–60.
22. Tavares LF, Silva TO, Sampaio CCV, Pazetto BC, Carvalho AMX. Influência de espécies arbóreas nativas do Cerrado sobre a acidez ativa e a umidade do solo.

Cad Agroecol. 2014;9(3):7–11.

23. ICMBio. Fitofisionomias Bioma Cerrado [Internet]. [cited 2017 Jan 24]. Available from: <http://www.icmbio.gov.br/projetoyalapao/pt/biodiversidade-3/fitofisionomias.html?showall=&limitstart=>

24. Bernardi ACC, Machado PLOA, Freitas PL, Coelho MR, Leandro WM, Júnior JPO, et al. Correção do Solo e Adubação no Sistema de Plantio Direto nos Cerrados. Embrapa Solos. 2003;46(21):22.

25. Ferreira ME, Ferreira LG, Huete AR, Peccinini AA. Análise comparativa dos produtos modis ecologia para o monitoramento biofísico ambiental do bioma Cerrado. Rev Bras Geofísica. 2006;24(2):251–60.

26. Guarim Neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. Acta Bot Brasilica. 2003;17(4):561–84.

27. Goldenberg R, Baumgratz JFA, Souza MLDER. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. Rodriguesia. 2012;63(1):145–61.

28. Goldenberg R, Reginato M. Sinopse da família Melastomataceae na Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. Bol do Mus Biol Mello Leitao (N Sér). 2006;20:33–58.

29. Reis CDOS, Bieras AC, Graças DAS. Anatomia foliar de Melastomataceae do Cerrado do Estado de São Paulo 1. Rev Bras Botânica. 2005;28(3):451–66.

30. Ocampo G, Michelangeli FA, Almeda F. Seed diversity in the tribe *Miconieae* (Melastomataceae): Taxonomic, systematic, and evolutionary implications. PLoS One. 2014;9(6).

31. Serpeloni JM, Bizarro M, Rodrigues J, Campaner L, Vilegas W, Varanda EA, et al. In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. Vol. 23, Mutagenesis. 2008. p. 501–7.

32. Melastomataceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do

Rio de Janeiro. [citado em 24 Fev 2017]. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB161>.

33. Romero R, Martins AB. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Botânica*. 2002;25(1):19–24.

34. Albuquerque LB, Aquino FG, Costa LC, Miranda ZJG, Sousa SR. Espécies de Melastomataceae Juss. com potencial para restauração ecológica de mata ripária no cerrado. *Polibotânica*. 2013;(35):1–19.

35. Chagas ECO. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) na Floresta Atlântica do Nordeste Oriental. [Dissertação] - Universidade Federal de Pernambuco. 2012.

36. Cruz AVM, Kaplan MAC. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambient*. 2004;11(1):47–52.

37. Cunha WR, Silva MLA, Turatti ICC, Ferreira DS, Betarello HL. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. *Rev Bras Fa*. 2003;84(2):47–9.

38. Santos FM, Souza MG, Crotti AEM, Martins CHG, Ambrósio SR, Veneziani RCS, et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Tibouchina candolleana* (Melastomataceae), isolated compounds and semi-synthetic derivatives against endodontic bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2012;793–9.

39. Vasconcelos PCP, Andreo MA, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of *Mouriri pusa* tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(1):146–53.

40. Mourão V, Moura D, Yam L, Souza D, Costa N, Gilm I, et al. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2017;196:168–77.

41. Gordon A, Schadow B, Quijano CE, Marx F. Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). *Food Res Int*. 2011;44(7):2120–7.

