UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ALESSANDRA CURY MACHADO

**Caracterização do extrato de aroeira
(*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a
viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**

AROEIRA
ASTRONIUM URUNDEUVA

BAURU

2013

ALESSANDRA CURY MACHADO

**Caracterização do extrato de aroeira
(*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a
viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão corrigida

**Bauru
2013**

M18c	<p>Machado, Alessandra Cury</p> <p>Caracterização do extrato de aroeira (<i>Myracrodruon urundeuva</i>) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos.</p> <p>Alessandra Cury Machado-Bauru, 2013.</p> <p>100p:il.;30 cm.</p> <p>Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira</p>
------	--

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho aos meus pais, Fatima Cury Machado e João Machado Junior, que estiveram sempre por perto, apoiando meus estudos por anos. Dedico também aos meus irmãos, Luis Fernando Cury Machado, Pedro Henrique Cury Machado, Thiago Cury Machado, ao meu tio Zezinho, aos meus sobrinhos, Maria Eduarda, Isabelle, Raul e Ana Beatriz. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha vida e meus estudos a Deus. Obrigada por mostrar sempre o melhor caminho que devo seguir, a estar por perto nas dificuldades e nos momentos de vitória. Obrigada pelas bençãos em minha vida!

Agradeço ao meu namorado, Jorge Luiz Abranches por estar por perto e me apoiar durante a escrita da tese. Obrigada pelo companheirismo, amizade e dedicação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pelo trabalho que desempenhamos juntos. Obrigada pela parceria, dedicação e paciência.

Agradeço à professora Dra. Anne Ligia Dokkedal Bosqueiro pela parceria que acrescentou muito ao nosso trabalho. Obrigada por todo o aprendizado com as plantas! Todo esse conhecimento só nos somou mais conhecimento em nossas vidas. Obrigada!

Agradeço à amiga e professora Dra. Carla Andreotti Damante. Obrigada pelas células gentilmente cedidas em nossa pesquisa. E, obrigada pela amizade de anos, pelo carinho e dedicação.

Agradeço as professoras da bioquímica Marília Buzalaf e Carol Magalhães pelas disciplinas cursadas e oportunidade de conhecimento no departamento.

Agradeço aos técnicos do departamento de bioquímica, Aline, Larissa, Ovidio e Thelma pela ajuda dentro do laboratório.

Agradeço a todos os alunos do departamento de bioquímica pelo companheirismo nas pesquisas.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa de cultura de células Adriana Arruda, Camila Roque, Flávia Amadeu pelo trabalho em equipe nesses anos. Com esforços, dificuldades e suor foi com que realizamos nossos trabalhos. A tudo isso obtivemos amadurecimento profissional.

Agradeço ao CIP, Centro Intensivo de Pesquisa, pelo apoio e trabalho. Obrigada também aos funcionários Marcelo, Márcia, Renato e Rafaela e ao professor Vinicius.

Agradeço ao Horto Florestal de Bauru por ter me fornecido as folhas da árvore de aroeira para realização da pesquisa.

Agradeço por parte do trabalho realizado no laboratório de Química de Produtos Naturais na Unesp de Bauru, e aos alunos Leonardo Saldanha, Lais e Cate por todo aprendizado e ajuda no processo de preparação do extrato e de análises cromatográficas.

Agradeço ao professor Dr. Wagner Villegas por fornecer o laboratório de Química da Unesp de Araraquara para as análises em HPLC e Massas, e pela ajuda do aluno de mestrado Leonardo Perez.

Agradeço ao herbário de Rio Claro pelo depósito da excicata da aroeira.

Agradeço aos amigos Maria Herminia e Cido pela amizade, dedicação e companheirismo de todos esses anos de aprendizado espírita. Obrigada pela força quando precisei. “Não precisamos de muitos amigos só de alguns amigos verdadeiros.”

Agradeço de coração à Faculdade de Odontologia de Bauru, USP por ter me acolhido como aluna de doutorado. Obrigada por todas as oportunidades e experiências enriquecedoras do universo da pesquisa. Só quem é pesquisador sabe a maravilha que é essa profissão.

Agradeço à parceria com a Faculdade de Ciências Biológicas da UNESP que complementou meus estudos.

Agradeço ao órgão de fomento, CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa do Nível Superior que financiou meus estudos durante todo esse tempo.

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar material para minha pesquisa.

Agradeço o departamento de pós-graduação e à funcionária Vera por toda a ajuda cedida com documentações.

EPÍGRAFE

"... é a ordem de Deus. E estou persuadido de que não há para vós maior bem na cidade que esta minha obediência a Deus. Na verdade, não é outra coisa o que faço nestas minhas andanças a não ser persuadir a vós, jovens e velhos, de que não deveis cuidar só do corpo, nem exclusivamente das riquezas, e nem de qualquer outra coisa antes e mais fortemente que da alma, de modo que ela se aperfeiçoe sempre, pois não é do acúmulo de riquezas que nasce a virtude, mas do aperfeiçoamento da alma é que nascem as riquezas e tudo o que mais importa ao homem e ao Estado."

** Sócrates **

Ao Viajante

“Tu que passas e ergues para mim o teu braço, antes que me faça mal. Olha-me bem. Eu sou o calor do teu lar nas noites frias de inverno. Eu sou a sombra amiga que tu encontras quando caminhas sobre o sol de agora. E os meus frutos sobre a frescura apetitosa que te sacia sede nos caminhos. Eu sou a trave amiga da tua casa, a tábua da tua mesa, a cama em que descansas, e o lenho do teu barco. Eu sou o cabo da tua enxada, a porta da tua morada e do teu próprio caixão. Eu sou o pão da bondade e a flor da beleza. Tu que passas olha-me bem e não me faças mal”

(Texto escrito ao lado de tronco de árvore dentro do Castelo de São Jorge, monumento nacional de Lisboa, em Portugal)

RESUMO

A aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) é uma árvore cujas folhas vem sendo estudadas com fins terapêuticos na medicina e odontologia por apresentar potencial antiinflamatório e antimicrobiano, além de favorecer o processo de reparo e cicatrização. O objetivo do trabalho foi caracterizar quimicamente o extrato de aroeira e avaliar seu efeito sobre fibroblastos gengivais humanos. Foi realizado a caracterização química da aroeira por meio do processo de triagem cromatográfica que consistiu na coleta das folhas sadias, maceração em metanol (MeOH) 80%, partição entre os solventes hexano, acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-(BuOH)). Em seguida, realizaram-se análises dos compostos químicos em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de fotodiodo HPLC-PAD, análises por espectrometria de massas MS e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Posteriormente foi realizada a análise de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de aroeira em fibroblastos gengivais humanos (linhagem FGH). Para a realização dos experimentos foram plaqueadas 2×10^3 células/poço em placas de 96 poços. O meio de cultivo foi substituído por meio de cultura de Eagle modificado por Dullbecco complementado por 10% soro fetal bovino (SFB) em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de aroeira (extrato bruto; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 e controle). As análises de viabilidade foram feitas nos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas, por meio dos testes de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio), captação do vermelho neutro e coloração pelo cristal violeta. A estatística foi realizada em análise de variância de 2 critérios seguido de uma análise de teste Tukey ($p < 0,05$). Os compostos encontrados no extrato foram os derivados de ácido gálico, galotaninos, além de flavonoides. Para a redução do MTT os resultados mostraram uma ligeira oscilação da absorbância em todos os grupos nos períodos experimentais. Destaque para as diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000 que apresentaram, em geral para todos os períodos, os maiores valores; enquanto os grupos de extrato bruto e diluição 1:10 apresentaram valores inferiores aos outros grupos ($p < 0,05$). Na análise da captação do vermelho neutro também houve uma leve oscilação dos valores de absorbância, no entanto os valores obtidos para o grupo do extrato bruto foram os menores em todos os períodos estudados ($p < 0,05$). Enquanto os grupos controle e de diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000

apresentaram valores semelhantes sem diferença significativa ($p>0,05$). Para o teste do cristal violeta, os resultados encontrados seguiram o mesmo padrão do vermelho neutro: valores de absorbância menores nos grupos do extrato bruto e 1:10, ao contrário dos outros grupos que apresentaram valores maiores ($p<0,05$). Em vista dos resultados, podemos concluir que o extrato metanólico de aroeira apresenta em sua composição taninos, flavonóides e derivados de ácido gálico e de galotaninos. Além disso, o extrato de aroeira é capaz de modular a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos de maneira dose-dependente.

Palavras-chave: fitoterápicos, viabilidade celular, plantas medicinais, MTT, Vermelho Neutro, *Myracrodruon urundeuva*.

ABSTRACT

Aroeira (*M. urundeuva*) is a tree whose leaves have been studied with therapeutic purpose in dentistry and medicine, due its antimicrobial and antiinflammatory potential protect, besides the repair and cicatrization processes. The aim of the study was characterize the aroeira's extract and evaluate effect over human gingival fibroblast. The aroeira's characterization was realized by means of chromatography screening, process that consists in healthy leaves maceration in 80% MeOH, partition in the BuOH, AcOEt and hexane's solvents. Next, the chemical compounds were analysed in High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array (HPLC-PAD), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) and Mass Spectrometry (MS's). Subsequently was realized the cytotoxicity's analysis from the aroeira hydroalcoholic extract in human gingival fibroblast (FGH lineage). For the experiment's realization was plated 2×10^3 cells/well in 96 well's plate. The culture's mean was substituted for Eagle's medium's culture changed for complemented Dullbeco for 10% bovine fetal serum in aroeira's hydroalcoholic extract's concentration's different (brute extract, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). The viability analysis was carried out in experimental times 24, 48, 72 and 96 hours, by means of MTT reduction's test (brometo3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), neutral red capture and violet crystal). The statistics were performed for analysis of variance in 2 criteria continue with a Tukey test analysis ($p < 0.05$). The founded compounds in the extract was the gallic acid, gallotannin linked to glucose, besides flavonoids. For the MTT's reduction the results display an absorbance oscillation lightness in all the groups in experimental periods. Distinction for the control group and 1:100, 1:1000 and 1:10000 dilution, that present, by and large, for all the periods, the biggest valuable, while the brute extract group and 1:10 dilution present valuable lower to the others groups ($p < 0.05$). In neutral red is capture analysis there was an absorbant's values light oscillation too, despite this, the gotten values for the brute extract's group was smaller in all the studied periods ($p < 0.05$). While the control group and the 1:100, 1:1000 and 1:10000 dilution presented similar values without significant difference ($p > 0.05$). In view of the results, conclude the aroeira's methanolic extract present in your composition flavonoids and gallotannin, and gallic acid derivatives. Then, the aroeira's extracts is able to human gingival fibroblast's viable modulate dependent dose way.

Keywords: phytotherapeutic, celular viability, medicinal plants, MTT, neutral red, *Myracrodruon urundeuva*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** CCD: 1- E.B. hidroalcoólico; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5-Fr aquosa. Fase móvel: BAW (6:1:2). Revelado com NP-Peg.....50
- Figura 2-** CCD: 1- E.B. hidroalcoólico; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5- Fr aquosa. Fase móvel: CHCl₃: MeOH (7:3). Revelado com NP-Peg.....57
- Figura 3-** CCD: 1- E.B. hidroalcoólica; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5-Fr aquosa. Fase móvel: CHCl₃: MeOH (7:3). Revelado com anisaldeído/ H₂SO₄.....58
- Figura 4-** Cromatograma de separação por HPLC-PAD dos constituintes químicos presentes no extrato MeOH 80% das folhas de *M. urundeuva*. FM: ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = Figura 4: 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min) perfazendo uma análise com tempo total de 85 min.....58
- Figura 5-** Espectro na região do UV de padrão de ácido gálico.....59
- Figura 6-** Cromatograma de separação por CLAE-PAD dos constituintes químicos presentes na fração 4 (BuOH) do extrato MeOH 80% das folhas de *M. urundeuva*. Coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (250 x 4.6 mm d.i.; 5 µm). FM: H₂O + Ác. Fórmico 0,1% (A) e MeOH + Ác. Fórmico 0,1% (B). Gradiente exploratório de 0-60 minutos, de 5-100% de B em A. Fluxo 1,0 mL.min⁻¹, volume injetado 20,0 µL, forno de coluna 25°C; λ 280 nm.....60
- Figura 7-** Bandas de máximo de absorção na região de UV típico de flavonóide, obtidas do pico em 16,6 min.....60
- Figura 8-** Espectro de massas em *full-scan* da Fr 4 (BuOH) obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo.....61
- Figura 9-** Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de *m/z* 1091.....61

