



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Programa de Pós-Graduação em Química

***Lotus corniculatus* L. cv. SÃO GABRIEL: ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

**JULIANA BASTOS DALMARCO**

Florianópolis  
2009

**JULIANA BASTOS DALMARCO**

***Lotus corniculatus* L. cv. SÃO GABRIEL: ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis

2009

**Juliana Bastos Dalmarco**

***Lotus corniculatus* L. cv. SÃO GABRIEL: ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Esta Dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 02 de março de 2009.

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Silvia Fröde  
(UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Inês Maria Brigunte  
(UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Antônio Carlos Joussef  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti  
(UFSC)

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Professor Moacir Geraldo Pizzolatti pela orientação, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do laboratório de Química de Produtos Naturais, Heros, Cristian, Henrique, Andressa, Munique, Solomon, Mariana, Patrícia, Aline, Fabiana, Guilherme, Ana Paula, Analice, Leandro e Luciana pelo companheirismo e principalmente à Beatriz e Michele pela sincera amizade que construímos durante este período. Em especial a minha grande amiga Alessandra, pelo carinho, amizade inigualável e pelo companheirismo admirável.

À Janaína e a professora Dr<sup>a</sup>. Tânia Silvia Fröde do laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da UFSC, pela realização dos ensaios biológicos de atividade anti-inflamatória.

Ao engenheiro agrônomo Ulisses de Córdova e EPAGRI, pelo fornecimento da planta.

Ao professor Msc. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela ajuda, ensinamentos e colaboração na realização dos ensaios de atividade antibacteriana.

À professora Dr<sup>a</sup>. Inês Maria Brigunte, pela ajuda e colaboração nos ensaios de atividade antioxidante.

Aos professores e funcionários da Central de Análises pela elaboração dos espectros.

A Capes e CNPq pelo suporte e apoio financeiro.

Aos meus pais e irmão, que sempre acreditaram em mim, e principalmente ao meu grande amor Eduardo, meu porto seguro, meu amor eterno.

A Deus, que sempre me guiou para que eu seguisse os caminhos certos .

A todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

## RESUMO

**Introdução:** A planta *Lotus corniculatus* L. cultivar São Gabriel (Fabaceae) é uma leguminosa forrageira que está distribuída em diversas regiões do mundo e é apontada como a solução para melhorar a dieta dos animais e as pastagens pela melhora na fixação simbiótica de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi investigar fitoquimicamente a *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel e avaliar as possíveis atividades biológicas desta planta, através de ensaios de avaliação antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória. A metodologia seguiu-se da seguinte maneira: as partes aéreas da planta foram secas e maceradas em etanol 96% durante quinze dias, produzindo o extrato bruto. O extrato bruto foi particionado com solventes de polaridade crescente resultando nas frações hexano, acetato de etila, butanol e água. As frações hexano e acetato de etila foram submetidas a procedimentos cromatográficos para o isolamento dos compostos. Para a avaliação do efeito antioxidante, foram utilizadas metodologias in vitro como a capacidade sequestrante DPPH, potencial redutor e peroxidação lipídica. O efeito antibacteriano foi avaliado através do método de microdiluição o qual produz a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima. Finalmente, o efeito anti-inflamatório de *Lotus corniculatus* foi analisado no modelo in vivo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, que é um modelo de inflamação aguda. Através da análise fitoquímica, foi possível elucidar três compostos: dois terpenos,  $\beta$ -sitosterol e o ácido oleanólico da fração hexano, e um flavonóide canferitrina da fração acetato de etila. A avaliação da atividade antioxidante mostrou que a fração BuOH apresentou o melhor resultado com  $IC_{50} = 99,27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  na capacidade sequestrante do radical livre DPPH. No ensaio de potencial redutor, a fração AcOEt apresentou a melhor atividade ( $212,32 \pm 5,58$ ). O extrato e frações de *L. corniculatus* não mostraram significativa inibição da peroxidação lipídica. No estudo antibacteriano de *L. corniculatus*, o composto isolado ácido oleanólico exibiu boa atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente ( $MIC = 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* ( $CIM = 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Já a canferitrina (flavonóide) demonstrou bom efeito antibacteriano contra *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexnerii*, *Salmonella typhimurium* e *Acinetobacter calcoaceticus* ( $MIC = 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e excelente atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* ( $MIC = 8.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e *Enterococcus faecalis* ( $CIM = 3.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). O estudo anti-inflamatório de *Lotus corniculatus* também mostrou resultados significativos. O extrato bruto de *L. corniculatus*, frações e também compostos isolados, inibiu significativamente a migração de leucócitos, exsudação, atividade da mieloperoxidase (MPO), assim como a concentração de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_x$ ) no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos ( $P < 0.05$ ). De acordo com os resultados foi possível verificar que a *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel possui importante propriedade antibacteriana e anti-inflamatória. Estes efeitos podem ser atribuídos aos compostos isolados como o ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol e principalmente ao canferitrina o qual demonstrou o melhor efeito farmacológico.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Lotus corniculatus* L. cultivar São Gabriel (Fabaceae), it's a leguminosae fodder that is distributed in many regions and is appointed out to be the solution to better the diet of animals, improvement of pastures by the symbiotic fixation of nitrogen. The aim of this study was to investigate the phytochemistry and the biological activities through the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory assays. The methodology followed in the following way: the aerial parts of *L. corniculatus* was dried and macerated with ethanol 96% during fifteen days, giving the crude extract. The crude extract was particionated with solvents in growing order of polarity giving the hexane, ethyl acetate, n-buthanol and aquous fractions. The hexane and ethyl acetate fractions, was submitted to a chromatographic procedures. To evaluate the antioxidant effect of *Lotus corniculatus* was used in vitro methodology such as DPPH scavenger, reductor pontential and lipid peroxidation. The antibacterial effect was evaluated by microdilution method, that produce the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). Finally, anti-inflammatory effects of *Lotus corniculatus* was analyzed in mouse model of pleurisy induced by carragenan, that is an acute model of inflammation. Through the phytochemistry analysis it was possible to elucidate three coumpounds: two terpenes,  $\beta$ -sitosterol and oleanolic acid from hexane fraction and the flavonoid kaempferitrin from ethyle acetate fraction. The evaluation of antioxidant activity showed that the BuOH fraction presented the best result with  $IC_{50} = 99, 27 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in the capacity of scavenger the DPPH radical. In the assay of reduction potential, the AcOEt fraction showed the best activity ( $212,32 \pm 5,58$ ). The extract and fractions didn't show significant inhibition of lipidic peroxidation. In the antibacterial study of *Lotus corniculatus*, the isolated compound oleanolic acid exhibited a good antibacterial activity on methycillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC =  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* (MIC =  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The kaempferitrin also demonstrated a good antibacterial effect on *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexinerii*, *Salmonella typhimurium* and *Acinetobacter calcoaceticus* (MIC =  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and excellent antibacterial activity on *Bacillus cereus* (MIC =  $8.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and *Enterococcus faecalis* (MIC =  $3.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The anti-inflammatory analysis of *Lotus corniculatus* also showed an important data. The crude extract , its derived fractions and also isolated compounds, significantly inhibited leukocytes influx, exudation, myeloperoxidase (MPO) activity, as well as nitrite/nitrate concentration ( $\text{NO}_x$ ) in the mouse model of pleurisy induced by carragenan ( $P < 0.05$ ). Our results demonstrated that *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel have important antibacterial, as well anti-inflamatory properties. These effects may be atributted to the isolated compounds such oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol and mainly to kaempferitrin that demonstrated better pharmacological and antibacterial effects.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Flavonóides descritos em espécies do gênero Lotus.....	15
Figura 2. <i>L. corniculatus</i> L. cv. São Gabriel (cornichão) .....	17
Figura 3. Procedimento de fracionamento do extrato de <i>L. corniculatus</i> L. cv. São Gabriel.....	32
Figura 4: Curva de calibração com ácido gálico para avaliação de fenólicos totais.....	33
Figura 5: Curva de calibração com quercetina para a avaliação do conteúdo de flavonóides. ....	34
Figura 6. Curva de calibração com ácido ascórbico utilizada para a determinação do potencial redutor...36	
Figura 7. Estrutura do BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno).....	37
Figura 8: Esquema geral de fracionamento da espécie <i>L. corniculatus</i> L. cv. São Gabriel .....	43
Figura 9. Esquema de fracionamento da fração HEX. ....	45
Figura 10. Espectro de Infravermelho do composto 1. ....	46
Figura 11. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> /400MHz) do composto 1.....	47
Figura 12. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> /100 MHz) do composto 1 .....	48
Figura 13. Estrutura do composto 1.....	49
Figura 14. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto 2.....	50
Figura 15. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> /400 MHz) do composto 2.....	51
Figura 16. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> /100MHz) do composto 2.....	52
Figura 17. Estrutura do composto 2.....	53
Figura 18: Esquema de fracionamento da fração AcOEt. ....	54
Figura 19: espectro de IV (KBr) do composto 3.....	55
Figura 20: espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD/400 MHz) do composto 3.....	57
Figura 21: Ampliação da região entre 3,3 ppm e 4,3 ppm do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto 3 ...58	
Figura 22: espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD/100 MHz) do composto 3.....	58
Figura 23: Espectro de correlação <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY (400MHz) do composto 3.....	59
Figura 24. Estrutura do composto 3.....	61
Figura 25. Complexo formado entre a estrutura do flavonóide e o reagente AlCl <sub>3</sub> .....	65
Figura 26: Estabilização radical livre DPPH na presença de um flavonóide. ....	66
Figura 27: Porcentagem de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da solução teste. ....	67
Figura 28. Estrutura do ácido ascórbico. ....	68
Figura 29. Ação protetora contra peroxidação lipídica do extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> .....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Alteração da coloração de antocianidinas e flavonóides em relação à mudança de pH .....	28
Tabela 2. Análise fitoquímica preliminar do extrato de <i>L. corniculatus</i> .....	44
Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos para o composto 1 comparados com a literatura (KOVGANKO, 2000). .....	49
Tabela 4: Valores de deslocamento químico para o composto 2 comparados com a literatura (MAHATO e KUNDU, 1994).....	53
Tabela 5: Valores de deslocamento químico para o composto 3 comparados com a literatura. ....	61
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais * presentes no extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> .....	63
Tabela 7. Teor de flavonóides totais* presentes no extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> .....	65
Tabela 8: Capacidade seqüestrante do radical livre DPPH ( $CE_{50}^*$ - $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> . ....	67
Tabela 9. Potencial redutor* do extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> . ....	69
Tabela 10. Inibição da peroxidação lipídica (%)* pelo extrato e frações de <i>L. corniculatus</i> .....	70
Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do extrato bruto, frações e compostos isolados de <i>L. corniculatus</i> L. ....	75
Tabela 12. Concentração Bactericida Mínima (CBM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do extrato bruto, frações e compostos isolados de <i>L. corniculatus</i> L. ....	76
Tabela 13 – Valores absolutos e percentagem de inibição do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel sobre a migração de leucócitos, exsudação e atividade da Mieloperoxidase , na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. ....	79
Tabela 14: Efeito do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de <i>L. corniculatus</i> cv. São Gabriel sobre as concentrações de óxido nítrico e sua percentagem de inibição em relação ao controle inflamado (Cg), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American type culture collection
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD <sub>3</sub> OD	Clorofórmio deuterado
CE <sub>50</sub>	Contração específica
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Correlation Spectroscopy
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EtOH	Etanol
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
HEX	Hexano
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase
MHz	Megahertz
NO	Óxido Nítrico
n-BuOH	n-Butanol
P.F.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – 1
UV/VIS	Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 O uso de produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos.....	12
1.2 Gênero Lotus.....	13
1.3 Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel.....	16
1.4 Atividades biológicas.....	18
1.4.1 Atividade antioxidante .....	19
1.4.2 Atividade antibacteriana .....	19
1.4.3 Atividade anti-inflamatória .....	20
2 OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo geral .....	22
2.2 Objetivos específicos .....	22
3 JUSTIFICATIVA .....	23
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Materiais utilizados e equipamentos .....	25
4.2 Material vegetal .....	26
4.3 Preparação do extrato vegetal .....	26
4.4.1 Teste para Heterosídeos Cianogênicos .....	27
4.4.2 Teste para Fenóis e Taninos .....	27
4.4.3 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides.....	27
4.4.4 Teste para Flavonóis, Flavononóis E Xantonas .....	28
4.4.5 Teste para Esteróides e Triterpenóides .....	28
4.4.6 Testes para saponinas .....	28
4.5 Fracionamento cromatográfico.....	29
4.5.1 Fração Hexano .....	29
4.5.2 Fração Acetato de etila.....	30
4.6 ENSAIOS PARA A VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	33
4.6.1 Determinação de compostos fenólicos totais .....	33
4.6.2 Determinação do teor de flavonóides nas amostras .....	34
4.6.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	35
4.6.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	38
4.6.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	39
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1 Fracionamento do extrato da espécie estudada.....	42
5.2 Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto .....	44
5.3 Isolamento e identificação dos terpenóides 1 e 2.....	45
5.4 Isolamento e identificação do flavonóide canferitrina .....	54
5.5 Atividades Biológicas do Extrato, Frações e Compostos Isolados de L. corniculatus L. ....	62
5.5.1 Atividade antioxidante.....	62
5.5.2 Atividade antibacteriana .....	72

5.5.3 Atividade anti-inflamatória .....	77
6 CONCLUSÕES .....	81
REFERENCIAS .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o homem busca na natureza produtos para as suas necessidades básicas tais como gêneros alimentícios, abrigos, roupas, meios de transporte, fertilizantes, aromas e fragrâncias e principalmente os medicamentos. O aumento na utilização de plantas medicinais na cura ou na prevenção de doenças, em humanos ou em animais, requer cada vez mais ações voltadas ao estudo científico de compostos que apresentam atividades biológicas (REIS, MARIOT e STEENBOCK, 2004). Além disso, atualmente as plantas e seus derivados representam aproximadamente 50% dos fármacos de uso clínico (GURIB-FAKIM, 2006).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. Em virtude da alta tecnologia, dos elevados custos e dos riscos inerentes para o desenvolvimento de um novo medicamento, alguns poucos países desenvolvidos, liderados pelos Estados Unidos e alguns países europeus, detêm as maiores indústrias farmacêuticas mundiais que dominam as modernas tecnologias na área farmacêutica. As estatísticas revelam que de cada 30 mil compostos sintetizados pelas indústrias, 20 mil entram nos estudos pré-clínicos; desses, 200 atingem a fase clínica I; 40 passam para a fase clínica II; e 12 chegam a fase clínica III. Apenas oito deles são aprovados por órgãos de vigilância e em geral um consegue obter mercado satisfatório (CALIXTO, 2003).