42. Chhabra S, Mahunnah R. Plants used in traditional medicine by Hayas of the Kagera region, Tanzania. *Econ Bot.* 1994;48(2):121–9.
43. Goldenberg R, Almeda F, Caddah MK, Martins AB, Meirelles J, Michelangeli FA, et al. Nomenclator botanicus for the neotropical genus *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae). *Phytotaxa* 106. 2013;106(1):1–171.
44. *Miconia* in Flora do Brasil 2020 em construção. [Internet]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 [cited 2017 Feb 23]. p. 1085–113. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2175-78602015000401085&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602015000401085&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
45. Rezende AR, Romero R, Goldenberg R. Sinopse de *Miconia* Seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil. 2014;(2001):273–87.
46. Goldenberg R. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Bot Brasilica.* 2004;18(4):927–47.
47. Cunha WR, Crevelin EJ, Arantes GM, Crotti AEM, Silva MLA, Furtado NAJC, et al. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. *Phyther Res.* 2006;20(6):474–8.
48. Pieroni LG, Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) triana leaves. *Molecules.* 2011;16(11):9439–50.
49. Trawneh AH, León F, Ibrahim MA, Pettaway S, McCurdy CR, Cutler SJ. Flavanones from *Miconia prasina*. *Changes.* 2012;(7):130–2.
50. Spessoto MA, Ferreira DS, Crotti AEM, Silva ML, Cunha WR. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine.* 2003;10(6–7):606–9.
51. Ortízz-Martínez DM, Rivas-Morales C, Garza-Ramos MA, Verde-Star MJ, Nuñez-Gonzalez MA, Leos-Rivas C. *Miconia* sp. Increases mRNA Levels of PPAR Gamma and Inhibits Alpha Amylase and Alpha Glucosidase. Evidence-based Complement Altern Med. 2016;2016:1–6.

52. Pinto GFS. Fitotoxicidade e análise fitoquímica a partir de folhas de cinco espécies do Cerrado. [Dissertação] - Universidade Estadual Paulista. 2015.
53. Kuhlmann M. Frutos e Sementes do Cerrado trativos para fauna: guia de campo. Brasília: Editora Rede de Sementes do Cerrado. 2012. 66-67 p.
54. Barros MTP, Nasser EF, Candido TS, Ferreira WA, Paula ACCFF. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas de *Miconia ligustroides* e *Miconia chamissois* (Melastomataceae). in: I Simpósio de Pesquisa e V SEMIC - Seminário de iniciação científica da UNIFENAS, 2006.
55. Sousa CMDM, Rocha H, Vieira-jr GM, Ayres MCC, Costa LS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova. 2007;30(2):351–5.
56. Roesler R, Carrasco LC, Holanda RB, Alves C, Sousa S, Pastore GM. Antioxidant activity of cerrado fruits. Ciênc Tecnol Aliment. 2007;27(1):53–60.
57. Vicentino ARR, Menezes FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Brazilian J Pharmacogn. 2007;17(3):384–7.
58. J Jiménez N, Carrillo-Hormaza L, Pujol A, Álzate F, Osorio E, Lara-Guzman O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. Ind Crops Prod. Elsevier B.V.; 2015;70:272–9.
59. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. Ciência e Tecnol Aliment. 2006;26(2):446–52.
60. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Res Int. Elsevier B.V.; 2015;74:10–36.
61. Heo J-H, Hyon-Lee, Lee K-M. The possible role of antioxidant vitamin C in Alzheimer's disease treatment and prevention. Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2013;28(2):120–5.
62. Borges LL, Lúcio TC, Gil EDS, Barbosa EF. Uma abordagem sobre Métodos

analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. Enciclopédia Biosf. 2011;7(12):1–20.

63. Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. Brazilian J Pharmacogn. 2009;19(April 2008):553–6.

64. 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. Anal Biochem. 1999;269(2):337–41.

65. Livermore DM. Discovery research: The scientific challenge of finding new antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):1941–4.

66. Tavares W. Problem gram-positive bacteria: resistance in *staphylococci*, *enterococci*, and *pneumococci* to antimicrobial drugs. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(3):281–301.

67. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quim Nov. 2010;33(3):667–79.

68. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Vol. 3, Nature protocols. 2008. p. 163–75.

69. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko T., Nishikawa SO, Freitas B. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(2):301–7.

70. Celotto AC, Nazario DZ, Spessoto MDA, Henrique C, Martins G, Cunha WR. Evaluation of the in Vitro Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Three Miconia Species. Brazilian J Microbiol. 2003;34:339–40.

71. Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J Ethnopharmacol. 1998;62(2):183–93.