Figura 10- Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 939.....	62
Figura 11- Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 787.....	62
Figura 12- Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG).....	63
Figura 13- Espectro de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon de m/z 477.....	63
Figura 14- Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 609.....	64
Figura 15- Análise da redução do MTT do extrato MeOH no período de 24 horas..	65
Figura 16- Análise da redução do MTT do extrato MeOH no período de 48 horas..	66
Figura 17- Análise da redução do MTT do extrato MeOH no período de 72 horas..	66
Figura 18- Análise da redução do MTT do extrato MeOH no período de 96 horas..	66
Figura 19- Análise da captação do vermelho neutro do extrato MeOH no período de 24 horas.....	67
Figura 20- Análise da captação do vermelho neutro do extrato MeOH no período de 48 horas.....	68
Figura 21- Análise da captação do vermelho neutro do extrato MeOH no período de 72 horas.....	69
Figura 22- Análise da captação do vermelho neutro do extrato MeOH no período de 96 horas.....	69
Figura 23- Análise do cristal violeta do extrato MeOH no período de 24 horas.....	71
Figura 24- Análise do cristal violeta do extrato MeOH no período de 48 horas.....	72
Figura 25- Análise do cristal violeta do extrato MeOH no período de 72 horas.....	72

Figura 26- Análise do cristal violeta do extrato MeOH no período de 96 horas.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbância

AcOEt: Acetato de etila

Ac: Ácido

ACN: Acetonitrila

BAW: Butanol: Ácido acético: Água (v:v:v)

n-BuOH: Álcool n- butílico (n-Butanol)

CCDc: Cromatografia em camada delgada comparativa

CHCl₃: Clorofórmio

CLAE (HPLC): Cromatografia Líquida de alta eficiência ("High Performance Liquid Chromatography")

CLAE/EM: Cromatografia Líquida de alta eficiência/Espectrometria de Massas

CV: Cristal Violeta

C₁₈: Carbono 18

Da: Dalton

DMEM: meio de cultura de Eagle modificado por Dullbecco

ESI: Ionização por eletrospray

EtOH: Álcool etílico (Etanol)

EB: Extrato bruto

FGH: Fibroblasto Gengival Humano

FIA: Flow injection analysis (Injeção por fluxo contínuo)

Fr: Fração

H: Hidrogênio

Hex: Hexano

HRCB: Herbário Rio Clareense do Departamento de Botânica

IR: Índice de refração

IT: íon-trap

M: massa

MeOH: Álcool metílico (Metanol)

MS (EM): Espectrometria de Massas

MTT: (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio)

m/z: relação massa carga

m₁: espectro de 1ª ordem

m_2 : espectro de 2ª ordem

nm: nanômetro

NP-Peg: “Natural Products”-Polyethilenglycol Reagent

PAD: Photo Diode Array Detector

PBS: Phosphate-buffered saline

PTFE: Politetrafluoretileno (*Teflon*®)

Λ : comprimento de onda

μm : micrômetro

μl : microlitro

R_f : Retention factor (Fator de retenção/Fator de retardamento)

RP₁₈: Phase Reverse 18 (Fase Reversa 18)

SFB: Soro Fetal Bovino

SPE: Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida)

TFA: Ácido trifluoracético

t_R : Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

VN: Vermelho Neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
Fitoterapia.....	27
Aroeira (<i>M. urundeuva</i>).....	28
Compostos fenólicos.....	33
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	45
4.1 Etapa Botânica.....	47
4.2 Metodologia de fracionamento e purificação das substâncias.....	47
4.2.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDc).....	47
4.2.2. Reveladores.....	47
4.3 Partição 4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	48
4.4.1.1 CLAE analítica.....	48
4.4.1.2. Análise por FIA-ESI-IT-MS/MS.....	49
4.5 Etapa Química.....	49
4.5.1. Avaliação do Perfil Cromatográfico da Fr BuOH.....	50
4.6 Cultura Celular.....	50
4.6.1. Preparo dos grupos experimentais.....	51
4.6.2. Análise de Viabilidade Celular.....	52
4.6.3. Redução do MTT.....	53
4.6.4. Captação do vermelho Neutro.....	53
4.6.5. Cristal Violeta.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1. Análise por CCD comparativa.....	57
5.1.2. Análise por CLAE analítico.....	58
5.1.3. Análise por CLAE-PAD da Fr4 do BuOH.....	59
5.1.4. Análise por FIA-ESI-IT-MSn.....	60
5.2 Análise de Viabilidade Celular.....	64
5.2.1. Análise da redução do MTT do extrato MeOH nos períodos de 24, 48,72 e 96 horas.....	64

5.2.2. Análise da captação do vermelho neutro do extrato MeOH nos períodos de 24, 48,72 e 96 horas.....	67
5.2.3. Análise do cristal violeta do extrato MeOH nos períodos de 24, 48,72 e 96 horas.....	70
6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÃO.....	83
8 REFERÊNCIAS.....	87
9 ANEXOS.....	101

1 Introdução

1. Introdução

Considerando os tempos atuais, nota-se um aumento de interesse pelos extratos de plantas, fruto da grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficácia de alguns produtos sintéticos, o alto custo dos medicamentos alopáticos e a busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo humano. Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, obtidos a partir de uma ou mais plantas e utilizados para o tratamento de várias doenças (SOARES et al., 2008).

Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, estimando que 41% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13,3% de microrganismos e 2,7% de animais (CALIXTO, 2003).

O conhecimento tradicional relata que as plantas medicinais são a base para a medicina popular no Brasil, a qual é derivada de uma mistura das influências de cultura brasileira indígena, européia e africana do período de colonização (CARTAXO et al., 2010).

Aliado ao componente cultural, o Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do mundo e há inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (SANTOS et al., 2009). Neste contexto a prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos. Foram identificadas pouco mais de 260 plantas medicinais distribuídas em cerca de 19 diferentes indicações para uso em odontologia. No entanto, muitos detalhes relacionados às suas propriedades biológicas permanecem sem esclarecimentos (SANTOS et al., 2009; BELLIK et al., 2012).

Uma das espécies brasileiras do cerrado que tem captado interesse de várias áreas é a *Astronium urundeuva* ou *Myracrodruon urundeuva*, também conhecida popularmente como aroeira. Poucos estudos com o extrato da aroeira foram realizados, mas já se apresentaram bem significativos para a odontologia. Destaca-se o trabalho realizado com o preparo do gel tópico feito com a casca de *Myracrodruon urundeuva* e o óleo da folha da *Lippia sidoides* em ratos, onde os autores observaram a redução da reabsorção alveolar quando comparado com o grupo controle, durante o experimento que induziu doença periodontal. O estudo de

Botelho e colaboradores (2007) também mostrou que o mesmo gel apresentou efeito antimicrobiano.

Além de ser usada como antiinflamatório na região do nordeste do Brasil, a aroeira, também mostrou efeito na atividade anti-ulcerogênica e no trânsito gastrointestinal (DESMARCHELIER, 1999). Um estudo *in vivo* realizado por Castelo Branco Neto (2006) avaliou o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorsocostal de ratos. Nesse trabalho o autor concluiu que o extrato de aroeira retardou a reepitelização das feridas da pele dos ratos.

Em outro estudo foram avaliadas as atividades antimicrobiana, antiaderente e antifúngica da aroeira-do-sertão sobre microorganismos do biofilme dental e candidose oral. O extrato mostrou-se eficaz inibindo o crescimento das bactérias do biofilme dental e fungos da candidose oral, sugerindo a utilização desse extrato como meio alternativo na terapêutica odontológica (ALVES, 2009).

Analisando os relatos acima existe ainda a necessidade de aprofundamento científico (compreensão dos mecanismos e componentes do extrato de aroeira), *in vitro* e *in vivo*, para possibilitar o uso do princípio ativo do extrato da aroeira como possível agente antimicrobiano e antiinflamatório no tratamento odontológico. Com potencial para uso como veículo usado durante cirurgias periodontais, enxaguante bucal pós-cirúrgico, curativo intracanal, entre outras possibilidades.

A caracterização dos componentes do extrato de aroeira, aliado ao entendimento do seu efeito (biocompatibilidade, moléculas envolvidas, etc) sobre fibroblastos gengivais humanos, pode colaborar na compreensão dos seus efeitos ou mesmo validar efeitos já conhecidos pela cultura popular. Esse “cruzamento” de informações (componentes *versus* efeitos biológicos) poderão nortear estudos futuros para estabelecimento de doses e indicações mais seguras e efetivas do extrato da aroeira.

2 Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

Fitoterapia

O homem busca, desde tempos remotos, a cura ou o alívio das doenças por meio do uso das plantas medicinais. Atualmente, diversos fitoconstituintes já são conhecidos e estudados em modelos experimentais para entendimento de suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* (CATÃO et al., 2006).

Os chamados medicamentos “fitoterápicos” são preparações vegetais padronizadas que consistem de uma mistura complexa de uma ou mais substâncias presentes na planta que são preparados adequadamente e posteriormente prescritos em obediência à legislação vigente (DI STASI, 2007). De modo geral, os compostos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas fórmulas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões, que são conhecidas como chás (FRANCISCO, 2010).

De acordo com Maciel (2002), as pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformação química de princípios ativos (química orgânica e sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações.

Estima-se, portanto, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Isso porque o custo é menor que os fármacos alopáticos (WHO, 1998). A OMS ainda estimula e recomenda o uso daquelas plantas que tiverem comprovada eficácia, segurança terapêutica e desenvolvimento de programas que permitam cultivar e utilizar as espécies vegetais na forma de preparações dotadas de eficácia, segurança e qualidade (LORENZI; MATOS, 2002). Assim, as plantas medicinais seriam a maior e melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade (SANTOS et al., 1995).

O Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (CARTAXO et al., 2010).

No contexto de uso de plantas medicinais a prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos. Foram identificadas pouco mais de 260 plantas medicinais distribuídas em cerca de 19 diferentes indicações para uso em odontologia. No entanto, extratos para uso na odontologia são relatados pela população, mas poucos foram avaliados cientificamente quanto às suas propriedades biológicas. Assim, maiores detalhes de seus efeitos são necessários (GROPPO et al., 2008; SANTOS et al., 2009; VARONI et al., 2012).

Mesmo plantas com comprovada atividade farmacológica, podem apresentar alguns efeitos colaterais devido ao uso indiscriminado. É o caso do chá verde (*Camellia sinensis*, *Theaceae*) que em excesso pode causar danos ao fígado e arritmia, além de interagir com outros medicamentos (SOUZA, 2012).

Sabemos, por exemplo, que espécies de plantas como Cravo da Índia, Romã, Malva, Tanchagem, Amoreira, Sálvia, Camomila, entre outras, são indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas. Algumas dessas afecções vêm sendo tratadas com a fitoterapia (OLIVEIRA et al., 2007).

Recentemente, extratos de plantas têm sido incorporados às fórmulas de dentifrícios, que além de desempenhar outras funções, tem como objetivo principal melhorar a ação antimicrobiana e atuar como agentes terapêuticos (BARRETO et al., 2005). No trabalho de Ditterich et al. (2007), os autores avaliaram a atividade antimicrobiana de várias marcas comerciais de dentifrícios com componentes terapêuticos: Sorriso Herbal[®] (própolis), Malvatricin[®] anti placa e anti-tártaro (tintura de malva), Colgate Herbal[®] (camomila), Gessy[®] (extrato de juá), Sorriso[®] (juá e própolis) e Paradontax[®] (tintura de mirra e camomila). Seus resultados mostraram que tanto o *Stafilococcus aureus* como a *Escherichia coli* foram sensíveis aos dentifrícios estudados, além de apresentar ação inibitória similar para microorganismos Gram positivos e Gram negativos.

Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* All)

Uma das espécies brasileiras do cerrado que tem captado interesse de várias áreas é a *Astronium urundeuva* ou *Myracrodruon urundeuva*. O gênero *Myracrodruon* foi descrito por Manoel Freire Allemão (FREIRE ALLEMÃO & FREIRE ALLEMÃO 1862), baseado em *M. urundeuva*. Engler em 1881, subordinou este gênero ao nível de secção do gênero *Astronium* Jacq. A partir desta data, com exceção de Barroso (1984), todos os autores respeitaram a junção efetuada por

Engler, até o trabalho de Santin e Leitão Filho (1991), onde o gênero *Myracrodruon* foi restabelecido *Astronium* foi sinonimizado a ele. *Myracrodruon* Freire Allemão é um pequeno gênero da família Anacardiaceae, distribuído restritamente à América do Sul, nativas no Brasil (SANTIN & LEITÃO, 1991). Conhecida pelos nomes populares de urundeuva, aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeúva e arindeúva. A aroeira é encontrada nos Estados do Ceará até o Paraná e Mato Grosso do Sul. É mais freqüente no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LORENZI, 2002).

O uso de plantas medicinais em saúde preventiva e curativa é cercado de recomendações rigorosas quando da sua utilização, pois segundo Veiga Jr e Pinto (2005) muitas plantas têm mostrado efeitos adversos como irritação gástrica, lesões no sistema nervoso, hemorragias, irritação na mucosa bucal (JUIZ et al., 2009).