Alguns fatores contribuíram para o aumento da utilização de plantas medicinais nos últimos anos: crise econômica, alto custo de medicamentos industrializados, difícil acesso da população à assistência médica, bem como tendência generalizada dos consumidores em utilizarem, freqüentemente, produtos de origem vegetal, atitude esta decorrente do aumento da consciência ecológica verificada nas últimas décadas (SCHENKEL et al., 1998).

Hoje em dia, devido às novas tecnologias, a química medicinal é considerada uma área importante e de caráter interdisciplinar. Como ciência, a química medicinal envolve a compreensão das estruturas moleculares nos organismos vivos resultando no desenvolvimento de novas moléculas protótipos que

são efetivamente candidatos a novos fármacos. Neste contexto, os produtos naturais têm sua importância na indústria farmacêutica, como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Considerando todos os aspectos relacionados ao uso de produtos naturais, e com uma visão do desenvolvimento de novos medicamentos, o presente trabalho contribui não somente para o estudo da química medicinal, mas também intensificar estudos interdisciplinares envolvendo diferentes áreas, principalmente estudando-se efeitos biológicos em modelos experimentais. Desse modo, considerando-se o valor das plantas medicinais não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos, torna-se importante estabelecer linhas de ação na busca de novos produtos com potencial utilidade como futuros medicamentos.

### **1.1 O uso de produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos**

Os metabólitos secundários representam o futuro que pode ser expresso em termos ecológicos, taxonômicos, diferenciação bioquímica e diversidade. A biossíntese e a presença de metabólitos secundários em plantas promovem a base para a taxonomia química. Além disso, a ampla diversidade molecular dos metabólitos secundários ao longo do reino vegetal representa uma área rica em recursos para a descoberta de novos fármacos e para o desenvolvimento de drogas inovadoras (GURIB-FAKIM, 2006). Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários que vem sendo estudados pela fitoquímica, incluindo as técnicas hifenadas, apenas os compostos presentes em maior concentração é que geralmente são isolados para estudos completos de bioatividade. A análise de substâncias ativas é muito complexa e demorada, já que em muitos casos os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos ou proporcionam importantes efeitos biológicos.

Muitas vezes o único recurso terapêutico em muitas comunidades e grupos étnicos é o conhecimento a respeito do uso de plantas medicinais. Esse tipo de cultura desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica. Estas áreas abrangem conhecimentos indispensáveis para a utilização segura de plantas medicinais, envolvendo pesquisas a respeito da distribuição geográfica de espécies

vegetais; extração, isolamento e identificação de princípios ativos; atividades farmacológicas, além da toxicidade. (MACIEL et al., 2002).

O uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece algumas vantagens, como por exemplo: 1) existência de uma grande quantidade de estruturas químicas; 2) muitas classes de estruturas homólogas; 3) existência de estruturas di e tridimensionais; 4) economia e também como fonte de novas moléculas para alvos moleculares complexos (CALIXTO, 2001).

## 1.2 Gênero *Lotus*

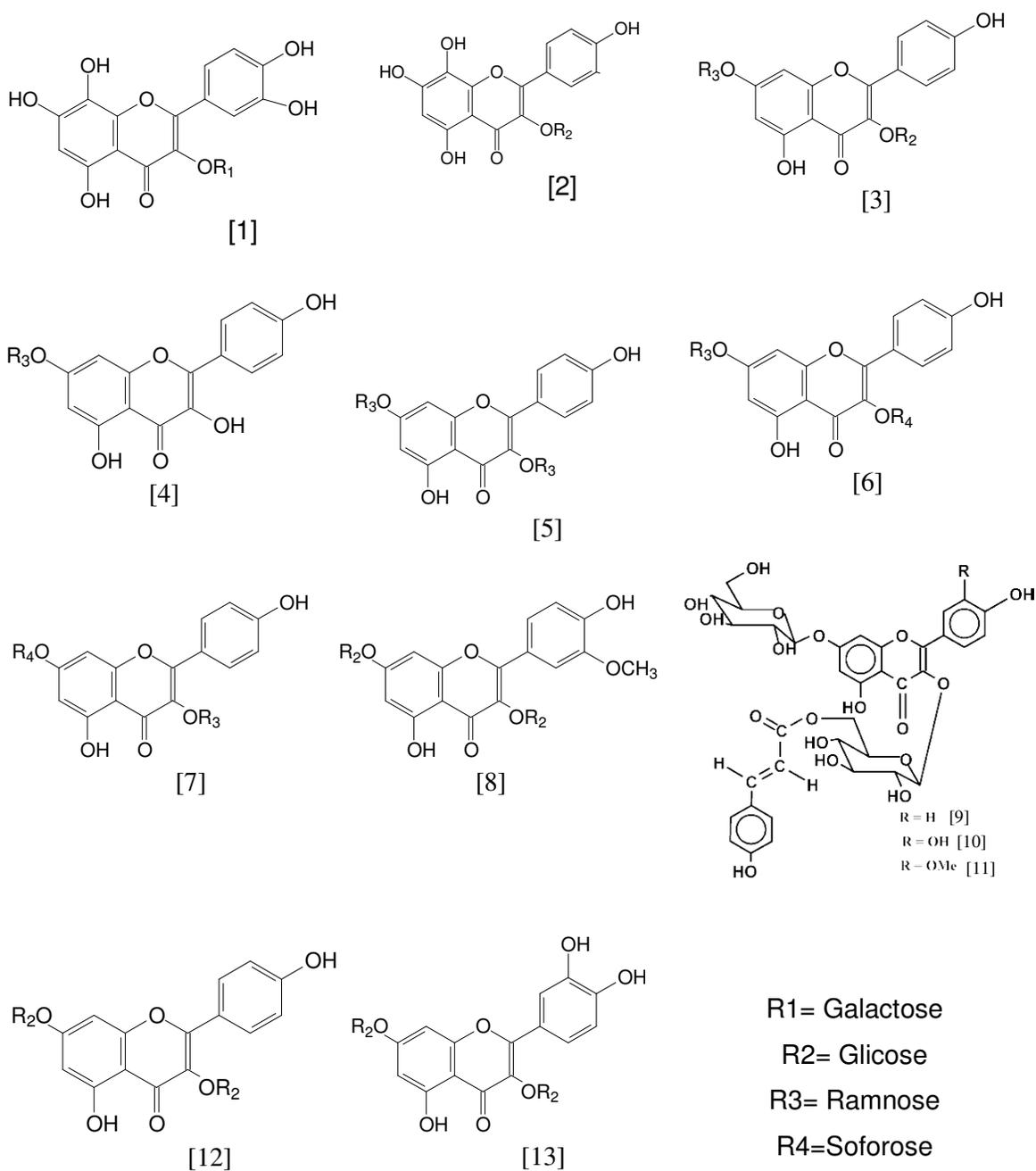
Plantas do gênero *Lotus* L. pertencem à família *Fabaceae* (Leguminosae), e suas espécies estão distribuídas em várias regiões do mundo, com exceção de regiões árticas muito frias. A maior concentração desta planta encontra-se na região do Mediterrâneo, indicando ser este o seu centro de origem (ALLEN & ALLEN, 1981).

Segundo Joly 1991, as plantas da família *Fabaceae* ou *Leguminosae* são: plantas de hábito muito variado, árvores de grande porte das matas tropicais, arbustus, ervas ou trepadeiras que vivem nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes. As folhas são sempre de disposição alternada, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas e estipelas às vezes transformadas em espinhos. As folhas e os folíolos são sempre com pulvinos na base, que permitem movimentos diurnos aos folíolos e as folhas. As flores são variadas e sempre cíclicas, de simetria radial até fortemente zigomorfas, com pétalas muito desiguais.

O gênero *Lotus* apresenta em torno de 170 espécies, sendo que a maioria é utilizada como suplemento alimentar para ruminantes, pelo qual é altamente difundida na agropecuária. Existe uma série de benefícios nutricionais quanto ao seu uso na pecuária, que se destacam pela produção de forragem, crescimento sob baixa disponibilidade de fósforo, fácil adaptação a solos ácidos, além do conteúdo de tanino, que beneficia o comportamento animal, atuando como regulador do consumo de forragem (RISSO e CARAMBULA, 1998).

Existem três cultivares perenes de *Lotus corniculatus* que são as mais difundidas como plantas forrageiras, pela sua grande representação nas regiões temperadas: *Lotus uliginosus* Schkuhr (cornichão-dos-banhados), *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel (cornichão) e *Lotus tenuis* Waldst & Kit. Dentre as leguminosas forrageiras inseridas no Brasil, a espécie *L. corniculatus* L. popularmente conhecida como cornichão, tem sua notoriedade alicerçada ao seu alto valor nutritivo, é a de fundamental importância na pecuária do Rio Grande do Sul (CAROSO et al., 1982).

O gênero *Lotus* (Leguminosae) inclui: espécies acianogênicas e altamente cianogênicas. Na medicina tradicional, é utilizada como contraceptivo, agente profilático para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis e na úlcera péptica. Investigações fitoquímicas anteriores em espécies do gênero *Lotus* relatam a presença de 3-O- $\beta$ -galactosídeo do flavonol gossipetina [1] em *L. corniculatus*; o canferol 3-O- $\beta$ -glicosídeo [2] e seus 7-O- $\alpha$ -derivados ramosídeos [3] em *L. tenuis* (birds trefoil). Recentemente, foi encontrado na espécie *L. hebranicus* Hochst ex. Brand, a presença de canferol 7-O- $\alpha$ -raminosídeo [4] e seus derivados o 3-O- $\alpha$ -raminosídeo [5] e o 3-O-soforosídeo [6]. O canferol 3-O- $\alpha$ -raminosídeo-7-O-soforosídeo [7] e a isoraminetina- 3-O- $\beta$ -glicosídeo-7-O- $\beta$ -glicosídeo [8] foram também descritos para esta planta. Na espécie *Lotus polyphyllus* foi descrito o isolamento de flavonóis glicosilados como: o canferol 3-O- $\beta$ -(6''-O-*E-p*-cumaroilglicosídeo)-7-O- $\beta$ -glicosídeo [9], a quercetina 3-O- $\beta$ -(6''-O-*E-p*-cumaroilglicosídeo)-7-O- $\beta$ -glicosídeo [10], a isoraminetina 3-O- $\beta$ -(6''-O-*E-p*-cumaroilglicosídeo)-7-O- $\beta$ -glicosídeo [11], o canferol 3,7-di-O-glicosídeo [12] e a quercetina 3,7-di-O-glicosídeo [13] (Figura 1) (EL MOUSALLAMI, 2002).



**Figura 1:** Flavonóides descritos em espécies do gênero *Lotus*.

Posição sistemática da espécie *L. corniculatus* L.:

---

REINO: Plantae

---

DIVISÃO : Magnoliophyta

CLASSE: Magnoliopsida

ORDEM: Fabales

FAMÍLIA: Fabaceae

SUBFAMÍLIA: Faboideae

TRIBO: Loteae

---

GÊNERO: Lotus

### 1.3 *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel

A *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel (Figura 2), popularmente chamada de cornichão, é uma leguminosa forrageira de origem mediterrânea, predominantemente das regiões da França e Itália. No Brasil, o único cultivar disponível é a cultivar São Gabriel, que foi desenvolvido pela Estação Experimental de Forrageiras de São Gabriel no Rio Grande do Sul, a partir de pesquisas entre 1955 e 1965, tendo seu cultivo se expandido para outros países da América do Sul (PAIM, 1988). O cultivo do cornichão no Brasil foi iniciado em 1940 no Rio Grande do Sul, e expandido a partir de 1955. Considerada inicialmente como uma leguminosa de clima frio (ARAÚJO & JAQUES, 1974a), o cornichão mostrou-se uma alternativa para o período de escassez de pasto, no inverno do Sul do Brasil.

Esse cultivar é caracterizado por apresentar folhas grandes, hábito de crescimento ereto e indeterminado, facilidade de adaptação, boa produção de forragem e ressemeadura natural (PAIM, 1988; OLIVEIRA, 1990). A planta produz uma forte raiz principal, e por ser uma forrageira de hastes finas e possuir um grande número de folhas, é muito apreciado pelos animais como alimento, sendo uma planta que é utilizada no pastejo para a produção de feno e na silagem (HUGHES, 1981).

A inclusão de maior número de espécies leguminosas de crescimento hibernal tem sido apontada como a solução para melhorar a dieta dos animais e no

melhoramento de pastagens bem como na fixação simbiótica de nitrogênio (CARNEIRO, 2002).

O cornichão no estado do Rio Grande do Sul é utilizado principalmente como alternativa para assegurar a produção animal. Além disso, a importância das espécies nativas deve-se a introdução de leguminosas exóticas hibernais que, além de produzirem forragem de boa qualidade, melhoram a qualidade do solo pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Os benefícios da utilização de espécies de *Lotus* na agropecuária também incluem: ganho de peso, aumento na produção de leite, ação anti-helmíntica e aumento na absorção de aminoácidos (MEAGHER et al, 2004).



Fonte: [www.missouriplants.com](http://www.missouriplants.com)



Fonte: [www.flickr.com](http://www.flickr.com)

**Figura 2.** *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel (cornichão)

A característica principal de plantas utilizadas como forragem, é a presença de taninos condensados. A presença destes compostos na composição celular aumenta o valor nutricional da forragem por exercerem um papel fundamental evitando o timpanismo, atuando como protetores da degradação protéica no rúmen (BRADES e FREITAS, 1992).