72. Adhikari A, Devkota HP, Takano A, Masuda K, Nakane T, Basnet P. Screening of Nepalese crude drugs traditionally used to treat hyperpigmentation: in vitro tyrosinase inhibition. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30:353–60.
73. Sánchez-Ferrer Á, Rodríguez-López JN, Garía-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1247(1):1–11.
74. Souza PM. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado.[Dissertação] - Universidade de Brasília. 2011.
75. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. Vol. 10, *International Journal of Molecular Sciences.* 2009. p. 2440–75.
76. Faria RO, Moure VR, Amazonas MALA, Krieger N, Mitchell DA. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol Biotechnol.* 2007;45(3):287–94.
77. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.* 2006;19(6):550–71.
78. Pandya AG, Guevara IL. Disorders of hyperpigmentation. *Dermatology Clin.* 2000;18(1):91–8.
79. Shimizu K, Yasutake S, Kondo R. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003;51(3):318–9.
80. Khan KM, Maharvi GM, Khan MTH, Jabbar Shaikh A, Perveen S, Begum S, et al. Tetraketones: A new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorganic Med Chem.* 2006;14(2):344–51.
81. Ortonne JP, Passeron T. Melanin pigmentary disorders: Treatment update. *Dermatol Clin.* 2005;23(2):209–26.
82. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLoS One.* 2012;7(11):1–7.

83. WHO. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. 1999. p. 1–66.
84. Sociedade Brasileira de Diabetes. Prevenção, diagnóstico e conduta terapêutica na doença renal do Diabetes. 2016. p. 1–100.
85. IDF. Diabetes atlas: International Diabetes Federation [Internet]. [cited 2017 Jan 7]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/>
86. About diabetes | International Diabetes Federation [Internet]. [cited 2017 Jan 7]. Available from: <http://www.idf.org/about-diabetes>
87. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Vol. 35, Diabetes Care. 2012. p. S64–S61.
88. Luyen NT, Tram LH, Hanh TTH, Binh PT, Dang NH, Minh C Van, et al. Inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*. Phytochem Lett. 2013;6(3):322–5.
89. Kim KT, Rioux LE, Turgeon SL. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. Phytochemistry. 2014;98:27–33.
90. Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, Stanton C, Paul Ross R. The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chem. 2013;141(3):2170–6.
91. Sundarram A, Murthy TPK.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. J Appl Environ Microbiol. 2014;2(4):166–75.
92. Zhang J, Cui J-H, Yin T, Sun L, Li G. Activated effect of lignin on  $\alpha$ -amylase. Food Chem. 2013;141:2229–37.
93. Rios JL, Francini F, Schinella GR. Natural products for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. Planta Med. 2015;81(12–13):975–94.
94. Corradini E, Lotti C, Medeiros ES, Carvalho AJF, Curvelo AAS, Mattoso LHC. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. Polímeros. 2005;15:268–73.

95. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 2001;161:839–51.
96. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
97. Dall'Antonia LH, Archela E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semin Ciências Exatas e Tecnológicas.* 2013;34(2):193.
98. Sirat HM, Rezali MF, Ujang Z. Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. *J Agric Food Chem.* 2010;58(19):10404–9.
99. Shaikh RU, Pund MM, Gacche RN. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *J Tradit Complement Med.* 2015;1–7.
100. Karou D, Dicko MH, Simpore J, Traore AS. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African J Biotechnol.* 2005;4(8):823–8.
101. Rashed K, Ćirić A, Glamočlija J, Soković M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Ind Crops Prod.* 2014;59:210–5.
102. Wang H, Du YJ, Song HC.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chem.* 2010;123(1):6–13.
103. Ali H, Houghton PJ, Soumyanathb A. Alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat Diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(3):449–55.
104. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res.* 2003;6(3):317–20.
105. Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* Second. Springer, editor. New York; 1996.
106. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of

various geographic origins. *Food Chem.* 2004;84(3):329–39.

107. Blois MS. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. *Nature.* 1958;181:1199–200.

108. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coisson J-D, Rinaldi M, Arlorio M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2009;114(3):889–97.

109. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. Vol. 23, Nccls. 2003. 1-58 p.

110. Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV. Antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of *Anacardium occidentale* Linn. against multi-drug resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17(4):572–7.

111. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic Med Chem.* 2005;13(2):433–41.

112. Bernfeld P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol.* 1995;1:149–58.

113. Sigma-Aldrich. Enzymatic Assay of  $\alpha$ -Amylase (EC 3.2.1.1). <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>.

114. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.

115. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989;119:203–10.

116. Silva N, Miranda F, Conceição G. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Sci*

Plena. 2010;6(2):1–17.

117. Bednarík A, Tomalová I, Kanický V, Preisler J. Thin-layer chromatography combined with diode laser thermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatography A*. 2014;1364:5–9.

118. Cheng S-C, Huang M-Z, Shiea J. Thin layer chromatography/mass spectrometry. *J Chromatography A*. 2011;1218:2700–11.