A questão da dosagem representa um grande entrave para se garantir a segurança e eficácia das ervas medicinais, mesmo em se tratando de plantas com atividade biológica confirmada, uma dose muito pequena pode não surtir efeito algum, enquanto que uma dose maior pode induzir interações perigosas com o organismo (SOUZA, 2012).

A aroeira do sertão, é uma árvore que, além das propriedades farmacológicas é conhecida pelo seu alto poder sensibilizante e irritante, capaz de ocasionar alergias, reações urticantes, eczemas e dermatites, frequentemente relatados por indivíduos que tem contado com a espécie (DIÓGENES e MATOS, 1999).

Alguns trabalhos identificaram compostos nos extratos com funções particulares, como no caso encontrado na casca da *Myracrodruon urundeuva* de onde foi isolada a lectina, proteína estável, que apresentou atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* de acordo com o estudo feito por Sá (2009). Enquanto Viana (2003) detectou a presença de chalconas diméricas presentes na casca de *Myracrodruon urundeuva*, que apresentaram efeito analgésico e antiinflamatório.

Souza (2007) também detectou a presença de tanino do tipo profisetidina encontrado no extrato da casca da aroeira *Myracrodruon urundeuva* que apresentou propriedades antiinflamatórias e antiulcerogênicas, em estudo induzindo lesão gástrica em roedores.

De acordo com Souza (2012), a estabilidade do extrato hidroalcoólico das folhas da aroeira apresenta facilidade de decomposição devido às características

comuns dos galotaninos presentes, responsáveis por sua classificação como taninos hidrolisáveis, onde as ligações depsídicas (ligação entre duas unidades de ácido gálico) são facilmente rompidas por solvólise (reação entre um soluto e um solvente para formar novas substâncias). As ligações sofrem metanólise em condições ligeiramente ácidas.

Em estudo realizado no tratamento da diarreia, o extrato alcoólico da casca de aroeira foi testado no trato gastrointestinal em ratos. A dose oral do extrato de 100 e 200 mg/kg inibiu significativamente a propulsão gastrointestinal induzida pela fisostigmina. Os efeitos anti-colinérgicos da planta podem justificar em parte esta atividade anti-diarreia (MENENDEZ e RAO, 1988).

Em um estudo fitoquímico com o extrato EtOH 70% das folhas e cascas da aroeira foram identificados os constituintes químicos do extrato de aroeira. Os principais constituintes encontrados foram o ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido clorogênico e ácido protocatecuico. Sendo os três primeiros em maiores quantidades enquanto que os últimos parecem substâncias minoritárias (SOUZA, 2012).

Em um recente trabalho o óleo essencial de três espécies da aroeira, *M. urundeuva*, *Schinus terebintifolium* e *Schinus molle* L. foram preparados, sendo estas espécies da família da Anacardiácea (MONTANARI et al., 2012). O óleo das folhas da espécie de *S. terebintifolium* exibiu atividade antibacteriana e antifúngica. Já o óleo essencial de folhas de *Schinus molle* L. demonstrou um efeito protetor contra *Streptococcus anatum* e *Streptococcus enteridis*. A alta atividade antibacteriana do óleo das folhas de *M. urundeuva* aumentou o conteúdo de ômega-3-carene, induzindo a peroxidação lipídica (MONTANARI et al., 2012).

O estudo do extrato EtOH (70%) das folhas de *A. urundeuva* indica que derivados de ácidos fenólicos são os metabólitos secundários de maior ocorrência na espécie, em especial galotaninos, que são polímeros de ácido gálico com um núcleo sacarídico (um núcleo formado por uma glicose ligado a moléculas de ácido gálico) (SOUZA, 2012). Essas substâncias são conhecidas pela sua instabilidade frente à solvólise, o que justifica um estudo criterioso não somente da composição química, mas também da estabilidade do extrato, que pode vir a sofrer transformações significativas durante as etapas de extração, armazenamento e análise, que podem influenciar sobremaneira na produção de um fitoterápico (SOUZA, 2012).

Em outro estudo, também recente, Carlini et al. (2013) mostraram que os extratos da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia) e *M. urundeuva* (aroeira-do-sertão) apresentaram um potencial tóxico quando administrados cronicamente. Esses foram capazes de induzir a má formação óssea nos filhotes de ratas fêmeas tratadas com esses extratos durante a gravidez. Nesse mesmo estudo altas doses de *S. terebinthifolius* diminuíram significativamente o número de células vermelhas do sangue, hemoglobina e hematócito. No caso do extrato de *M. urundeuva* foi achado uma diminuição significativa nos valores de hematócitos, e houve uma diminuição não significativa no número de eritrócitos e hemoglobina.

O estudo de Menezes e colaboradores (2010) teve como objetivos avaliar a capacidade dos extratos de araçá e de aroeira do sertão em interferir com a microdureza do esmalte dental de ratos submetidos a desafio cariogênico, bem como avaliar o efeito desses extratos sobre a microbiota cariogênica implantada desses animais, e seus possíveis efeitos colaterais. O modelo animal e as condições experimentais se mostraram adequadas para a caracterização dos efeitos dos extratos de araçá e aroeira diluído em água testados sobre a microdureza do esmalte e sobre a microbiota cariogênica, sendo que os dois extratos testados produziram uma redução substancial da microbiota cariogênica nos animais experimentais e o consumo dos mesmos afetou positivamente a dureza superficial do esmalte. A ingestão dos extratos não alterou significativamente os órgãos dos animais, quando comparado com o grupo controle.

Em estudo realizado com o extrato da casca de *M. urundeuva* foi realizado ensaio de MTT com três linhagens cancerígenas celulares, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295. Nos resultados obtidos o extrato apresentou atividade citotóxica em células cancerígenas (MAHMOUD et al., 2011).

Alguns efeitos da aroeira, descritos popularmente (redução na inflamação do ovário, úlceras externas, bronquite, tosse) foram pesquisados por alguns autores. Foi relatada atividade anti-ulcerogênica e no trânsito gastrointestinal em ratos (DESMARCHELIER, 1999). Outro estudo realizado *in vivo*, por Castelo Branco Neto (2006), avaliou o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorsocostal de ratos. Nesse trabalho o autor concluiu que o extrato de aroeira retardou a reepitelização das feridas da pele dos ratos.

Em estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2011) foram testados 21 extratos e dentre os testados pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação, apenas o extrato etanólico obtido a partir de sementes de *Myracrodruon urundeuva*, o qual apresentou traços de esteróides (alcalóides e fenóis em sua composição), demonstrou atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais humanas, sendo 2 vezes mais ativo sobre a linhagem leucêmica HL-60 do que sobre células de glioblastoma SF-295 e de sarcoma 180.

No trabalho de Machado et al. (2012), os autores avaliaram a resposta biológica (por meio de análise edemogênica e histopatológica) frente ao contato dos extratos da folha de aroeira com o tecido conjuntivo subcutâneo em ratos. O extrato aquoso de aroeira apresentou, aos 28 dias de experimentação, resultados semelhantes ao grupo controle (soro fisiológico): edema e reparo tecidual brando (tecido conjuntivo de granulação composto por fibras colágenas e fibroblastos), enquanto para o extrato hidroalcoólico, houve uma relação persistente de inflamação até os 28 dias.

Na odontologia, apesar do uso da fitoterapia ser milenar, a utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou sistêmicas com manifestações bucais ainda é pouco explorada (OLIVEIRA et al., 2007; VARONI et al., 2012). Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente, frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e mais biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010).

Nos trabalhos realizados por Botelho et al. (2007 e 2008) os autores utilizaram um preparo de gel tópico feito com a casca da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e o óleo da folha do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*). O gel foi aplicado no tecido gengival em ratos que tiveram doença periodontal induzida. Nos animais tratados com o gel foi observada a redução da reabsorção óssea alveolar quando comparado com o grupo controle. Além desses resultados, o estudo de Botelho et al. (2007) também mostrou que o gel apresentou efeito antimicrobiano. Os autores ainda destacaram a necessidade de se conhecer e pesquisar os efeitos clínicos desses compostos (BOTELHO et al., 2007; BOTELHO et al., 2008).

Em outro estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* da aroeira-do-sertão (extrato hidroalcoólico da entrecasca) sobre microorganismos do biofilme dental e candidose oral. O extrato mostrou-se eficaz

inibindo o crescimento das bactérias do biofilme dental e fungos da candidose oral, sugerindo a utilização desse extrato como meio alternativo na terapêutica odontológica (ALVES et al., 2009).

Um outro estudo foi realizado com o fitoterápico na forma de gel, feito com o extrato aquoso com 10% da entrecasca da aroeira. Os participantes foram orientados a escovar os dentes com o gel durante 3 vezes ao dia por trinta dias. Em seguida foi realizado a avaliação por meio do índice de placa supragengival, gengivite e sangramento gengival. Os resultados demonstraram que o gel não apresentou efeito adicional sobre a redução da inflamação gengival. Dois grupos do trabalho (grupo com gel contendo 10% de *Myracrodruon urundeuva* e o grupo controle - gel placebo) apresentaram redução significativa da gengivite de forma semelhante, apresentando no final do estudo uma porcentagem de áreas com sangramento gengival abaixo do nível considerável tolerável de 20% (PEREIRA et al., 2009).

Analisando os relatos acima existe ainda a necessidade de aprofundamento científico (compreensão dos mecanismos e componentes do extrato de aroeira), *in vitro* e *in vivo*, para possibilitar o uso do princípio ativo do extrato da aroeira como antimicrobiano e antiinflamatório no tratamento odontológico para possível veículo usado durante cirurgias periodontais, enxaguante bucal pós-cirúrgico, entre outras possibilidades.

Compostos fenólicos

Os metabólitos secundários em plantas medicinais são compostos denominados de fenólicos, alcalóides e terpenóides (EID et al., 2012).

Uma ampla variedade desses metabólitos secundários é produzida pelos vegetais superiores, responsáveis pela defesa natural da planta sob estresses bióticos e abióticos. Neste grupo de metabólitos estão envolvidos compostos nitrogenados (alcalóides, aminas, aminoácidos, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, inibidores de proteases e lectinas) e não nitrogenados como os terpenóides, saponinas, flavonóides, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, ligninas, lignanas e poliacetilenos (RÊGO JUNIOR et al., 2011).

Dentre os compostos acima citados, os ácidos fenólicos pertencem à classe de compostos fenólicos que apresenta estrutura simples, formada por um anel aromático e substituinte (em geral hidroxilas). São formados a partir de aminoácidos

fenilalanina e tirosina por meio da via de sintetização do ácido chiquímico (JARDINI et al., 2010). Os compostos fenólicos estão distribuídos em toda a planta de maneira não uniforme, nas formas livre ou esterificados a compostos solúveis (compartimentalizados nos vacúolos celulares) ou insolúveis (na parede celular), formando uma mistura complexa juntamente a carboidratos, proteínas e outros componentes de vegetais, de modo que os métodos de análise dependem da natureza da matriz. Por esta razão não há um modelo padrão para a extração e identificação destes compostos (LIMA e MANCINI-FILHO, 2005; KHODDAMI et al., 2013).

Os fenólicos são um grupo de metabólitos secundários de plantas encontrados amplamente em todo reino vegetal, como exemplificado no Esquema 1. Entre esses metabólitos estão os flavanóides, tocoferóis, catequinas, ácidos fenólicos, etc (RECIO, ANDÚJAR e RÍOS, 2012).

Esquema 1: Classificação de Fitoquímicos

Adaptado de Liu, 2004.

A eficiência dos compostos fenólicos na atividade antioxidante é variável e um dos fatores relevantes é a estrutura química de cada composto, contando o número e o posicionamento de grupamentos hidroxila ligados ao anel aromático (JARDINI et al., 2010).

Os efeitos desses diversos compostos são descritos na literatura, entretanto, muitas lacunas (mecanismos moleculares) ainda não foram totalmente preenchidas (BELLIK et al., 2012). Vários mecanismos de ações celulares são propostas para explicar o modo de ação de fitoquímicos, mas poucas evidências foram apresentadas no sentido de explicar os efeitos *in vivo* desses fitoquímicos. Provavelmente são múltiplos mecanismos celulares que são modulados (estimulados/inibidos) por vários componentes. Em adição faltam trabalhos clínicos duplo-cego para comprovar a eficácia e segurança desses compostos (BELLIK et al., 2012). Quando procurados trabalhos em animais ou clínicos, relacionados à prevenção e tratamento em saúde bucal, com uso de fenólicos, estão são insuficientes ou mesmo inexistentes. Restando apenas evidências em trabalhos *in vitro* (VARONI et al., 2012).