Em forragens tropicais, os taninos condensados são freqüentemente um dos principais compostos fenólicos, o que inclui os taninos hidrolisáveis e outros metabólitos secundários que podem chegar até 300 g/kg de matéria seca. Dentre os principais efeitos biológicos dos taninos, podemos mencionar que estes, ligam-se a parede celular das bactérias presentes no rúmen degradando-as e inibindo o seu crescimento ou sua atividade enzimática. Os taninos também podem complexar com

as proteínas da alimentação, diminuindo assim a viabilidade dos microrganismos em degradar estas proteínas, e com isso o animal ganha peso mais rapidamente (WAGHORN, 2007). Outros efeitos biológicos e farmacológicos reportados para taninos condensados incluem atividades antibacterianas e antivirais, efeito antioxidante e anti-inflamatório, propriedades antimutagênicas e antitumorais. (BRUYNE et al., 1999).

Segundo ABDEL-GHANI, da espécie *L. corniculatus* cv. *tenuifolius* L., foram isolados os compostos:  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol e ácido ursólico, além dos flavonóides quercetina, quercetrina, canferol e canferitrina, sendo este último encontrado também na espécie *Lotus japonicus*.

A quantidade de flavonóides presente em *L. corniculatus*, varia de acordo com as condições climáticas e principalmente variações de altitude. Estudos anteriores sobre esta espécie relatam a identificação de diferentes classes químicas incluindo, além dos flavonóides citados acima, antocianinas e proantocianinas (REYNAUD e LUSSIGNOL, 2005).

Na França, a espécie *L. corniculatus* é utilizada na medicina popular como sedativo e antiespasmódico (TROUILLAS et al., 2003). Já no Brasil, não existem relatos do uso de *L. corniculatus* na medicina popular.

#### **1.4 Atividades biológicas**

Os métodos de triagem de atividades biológicas são importantes, a fim de verificar as possíveis ações farmacológicas para os extratos e/ou compostos isolados, e dessa maneira orientar o processo de extração e isolamento de compostos bioativos de plantas medicinais. O trabalho laboratorial do químico de produtos naturais pode ser acompanhado por ensaios simples, que podem ser executados no próprio laboratório de química ou em parceria com outros laboratórios. Para ser compatível com o grande número de amostras a serem testadas, estes ensaios devem ser, além de simples, reproduzíveis, rápidos e de baixo custo (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991).

### **1.4.1 Atividade antioxidante**

O interesse em fontes naturais de moléculas antioxidantes para uso em alimentos, bebidas e indústrias de cosméticos tem resultado em extensas investigações nos últimos anos. É sabido que as substâncias antioxidantes naturais extraídas de ervas e especiarias possuem alta atividade antioxidante e são usadas nas mais diversas aplicações. Dentre estas, citam-se os compostos fenólicos, que são amplamente distribuídos no mundo vegetal e têm a habilidade de seqüestrar radicais livres por transferência de um único elétron. Vários estudos têm reportado a atividade antioxidante de extratos de plantas relacionando com o conteúdo de compostos fenólicos (SCHERER e GODOY, 2009).

Atualmente é grande o interesse no estudo de compostos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. As reações de oxidação são fundamentais na bioquímica da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Assim, os radicais livres são produzidos naturalmente nestas cascatas bioquímicas e também por alguma disfunção ou descompensação metabólica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs). O organismo humano está em constante contato com EROs e ERNs geradas em processos inflamatórios, por algumas disfunções biológicas ou provenientes dos alimentos (BARREIROS et al., 2006). Os efeitos de espécies oxidantes sobre o organismo tornaram-se alvo de interesse e intensa investigação científica, uma vez que são causas de uma série de patologias, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento (CHISOLM e STEINBERG, 2000).

### **1.4.2 Atividade antibacteriana**

Desde a antiguidade, o homem tem usado plantas para tratar doenças infecciosas comuns e algumas destas medicinas tradicionais ainda estão incluídas como parte de tratamentos habituais para vários males. As bactérias são freqüentemente causa de varias infecções, e apresentam importante risco para a

saúde pública, principalmente quando se tratam de infecções hospitalares (Rios e Recio, 2005).

Durante as últimas décadas novas doenças infecciosas surgiram e algumas infecções têm reemergido. Neste sentido, há a perspectiva de que novos agentes infecciosos apareçam e causem sérias ameaças no século XXI. Além disso, a eficácia dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente está diminuindo rapidamente com o aumento da resistência bacteriana, causada principalmente pela utilização indiscriminada dos antimicrobianos. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias gram-positivas, como enterococos e estafilococos e gram-negativos como as enterobactérias e a *Pseudomonas aeruginosa* (SILVEIRA et al., 2006).

O problema da resistência bacteriana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antibacterianas, incerta. Por este motivo, torna-se imperativo adotar medidas para enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de antibióticos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sejam elas sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000). Este fato, conjuntamente com os efeitos adversos causados pelos antibióticos, tem levado os pesquisadores a uma constante busca de novas substâncias antimicrobianas em diversas fontes, incluindo as plantas medicinais.

### **1.4.3 Atividade anti-inflamatória**

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, para sua posterior destruição e formação de um novo tecido (NATHAN, 2002; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). O reconhecimento deste agente desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis pela vasodilatação, extravasamento de líquido e migração de leucócitos (CORSINI et al., 2005; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Na resposta inflamatória existe a participação de células como leucócitos, neutrófilos e mononucleares (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006), além de diversos mediadores químicos considerados pró-inflamatórios e/ou anti-inflamatórios. Dentre os mediadores, destaca-se o óxido nítrico considerado um importante vasodilatador (TAKEUCHI et al., 2004) que quando liberado em altas quantidades, está diretamente relacionado à formação de edema, sinal clássico do processo inflamatório (RICCIARDOLO, 2003; BOVE e VAN DER VLIET, 2006). Além disso, enzimas como a mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA) também são importantes participantes da resposta inflamatória. Estas enzimas estão presentes em neutrófilos e mononucleares, respectivamente, que quando ativados liberam-nas com a função de destruir o agente lesivo (PATTISON e DAVIES, 2006; VASS e HORVÁTH, 2008).

Atualmente existem muitas doenças inflamatórias que muitas vezes não respondem aos tratamentos usuais, como a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso, a doença de Crohn, entre outras. Este fato revela que o paciente acometido por estas doenças tenham poucas opções na utilização do rol de medicamentos anti-inflamatórios atualmente presentes no mercado. Além disso, a classe de fármacos anti-inflamatórios desenvolvida recentemente, os coxibes, estão associados a problemas gastrintestinais e que não diferiam de forma significativa quando comparados aos problemas causados pelos anti-inflamatórios menos seletivos para a Cox-2. Mais ainda, os dados mostraram que os coxibes (inibidores seletivos de Cox-2) parecem promover aumento do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares importantes (DABU-BONCOC e FRANCO, 2008). Com isso, tem surgido à necessidade de descoberta e do desenvolvimento de novas classes de medicamentos com propriedade anti-inflamatória, o que faz com que a pesquisa de produtos naturais esteja atualmente em grande evidência. (KAPLAN et al., 2007).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado da espécie *L. corniculatus* cv. São Gabriel, além de isolamento e caracterização dos constituintes químicos, avaliando possíveis atividades biológicas do extrato, frações e compostos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a análise fitoquímica preliminar do extrato bruto;
- Realizar o isolamento e a caracterização de compostos a partir do extrato obtido da planta;;
- Avaliar o efeito antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório (*in vitro* e/ou *in vivo*) do extrato, frações e compostos isolados.

### 3 JUSTIFICATIVA

Usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos. Este tipo de cultura desperta o interesse dos pesquisadores em descobrir novos produtos ou compostos protótipos. O interesse não se limita apenas em plantas já conhecidas, uma vez que, muitas destas distribuídas na natureza não são utilizadas na medicina tradicional, tornando-se então fontes alternativas de compostos farmacologicamente ativos.

Os flavonóides estão dentre os mais importantes compostos biologicamente ativos isolados de plantas, sendo atualmente objeto de estudo em inúmeras pesquisas da química medicinal. Estes compostos têm demonstrado inúmeras propriedades farmacológicas como: atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, antioxidante, vascular e ação antitumoral (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Os flavonóides são metabólitos secundários presentes em grande quantidade na espécie *L. corniculatus* (REYNAUD e LUSSIGNOL, 2005). Em nosso trabalho procurou-se focar principalmente o isolamento de um flavonóide heterosídeo (canferitrina), pois os flavonóides glicosilados exibem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas e antidiabéticas, assim como a atividade antiviral por meio da inibição da transcriptase reversa de HIV e DNA topoisomerase I. O flavonóide canferitrina é produzido por várias espécies de plantas e é reportado por apresentar efeito hipoglicemiante em modelos experimentais em ratos diabéticos e possui propriedades antioxidantes comparáveis com a quercetina (JORGE et al., 2004; URGONKAR e SHAW, 2007).

Sendo canferitrina, o principal representante desta classe de compostos na *Lotus. corniculatus L. cv. São Gabriel*, nossos estudos foram dirigidos para avaliação de sua possível ação antibacteriana frente a diversas bactérias de interesse clínico em um modelo *in vitro* e o potencial anti-inflamatório em um modelo *in vivo*, sendo que estas avaliações são inéditas para a espécie.

A escolha do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos para avaliar a atividade anti-inflamatória da *L. corniculatus cv. São Gabriel*, pode ser justificada por se tratar de um modelo de fácil execução e avaliação dos mediadores inflamatórios envolvidos, além de estar estabelecido como um modelo de triagem e estudo de substâncias naturais com potenciais efeitos anti-inflamatórios (SALEH et al., 1996; VARGAS et al., 2007; MONTANHER et al., 2007).

Por sua vez, os modelos de avaliação das atividades antibacteriana e antioxidantes *in vitro*, também foram utilizados por serem facilmente reproduzíveis e apresentarem custo relativamente baixo, além de fornecerem resultados amplamente aceitos pela comunidade científica (WATERMAN e MOLE, 1994; CAVIN et al., 1998; RAHMAN, et al., 2004; MOKBEL e HASHINAGA, 2006).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Materiais utilizados e equipamentos

Os solventes utilizados na partição líquido-líquido, cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD), foram de grau analítico PA.

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por CC, foi utilizado como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 *mesh* para CC normal e 0,04 - 0,063 *mesh* para CC flash.

As frações e compostos obtidos foram analisadas através de CCD, utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários métodos: revelação em câmara de iodo, revelação com reagente cloreto férrico e revelação com reagente anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento a 110°C. O reagente anisaldeído-sulfúrico foi preparado do seguinte modo: A 9 mL de etanol foram adicionados sequencialmente, com agitação e banho de gelo, 0,5 mL de ácido sulfúrico (conc.), 0,1 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de anisaldeído. O reagente foi estocado sob refrigeração.

Para medir o ponto de fusão dos compostos isolados, foi utilizado um aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Este equipamento é provido de lupa para a visualização da fusão da amostra e uma chapa aquecida, sobre a qual é colocada a amostra entre a lâmina e lamínula.

Para a obtenção dos espectros dos compostos isolados na região do infravermelho (IV), utilizou-se o espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC, com as amostras preparadas em pastilhas comprimidas de KBr, sendo os valores registrados em centímetros<sup>-1</sup> ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Varian AS-400, operando em 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram dissolvidas em metanol e/ou clorofórmio deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em valores adimensionais, a constante de acoplamento  $J$  em Hz, a multiplicidade dos sinais foi indicada como s = simpleto, d = duplete, dd=duplo duplete, t = tripleto e m = multiplete.

## 4.2 Material vegetal

A espécie *L. corniculatus* L. cultivar São Gabriel foi coletada no município de Lages, na estação de pesquisa agropecuária da EPAGRI, no mês de novembro de 2006, a qual foi identificada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg e depositada no herbário FLOR, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina tendo como número 18.770.

## 4.3 Preparação do extrato vegetal

O material vegetal (partes aéreas de *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel), após coleta e identificação, foi seco em estufa com circulação de ar a 50° C resultando em 620 g de material seco. Após, o material foi moído em moinho de facas e submetido ao procedimento de maceração em etanol hidratado 96% durante quinze dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (60°C) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até seu volume ser reduzido em 1/3 do volume inicial, de forma que o solvente evaporado fosse recuperado e posteriormente reutilizado para nova maceração. Este mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes por mais 15 dias resultando no final das extrações 78,12g de extrato bruto seco, correspondendo a 12,5% da planta seca.

## 4.4 Análise fitoquímica preliminar do Extrato Bruto Hidroalcoólico

O extrato bruto de *L. corniculatus* foi submetido a testes fitoquímicos qualitativos preliminares, utilizando métodos de reações colorimétricas e/ou precipitação, preconizado por WHO (1984) e MATOS (1997).

Os testes realizados para a avaliação foram: heterosídeos cianogênicos, fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, xantonas, esteróides, triterpenos e saponinas com o intuito de pesquisar as principais classes de compostos presentes no extrato. Operações preliminares: uma parte do extrato bruto hidroalcoólico foi separado em sete porções de 3-4 mL em tubos de ensaios

numerados. O conteúdo dos tubos de ensaio foram submetidos aos seguintes testes:

#### **4.4.1 Teste para Heterosídeos Cianogênicos**

Em um erlenmeyer foi misturada 2 g de planta seca, com 50 mL de água e juntou-se 1 mL de solvente  $H_2SO_4$  1N. Prendeu-se à tampa uma fita de papel picrato de sódio sem deixar tocar no líquido. Esta mistura foi mantida aquecida a uma temperatura de 50-60°C durante duas horas.

*Resultado esperado:* O aparecimento de cor vermelho-castanho no papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

#### **4.4.2 Teste para Fenóis e Taninos**

Ao tubo 1 foi adicionado 3 gotas de solução alcoólica de  $FeCl_3$ . Após agitação foi observada qualquer variação da cor ou formação de precipitado abundante, escuro, em comparação com teste em branco, isto é, usando água e cloreto férrico.

*Resultado esperado:* Coloração variável entre azul e vermelha é indicativo da presença de fenóis quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos ou hidrolisáveis e a cor verde, a presença de taninos flobafenos ou condensados.

#### **4.4.3 Teste ara Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides**

Ao tubo 2, 3 e 4 contendo a amostra, ajustou-se o pH para 3, 8,5 e 11 respectivamente. Com isso, foi avaliada a mudança de coloração dos materiais.