119. Fried B, Sherma J. *Thin-Layer Chromatography, Revised And Expanded*. 4<sup>a</sup>. New York: Marcel Dekker; 1999. 512 p.

120. Huber LS, Rodriguez-amaya DB. Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e Fatores que influenciam a composição em alimentos. *Aliment Nutr*. 2008;19(1):97–108.

121. Özkay ÜD, Can ÖD. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacol Biochem Behavior*. 2013;109:23–30.

122. Aslam MS, Ahmad MS, Mamat AS. Pharmacological Potential of Vitexin. *Indian Res J Pharm Sci*. 2015;2(2):114–22.

123. Yang SH, Liao PH, Pan YF, Chen SL, Chou SS, Chou MY. The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. *Phyther Res*. 2013;27(8):1154–61.

124. Dong LY, Li S, Zhen YL, Wang YN, Shao X, Luo ZG. Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating inflammatory cytokines and MAPK pathway. *Am J Chin Med*. 2013;41(6):1251–66.

125. Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan MS. Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Med*. 1981;43(4):396–403.

126. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, Mendonça S, Oliveira LFS, et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J Ethnopharmacol*. 2010;128(3):583–9.

127. Nguta JM, Appiah-Opong R, Nyarko AK, Yeboah-Manu D, Addo PGA.

Medicinal plants used to treat TB in Ghana. *Int J Mycobacteriology*. 2014 Asian African Society for Mycobacteriology. 2015;4(2):116–23.

128. Rath G, Touré A, Nianga M, Wolfender JL, Hostettmann K. Characterization of C-glycosylflavones from *Dissotis rotundifolia* by liquid chromatography - UV diode array detection - tandem mass spectrometry. Vol. 41, *Chromatographia*. 1995. p. 332–42.

129. Serna DMO, Martínez JHI. Phenolics and polyphenolics from Melastomataceae species. *Molecules*. 2015;20(10):17818–47.

130. Montenegro H, González J, Ortega-Barria E, Cubilla-Rios L. Antiprotozoal activity of flavonoid glycosides isolated from *Clidemia sericea* and *Mosquitoxylon jamaicense*. *Pharm Biol*. 2007;45(5):376–80.

131. Veitch NC, Grayer RJ, Di C, Grayer RJ, Grayer J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat Prod Rep*. 2011;28(10):1626.

132. Soares M, Welter L, Kuskoski EM, Gonzaga L, Fett R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágaras e Isabel. *Rev Bras Frutic*. 2008;30:59–64.

133. Awah M, Uzoegwu PN, Ifeonu P, Oyugi O, Rutherford J, Yao X, et al. Free radical scavenging activity, phenolic content and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chem*. 2012;131:1279–86.

134. Forte ALSA. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica. [Dissertação] - Universidade de São Paulo. 2012.

135. Deo P, Hewawasam E, Karakoulakis A, Claudie DJ, Nelson R, Simpson BS, et al. In vitro inhibitory activities of selected Australian medicinal plant extracts against protein glycation, angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes linked to type II diabetes. *BMC Complement Altern Med*. BioMed Central. 2013;61(5):943–7.

136. Valverde Malaver CL, Colmenares Dulcey AJ, Isaza Martínez JH. Comparison of DPPH Free Radical Scavenging, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), and

Total Phenolic Content of Two *Meriania* Species (Melastomataceae). *Rev Cienc.* 2015;19(2)(2):117–24.

137. Danladi S, Wan-Azemin A, Sani YN, Mohd KS, Rao US M, Mansor SM, et al. Phytochemical screening, total phenolic and total flavonoid content, and antioxidant activity of different parts of *Melastoma malabathricum*. *J Teknol.* 2015;77(2):63–8.

138. Pontis JA, Costa LAMA., Silva SJR, Flach A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Sci Technol.* 2014;34(1):69–73.

139. Cornard J., Merlin J. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. *J Mol Struct.* 2001;569(1):129–38.

140. Genovese MI, Da Silva Pinto M, De Souza Schmidt Gonçalves AE, Lajolo FM. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulpes from Brazil. *Food Sci Technol Int.* 2008;14(3):207–14.

141. Sýs M, Metelka R, Vytřas K. Comparison of tyrosinase biosensor based on carbon nanotubes with DPPH spectrophotometric assay in determination of TEAC in selected Moravian wines. *Monatshefte für Chemie.* 2015;146(5):813–7.

142. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Quim Nova.* 2009;32(3):689–702.

143. Pyrzynska K, Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal Methods.* 2013;5(17):4288–95.

144. Musa KH, Abdullah A, Al-Haiqi A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. *Food Chem.* 2016;194:705–11.

145. Murugan R, Parimelazhagan T. Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. - An in vitro approach. *J King Saud Univ - Sci.* 2013;26(4):267–75.

146. Silva MJD, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA. Avaliação da

atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). Rev Ciencias Farm Basica e Apl. 2012;33(2):267–74.

147. Kim JH, Lee BC, Kim JH, Sim GS, Lee DH, Lee KE, et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. Arch Pharm Res. 2005;28(2):195–202.

148. Tsai J, Huang G, Chiu T, Huang S. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium species*. African J Pharm Pharmacol. 2011;5(4):468–76.

149. Zielińska D, Zieliński H. Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies. Food Chem. 2011;124:672–8.

150. O'Brian J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 2000;267:5421–6.

151. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res. 2006;99(2):103–7.

152. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007;42(4):321–4.

153. Rodrigues J, Michelin DC, Rinaldo D, Zocolo GJ, dos Santos LC, Vilegas W, et al. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). J Med Food. 2008;11(1):120–6.

154. Rodrigues K, Ramos DF, Carrion LL, Cursino LMC, Jefreys MF, Pedroza LS, et al. Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of *Candida* spp. Int J Phytopharm. 2014;5(6):445–53.

155. Bona EAM, Pinto FGDS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos.

Pharmacology. 2014;81(3):218–25.

156. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564–82.

157. Alves EG, Helena A, Vinholis C, Casemiro LA, Jacometti NA, Furtado C, et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extrato brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Quim Nova. 2008;31(5):1224–9.

158. Das MC, Sandhu P, Gupta P, Rudrapaul P, De UC. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. Nat Publ Gr. Nature Publishing Group; 2016:1–13.

159. Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. Phytochemistry. 1999;52(8):1479–82.

160. E Espin JC, Morales M, Varon R, Tudela J, Garciacanovas F. A Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. Anal Biochem. 1995;231(1):237–46.

161. Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. J Ethnopharmacol. 2002;82(2–3):155–8.

162. Orhan IE, Senol FS, Erdem SA, Tatli II, Kartal M, Alp S. Tyrosinase and Cholinesterase Inhibitory Potential and Flavonoid Characterization of *Viola odorata* L. (Sweet Violet). Phyther Res. 2015;29(9):1304–10.

163. Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra ENS, De Medeiros Nóbrega YK, et al. Extracts of *Morus nigra* L leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. PLoS One. 2016;11(9):1–24.

164. Yao Y ang, Cheng X, Wang L, Wang S, Re G. Mushroom tyrosinase inhibitors from mug bean (*Vigna radiatae* L.) extracts. Int J Food Sci Nutr. 2012;63(3):358–61.

165. Silva N, Monteiro VN, Arc JD, Alcanfor X, Assis EM, Asquieri ER. Comparação

de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. Ciênc Tecnol Aliment. 2003;23(3):337–41.

166. Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhaes PO. Inhibitory Activity of alpha-Amylase and alpha-Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. *Planta Med.* 2012;78(4):393–9.

167. Zorzin FM. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. [Dissertação] - Universidade de Brasília. 2014.

168. Sheliya MA, Begum R, Pillai KK, Aeri V, Mir SR, Ali A, et al. In vitro  $\alpha$  -glucosidase and  $\alpha$  -amylase inhibition by aqueous , hydroalcoholic , and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L. *Drug Dev Ther.* 2016;7:26–30.

169. Xiao J, Ni X, Kai G, Chen X. A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(5):497–506.

170. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Tomoko M. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006;52:149–53.

171. Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutierrez C, Sineiro J, et al. Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of antioxidant compounds and  $\alpha$ -glucosidase/ $\alpha$ -amylase inhibitors. *J Agric Food Chem.* 2011;59(5):1630–7.

172. Sayed HM, Mohamed MH, Farag SF, Mohamed G a, Omobuwajo ORM, Proksch P. Fructose-amino acid conjugate and other constituents from *Cyperus rotundus* L. *Nat Prod Res.* 2008;22(17):1487–97.

173. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1–2):57–63.