As evidências científicas, na sua grande maioria trabalhos *in vitro*, tem apontado para efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos, antioxidantes, antitumor de polifenóis (ARAIM et al., 2002; QUEIRES et al., 2006; RECIO, ANDÚJAR e RÍOS, 2012; ROMANO et al., 2013) e alguns são considerados antimicrobianos (MUKNE et al., 2011). Os polifenóis podem modular a expressão de sinais pró-inflamatórios (RECIO, ANDÚJAR e RÍOS, 2012); regular vias de sinalização e segundos mensageiros (GMPc, AMPc, proteína-quinases, e cálcio) (CALIXTO et al., 2008); inibir algumas enzimas como a DNA girase (CUSHNIE e LAMB, 2006; ROMANO et al., 2013). Flavonóides exercem ações anticâncer por meio de uma combinação de mecanismos, tais como inativação cancerígena, anti-proliferação, parada do ciclo celular, indução de apoptose, inibição da angiogênese, entre outros (GIBELLINI et al., 2011; CHAHAR et al., 2012). Em um trabalho recente (TRENTIN et al., 2013) foi proposto que os taninos obtidos de plantas da Caatinga, entre elas a *Myracrodruon urundeuva*, foram capazes de inibir a formação de biofilme por danificar a membrana bacteriana, exibindo assim propriedades bacteriostáticas.

As catequinas e epicatequinas são flavanóis com atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica presentes principalmente em

sementes de uvas. Esses são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos de uva (ABE et al., 2007).

O ácido gálico também é um ácido fenólico conhecido pela sua capacidade na indução da morte celular. Em cultura de células de linhagens tumorais que foram tratadas com distintas frações de compostos fenólicos extraídas da semente da *Oenothera biennis*, foi possível verificar que aquela que continha 55% (Fr 4) de ácido gálico foi a mais eficiente em diminuir a proliferação e a viabilidade celular. O ácido gálico é conhecido por induzir morte celular ou deter o ciclo celular em uma variedade de células tumorais de maneiras diferentes, dependendo da linhagem celular usada (PELLEGRINA et al., 2005).

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas. Apresentam alto peso molecular (500-3000 Da) e contém grupos hidroxilafenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (HASLAM, 1966).

Os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou condensados (SINGLETON e KRATZER, 1973). Os taninos hidrolisáveis por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar (SGARBIERI, 1996). Esses ácidos fenólicos, assim como os demais compostos fenólicos existentes em diversos vegetais, apresentam atividade antioxidante, a qual é considerada uma importante função fisiológica.

Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas; fundamentando-se nessa propriedade podem-se identificar taninos por teste de precipitação de gelatinas, por exemplo. Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MONTEIRO et al., 2005).

Se conhece 10 classes de flavonoides, todos contendo 15 átomos de Carbono e seu núcleo básico em um sistema C6-C3-C6 no qual dois anéis aromáticos A e B estão unidos por uma unidade de 3 carbonos que podem formar um terceiro anel, que se caso existir, chama-se Anel C (UGAZ, 1994).

As ações antiinflamatórias e antioxidantes têm aplicações específicas por patologias associadas com inflamação crônica sistêmica de baixo grau que sustenta

a progressão de diabetes mellitus e doença cardiovascular. Mecanismos envolvidos dependem da estrutura dos compostos, estado redox da inflamação ao redor e outras interações (SOORY, 2012).

Em relação aos flavonoides, estes podem ser divididos em classes, sendo que as propriedades químicas e biológicas destes subgrupos podem ser completamente diferentes de acordo com suas estruturas (ERLUND, 2004).

Os flavonoides representam a classe mais abundante de polifenóis de plantas com mais de 6000 (seis mil) estruturas identificadas. Em recentes anos, os flavonoides têm se tornado cada vez mais importante por seu uso potencial como agente profilático e terapêutico em muitas doenças. Investindo em sua aplicação, focando efeitos antioxidante, antitumoral, antimicrobiano, antiinflamatório, antiviral, antiangiogênico e imunomodulador. Os efeitos biológicos dos flavonóides têm sido relacionados à sua habilidade de inibir enzimas e/ou suas propriedades antioxidantes (GRUBESIC, 2013).

Os flavonóides são capazes de influenciar a atividade do sistema nervoso central e também por ligação do sítio benzo diazepina no receptor GABA resultando em efeitos de sedação, ansiolítico ou anti-convulsivo ou por ação como inibidores da oxidase monoamina A ou B, assim trabalhando como anti-depressores ou antiparkinsons (CHOUDHARY et al., 2011; GUO et al., 2011; HERRERA-RUIZ et al., 2011; JÄGERAND SAABY, 2011; JIANG et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2012; KARIM et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Salgado (2006) afirma também que os flavonoides mostram um conjunto extraordinário de ações farmacológicas e bioquímicas dos quais sugerem efeito antiinflamatório e modulação do sistema imune. Diversos mecanismos de ação têm sido propostos a explicar as ações antiinflamatórias de flavonoides *in vivo*. Flavonóides também modulam as funções de células inflamatórias como linfócitos, células assassinas naturais, monócitos, neutrófilos, células alvo e macrófagos.

Os flavonoides ainda exercem ação anti cancerígena via uma combinação de mecanismos como inativação carcinogênica, antiproliferação, interrupção do ciclo celular, indução da apoptose, inibição da angiogênese e resistência reversa de múltiplas drogas (GIBELLINE et al., 2011; CHAHAR et al., 2012).

Chás que apresentam polifenóis dispõem de várias propriedades que têm sido caracterizadas *in vitro*. Uma dessas propriedades, por exemplo é de que os polifenóis são 5 vezes mais efetivos, como antioxidante, que a vitamina C ou

vitamina E e tem sido recentemente observado que o flavonoide galato de epigallocatequina, encontrado em chás pode regular a produção de ROS pela modulação da atividade da glutathione e da enzima citocromo P450 (QUNINONES, 2013). Também foram encontrados flavonoides no chá verde que apresentam efeitos neuroprotetores, quando estudados em modelos animais e células (RENDEIRO, 2011).

Alguns estudos tem demonstrado que os compostos fenólicos da romã são possíveis inibidores do crescimento de tumores de mama e de próstata (JARDINI et al., 2010). A inibição do crescimento das células foi verificada por Seeram e colaboradores (2005), em linhagens tumorais do cólon, próstata e oral. Além da indução da apoptose e a inibição da lipoperoxidação induzida por Fe^{+2} em modelo lipossômico.

Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “espécies reativas do oxigênio” ou EROS. Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo. Os produtos alimentícios também se mostram susceptíveis a estes processos oxidativos, resultando em substâncias finais prejudiciais ou com características sensoriais indesejáveis, reduzindo com isso o prazo de validade dos produtos (DEGASPARY, 2004).

No início dos anos 80 o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (DEGASPARY, 2004).

Um novo composto, isolado a partir do extrato metanólico das folhas de *Paepalanthus argenteus* var (Bongard) foi caracterizado como xeractinol, um novo diidroflavonol C-glucosilado, que corresponde a um flavonoide com atividade antioxidante (DOKKEDAL et al., 2007) e atividade antiinflamatória (COUTINHO et al., 2009).

Os taninos apresentam propriedades relacionadas à capacidade de seqüestro de seus radicais (SILVA et al., 1991), e essas propriedades tem sido usadas contra doenças do coração até redução de oxidação lipídica. Os taninos apresentam

grande variação em sua estrutura, além de estarem em grande concentração entre determinadas espécies de plantas (SILVA et al., 1991).

3 Proposição

3. Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o extrato de aroeira e avaliar seu efeito sobre fibroblastos gengivais humanos.

Objetivos específicos

- 1- Identificar o perfil químico do extrato hidroalcoólico de aroeira e seus principais constituintes;
- 2- Analisar a influência do extrato hidroalcoólico de aroeira na viabilidade de fibroblastos gengivais humanos da linhagem FGH.

Material e Método

4. Material e Método

4.1. Etapa Botânica

Foram coletados 640 g de folhas secas e saudáveis de *M. urundeuva* no Horto Florestal de Bauru e preparada excicata que foi identificada e armazenada no herbário Rioclarense (HRCB) do Departamento de Botânica-IB-UNESP-Rio Claro sob nº de identificação da excicata-HRCB59831.

4.2. Metodologia para Análise dos Extratos e Frações

4.2.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDc)

Foram utilizadas placas preparadas comerciais de sílica gel 60 (Merck), de tamanho 20 X 20 cm em 0,2 mm de espessura de adsorvente. As amostras foram aplicadas por meio de capilares de vidro nas placas na forma de soluções, em solventes bastante voláteis, que possam ser facilmente eliminados após a aplicação. Estas amostras foram aplicadas em forma de ponto de 0,3 mm de diâmetro, 1,0 cm acima da borda inferior e 1,0 cm de distância das adjacentes. A placa é introduzida numa cuba cromatográfica de vidro, contendo um papel de filtro para saturação com os vapores do solvente e eluídas em diferentes sistemas de solventes orgânicos (fase móvel), utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, álcool (n)-butílico, álcool metílico ou outros.

4.2.2. Reveladores

Inicialmente as placas foram visualizadas sob luz UV 254-366 nm e posteriormente submetidas a vapores de iodo sublimado ou reveladores como Anisaldeído/H₂SO₄ (Wagner, 1996): 85,0 mL de MeOH, 10,0 mL de ácido acético, 5,0 mL de H₂SO₄, que é pulverizado na placa cromatográfica; observam-se manchas roxas para terpenos, lilás para saponinas, amareladas para flavonóides, cinza para ácido gálico e marrom para taninos; ou NP-Peg (WAGNER, 1996); 100,0 mg de difenilaminoborato (NP), 500,0 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG), 20,0 mL de MeOH, que é borrifado sobre a placa cromatográfica e observa-se no visível e sob luz UV, manchas amarelas para flavonóides derivadas do Kaempferol e alaranjadas para derivados da quercetina.

4.3. Partição

O método de partição foi utilizado para um fracionamento inicial dos extratos. Utilizou-se funil de separação, onde foram colocados dois solventes orgânicos imiscíveis, com volumes iguais, com a amostra previamente dissolvida em um dos solventes utilizados. Após um dia de repouso, as fases foram coletadas separadamente, e em seguida concentradas em rotoevaporador sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 60°C. Cada fração foi transferida para vidro tarado, deixada na capela até completa secura e pesada.

4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.4.1.1. CLAE analítica

A análise do perfil químico (“fingerprint”) do extrato hidroalcoólico (MeOH 80%) foi realizada em CLAE Jasco® com bomba quaternária, modelo PU-2089 (Jasco®) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PAD), modelo MD-2010 (Jasco®) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®). Como fase móvel foi utilizada ACN + TFA 0,1% (B) e H₂O + TFA 0,1% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min) perfazendo uma análise com tempo total de 85 min. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Wagner Vilegas, no Laboratório de Química de Produtos Naturais, IQ-UNESP/Araraquara com a colaboração do aluno de Mestrado Leonardo Perez.

A análise do perfil químico (“fingerprint”) das frações de partição de *M. urundeuva* foi realizada em cromatógrafo Jasco® com bomba quaternária com forno de coluna, detector PAD, em coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (250 x 4.6 mm d.i.; 5 µm). Como fase móvel utilizou-se os solventes H₂O + Ác. Fórmico 0,1% (A) e MeOH + Ác. Fórmico 0,1% (B), pureza HPLC. Gradiente exploratório de 0-60 minutos, de 5-100% de B em A. O fluxo foi de 1,0 mL.min⁻¹, o volume da amostra injetado foi de 20,0 µL, à temperatura de 25°C; as análises foram feitas monitorando no comprimento de onda de 280 nm. Estes experimentos de “fingerprint” em CLAE foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências, UNESP/Bauru com a colaboração do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes e dos alunos de Mestrado Laís Pierone e Luiz Leonardo Saldanha.

As frações de partição foram pré-tratadas utilizando cartuchos Sep PaK (SPE) Strata C₁₈ de 500 mg/3 mL, acoplado com filtro PTFE de 0,2 µm; os cartuchos foram pré-condicionados passando sequencialmente MeOH e H₂O, ativando, assim, a fase estacionária; em seguida, a amostra (1 mg de amostra para cada 10 mg da fase estacionária) previamente solubilizada em pequeno volume de MeOH é aplicada no cartucho.

4.4.1.2. Análise por FIA-ESI-IT-MS/MS

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo scientific, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 275°C, gás de arraste (N₂) fluxo 12 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos. Para os experimentos de LC-MS o equipamento foi acoplado a um cromatógrafo modelo Accela High Speed LC (Thermo científico®). A análise por FIA-ESI-IT-MS/MS foi realizada no Laboratório de Química da UNESP/Araraquara com a colaboração do professor Wagner Villegas e do aluno de Mestrado Leonardo Perez Souza.