*Resultado esperado:* O aparecimento de diversas cores conforme a tabela 1, indica a presença de constituintes devidamente demonstrados:

Tabela 1 - Alteração da coloração de antocianidinas e flavonóides em relação à mudança de pH

Constituintes	Meio ácido (3)	Meio alcalino (8,5)	Meio alcalino (11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-----	-----	Amarelo

#### 4.4.4 Teste para Flavonóis, Flavononóis e Xantonas

Ao tubo 7 foram adicionados alguns decigramas de magnésio em fita e 0,5 mL de HCl concentrado. Após o término da reação indicada pelo fim da efervescência identificou-se a mudança na cor da mistura da reação por comparação aos tubos 5 (branco= com HCl sem Mg) e 7 (acidificado).

*Resultado esperado:* Aparecimento ou intensificação da cor vermelha indica a presença de flavonóis, flavononas e/ou xantonas, livres ou heterosídeos

#### 4.4.5 Teste para Esteróides e Triterpenóides

Extraiu-se o resíduo seco de cerca de 1g de EB duas e três vezes com 1-2 mL de clorofórmio, tendo o cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com alguns decigramas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético e sob agitação vigorosa, juntou-se três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Agitou-se novamente e foi identificado se houve rápido desenvolvimento de cores.

*Resultado esperado:* Coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa a presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

#### 4.4.6 Testes para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado na operação anterior, foi redissolvido, com 5-10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio.

Agitou-se o tubo com a solução, fortemente, por dois a três minutos e avaliou-se formação da espuma. *Resultado esperado:* Espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

#### 4.5 Fracionamento cromatográfico

O extrato bruto foi resuspenso em H<sub>2</sub>O/EtOH, e após submetido a um fracionamento por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, usando hexano, acetato de etila e n-butanol, conforme o esquema apresentado na figura 3, resultando nas frações Hexano, Acetato de etila, n-Butanol e Aquosa, após completa remoção dos solventes por rota-evaporador. As frações obtidas foram então cromatografadas em coluna de sílica gel e a separação monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Nestes procedimentos obteve-se compostos isolados e com quantidade suficiente para submissão aos ensaios de atividade biológica. As frações Hex e AcoEt foram cromatografadas em coluna de sílica gel conforme descrito abaixo.

##### 4.5.1 Fração Hexano

Parte da fração hexânica (5,34g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com misturas de hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt) para obter um gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 54 sub-frações, as quais foram reunidas conforme similaridade por cromatografia em camada delgada. As frações 10-13 e 18-35 que deram reação positiva com o reagente anisaldeído-sulfúrico, foram reunidas e purificadas resultando no isolamento de dois terpenóides: **composto 1** ( $\beta$ -sitosterol) e **composto 2** (ácido oleanólico). O composto 1 eluiu na proporção de HEX/AcOEt 90:10 e o composto 2, na proporção de HEX/AcOEt 70:30 .

**$\beta$ -sitosterol:** purificado por recristalização em metanol, obtendo-se cristais brancos.  
P.F.: 137-139°C.

I.V. <sup>KBr</sup> cm<sup>-1</sup> : 3425, 2936, 1646, 1463, 1376, 1057.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,59-2,30 (48H,m), 3,41-3,59 (1H, m), 5,35 (1H, dd, H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 12,09; 12,21; 19,01; 19,2; 19,6; 20,0; 21,31; 23,29; 24,54; 26,27; 28,48; 29,36; 31,89; 32,14; 32,14; 34,16; 36,38; 36,73; 37,48; 39,99; 42,53; 42,53; 46,05; 50,35; 56,27; 56,99; 72,04; 121,95; 140,97.

**Ácido oleanólico:** purificado por recristalização em metanol, na forma de um sólido branco.

P.F.: 279-282°C.

I.V.  $^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3453, 2942, 1692, 1644, 1464, 1382, 1273, 1183, 1087, 1034.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  : (0,74 (3H, s), 0,76 (3H, s), 0,89 (3H, s), 0,90 (3H, s), 0,91 (3H, s), 0,97 (3H, s), 1,12 (3H, s), 1,24 (3H, s), 1,00-2,00 (m), 2,81 (1H, dd,  $J=14$  Hz), 3,20 (1H, dd,  $J=6,8$  Hz), 5,27 (1H, m, H-12).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  : 15,29; 15,52; 17,11; 18,25; 22,87; 23,36; 23,55; 25,91; 27,13; 27,65; 28,07; 30,65; 32,40; 32,56; 33,05; 33,75; 37,05; 38,34; 38,72; 39,22; 40,92; 41,54; 45,83; 46,48; 47,58; 55,1; 79,0; 122,59; 143,56; 183,33.

#### 4.5.2 Fração Acetato de etila

Parte da fração acetato de etila (10g) foi fracionada em uma coluna de sílica gel, utilizando como solvente uma mistura de hexano e acetato de etila coletando as sub-frações de 1- 11 e após com uma mistura de acetato de etila e etanol as frações de 12-16. As sub-frações 12-16 foram reunidas e recromatografadas em coluna flash, utilizando um sistema de solvente: AcOEt/Ácido acético/Ácido fórmico/Água (70:3:2:20) v/v resultando no isolamento do **composto 3** (canferitrina).

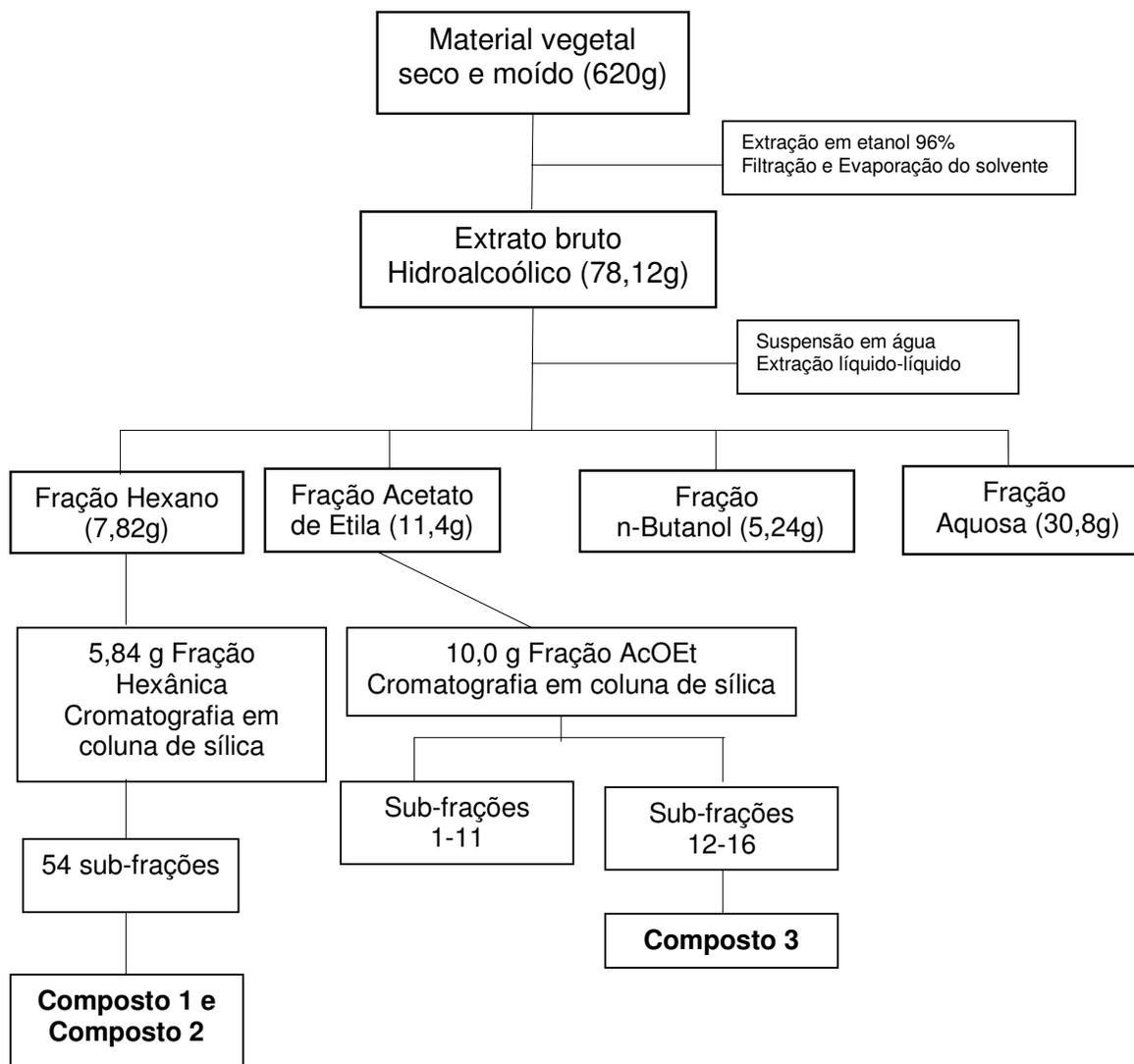
**Canferitrina:** purificado por recristalização em AcOEt/MeOH, apresentando-se na forma de cristais de coloração amarela.

P.F.: 198.5- 201.3°C.

I.V.  $^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3383, 2983, 2923, 1906, 1659, 1605, 1513, 1493, 1448.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  : 0,96 (3H, d,  $J=6,2$  Hz), 1,25 (3H, d,  $J=6,2$  Hz), 3,30 (1H, m), 3,30 (1H, m), 3,33 (1H, m), 3,47 (1H, t,  $J=9,2$  Hz), 3,59 (1H, m), 3,71 (1H, dd,  $J=3,1$  e  $9,2$  Hz), 3,82 (1H, dd), 4,01 (1H, dd), 5,38 (1H, d,  $J=1,8$  Hz), 5,55 (1H, s), 6,45 (1H, d,  $J=2,2$ ), 6,71 (1H, d,  $J=2,2$  Hz), 6,93 (2H, d,  $J=8,8$  Hz), 7,78 (2H, d,  $J=8,8$  Hz).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  : 17,67; 18,08; 71,29; 71,68; 71,79; 71,90; 72,05; 72,78; 73,14; 73,58; 95,58; 99,83; 100,5; 103,52; 107,53; 116,57; 122,37; 132,00; 136,47; 158,07; 159,79; 161,77; 163,00; 163,52; 179,77.



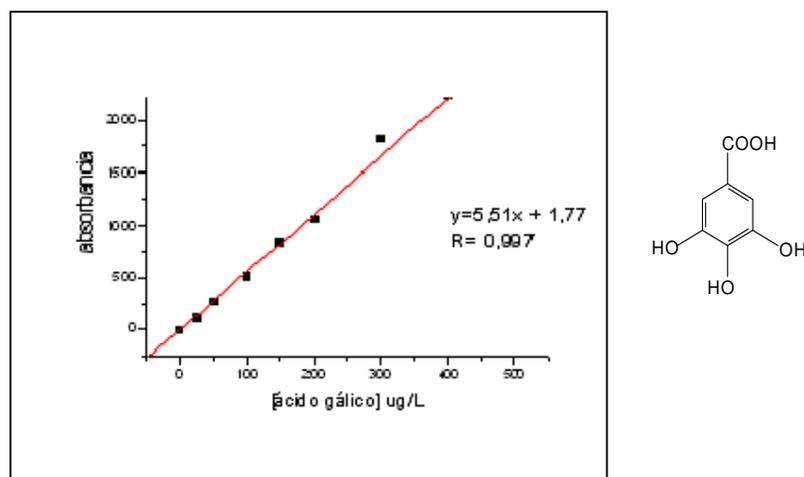
**Figura 3.** Procedimento de fracionamento do extrato de *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel

As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas através das análises dos respectivos espectros de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A confirmação das estruturas veio da comparação dos dados espectroscópicos com aqueles da literatura e por co-eluição em CCD com padrões. O processo de extração e fracionamento foi monitorado por meio de testes como a atividade antioxidante, realizada em nosso laboratório, além da atividade antibacteriana e anti-inflamatória, realizados através da colaboração com outros laboratórios de pesquisa.

## 4.6 ENSAIOS PARA A VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.6.1 Determinação de compostos fenólicos totais

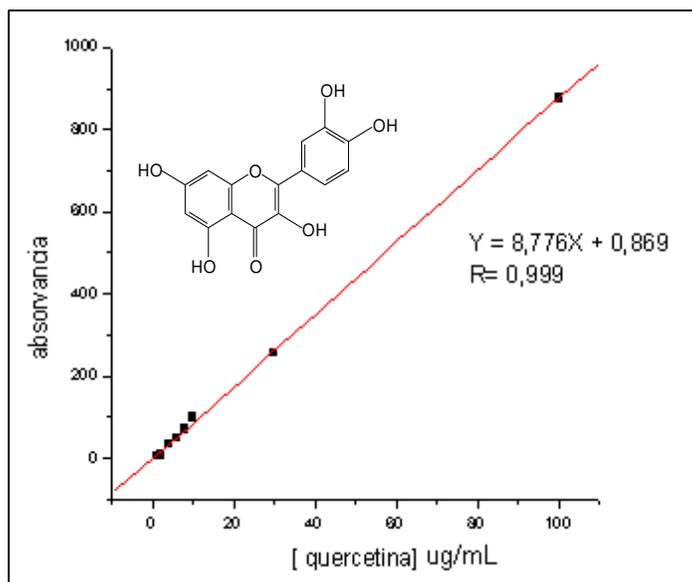
O teor de fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em metanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionado 1,0 mL da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , agitou-se e a solução ficou em repouso por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a solução da amostra. Nesta etapa foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , diluído em metanol, para comparação (Figura 4). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de amostra.



**Figura 4:** Curva de calibração com ácido gálico para avaliação de fenólicos totais.

#### 4.6.2 Determinação do teor de flavonóides nas amostras

A determinação do teor de flavonóides foi realizado conforme método descrito por Woisky e Salantino, 1998. A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm diluídos em metanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  2%. Após 1 hora, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco foi utilizado metanol. Neste protocolo, foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , diluída em metanol, para comparação (Figura 5). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonoídicos foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração seco.



**Figura 5:** Curva de calibração com quercetina para a avaliação do conteúdo de flavonóides.

### **4.6.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

#### **4.6.3.1 Avaliação da ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Cavin e colaboradores (1998), com algumas modificações. Uma solução de DPPH 0,004% foi adicionada à solução teste nas concentrações de 5 a 200 µg/mL. A absorvância das soluções foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (517nm) após 30 minutos. Por meio da leitura da absorvância de uma solução de DPPH (2 mL de solução 0,004%), acrescentado de 1 mL de MeOH, obteve a absorvância no tempo inicial ( $A_0$ ). A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorvância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorvância de uma solução teste (1 mL) em metanol (2 mL), foi subtraída da absorvância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do extrato nesse comprimento de onda. A análise foi realizada em triplicata.

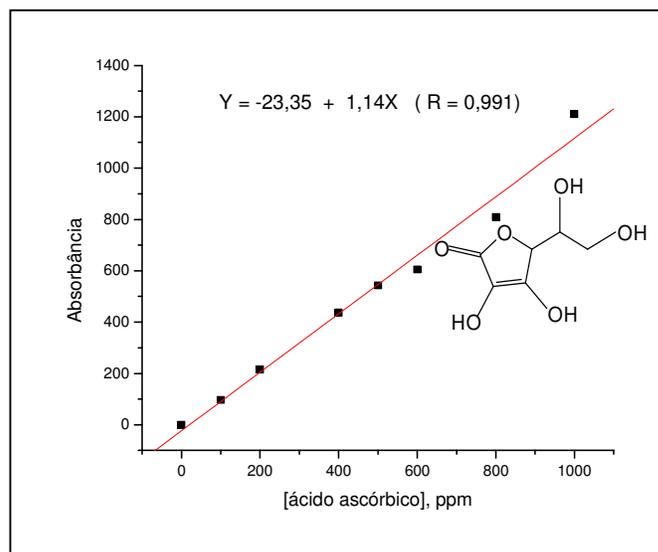
Os valores obtidos para as absorvâncias das diferentes soluções testes foram plotados em gráficos na forma de % de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde determinou-se a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % ( $CE_{50}$ ) nas soluções testadas.

#### **4.6.3.2 Determinação do potencial redutor**

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. A 100 µL das soluções teste (extratos brutos e frações, diluídos em metanol, na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se então 1,0 mL da solução de  $FeCl_3$  0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M, e misturou-se.

Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorvância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. A análise foi feita em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da

amostra. Nesta etapa, foi realizada uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 0 a 1000 ppm ( $Y = -23,35 + 1,14X$ ,  $R = 0,991$ ) (Figura 6). O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.



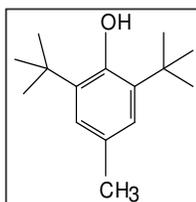
**Figura 6.** Curva de calibração com ácido ascórbico utilizada para a determinação do potencial redutor.

#### 4.6.3.3 Determinação do potencial inibidor da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada através do modelo  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico (MOKBEL e HASHINAGA, 2006). Uma emulsão foi preparada com 3,0 mg de  $\beta$ -caroteno, 1,0 mL de  $\text{CHCl}_3$ , 45 mg de ácido linoléico e 215 mg de tween-80. O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório, durante 4 minutos, sob temperatura de  $45^\circ \text{C}$ . À mistura resultante foram adicionadas 6,0 mL de água destilada, sob agitação, para fazer a emulsão.

A emulsão foi então dissolvida para 100 mL com peróxido de hidrogênio 0,01 M. Alíquotas desta emulsão (4,0 mL) foram adicionadas à tubos contendo 0,2 mL das soluções teste (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, dissolvidas em metanol). Como controle positivo foi utilizado uma solução de BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno) (Figura 7) na concentração de 1000 ppm. Um controle negativo, contendo 0,2 mL de metanol e 4,0 mL da emulsão acima também foi preparado. Todos os tubos foram colocados em banho-maria, a  $50^\circ \text{C}$ , e as absorvâncias das soluções foram determinadas no tempo zero, e a cada 30 minutos, em

espectrofotômetro a 470 nm, até a descoloração do tubo contendo o controle negativo (180 minutos). Como branco, foi utilizada uma emulsão preparada como descrito acima, porém sem a presença de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 7.** Estrutura do BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno).

Os resultados dos ensaios foram expressos através de gráficos de absorvância das soluções testes em função do tempo de ensaio. A atividade antioxidante (AA) (potencial inibidor da peroxidação lipídica, em porcentagem) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$AA = 100 [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

Onde:

$A_0$  = Absorvância da amostra no tempo zero

$A_t$  = Absorvância da amostra após 180 minutos

$A_0^0$  = Absorvância do controle negativo no tempo zero

$A_t^0$  = Absorvância do controle negativo após 180 minutos

#### **4.6.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

##### **Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), com objetivo de se produzir soluções-mãe contendo 100 mg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas destas soluções em caldo Brain Heart Infusion (BHI), produzindo concentrações variando de 50 mg/mL a 1,5 µg/mL, distribuídas em volumes de 100 µL em cada orifício teste da placa de microdiluição estéril de 96 poços. Em cada orifício teste foi adicionado 5 µL do inóculo bacteriano contendo  $5 \times 10^5$  UFC/mL de cada microorganismo testado. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em aerobiose a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após esta incubação inicial, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol, a cada microcavidade da placa utilizada no experimento (CLSI, 2005). Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde há presença de bactérias viáveis, ou seja, onde os extratos, frações e compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. O teste do tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração celular, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazam (JOHNSON et al., 1985; RAHMAN et al., 2004).

Para a classificação da atividade antibacteriana de extratos e frações, foi utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores (2005). Os extratos e as frações que apresentaram valores de CIM menores que 10 µg/mL foram considerados excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL bons; valores entre 100 e 500 µg/mL atividade moderada; valores entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade e para valores de CIM acima de 1000 µg/mL, inativos. Já para a classificação da atividade antibacteriana dos compostos isolados, foi utilizado o critério proposto por Ríos e Recio (2005), o qual classifica como moderada atividade compostos com valores entre 10 a 100 µg/mL; e como excelente atividade antibacteriana compostos com CIM abaixo de 10 µg/mL.

Também foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM), onde 10µL de cada micropoço utilizado na avaliação do MIC foram pegas com alça de platina calibrada, semeadas em Agar Muller-Hinton e incubadas por 24 h a 37°C. O CBM representa a concentração de extrato, fração ou composto isolado necessário para inibir o crescimento em 99,9% ou mais do inóculo inicial (BOSIO et al., 2000).

Com o objetivo de determinar se a ação antibacteriana era classificada como bactericida ou bacteriostática foi utilizado o esquema proposto por OKUSA e colaboradores (2007), onde os resultados são classificados como bactericida, se a CBM for menor ou igual a três diluições (sucessivas) o valor da CIM. Mas, se o valor da CBM for maior que três diluições (sucessivas) o valor apresentado pela CIM, a atividade antibacteriana é considerada bacteriostática (OKUSA et al., 2007).

Como controle de inibição bacteriana foi utilizado o antibiótico de referência gentamicina, um antibiótico que apresenta boa atividade contra todas as cepas testadas em nosso experimento, com exceção para o *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA).

#### **4.6.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

##### **4.6.5.1 Animais**

Para a técnica de pleurisia foram utilizados camundongos albinos suíços, 1 mês de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 e 25g, que foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolo da CEUA nº PP00180.

#### **4.6.5.2 Procedimento anestésico e eutanásia dos animais**

A anestesia nos animais foi induzida pela aplicação de pentobarbital (30 mg/kg, i.p.), com a finalidade de possibilitar a aplicação do agente flogístico (carragenina) e do corante azul de Evans. A eutanásia dos animais foi realizada pela *overdose* de pentobarbital (60 mg/kg).

#### **4.6.5.3 Pleurisia induzida por carragenina em camundongos**

A pleurisia, em camundongos foi induzida segundo metodologia descrita por SALEH et al., 1996; DALMARCO et al., 2002, 2004. De acordo com o protocolo experimental, para o estudo da curva dose resposta, diferentes grupos de animais receberam tratamento prévio (0,5 h) com diferentes doses de extrato bruto, frações e compostos, administrado por via intraperitoneal (i.p.). A análise da resposta inflamatória foi realizada 4 h após a administração da carragenina (1%). Os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital e a cavidade pleural foi aberta e lavada com 1 mL de salina tamponada (PBS pH 7,6) e heparinizada (20 UI/mL).

#### **4.6.5.4 Determinação do Grau de exsudação**

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/Kg, 0,2 mL/animal) administrado por via intraorbital (i.o.) 10 min antes da indução da pleurisia. Após respeitado o período de pleurisia (4 hs), os animais foram sacrificados e os lavados pleurais obtidos foram lidos em leitor de ELISA a 620 nm (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) para a determinação dos níveis de azul de Evans. Em seguida, os níveis indiretos da exsudação foram então obtidos pela interpolação das absorbâncias em uma curva de calibração pré-estabelecida.

#### **4.6.5.5 Determinação dos níveis de Leucócitos Totais e Neutrófilos**

A contagem dos leucócitos totais no lavado pleural foi realizada com o auxílio de um hematocítmetro (Câmara de Neubauer). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos  $\times 10^6$ . Para a contagem diferencial dos leucócitos, os lavados pleurais foram centrifugados em citocentrífuga (Citospin®, Fanem, modelo: 248, São Paulo, Brasil) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A

contagem celular diferencial (Neutrófilos) foi realizada em microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^6$  (SALEH et al., 1996, 1999; DALMARCO et al., 2002, 2004).

#### **4.6.5.6 Determinação da atividade da Mieloperoxidase**

As amostras dos lavados das cavidades pleural foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase de acordo com a metodologia descrita por RAO et al., 1993. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7 – 140U/L) e suas densidades óticas (450 nm) também foram determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em U/L, com o auxílio da equação da reta. A leitura foi realizada em Espectrofotômetro (Quick-Lab, Drake Eletrônica e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) (FRÖDE e MEDEIROS, 2001).

#### **4.6.5.7 Análise quantitativa dos níveis de Nitrito/Nitrato**

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram quantificados pela formação de seus metabólitos nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras dos lavados das cavidades pleurais foram coletadas para a determinação das concentrações de nitrato/nitrito (Di ROSA et al., 1996). A reação foi quantificada através da medida das densidades óticas em Espectrofotômetro (Quick-Lab, Drake Eletrônica e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) em 543 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_2^-$  ou  $\text{NO}_3^-$  (0-150  $\mu\text{M}$ ) e suas densidades óticas também foram determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta (SALEH et al., 1999).

#### **4.6.5.8 Análise Estatística**

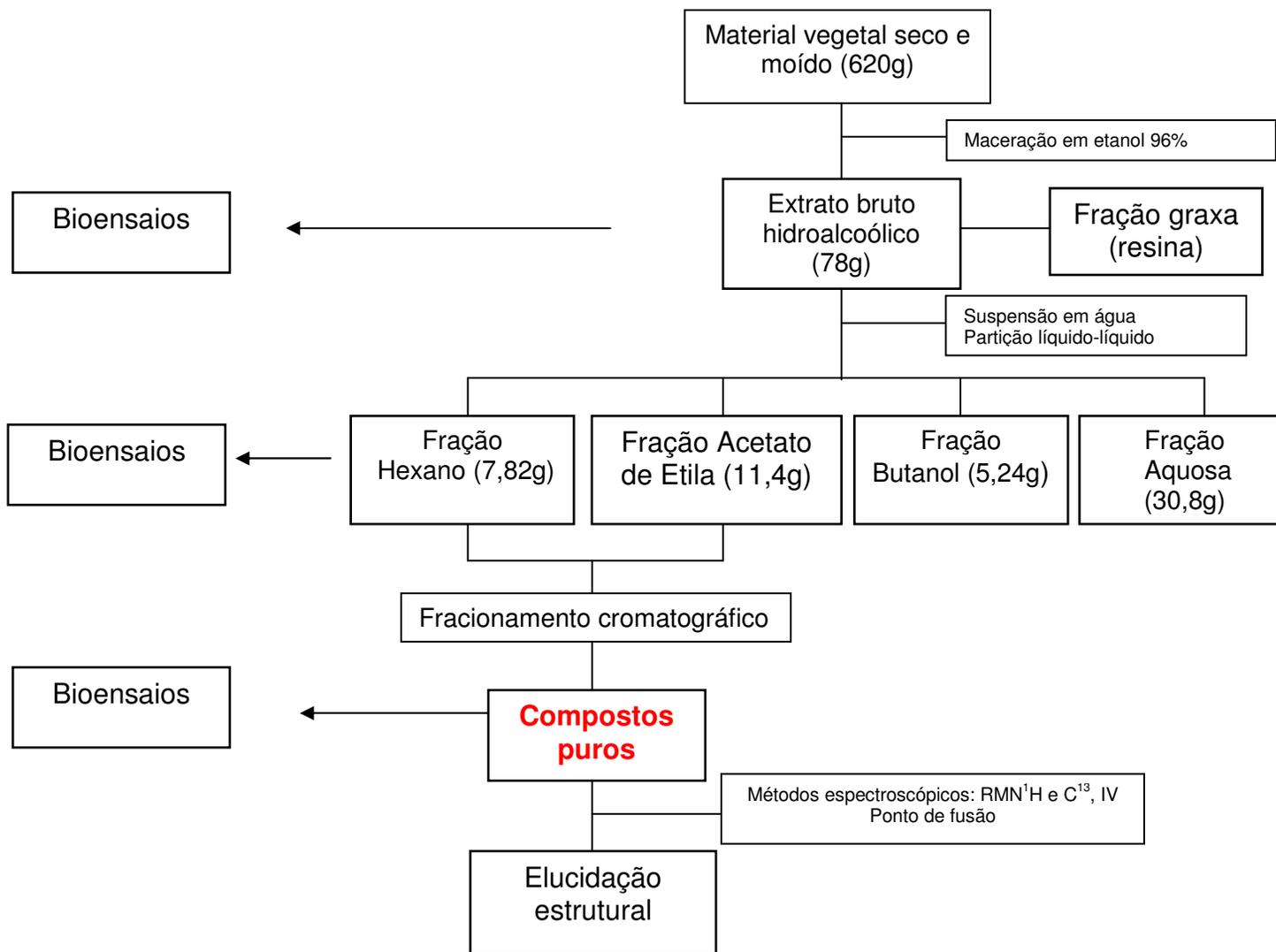
A comparação entre os parâmetros inflamatórios dos controles inflamados e os tratados com os produtos naturais, foi realizada através do teste *t* de Student (Não paramétrico). Valores de P menores do que 0,05 foram considerados significativos.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Até o momento, são raros os relatos de pesquisas científicas focando a descoberta de uma possível atividade farmacológica da *L. corniculatus* L. no mundo. No Brasil, as pesquisas sobre a espécie em questão, restringem-se apenas a estudos direcionados ao seu valor agrônomo. Assim, como esta planta possui restrita utilização na medicina tradicional e não existindo registros de experimentos sobre possível atividade anti-inflamatória e antioxidante, os resultados descritos a seguir para esta espécie vegetal são inéditos.