4.5. Etapa Química

As folhas da aroeira foram selecionadas para extração com MeOH 80%. A extração foi feita por maceração da planta com o solvente orgânico por uma semana. Este procedimento foi repetido várias vezes, até completa extração das substâncias. Após a extração, o solvente foi filtrado em papel filtro e concentrado em

rotaevaporador sob pressão reduzida em temperatura $<60^{\circ}\text{C}$. O extrato bruto assim obtido foi transferido para vidro tarado e foi deixado em capela até completa secura e pesado obtendo 304 g do extrato bruto. O extrato foi submetido a uma triagem cromatográfica, a fim de se determinar as classes de produtos naturais presentes e, conseqüentemente, estabelecer uma estratégia para a separação dos componentes. Em seguida, sofreu partição entre solventes orgânicos para obtenção de frações enriquecidas (Hex (49.7g), AcOEt (59 g), BuOH (52 g)).

Após a análise comparativa da cromatografia em camada delgada, foi escolhida a Fr BuOH para dar continuidade aos experimentos. A escolha se deve pela fração apresentar flavonóides em sua constituição.

4.5.1. Avaliação do Perfil Cromatográfico da Fr n-BuOH

A Fr n-BuOH (10 mg) foi dissolvida em 1 mL de MeOH grau de HPLC :H₂O (1:1) e submetida à extração em fase sólida (SPE) em cartucho Sep Pak (Strata-X Phenomenex) de fase reversa (C₁₈) com 500,0 mg de adsorvente ativado com 15,0 mL de MeOH e ambientado com 10,0 mL de H₂O. A amostra foi depositada no cartucho para separação com o seguinte gradiente (**Tabela 1**):

Frações BuOH	MeOH/H ₂ O (%)	Volume injetado (ml)
Fr 1	H ₂ O 100%	8
Fr 2	MeOH 10%	8
Fr 3	MeOH 20%	8
Fr 4	MeOH 50%	8
Fr 5	MeOH 100%	8

Tabela 1: Gradiente de eluição empregado na separação da fr BuOH para extração em fase sólida.

4.6. Cultura Celular

As células que foram utilizadas para o experimento são fibroblastos gengivais humanos (FGH) armazenados em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica da FOB-USP, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Carla A. Damante. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em uma capela de fluxo laminar acoplada a um sugador Nevoni (BioPump-ACME) de alta potência. As células foram incubadas em ambiente úmido a 37°C , numa atmosfera contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono.

Os fibroblastos foram cultivados em meio de cultura de Eagle modificado por Dullbecco (DMEM) (Cultilab, Campinas, Brasil) e 10% soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 1% de antibiótico. Assim que atingiram a subconfluência foi realizado o subcultivo. O meio do frasco de cultivo foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina PBSA, pH 7,2 (Cultilab, Campinas, Brasil).

A seguir as células foram separadas com 2 mL de uma solução de tripsina a 0,25% (Cultilab, Campinas, Brasil), durante 1 minuto, a 37°C. A tripsina foi inativada com meio de cultura e as células em suspensão foram transferidas para um tubo plástico do tipo Falcon (TPP®) e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, em temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1mL de meio fresco, e a suspensão de células foi replaqueada em frascos de cultivo T75.

4.6.1. Preparo dos grupos experimentais

Para os experimentos foram plaqueadas 2×10^3 células/poço em placas de 96 poços (TPP®) (sextuplicatas). Após incubação por 24h o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM complementado por 10% de SFB e 1% antibiótico de diferentes concentrações do extrato de aroeira hidroalcoólico (extrato bruto; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000). A ISO nº 10993-5 sugere o protocolo para teste *in vitro* do extrato do material em diferentes diluições, dessa maneira nosso protocolo foi uma adaptação desse teste da ISO. As soluções hidroalcoólicas de aroeira foram previamente preparadas dentro da capela de fluxo laminar e armazenadas em frascos esterilizados. Inicialmente 20 mg do extrato bruto hidroalcoólico (MeOH) de aroeira foi acrescentado em 20 mL de meio DMEM e 10% SFB em tubo falcon de 50 mL. Em seguida foram realizadas as diluições seriadas, do frasco menos diluído para o mais diluído: 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 respectivamente. As diluições foram realizadas um dia anterior ao ensaio e armazenado na geladeira. Antes do uso foi necessário agitar em vórtex para homogeneização da solução.

Os fibroblastos foram analisados em tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas após a adição do meio condicionado. Após cada período experimental, o meio de cultura contendo o extrato de aroeira hidroalcoólico foi removido, as células foram lavadas com PBSA e divididas para realização das diferentes análises. Cada ensaio foi repetido duas vezes.

Os grupos experimentais foram divididos em:

G1 - Controle – DMEM

G2 - DMEM + extrato bruto aroeira hidroalcoólico

G3 - DMEM + 1:10 aroeira hidroalcoólico

G4 - DMEM + 1:100 aroeira hidroalcoólico

G5 - DMEM + 1:1000 aroeira hidroalcoólico

G6 - DMEM + 1:10000 aroeira hidroalcoólico

B - Blank

4.6.2. Análise da viabilidade celular

Das análises de viabilidade celular foram escolhidas três diferentes, sendo cada uma responsável pela coloração de uma organela e/ou função específica: MTT, Vermelho Neutro e Cristal Violeta.

4.6.3. Redução do MTT

O teste de atividade mitocondrial das células foi realizado pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) que ocorre nas mitocôndrias de células viáveis (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantificou a conversão do MTT (Vybrant, Molecular Probes, EUA), que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 570 nm. As células foram incubadas numa solução de 0,5 mg de MTT/ml de DMEM sem SFB, por 4h a 37°C; após a remoção da solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em 200 µl de etanol/poço, sob agitação suave por 10 min à temperatura ambiente. Experimento realizado em sextuplicata. Em seguida, a absorbância do extrato hidroalcoólico de cada poço foi mensurada a 570 nm (FluoStar OPTIMA, leitor de fluorescência em microplacas).

4.6.4. Captação do vermelho neutro (VN)

O parâmetro mais utilizado para checar toxicidade é a viabilidade celular que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003).

A partir de uma solução estoque de vermelho neutro 0,4% foi obtida uma solução de 50 µg/mL de vermelho neutro em DMEM. A solução obtida permaneceu em estufa 37°C, "overnight" para haver a precipitação de cristais, sendo então filtrada em filtro Millipore (0,22 µm). As células foram tratadas com essa solução (50 µg/mL) e as placas incubadas por 3h, à 37°C, para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Elas foram lavadas com PBS-Ca⁺² e o corante foi extraído numa solução de etanol 50 % e ácido acético 1%, colocando-se 200 µL dessa solução/poço. Em seguida, determinamos a absorbância a 540 nm (FluoStar OPTIMA, leitor de fluorescência em microplacas).

4.6.5. Cristal Violeta

O cristal violeta é um corante que marca ácidos nucleicos das células aderidas e fixadas (KUENG et al., 1989).

Para a realização do experimento as células foram plaqueadas na proporção de 2×10^3 células/poço em placas de 96 poços para os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Em seguida, as células viáveis foram lavadas com PBS e fixadas em etanol-glacial absoluto e ácido acético (3:1, vol/vol) por dez minutos a temperatura ambiente, deixando secar ao ar, encubando à 37°C, envolvida em papel alumínio. As células foram coradas com cristal violeta a 0,1% (peso/vol) por dez minutos a temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido por decantação e lavado duas vezes com água destilada. O corante foi extraído em ácido acético a 10% (vol/vol) e a densidade óptica foi avaliada a 550 nm (FluoStar OPTIMA, leitor de fluorescência em microplacas).

Análise Estatística

A estatística foi realizada em análise de variância de 2 critérios seguido de uma análise de teste Tukey ($p < 0,05$). Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados através do programa Statistica 11.0.s

5 Resultados

5. Resultados

5.1.1. Análise por CCD comparativa

As frações de partição foram submetidas à cromatografia em camada delgada (**Figuras 1, 2 e 3**). Observa-se nos diferentes sistemas de solventes e reveladores que a fração 4 (BuOH) apresenta manchas roxas, quando reveladas com NP-Peg sob luz UV, que se tornam amarelas quando reveladas com anisaldeído/ H_2SO_4 . Estas colorações sugerem a presença de flavonóides nesta fração (WAGNER, 1994).

Figura 1: CCD: 1- E.B. hidroalcoólico; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5-Fr aquosa. Fase móvel: BAW (6:1:2). Revelado com NP-Peg.

Figura 2: CCD: 1- E.B. hidroalcoólico; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5- Fr aquosa. Fase móvel: CHCl_3 : MeOH (7:3). Revelado com NP-Peg.

Figura 3: CCD: 1- E.B. hidroalcoólico; 2-Fr hex; 3-Fr AcOEt; 4-Fr BuOH; 5-Fr aquosa. Fase móvel: CHCl_3 : MeOH (7:3). Revelado com anisaldeído/ H_2SO_4 .

5.1.2. Análise por CLAE analítico

Uma alíquota (10 mg) do extrato MeOH 80% obtido por maceração foi avaliada por HPLC-PAD. Foram observados, no cromatograma, dois comportamentos distintos. Uma primeira parte com picos bem resolvidos (t_r entre 0 e 45 min), seguida de uma região com picos bastante alargados (t_r entre 45 e 85 min), quase que totalmente sobrepostos (**Figura 4**).

Figura 4: Cromatograma de separação por HPLC-PAD dos constituintes químicos presentes no extrato MeOH 80% das folhas de *M. urundeuva*. FM: ACN + TFA 0,1% e H_2O + TFA 0,1%. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 280 nm, Sistema de eluição gradiente: 0-15% B (15 min), 15-20% B (30 min), 20-30% B (30 min), 30-100% B (5 min), 100% B (isocrático, 5 min) perfazendo uma análise com tempo total de 85 min.

A evidência da presença de derivados do ácido gálico foi comprovada pelas bandas de absorção do sistema benzílico, com máximos na região do UV em 210-220 nm e entre 260-280 nm, conforme **Figura 5** (STICHER, 2008).

Figura 5: Espectro na região do UV de padrão de ácido gálico.

A má resolução dos picos cromatográficos somada às bandas de absorção no UV sugerem que as substâncias eluindo entre 45 e 85 min (**Figura 5**) correspondem aos galotaninos.

Considerando que as análises por CCD indicaram a presença de flavonóides na Fr4 da fração BuOH da partição, esta foi escolhida para análises de CLAE-PAD e FIA-ESI-IT-MS/MS.

5.1.3. Análise por CLAE PAD da Fr 4 do BuOH

Por meio da separação por CLAE, com o auxílio do detector PAD (**Figura 6**) foi possível confirmar a presença dos compostos derivados de ácido gálico, eluindo entre 0 e 10 min, além de flavonóides entre 16 e 31,7 min., com UV característico desta classe de substâncias, que mostram bandas de absorção em 240-290 nm (Banda II, anel A) e em 300-390 nm (Banda I, anel B) (**Figura 7**) (MERKEN & BEECHER, 2000).

Figura 6: Cromatograma de separação por CLAE-PAD dos constituintes químicos presentes na fração 4 (BuOH) do extrato MeOH 80% das folhas de *M. urundeuva*. Coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (250 x 4.6 mm d.i.; 5 µm). FM: H₂O + Ác. Fórmico 0,1% (A) e MeOH + Ác. Fórmico 0,1% (B). Gradiente exploratório de 0-60 minutos, de 5-100% de B em A. Fluxo 1,0 mL.min⁻¹, volume injetado 20,0 µL, forno de coluna 25°C ; λ 280 nm.

Figura 7: Bandas de máximo de absorção na região de UV típico de flavonóide, obtidas do pico em 16,6 min.

5.1.4. Análise por FIA-ESI-IT-MSn

O espectro de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS (**Figura 8**) indica a presença de derivados de ácido gálico e galotaninos. Os sinais de m/z 1547, m/z 1091, m/z 939, m/z 787 indicam uma série de galotaninos com até 9 unidades de ácido gálico esterificando uma molécula de glicose (SOUZA, 2012). Experimentos de

MS₂ desses íons precursores mostraram perdas consecutivas de unidades de m/z 152 Da, característico de grupos galoil (**Figuras 9, 10 e 11**).

AlessandraAnne_AroeirameohFr4_esineg_2607201101_110726101451 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,00E2
T: ITMS - c ESI Full ms [200,00-2000,00]

Figura 8: Espectro de massas em *full-scan* da Fr 4 (BuOH) obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo.

alessandra_anne_Aroeira_MeOHBuOH_filhos_esineg20V 1909201101 110919103330 #249 RT: 5,44 AV: 1 NL: 1,64
T: ITMS - c ESI Full ms2 1091,00@cid20,00 [300,00-2

Figura 9: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 1091.

O pico intenso referente ao íon de m/z 939 $[M-H]$ sugere a presença do composto 1,2,3,4,6-pental-O-galoil- β -D-glicose (**Figura 9**) (SOUZA, 2012), substância natural presente em diversas plantas medicinais (ZHANG et al., 2009).

Figura 10: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 939.

Figura 11: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 787.

Figura 12: Estrutura química do 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (PGG).

O sinal intenso de m/z 477 no espectro de primeira-ordem foi atribuído a quercetina-3-O-glucuronídeo (KAJDŽANOSKA et al., 2010). Fragmentação em segunda-ordem deste íon gerou o sinal de m/z 301 $[M - 176 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade glucurônica no flavonóide (**Figura 13**). Esse padrão de fragmentação confirma a presença deste composto.

Figura 13: Espectro de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon de m/z 477.

O sinal de m/z 609 $[M - H]^-$, no espectro de primeira-ordem foi atribuído à rutina. Fragmentação em segunda-ordem deste íon gerou o sinal de m/z 301 $[M - 308 - H]^-$, o que sugere a perda de uma unidade de hexose e uma deoxihexose ($162 + 146 = 308$), confirmando a presença deste composto.

Figura 14: Espectro de massas de segunda-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS em modo negativo do íon precursor de m/z 609.

5.2. Análise de Viabilidade Celular

5.2.1. Análise da redução do MTT do extrato MeOH nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas

No primeiro período (24 horas), para a análise da redução do MTT, todos os grupos apresentaram valores maiores que o grupo controle. Os grupos 1:100, 1:1000 e 1:10000 (absorbâncias próximas à 0,200) apresentaram valores semelhantes em relação ao extrato bruto (0,180) e superiores ao grupo controle (0,096), entretanto sem diferenças significantes ($p > 0,05$). A única exceção deste período foi o grupo com diluição de 1:10 (0,374) que obteve maior viabilidade em relação ao controle ($p < 0,05$) (**Figura 15 e Anexo 1**).

No segundo período (48 horas), com exceção do grupo 1:1000 (0,335), todos os grupos apresentaram valores de absorbância inferiores ao grupo controle (0,321). O extrato bruto apresentou o menor valor (0,054 de absorbância), seguido pelo grupo 1:10 (0,177). Enquanto os grupos 1:100 e 1:10000 apresentaram valores de absorbância de 0,287 e 0,297 respectivamente (**Figura 16**). Apesar das variações nos valores de absorbância, apenas os grupos controle, 1:1000 e 1:10000 foram significativamente diferentes do extrato bruto ($p < 0,05$) (**Figura 16 e Anexo 1**).

No período de 72 horas houve uma oscilação em relação aos valores de absorbância obtidos, no entanto não foram encontradas diferenças significantes

($p>0,05$). O grupo do extrato bruto (0,143) apresentou valor semelhante ao controle (0,163). Na diluição de 1:10 do extrato o valor obtido foi 0 (zero) isso porque o extrato matou todas as células, não apresentando viabilidade celular nesse grupo. Nas diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000 os valores foram superiores ao do grupo controle, com 0,747, 0,806 e 0,620 de absorbância, respectivamente (**Figura 17 e Anexo 1**).

No período de 96 horas os dois grupos com o extrato mais concentrado (extrato bruto e 1:10) obtiveram valores inferiores ao do grupo controle (controle – 1,002; extrato bruto – 0,233; 1:10 – 0,748), entretanto apenas o extrato bruto apresentou diferença significativa do controle ($p<0,05$). Em contrapartida, as outras diluições 1:100 (1,104); 1:1000 (1,135) e 1:10000 (1,296) apresentaram valores de absorbância superiores ao grupo controle e muito próximos entre si (1,100 -1,200) ($p>0,05$). O grupo com o maior valor no período (1:10000 – 1,296) também apresentou diferença do grupo controle ($p<0,05$) (**Figura 18 e Anexo 1**).

Figura 15: Análise da redução do MTT do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 24 horas.

* diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Figura 16: Análise da redução do MTT do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 48 horas.
* diferença significante em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 17: Análise da redução do MTT do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 72 horas.
Não houve diferença significante entre os grupos ($p > 0,05$). O grupo 1:10 não apresentou leitura (0,0).

Figura 18: Análise da redução do MTT do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 96 horas.

* diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.2.2. Análise de Captação do Vermelho Neutro nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas

Na análise da captação do vermelho neutro também houve uma leve oscilação dos valores de absorbância, no entanto, os valores obtidos para o grupo do extrato bruto foram os menores em todos os períodos estudados ($p < 0,05$). Enquanto os grupos controle e de diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000 apresentaram valores semelhantes sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figuras 19, 20, 21, 22 e Anexo 2**).

Para o período de 24 horas, por meio da análise de captação do vermelho neutro, notamos uma oscilação nos valores de absorbância dos grupos estudados. Os grupos do extrato bruto (0,102); 1:100 (0,128); 1:1000 (0,161) e 1:10000 (0,130) apresentaram valores menores que o grupo controle (0,179). Por outro lado a diluição de 1:10 do extrato (0,186) apresentou valor superior ao controle (**Figura 19**). No entanto, apenas o grupo de extrato bruto apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Anexo 2**).

No período de 48 horas notamos um padrão para os valores de absorbância obtidos nos grupos de diluições do extrato MeOH, com exceção ao extrato bruto. Em geral, as diluições de 1:10 (0,150) até 1:10000 (0,133) apresentaram valores

maiores que o do grupo controle (controle - 0,109) e não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) (**Figura 20 e Anexo 2**). Apenas o grupo do extrato bruto apresentou valor de absorbância (0,016) inferior aos outros grupos ($p<0,05$) (**Figura 20 e Anexo 2**).

No período de 72 horas, os grupos das diluições de 1:100 (0,166), 1:1000 (0,193) e 1:10000 (0,203) apresentaram valores semelhantes entre si e em relação ao grupo controle (0,176), não apresentando diferença significativa ($p>0,05$). O grupo do extrato bruto (0,017) e o grupo da diluição de 1:10 (0,049) obtiveram valores de absorbância muito abaixo dos outros grupos ($p<0,05$) (**Figura 21 e Anexo 2**).

No último período (96 horas) o perfil dos resultados foi muito semelhante ao período anterior (72 horas). Os valores de absorbância dos grupos controle (0,274); 1:100 (0,254); 1:1000 (0,284) e 1:10000 (0,292) ficaram próximos (0,254 – 0,292), não havendo diferenças significantes ($p>0,05$). Enquanto os grupos de extrato bruto (0,054) e diluição 1:10 (0,131) apresentaram valores bem inferiores aos demais grupos ($p<0,05$) (**Figura 22 e Anexo 2**).

Figura 19: Análise da captação do vermelho neutro do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 24 horas. * diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Figura 20: Análise da captação do vermelho neutro do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 48 horas. * diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 21: Análise da captação do vermelho neutro do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 72 horas. * diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 22: Análise da captação do vermelho neutro do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 96 horas. * diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.2.3. Análise do Cristal Violeta do extrato MeOH nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas

Na análise da coloração por cristal violeta houve um aumento nos valores de absorbância no decorrer dos períodos, no entanto, os valores obtidos para os grupos do extrato bruto e 1:10 foram os menores na maioria dos períodos estudados ($p < 0,05$). Enquanto os grupos controle e de diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000 apresentaram valores maiores, em geral sem diferença significativa ($p > 0,05$) (**Figuras 23, 24, 25, 26 e Anexo 3**).

Para a análise do cristal violeta, no período de 24 horas, os grupos tratados com as maiores diluições (1:100; 1:1000 e 1:10000) apresentaram valores próximos entre si (0,170; 0,162 e 0,175) e pouco abaixo do grupo controle (0,202). Por outro lado os grupos do extrato bruto e 1:10 apresentaram os menores valores de absorbância: 0,087 e 0,128 respectivamente (**Figura 23**). Apesar das variações de absorbância, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (**Anexo 3**).

No período de 48 horas todos os valores de absorbância dos grupos tratados foram inferiores ao grupo controle (0,429), no entanto não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) (**Anexo 3**). Os valores de absorbância obtidos pelos

grupos tratados foram crescentes de acordo com o aumento da diluição (extrato bruto – 0,155 e 1:10000 – 0,326) (**Figura 24**).

No período de 72 horas, os grupos controle (1,012) e 1:10000 (0,983) apresentaram valores semelhantes entre si, sem diferença significativa estatisticamente ($p>0,05$). Por outro lado, o extrato bruto (0,372) e o grupo de diluição de 1:10 (0,550) apresentaram valores inferiores ao controle (1,012) ($p<0,05$) (**Anexo 3**). O grupo da diluição de 1:100 não obteve valor de absorbância enquanto o grupo 1:1000 (0,653) apresentou um valor intermediário aos outros grupos (**Figura 25**).

No período de 96 horas, os grupos das diluições de 1:100 (1,137), 1:1000 (1,051) e 1:10000 (1,084) apresentaram valores semelhantes, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) (**Anexo 3**). A diluição 1:10 (0,364) apresentou valor muito inferior aos outros grupos ($p<0,05$) (**Anexo 3**). O maior valor encontrado foi para o grupo controle (1,599), o qual foi diferente de todos os outros grupos ($p<0,05$) (**Anexo 3**). O extrato bruto não obteve leitura (**Figura 26 e Anexo 3**).

Figura 23: Análise do cristal violeta do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 24 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 24: Análise do cristal violeta do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 48 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 25: Análise do cristal violeta do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 72 horas.

* diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo 1:100 não apresentou leitura (0,0).

Figura 26: Análise do cristal violeta do extrato hidroalcoólico de aroeira no período de 96 horas.

* diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo EB MeOH não apresentou leitura (0,0).

6 Discussão

6. Discussão

O uso de compostos de origem vegetal para o tratamento de doenças não é uma conduta nova, no entanto, nos últimos anos vários compostos e plantas tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, com potencial para a indústria farmacêutica (RECIO, ANDÚJAR e RÍOS, 2012).

Alguns trabalhos têm caracterizado extratos de plantas e identificados compostos que apresentam efeitos biológicos de interesse para a área da saúde (CRAGG et al., 1997). Essa identificação e padronização do preparo de extrato de plantas é fundamental para a validação e uso desses fitoterápicos. O cuidado nesse sentido se justifica, uma vez que, também são relatados na literatura efeitos colaterais de alguns compostos e mesmo interação com outras drogas. Entre os exemplos dessas possíveis reações adversas estão: 1) Cerca de 25% dos gêneros de Anacardiaceae são conhecidos pela sua toxicidade e por causarem dermatite de contato, como por exemplo, *Anacardium*, *Astronium*, *Blepharocarya*, *Cotinus*, *Lithrea*, *Mangifera*, *Mauria*, *Myracrodruon*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Semecarpus*, *Spondias*, *Swintonia* e *Toxicodendron*. A dermatite provocada por estas plantas é atribuída principalmente aos lipídios fenólicos (PELL, 2004); 2) Outras revisões sobre os flavonóides (compostos encontrados em muitas plantas) têm demonstrado alguns efeitos como toxicidade e hepatotoxicidade (GALATI e O'BRIEN, 2004) e 3) Interações adversas com drogas analgésicas (ABEBE, 2002).

Nesse sentido, os relatos da literatura demonstram efeitos biológicos de compostos que são encontrados na aroeira (foco do presente trabalho). Estudos sobre a constituição química de Anacardiaceae relatam uma ocorrência de flavonóides, incluindo biflavonóides, terpenos, xantonas, chalconas, e principalmente, lipídios totais e fenólicos e seus derivados (GEBARA et al., 2011; NAWWAR et al., 2011). Essas informações estão convergentes com recente trabalho (SOUZA, 2012) e com nossos resultados, uma vez que foram identificados, dentre os componentes do extrato de aroeira, flavonoides e derivados do ácido gálico.

No trabalho de Souza (2012) foram identificados, pelo método cromatográfico HPLC-PAD, os seguintes constituintes químicos: ácido gálico, galato de metila, galato de etila, ácido clorogênico e ácido protocatecuico. Todas essas substâncias foram detectadas no extrato etanólico (EtOH) 70% das folhas de aroeira, sendo que

as três primeiras estavam em maiores quantidades, enquanto que as últimas parecem substâncias minoritárias. Em nosso trabalho encontramos galotaninos e derivados de ácido gálico, sendo que a Fr4 BuOH foi escolhida para análise, pois além dos flavonóides foram encontrados derivados de ácido gálico nesta amostra.

Uma outra informação importante dentro deste contexto é que flavonóides podem ocorrer tanto no estado livre ou associados à glicosídeos (DI CARLO et al., 1999; SAMUELSSON, 1999). Nossos resultados também confirmaram essa informação, uma vez que obtivemos resultados sugestivos de glicose associada aos flavonóides. Os sinais de m/z 1547, m/z 1091, m/z 939, m/z 787 obtidos pelo FIA-ESI-IT-MS indicam uma série de galotaninos com até 9 unidades de ácido gálico esterificando uma molécula de glicose (SOUZA, 2012). Experimentos de MS² desses íons precursores mostraram perdas consecutivas de unidades de m/z 152 Da, característico de grupos galoil.