### **5.1 Fracionamento do extrato da espécie estudada**

Após o material vegetal passar pelo processo de maceração em etanol, obtivemos o extrato bruto hidroalcoólico com rendimento de 12,5%. O extrato bruto hidroalcoólico foi submetido à análise fitoquímica preliminar e a um fracionamento biomonitorado conforme mostra a figura 9. Após o particionamento com solventes de diferentes polaridades, obteve-se as frações hexano, acetato de etila, n-butanol e aquosa rendendo 10%, 14,6%, 6,7% e 39,4% respectivamente. As frações obtidas foram testadas quanto a sua atividade biológica e submetidas a fracionamentos cromatográficos para o isolamento dos constituintes micromoleculares e determinação das estruturas (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema geral de fracionamento da espécie *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel

## 5.2 Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto

A análise fitoquímica preliminar visa mostrar de forma generalizada, as diferentes classes constituintes químicos presentes na espécie alvo. Quando não se dispõe de estudos químicos prévios sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. A análise fitoquímica preliminar do extrato bruto de *L. corniculatus*, revelou as seguintes classes de compostos, apresentados na tabela 2:

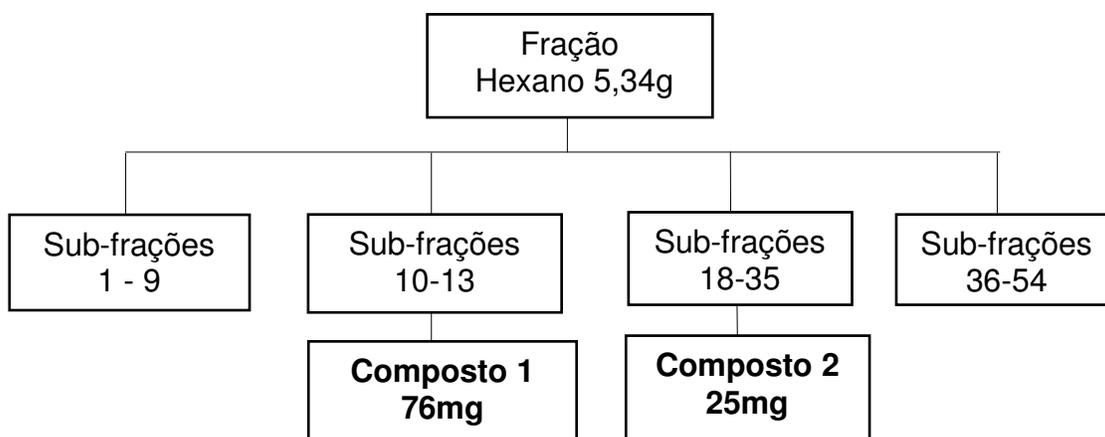
Tabela 2. Análise fitoquímica preliminar do extrato de *L. corniculatus*.

TESTES	RESULTADO
FENÓIS	+
HETEROSÍDEOS CIANOGENÍCOS	-
TANINOS CONDENSADOS	+
ANTOCIANINAS e ANTOCIANIDINAS	+
FLAVONAS	+
FLAVONONAS	+
XANTONAS	+
ESTERÓIS	+
TRITERPENOS	+
SAPONINAS	+

+ = positivo, - = negativo

### 5.3 Isolamento e identificação dos terpenóides 1 e 2

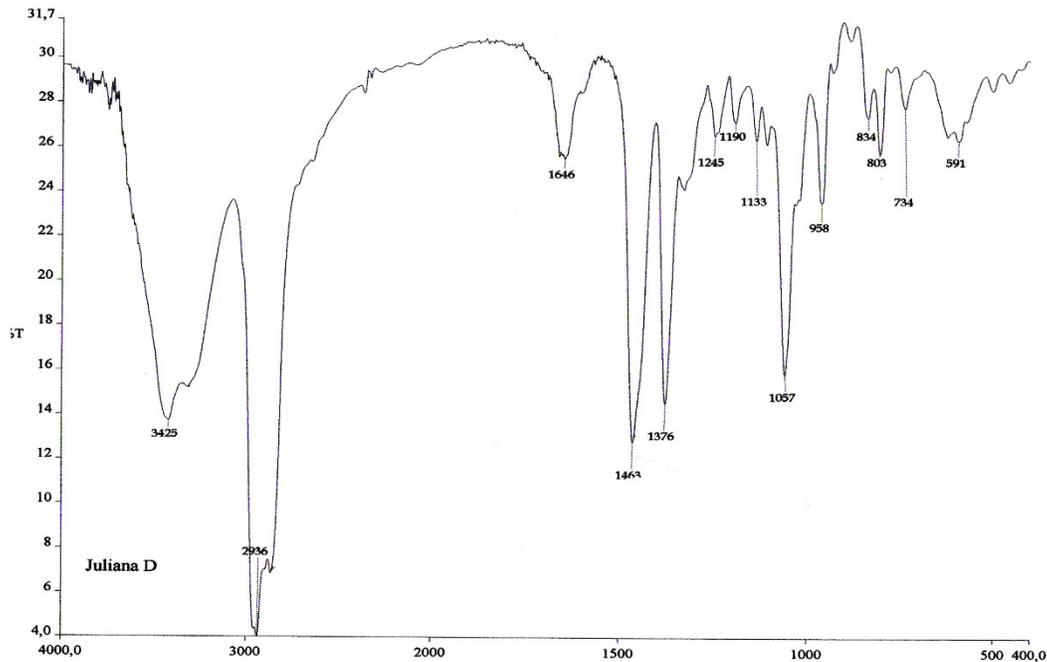
O fracionamento cromatográfico da fração HEX em coluna de sílica gel, eluída com HEX/AcOEt no modo gradiente de polaridade, resultou em 54 sub-frações das quais foram isolados os compostos **1** e **2** (Figura 9). A análise por CCD das 54 sub-frações reveladas com anisaldeído, indicou a presença de dois tipos de estruturas terpenoídicas na fração 10-13 e 18-35. Nas demais frações, só foram detectados hidrocarbonetos como, ácidos graxos, alcoóis graxos, ésteres de ácidos graxos e pigmentos. Esta composição é esperada na fração hexano, pois é nesta que se concentram os pigmentos porfirínicos, tais como as clorofilas e todo o material da cera epicuticular das folhas.



**Figura 9.** Esquema de fracionamento da fração HEX.

As sub-frações 10-13 foram reunidas e purificadas por recristalização em metanol fornecendo 76 mg do composto 1, na forma de um sólido branco, com ponto de fusão 137° – 139 °C. O espectro de infravermelho em pastilha de KBr apresentou um perfil de absorção típico de estruturas esteroidais ou triterpênicas. Uma banda intensa e larga com máximo de absorção em 3425 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da ligação O-H; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2980-2840 cm<sup>-1</sup>, cuja alta intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada não linear. Cadeias de hidrocarbonetos lineares mostram duas absorções intensas e finas

bem definidas em 2919 e 2849  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, observou-se uma banda em 1646  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a absorção de estiramento de ligação dupla C=C (Figura 10).



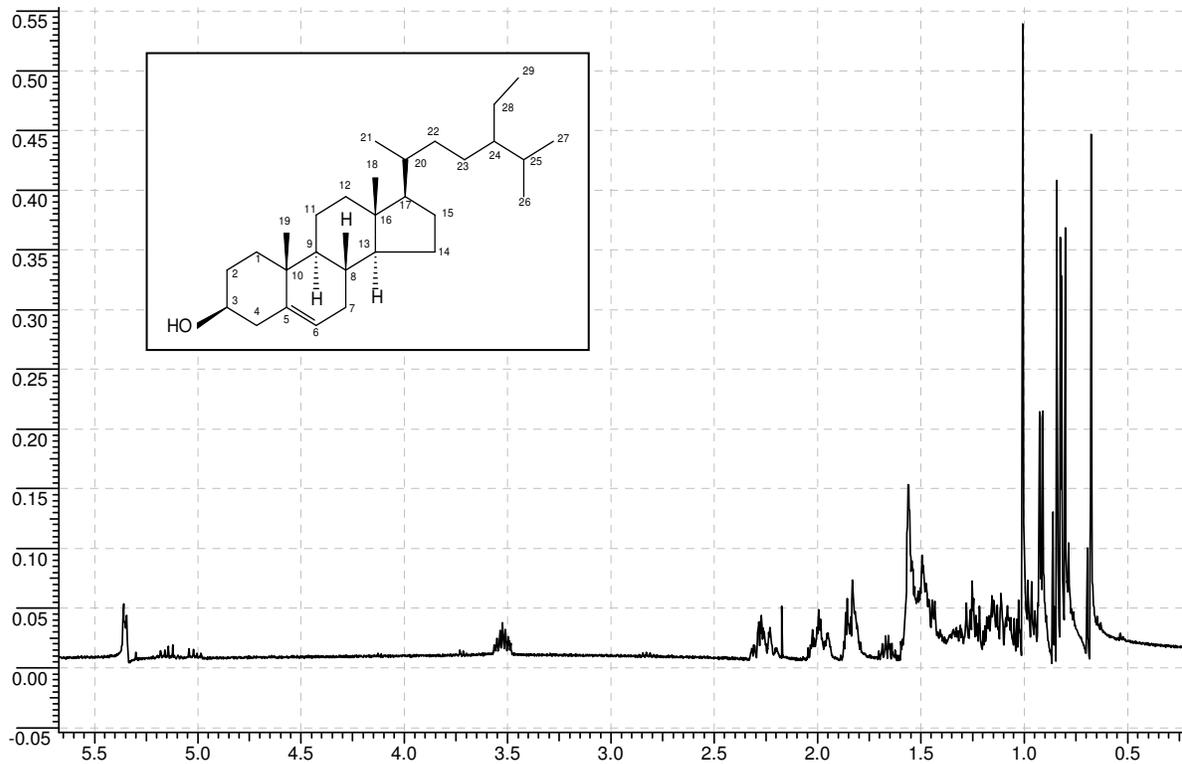
**Figura 10.** Espectro de Infravermelho (KBr) do composto 1.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 11) e  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) confirmam o perfil de de uma estrutura esteroidal. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , são observadas entre outros sinais, duas metilas quaternárias em 0,7 e 1,00 ppm, três metilas dupletes entre 0,75 e 0,85 ppm e uma metila triplete em 0,90 ppm. O grupo de absorções na região de 0,7-2,4 são típicas de estruturas esteroidais com destaque ao multiplete centrado em 2,25 e 2,00 ppm para os metilenos C-4 e C-7 respectivamente. A presença do multiplete centrado em 3,5 ppm sinaliza a presença do hidrogênio carbinólico típico da C-3  $\beta$ -hidroxilação do sistema ciclopentanoperidrofenantreno característica dos fitoesteróis. Finalmente o sinal centrado em 5,4 ppm para um hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$ , informa a presença de uma ligação dupla endocíclica trissubstituída.

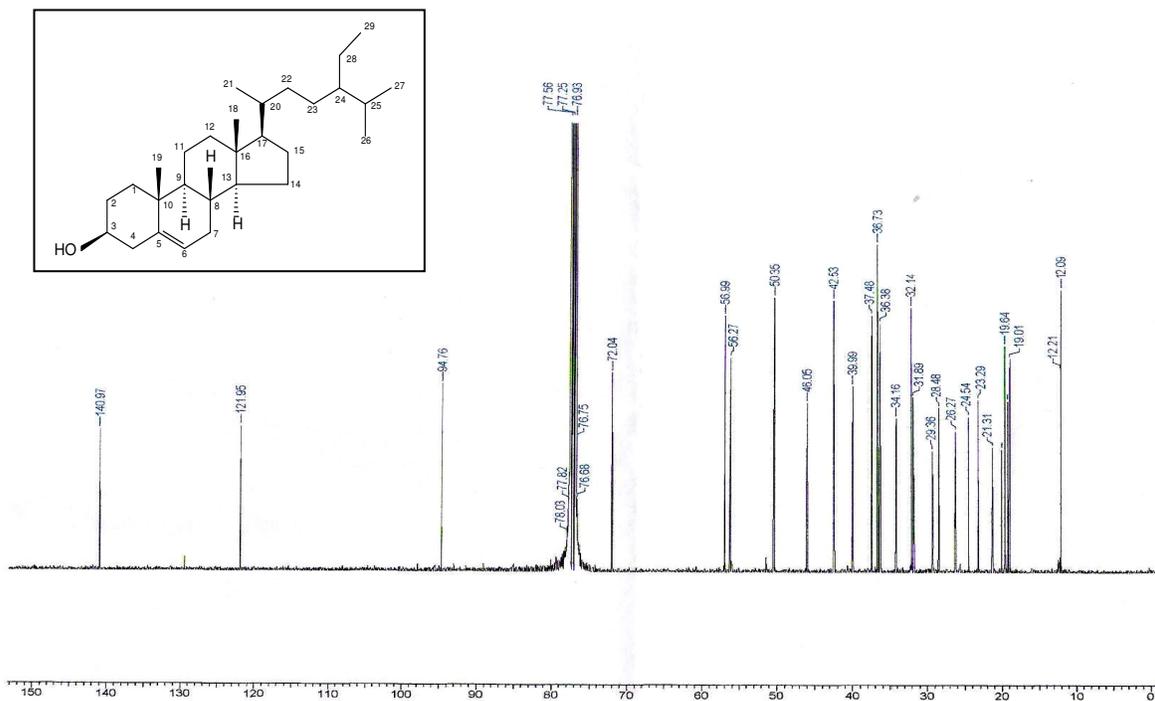
Além disso, pode ainda ser observado um grupo de sinais de baixa intensidade na região de 5-5,2 ppm, na forma de um duplo-duplete indicativo de uma ligação dupla trans dissustituída que é característica de fitoesteróis como o estigmasterol que

apresenta uma ligação dupla entre os C-22 e C-23. De fato há muitos relatos na literatura que o fitoesterol  $\beta$ -sitosterol geralmente vem acompanhados de pequenas quantidades de estigmasterol.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 12) mostrou a presença de 29 sinais, descartando a hipótese de um triterpeno, verificando-se que a estrutura tratava-se de um esteróide. Neste contexto, foi observado a presença de dois sinais, em 140,97 e 121,95 ppm, correspondentes aos carbonos da ligação dupla endocíclica 5-6, e um sinal em 72,04 ppm, correspondente ao carbono 3 ligado a uma hidroxila.



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  /400MHz) do composto 1.



**Figura 12.** Espectro de RMN 13C (CDCl<sub>3</sub>/100 MHz) do composto 1

As atribuições dos deslocamentos químicos para os carbonos do composto 1 (Figura 13) comparados com dados obtidos da literatura estão descritos na tabela 3:

Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos para o composto 1 comparados com a literatura (KOVGANKO, 2000).

C	$\delta$ deslocamento químico (ppm)	
	Composto 1	$\delta_c$ literatura
1	37,48	37.3
2	31,89	31.6
3	72,04	71.8
4	42,53	42.3
5	140,97	140.8
6	121,95	121.7
7	32,14	32.1
8	32,14	32.1
9	50,35	50.2
10	36,73	36.5
11	21,31	21.1
12	39,99	39.8
13	42,53	42.3
14	56,99	56.8
15	24,54	24.3
16	28,48	28.3
17	56,27	56.1
18	12,21	12.0
19	20,0	19.1
20	36,38	36.2
21	19,01	18.8
22	34,16	34.0
23	26,27	26.2
24	46,05	45.2
25	29,36	29.2
26	19,6	18.9
27	19,2	19.1
28	23,29	23.1
29	12,09	11.9

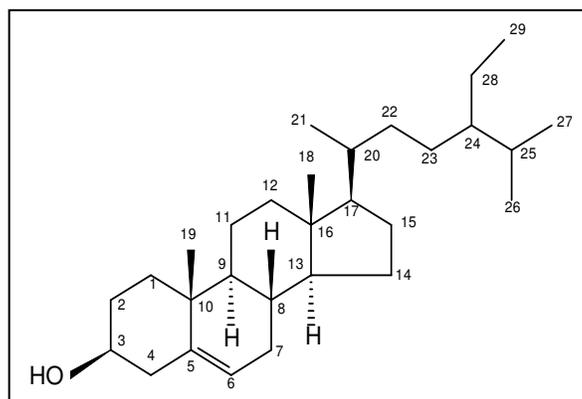
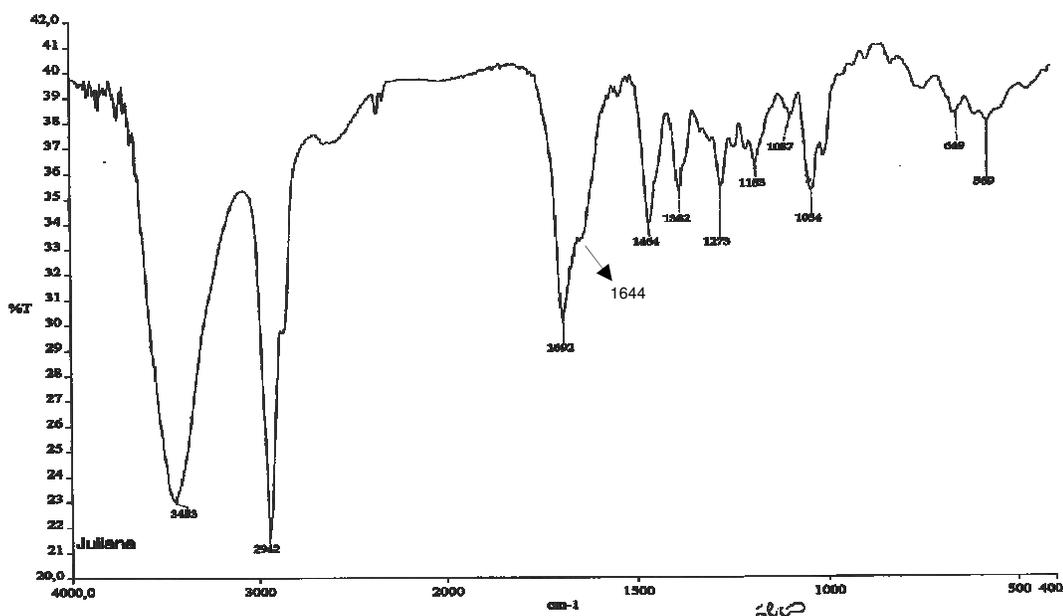


Figura 13. Estrutura do composto 1.

De acordo com as análises espectroscópicas apresentadas, por comparação com dados da literatura e comparação por CCD com vários outros esteróides isolados anteriormente pelo grupo de pesquisa, o composto 1 foi finalmente identificado como o esteróide  $\beta$ -sitosterol.

As sub-frações de 18-35 foram reunidas, e após purificação por recristalização em metanol, apresentou-se na forma de um fino sólido branco com ponto de fusão  $279^{\circ}$  -  $282^{\circ}$ C. O espectro de infravermelho (Figura 14) em pastilha de KBr destaca uma larga e intensa absorção na região de  $3453\text{ cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos de ligação O-H, que juntamente com a banda em  $1692\text{ cm}^{-1}$  para a C=O de ácido, sinalizam a presença de um ácido carboxílico. Por outro lado a intensa absorção em  $2942\text{ cm}^{-1}$  para estiramentos de ligações C-H e comparando sua intensidade com a banda de C=O, mostra ser um composto contendo uma cadeia hidrocarbonada muito grande. Este perfil observado no espectro de IV, juntamente com o alto ponto de fusão, orienta as análises espectrais para a estrutura de um ácido triterpênico.

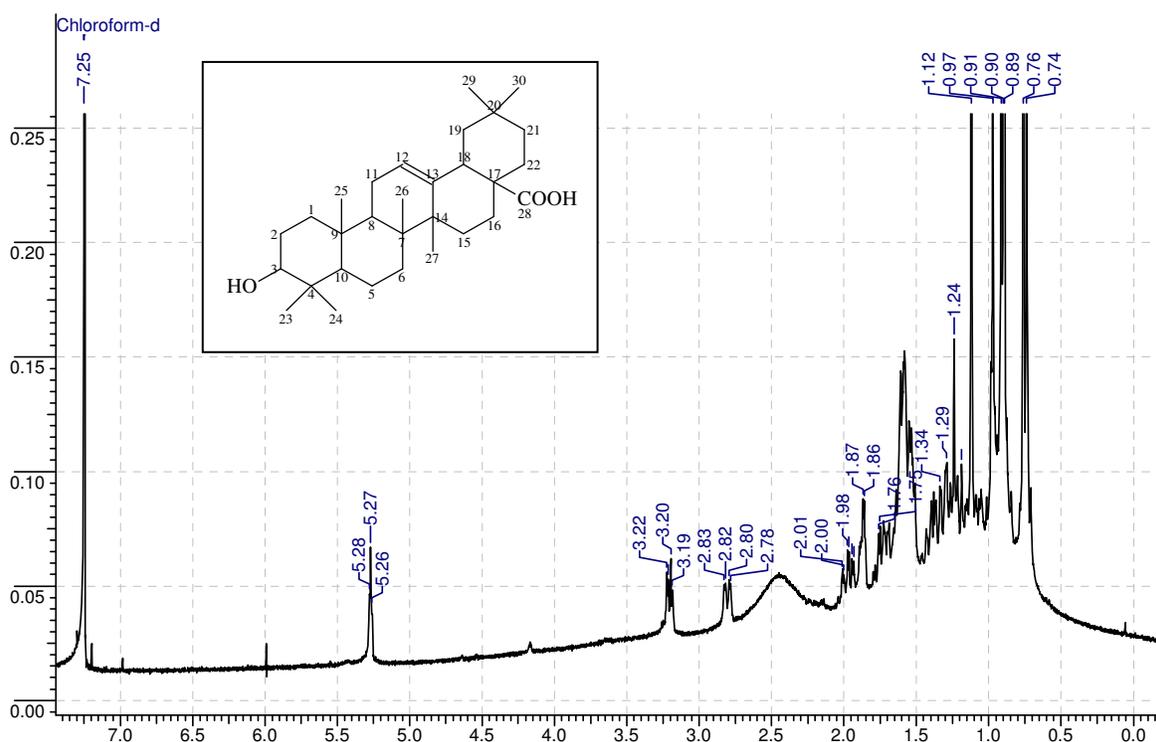


**Figura 14.** Espectro de Infravermelho (KBr) do composto 2.

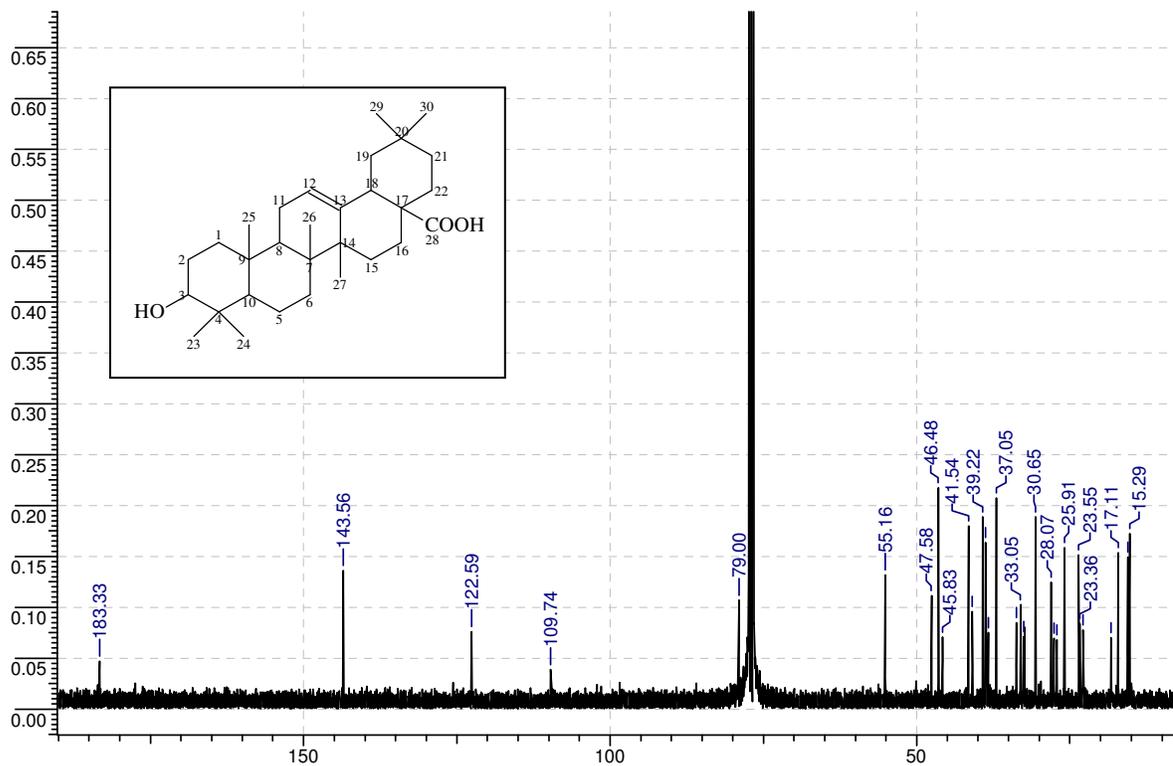
O espectro de RMN de  $H^1$  (Figura 15) do composto 2, apresentou grupos de sinais na região de 0,8 a 1,0, onde são observados sete simpletos característicos de metilas de triterpenos. O triplete centrado em 5,27 ppm para um átomo de hidrogênio ligado a carbono  $sp^2$ , indica a presença de uma ligação dupla trissubstituída. O duplo duplete observado em 3,20 ppm é característico do H-3 carbinólico de triterpenos.

Observa-se que nos esteróis, este H-3 forma um multiplete pelo acoplamento com dois grupos metilenos vizinhos 2-CH<sub>2</sub> e 4-CH<sub>2</sub>. Nos triterpenos, a presença de duas metilas em C-4, faz com que o H-3 acople somente com os hidrogênios axial e equatorial do metileno C-2, resultando em um sinal com a forma de um duplo-duplete. O duplo-duplete em 2,81 ppm foi atribuído ao H-18 que está acoplado ao CH<sub>2</sub>-19. O deslocamento químico do átomo de hidrogênio H-18 para campo mais baixo é justificado pelos efeitos de desproteção anisotrópica conferido pela carbonila do ácido carboxílico em C-17 e pela ligação dupla nos carbonos C-12 e C-13.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 16) mostrou a presença de 30 sinais, confirmando a estrutura triterpênica. O sinal em 183,33 ppm corresponde a carbonila de ácido. Foi observado também, os sinais 143,56 e 122,59 ppm que correspondem aos carbonos da dupla ligação endocíclica em C-12 e C-13 respectivamente. O sinal em 79 ppm corresponde ao C-3 ligado a uma hidroxila.



**Figura 15.** Espectro de RMN 1H (CDCl<sub>3</sub> /400 MHz) do composto 2.



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3/100\text{MHz}$ ) do composto 2.

Os demais sinais do composto 2 (Figura 17) foram atribuídos com o auxílio dos dados de literatura e estão descritos na tabela 4:

Tabela 4: Valores de deslocamento químico para o composto 2 comparados com a literatura (MAHATO e KUNDU, 1994).