O sinal intenso de m/z 477 no espectro de primeira-ordem foi atribuído a quercetina-3-O-glucuronídeo (KAJDŽANOSKA et al., 2010). Fragmentação em segunda-ordem deste íon gerou o sinal de m/z 301 [$M - 176 - H$]⁻, sugerindo a perda de uma unidade glucuronídica no flavonóide. Esse padrão de fragmentação confirma a presença deste composto.

Todos os flavonóides são derivadas dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, e tem estruturas de três anéis (ROUTRAY & ORSAT, 2012). Variações na estrutura dos flavonóides surgem a partir da escala e padrão de reações de hidroxilação, prenilação, alcalinização e glicosilação que alteram a molécula básica (STALIKAS, 2007). Sabemos ainda que as plantas da Caatinga expostas à radiação solar elevada num ambiente semi-árido favorece a síntese de derivados fenólicos, reforçando o potencial medicinal de plantas a partir desse bioma (ALMEIDA et al., 2012).

Num trabalho realizado por Queires e colaboradores (2006) os autores testaram um extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) em células de linhagem humana de carcinoma de próstata. Os referidos autores descreveram resultados interessantes na linhagem celular, incluindo a inibição da proliferação dessas células com o extrato bruto e uma fração (F3). Vale ressaltar que os autores demonstraram que a fração F3 promoveu uma inibição de proliferação 30 vezes maior que o extrato bruto. Foi identificado, no mesmo trabalho (QUEIRES et al., 2006), que a fração de polifenóis promoveu parada no ciclo celular (G0/G1) e induziu

apoptose. Os dados descritos por Queires e colaboradores (2006) parecem similares com nossos resultados de viabilidade celular (testes de redução do MTT, captação do Vermelho Neutro e coloração pelo Cristal Violeta), pois encontramos redução na viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos tratados com o extrato bruto da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) em concentração maior (diluição 1:10). Um outro dado importante, dos mesmos autores, é a sugestão de um mecanismo de ação de indução de autofagia das células estudadas pelos polifenóis da aroeira, uma vez que foi constatada uma alteração na atividade da fosfatase ácida lisossomal. Esse dado também pode estar convergindo para um resultado encontrado no nosso trabalho: viabilidade, aferida pelo teste do Vermelho Neutro, das células tratadas com o extrato bruto. Sabemos que o teste do vermelho neutro se baseia na ligação do corante (vermelho neutro) em lisossomos de células viáveis. Em nossos resultados de 24 horas, do vermelho neutro, os grupos de extrato bruto e diluição 1:10 apresentaram valores de absorbância relativamente altos, no entanto, nos últimos períodos esses valores diminuíram. Isso pode ser um indício de que pode ter havido uma ativação da fosfatase ácida lisossomal para iniciar o processo de morte por autofagia nas células tratadas com o extrato de aroeira em maiores concentrações, seguindo assim o mesmo mecanismo proposto por Queires e colaboradores (2006).

Em um estudo, também com células neoplásicas (leucemia), Ferreira e colaboradores (2011) demonstraram que o extrato etanólico de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) promovia morte celular, provavelmente por apoptose. Dados esses também parecidos com nossos resultados de viabilidade celular, uma vez que constatamos que as células humanas (fibroblastos gengivais) tratadas com o extrato bruto de aroeira tiveram menor proliferação (em alguns casos morte celular) quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento com o extrato de aroeira).

Outros trabalhos têm demonstrado que alguns compostos fenólicos, como o ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxidobenzóico) e seus derivados, apresentam uma citotoxicidade seletiva contra uma variedade de células tumorais (de origem humana e camundongos), preservando células normais (PELLEGRINA et al., 2005). No trabalho de Sakao e colaboradores (2009) os autores sugerem que os efeitos apoptótico dos flavonoides em células tumorais eram principalmente exercidos pelos grupos hidroxil das quercetinas. Esses autores sugeriram o seguinte modelo de

ação: os grupos hidroxilas da quercetina contribuiriam para a geração de superóxido intracelular, consequentemente inibição da proliferação celular e indução de apoptose de células alteradas (HL-60). Novamente, esses relatos da literatura parecem convergir no sentido de que alguns componentes dos extratos de plantas (ácido gálico, quercetina, etc) podem promover um controle da proliferação celular e indução de morte por apoptose, dados esses que parecem similares aos encontrados no nosso trabalho. A redução da viabilidade celular pelas altas concentrações do extrato de aroeira, encontrado no presente trabalho, pode estar associada à presença de ácido gálico em maiores concentrações.

Sabemos que diversas populações usam de plantas regionais para obtenção de preparados para as mais variadas indicações (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA, 2007; DING et al., 2012; MONIGATTI et al., 2013). Em alguns casos são relatados centenas de plantas utilizadas numa mesma região geográfica para “cura” de algumas doenças (ALMEIDA et al., 2010; CECÍLIO et al., 2012). Especificamente no Brasil, tem sido relatado pela literatura que regiões do Nordeste (em especial da Caatinga) alguns habitantes usam preparados de plantas para o tratamento de dores e outras doenças, entre elas a aroeira (MONTEIRO et al., 2006; LUCENA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010; CARTAXO et al., 2010).

As indicações mais utilizadas para a aroeira, segundo a medicina popular, têm sido como antiinflamatório (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA, 2007; CARTAXO et al., 2010; JUNIOR et al., 2011) como bebida ou lavando a área afetada, câncer, dor de dente (CARTAXO et al., 2010), cicatrizante (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA, 2007) e outros. Nesse sentido alguns trabalhos científicos têm comprovado alguns desses efeitos descritos pela medicina popular. Resultados em animais têm confirmado o efeito da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi e *Myracrodruon urundeuva*) como cicatrizante (COUTINHO et al., 2006; ESTEVÃO et al., 2013); antiinflamatório (SOUZA et al., 2007), antiúlcera (SOUZA et al., 2007), antimicrobiana e antifúngica (ALVES et al., 2009).

Em adição, nossos resultados apresentam dados convergentes com os trabalhos da literatura em relação aos componentes presentes no extrato de aroeira e a confirmação de modulação da viabilidade celular de maneira dose-dependente, como descrito por outros autores em diferentes linhagens celulares testadas. Vale destacar que até o presente momento não foram feitos trabalhos de viabilidade com

fibroblastos humanos para testar o extrato de aroeira, com exceção do presente trabalho.

7 Conclusões

7. Conclusões

Por meio dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O extrato metanólico de aroeira apresenta compostos como flavonoides, derivados de ácido gálico e galotaninos;

- Altas concentrações (extrato bruto e diluição 1:10) do extrato de aroeira promovem redução da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos. Por outro lado, o extrato de aroeira em diluições superiores à 1:1000 não interferem na viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos.

Em vista do escrito acima, o extrato de aroeira é capaz de modular a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos de maneira dose-dependente.

Referências

8. Referências

- Abe LT, Da Mota RV, Lajolo FM, Genovese MI. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007; 27(2): 394-400.
- Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther.* 2002; 27(6):391-401.
- activating and modulating actions at GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 2012; 165(4): 880–896.
- Albuquerque UP, de Oliveira RF. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J Ethnopharmacol.* 2007; 113(1):156-170.
- Almeida AC, Sobrinho EM, de Pinho L, Souza PNS, Martins ER, Duarte ER, Santos HO, Brandi IV, Cangussu AS, Costa JPR. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. *Ciência Rural* 2010; 40(1): 200-203.
- Almeida CFCBR, Cabral DLV, Almeida CCBR, Amorim ELC, Araújo JM, de Albuquerque UP. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. *Pharm Biol* 2012; 50: 201–207.
- Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira M do SV. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(2): 222-224.
- Araim O, Ballantyne J, Waterhouse AL, Sumpio BE: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *Eur J Vasc Surg* 2012; 35(6): 1226-1232.

Barreto VL, Feitosa AMSC, Araújo TJ, Chagas FK, Costa LK. Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápicos. Av Odontoestomatol 2005; 21(4): 195-201.

Barroso GM. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa. Imp Universitária v.2; 1984.

Bellik Y, Boukraâ L, Alzahrani HA, Bakhotmah BA, Abdellah F, Hammoudi SM, Iguer-Ouada M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. Molecules 2012; 18(1): 322-353.

Botelho MA, Rao VS, Carvalho CBM, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar resorption in experimental periodontitis in rats. Journal Ethnopharmacology 2007;113(3):471-478.

Botelho MA, Rao VS, Montenegro D, Bandeira MA, Fonseca SG, Nogueira NA, Ribeiro RA, Brito GA. Effects of an herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. Phytother Res 2008; 22(4):442-449.

Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamento. Cienc Cult 2003; 55 (3); 37-39.

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Jaboch R. Assessment of the toxicity of the brasilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da praia) e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). Phytoterapy Research 2013; 27: 692-698.

Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology 2010; 131: 326–342.

Castelo Branco Neto ML, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Oliveira Filho MA, Czezczko NG, Aoki S, Cunha R, Fonseca VR, Teixeira HM, Aguiar LRF. Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em ratos. Acta Cir Bra 2006; 21 (2):15-20.

Catão RMR, Antunes RMP, Arruda TA, Pereira MSV, Higino JS, Alves JA, Passos MGVM, Santos VL. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum linn* (Romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anal Clin 2006; 38 (2):111-113.

Cecílio AB, de Faria DB, Oliveira PC, Caldas S, de Oliveira DA, Sobral ME, Duarte MG, Moreira CP, Silva CG, de Almeida VL. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. J Ethnopharmacol 2012; 141(3):975-981.

Chahar MK, Sanjaya Kumar DS, Lokesh T, Manohara KP. *In vivo* antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. Int Immunopharmacol 2012; 13(4): 386–391.

Choudhary N, Bijjem KR, Kalia AN. Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*. J Ethnopharmacol 2011; 135(2): 238–242.

Coutinho IH, Torres OJ, Matias JE, Coelho JC, Stahlke Júnior HJ, Agulham MA, Bachle E, Camargo PA, Pimentel SK, de Freitas AC. *Schinus terebinthifolius* Raddi and it's influence in the healing process of colonic anastomosis: experimental study in rats. Acta Cir Bras 2006; 21 (3):49-54.

Cragg GM; Newman DJ; Snader KM. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod 1997; 60: 52–60.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents 2006; 27(2): 181.

Degaspary CH, Waszczynskyj N. Antioxidant properties of phenolic compounds. Visão Acadêmica 2004; 5(1): 33-40.

Desmarchelier C, Lisboa RR, Coussio J, Ciccia G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brasil. J Ethnopharmacol. 1999; 67(1): 69-77.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci 1999; 65(4): 337–353.

Di Stasi LC. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

Ding RB, Tian K, Huang LL, He CW, Jiang Y, Wang YT, Wan JB. Herbal medicines for the prevention of alcoholic liver disease: a review. J Ethnopharmacol. 2012; 144(3):457-65.

Diogenes MJN, Matos FJA. Dermatites causadas por plantas. Anais Brasileiro de Dermatologia 1999; 74: 629 - 634.

Ditterich RG, Romanelli MCMOV, Rastelli MC, Portero PP, Santos EB. “*In vitro*” antimicrobial activity of natural substances in toothpastes. Odontologia. Clín Cientif 2007; 6 (4): 303-307.

Dokkedal AL, Lavarda F, Santos LC, Vilegas W. Xeractinol-A nem flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). J Braz Chem Soc 2007; 18 (2): 437-439.

Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. Phytomedicine 2012; 19(14):1307-1314.

Estevão LR, Mendonça FS, Baratella-Evêncio L, Simões RS, de Barros ME, Arantes RM, Rachid MA, Evêncio-Neto J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. Acta Cir Bras. 2013; 28(3):202-209.

Fernandez SP, Karim N, Mewett KN, Chebib M, Johnston GA, Hanrahan JR. Flavan-3-ol esters: new agents for exploring modulatory sites on GABA (A) receptors. Br J Pharmacol 2012; 165(4): 965–977.

Ferreira Júnior WS, Ladio AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. Ethnopharmacol. 2011; 138(1):238-252.

Ferreira Júnior WS, Ladio AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. Ethnopharmacol. 2011; 138(1):238-252.

Ferreira PM, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Carvalho AF. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *An Acad Bras Cienc* 2011 ;83(3):1045-1058. Epub 2011 Jul 15.

Francisco KSF. Fitoterapy: an option in odontological treatment. *Revista Saúde*. 2010; 4 (1): 18-24.

Freire Allemão F & Freire Allemão M. *Ordinis therebinthacearum*. *Trab Comm Sc Expl Séc Bot* 1862; 1:3-6.

Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(3):287-303.

Gebara SS, de Oliveira Ferreira W, Ré-Poppi N, Simionatto E, Carasek E. Volatile compounds of leaves and fruits of *Mangifera indica* var. coquinho (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *Food Chem*. 2011; 127(2):689-693.

Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 591356.

Grosso FC, Bergamaschi Cde C, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, de Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res* 2008; 22(8):993-998.

Grubesić RJ, Srećnik G, Kremera D, Rodriguez a JV, Nikolić T, Vladimir Knežević S. Simultaneous RP-HPLC-DAD Separation, and Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in *Plantago L. Species*. 2013; 10 (7): 1305-1316.

Guo J, Xue C, Duan JA, Qian D, Tang Y, You Y. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components *in vivo*. *Phytomedicine* 2011; 18(14): 1250–1254.

Haslam E. Chemistry of vegetable tannins. London: Academic Press, 1966. 179 p.

Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, González-Cortazar M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine* 2011; 18(14): 1255–1261.

ISO 10993-5 (1999) Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. International Organization for Standardization. Geneva.

Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 2011; 16(2): 1471–1485.

Jardini FA, Lima A, Mendonça EMZ, Pinto RJ, Mancini DAP, Mancini-Filho J. Compostos fenólicos da polpa e sementes de Romã (*Punica granatum*, L): atividade antioxidante e protetora em células MDCK. *Alim Nutr* 2010; 21 (4): 509-517.

Jiang R, Miyamoto A, Martz A et al. Retrochalcone derivatives are positive allosteric modulators at synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors *in vitro*. *Br J Pharmacol* 2011;162(6): 1326–1339.

Juiz PJL, Alves RJC, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Braz Journal Pharmacognosy* 2009; 20 (1): 134-139.

Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010; 29 (2): 181-194.

Karim N, Curmi J, Gavande N, Johnston GA, Hanrahan JR, Tierney ML, Chebib M. 2'-Methoxy-6-methylflavone: a novel anxiolytic and sedative with subtype selective

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013 Feb 19;18(2):2328-75. doi: 10.3390/molecules18022328.

Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 1989;182(1):16-19.

Lima A, Mancini-Filho J. Compostos com atividade antioxidante no pequi (*Caryocar brasiliense*, L.) *Nutrire* 2005; 30: 296.

Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. J Nutr 2004, 134, 3479S–3485S.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

Lucena RF, Albuquerque UP, Monteiro JM, Almeida C de F, Florentino AT, Ferraz JS. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil--a look at their conservation and sustainable use. Environ Monit Assess. 2007; 125(1-3):281-290.

Machado AC, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Ruvieri DB, Zoccal R, Damante CA, Gaetti Jardim Junior. Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. J Apply Oral Sci 2012; 20 (4): 414-8.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr. VF. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. Quim Nova 2002; 25 (3): 429-438.

Mahmoud TS, Marques MR, Pessoa CO, Lotufo LVC, Magalhães HIF, Moraes MO, Lima DP, Tininis AG, Oliveira JE. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2011; 21 (3): 456-464.

Menendez A, Rao V. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1988; 21: 531–533.

Menezes TEC, Delbem ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Jardim Junior EG. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. Pharmaceutical Biology 2010; 48 (3) 300-305.

Merken HM, Beecher GR. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. J Chromatogr A. 2000; 897(1-2):177-184.

Monigatti M, Bussmann RW, Weckerle CS. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *J Ethnopharmacol.* 2013; 145(2):450-64.

Montanari RM, Barbosa LCA, Demuner AJ, Silva CJ, Andrade NJ, Smail FMD, Barbosa MCA. Exposure to anacardiácea volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cels. *Molecules* 2012; 17: 9728-9740.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Tannins: from chemistry to ecology. *Quim Nova* 2005; 28 (5): 892-896.

Monteiro JM, de Albuquerque UP, Lins-Neto EM, de Araújo EL, de Amorim EL. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol.* 2006; 105(1-2):173-186.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.

Mukne AP, Viswanathan V, Phadatare AG. Structure prerequisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacogn Rev* 2011; 5(9): 13–18.

Nawwar M; Hussein S; Ayoub N; Hashim A; El-Sharawy R; Lindequist U; Harms M; Wende K. Constitutive phenolics of *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) and their biological effects on human keratinocytes. *Fitoterapia*, 2011; 82: 1265-1271.

Oliveira FG, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Plants species indicated in odontology. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17 (3): 466-476.

Pell SK. Molecular systematic of the cashew family (Anacardiaceae). 2004. 207 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Department of Biological Science, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2004.

Pellegrina CD, Padovani G, Mainente F, Zoccatelli G, Bissoli G, Mosconi S, Veneri G, Peruffo A, Andrighetto G, Rizzi C, Chignola R. Antitumor potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. *Cancer Lett* 2005; 226: 17-25.

Pereira SLS, Lima MSS, Costa FN, Carlos MX, Kayatt FE. Evaluación del efecto de un gel conteniendo extracto de aruera en el tratamiento de gingivitis. Estudio clínico em humanos. *Acta Odontológica Venezolana* 2010; 47 (4): 1-8.

Queires LC, Fauvel-Lafève F, Terry S, De la Taille A, Kouyoumdjian JC, Chopin DK, Vacherot F, Rodrigues LE, Crépin M. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Res* 2006; 26(1A):379-387.

Quinones M, Miguel M, Aleixandre Amaya. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research* 2013; 68 (1) 125–131.

Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem.* 2012;19(14):2088-2103.

Rêgo Junior NO, Fernandes LG, Castro RD, Silva LC, Gualberto AS, Pereira MLA, Silva MV. Bioactive compounds and antioxidant activity of crude extracts of brushwood vegetable species. *Braz J Food Technol* 2011; 14 (1): 50-57.

Rendeiro C, Guerreiro JDT, M. Williams CM, Spencer JPE. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012; 71, 246–262.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas modalidades. *Mat Res* 2003; 6(3): 317-320.

Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. *Phytother Res.* 2013 Jul 4. doi: 10.1002/ptr.5023. [Epub ahead of print]

Routray W, Orsat V. Review: Microwave-assisted extraction of flavonoids. *Food Bioprocess Technol* 2012; 5: 409–424.

Sá RA, Santos ND, Da Silva CS, Napoleão TH, Gomes FS, Cavada BS, Coelho LC, Navarro DM, Bieber LW, Paiva PM. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009; 149:300–306.

Salgado ADY, Maia JL, Pereira SLS, Lemos TLG, Olívia Moraes OML. Antiplatelet and antigingivitis effects of a gel containing *Punica Granatum* Linn extract. A Double-blind clinical study in humans. J Appl Oral Sci 2006; 14(3):162-166.

Samuelsson G.1999. Drugs of Natural Origin. Swedish Pharmaceutical Press: Stockholm, Sweden.

Santin DA, Leitão HF. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiácea). Rev Bras Bot 1991; 14:133-145.

Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no Município de João Pessoa, Brasil. Rev Bras Pharmacognosy 2009; 19: 321-324.

Santos PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev Farm Bioquim Univ São Paulo 1995; 31 (1): 35-38.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem 2005; 16: 360-367.

Sgarbieri VC. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades – degradação–modificações. São Paulo: Varela, 1996. Cap. 5: Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.

Silva RJM, Darmon N, Fernandez Y. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1991; 39(9):1549-1552.

Singleton VL, Kratzer FH. Plant phenolic, 1973. In: Silva MR, Silva MAAP. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. Rev. Nutr. Campinas 1999; 12(1): 5-19.

Soares SP, Vinholis AHC, Casemiro LA, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms. Rev Odonto Ciênc 2008; 23(2):141-144.

Soory M. Nutritional antioxidants and their applications in cardiometabolic diseases. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(5):388-401.

Souza LP. Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiácea). Dissertação. Mestrado-Área de Concentração em Química- Universidade Estadual Paulista; Araraquara, 2012.

Souza SMC, Aquino LCM, Milach Jr AC, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (anacardiácea) in rodents. *Phytotherapy Research* 2007; 21(3): 220-225.

Stalikas CD. Review: Extraction, Separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007; 30: 3268–3295.

Sticher O. Natural product isolation. *Nat Prod Rep* 2008 ;25(3):517-554.

Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lopes NP, Giordani RB, Macedo AJ. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS One*. 2013 Jun 11;8(6):e66257. doi: 10.1371/journal.pone.0066257. Print 2013.

Ugaz OL. Fitoquímica-Métodos em El estudio de productos naturales. 1994.

Varoni EM, Lodi G, Sardella A, Carrassi A, Iriti M. Plant polyphenols and oral health: old phytochemicals for new fields. *Curr Med Chem*. 2012; 19(11):1706-1720.

Veiga Jr. VF, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova*. 2005; 28: 519-528.

Viana GS, Bandeira MA, Matos FJ. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemão. *Phytomedicine* 2003; 10 (2-3): 189-195.

Wagner H. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer, Berlin; 1996, 384p.

World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva: WHO; 1998. 45p.

Zhang J, Li L, Kim S, Hagerman AE, Lu J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharmaceutical Research* 2009; 26(9): 2066-2080.

Zhang XH, Ma ZG, Rowlands DK et al. Flavonoid myricetin modulates GABA(A) receptor activity through activation of Ca (2+) channels and CaMK-II pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 75809

ANEXOS

Anexo 1: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) dos testes de MTT em todos os grupos e períodos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,096 ^{A,B} ±0,041	0,321 ^{B,C,D} ±0,071	0,163 ^{A,B,C,D} ±0	1,002 ^{E,F} ±0,207
Extrato Bruto	0,180 ^{A,B,C,D} ±0,077	0,0545 ^A ±0,012	0,143 ^{A,B,C} ±0,086	0,233 ^{A,B,C,D} ±0,129
1:10	0,374 ^{C,D} ±0,036	0,177 ^{A,B,C} ±0,051	0	0,748 ^E ±0,083
1:100	0,242 ^{A,B,C,D} ±0,035	0,287 ^{A,B,C,D} ±0,024	0,747 ^{A,B,C,D} ±0,148	1,104 ^{F,G} ±0,104
1:1.000	0,219 ^{A,B,C,D} ±0,058	0,335 ^D ±0,083	0,806 ^{A,B,C,D} ±0,094	1,135 ^{F,G} ±0,148
1:10.000	0,209 ^{A,B,C,D} ±0,036	0,297 ^D ±0,048	0,620 ^{A,B,C,D} ±0,150	1,296 ^G ±0,147

Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Anexo 2: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) dos testes de Vermelho Neutro em todos os grupos e períodos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,179 ^{D,E,F} ±0,029	0,109 ^{B,C} ±0,012	0,176 ^{D,E,F} ±0,015	0,274 ^H ±0,017
Extrato Bruto	0,102 ^{B,C} ±0,017	0,016 ^A ±0,010	0,017 ^A ±0,005	0,054 ^{A,B} ±0,005
1:10	0,186 ^{D,E,F} ±0,028	0,150 ^{C,D,E,F} ±0,022	0,049 ^{A,B} ±0,018	0,131 ^{C,D} ±0,014
1:100	0,128 ^{C,D} ±0,031	0,152 ^{C,D,E,F} ±0,028	0,166 ^{D,E,F} ±0,018	0,254 ^{G,H} ±0,026
1:1.000	0,161 ^{C,D,E,F} ±0,035	0,108 ^{B,C} ±0,021	0,193 ^{E,F} ±0,009	0,284 ^H ±0,010
1:10.000	0,130 ^{C,D,E} ±0,010	0,133 ^{C,D} ±0,023	0,203 ^{F,G} ±0,021	0,292 ^H ±0,022

Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Anexo 3: Valores de absorvância (média e desvio-padrão) dos testes do Cristal Violeta em todos os grupos e períodos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,202 ^{A,B,C} ±0,038	0,429 ^{B,C,D} ±0,049	1,012 ^{E,F} ±0,156	1,599 ^G ±0,134
Extrato Bruto	0,087 ^{A,B} ±0,016	0,155 ^{A,B,C} ±0,056	0,372 ^{B,C,D} ±0,039	0
1:10	0,128 ^{A,B} ±0,026	0,167 ^{A,B,C} ±0,055	0,550 ^{C,D} ±0,037	0,364 ^{B,C,D} ±0,093
1:100	0,170 ^{A,B,C} ±0,031	0,219 ^{A,B,C} ±0,032	0	1,137 ^F ±0,232
1:1.000	0,162 ^{A,B,C} ±0,019	0,236 ^{A,B,C} ±0,038	0,653 ^{D,E} ±0,198	1,051 ^F ±0,213
1:10.000	0,175 ^{A,B,C} ±0,027	0,326 ^{B,C} ±0,079	0,983 ^{E,F} ±0,184	1,084 ^F ±0,088

Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).