C	δ deslocamento químico (ppm)	
	Composto 2	δ <sub>c</sub> literatura
1	38.34	38.5
2	27.13	27.4
3	79.0	78.7
4	38.72	38.7
5	55.1	55.2
6	18.25	18.3
7	32.56	32.6
8	39.22	39.3
9	47.58	47.6
10	37.05	37.0
11	22.87	23.1
12	122.59	122.1
13	143.5	143.4
14	41.54	41.6
15	27.65	27.7
16	23.55	23.4
17	46.48	46.6
18	40.92	41.3
19	45.83	45.8
20	30.65	30.6
21	33.75	33.8
22	32.40	32.3
23	28.07	28.1
24	15.52	15.6
25	15.29	15.3
26	17.11	16.8
27	25.91	26.0
28	183.33	181.0
29	33.05	33.1
30	23.36	23.6

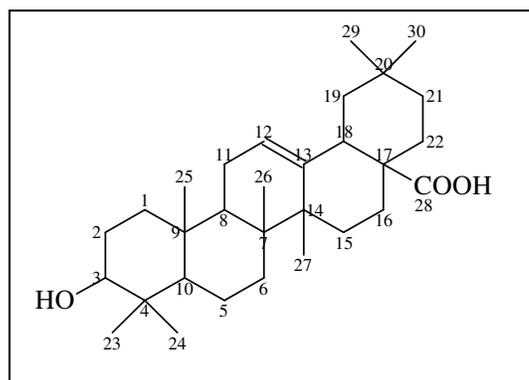
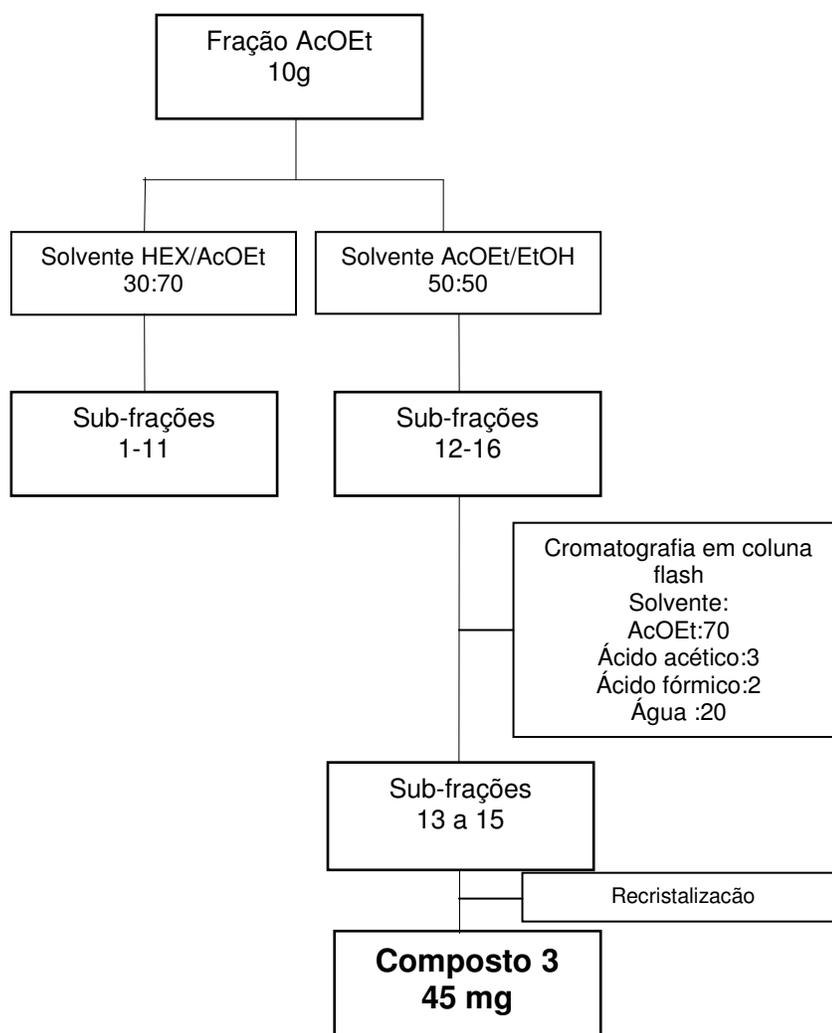


Figura 17. Estrutura do composto 2.

De acordo com as análises obtidas e por comparação com os dados da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994), além da comparação por CCD com outros triterpenos já isolados pelo grupo, confirma-se a estrutura do composto 2 como sendo o ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olea-12-en-28-óico).

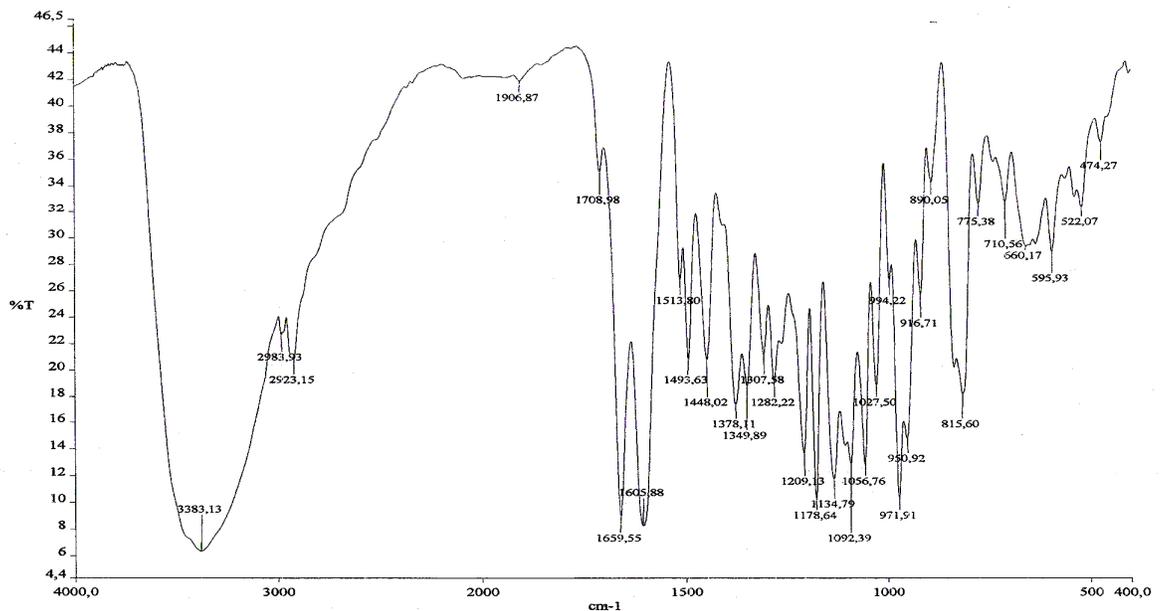
#### 5.4 Isolamento e identificação do flavonóide canferitrina

A fração AcOEt (10g) foi cromatografada em coluna de sílica gel conforme ilustrado na figura 19. Foram obtidas 16 sub-frações, das quais as sub-frações 1-11 foram eluídas com HEX/AcOEt de etila (30:70) e as sub-frações 12-16 eluídas com AcOEt/EtOH (50:50) (Figura 18) no modo isocrático. Após, as sub-frações 12-16 foram purificadas por cromatografia em coluna flash, utilizando um sistema de solventes, o qual resultou no isolamento de 45 mg do composto **3**.



**Figura 18:** Esquema de fracionamento da fração AcOEt.

O composto **3**, após purificação e recristalização em AcOEt/MeOH, apresentou-se na forma de finos cristais em agulha de coloração amarelada com ponto de fusão 198.5-201.3 °C. Valor este característico para flavonóides. No espectro de infravermelho do composto **3**, observou-se uma banda muito intensa e larga com máximo de absorção em 3383 cm<sup>-1</sup>. Isto indica a presença de vários grupos O-H e que ao realizarem ligações de hidrogênio causam o alargamento da banda. Esta absorção, juntamente com a intensa absorção em 1178 cm<sup>-1</sup> é um indicativo de glicosídeo na molécula. Foram observadas também, uma banda em 1659 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento C=O de uma carbonila conjugada e em 1605 cm<sup>-1</sup> característico de ligações C=C (Figura 19). Além disso, se observa uma pequena absorção em 2983-2923 cm<sup>-1</sup>, indicando a presença de estiramento C-H alifáticos. Estas características orientam a análise estrutural do composto **3** para um flavonóide glicosilado.



**Figura 19:** espectro de IV (KBr) do composto **3**

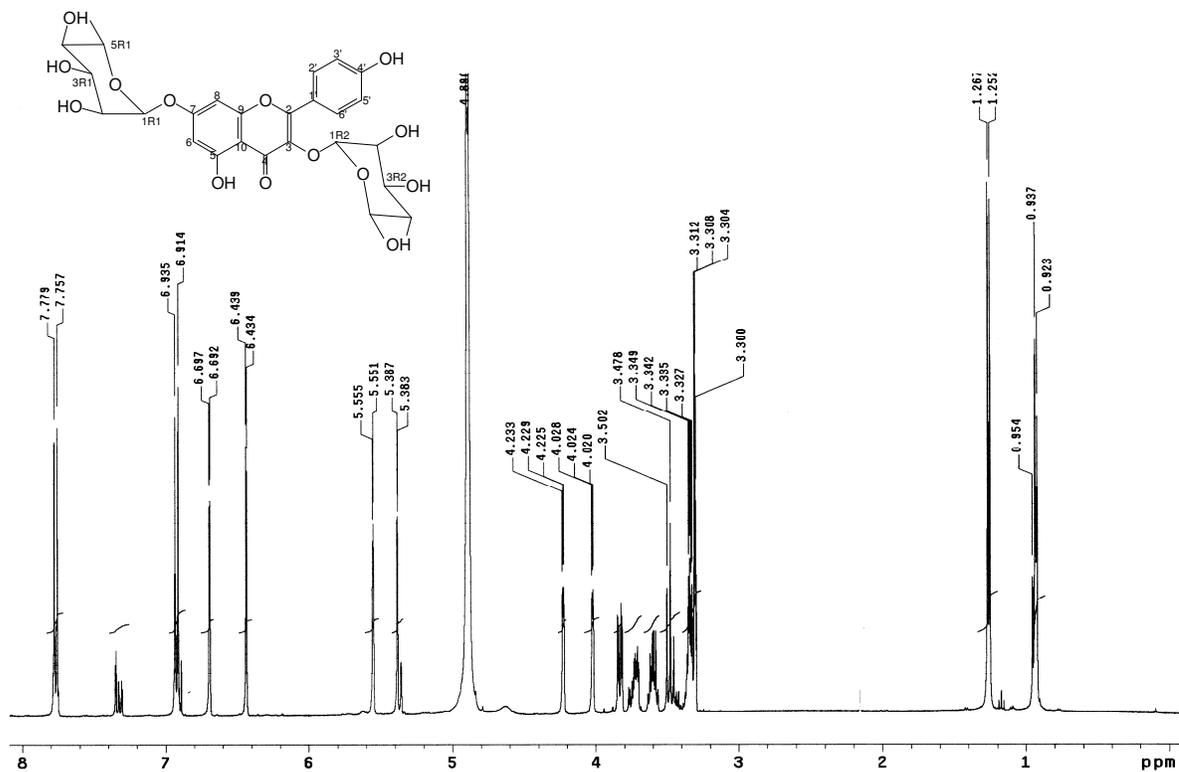
Assim, comparando este IV com o de flavonóides glicosilados, observa-se o mesmo padrão de absorção que aliado à sua alta polaridade e por revelar azul escuro em CCD com cloreto férrico, trabalhamos a identificação deste composto como sendo

um flavonóide glicosilado. De fato, a primeira inspeção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , revelam sinais para uma estrutura flavonoídica.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20) podemos distinguir dois grupos de sinais: um entre 6,8 e 7,9 ppm atribuídos a aglicona de um flavonóide e entre 0,9 a 5,6 ppm para a unidade glicosídica. A presença de dois dupletos centrados 0,96 e 1,25 com  $J=6,2$  Hz, é característico de metilas de 2 unidades de 6-deoximannose (ramnose) de um disacarídeo ligado à aglicona. Os demais sinais da unidade glicosídica são observados na região entre 3 e 4 ppm (Figura 21), e os átomos de hidrogênio anoméricos na forma de dupletos centrados em 5,38 ppm,  $J=1,8\text{Hz}$  e um singleto em 5,55 ppm. Através da constante de acoplamento do sinal em 5,38 ppm com  $J=1,8\text{Hz}$ , foi possível afirmar que a molécula de açúcar ligada a aglicona é  **$\alpha$ -glicosídica**. Segundo diagrama de Karplus, se a constante de acoplamento deste sinal fosse acima de 8Hz, a ligação seria  $\beta$ -glicosídica. Segundo Harborne (1994), quando a ramnose ocorre na posição 3 em esqueleto do tipo canferol, o valor do deslocamento químico dos hidrogênios metílicos ficam entre 0,72-0,86 ppm e dos hidrogênios anoméricos entre 4,96-5,36 ppm, enquanto que a ramnose na posição 7 mostra tais sinais entre d 1,04-1,21 e d 5,22-5,75 para os referidos hidrogênios. Como foram observadas as absorções em d 1,25 para os hidrogênios metílicos e d 5,55 para o hidrogênio anomérico de uma das unidades de ramnose e d 0,93 ( $\text{CH}_3\text{-6R1}$ ) e d 5,38 ( $\text{H-1R1}$ ) para a outra unidade, foi possível então propor que as glicosilações ocorreriam nos carbonos 7 e 3, respectivamente. Os sinais dupletos em 6,43 e 6,69 ppm com  $J=2,2\text{Hz}$  (acoplamento meta), são atribuídos aos hidrogênios do anel A H-6 e H-8 respectivamente. E os sinais dupletos em 6,92 e 7,76 ppm com  $J=8,8$  Hz (acoplamento orto) dos hidrogênios do anel B H-2'-6' e H-3'-5', respectivamente.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22) corroborou com a proposta de duas ramnoses ao revelar sinais para dois carbonos anoméricos em 99,83 e 103,50 e ainda para os dois carbonos metílicos em 18,08 e 17,67, além dos demais picos da ramnose entre 71,29 e 73,58. Os demais sinais confirmam a estrutura do canferol aglicona com o sinal da carbonila em 179,0 ppm e os sinais mais intensos em 116,57 ppm e 132,0 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos 3',5' e 2',6' respectivamente.

Os sinais dos hidrogênios das hidroxilas posicionadas em C-5 e C-4' não aparecem no espectro, devido à utilização de metanol deuterado para a análise. A partir da atribuição de todos os sinais dos espectros RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e de COSY (figura 23), foi possível identificar a estrutura do composto 3.



**Figura 20:** espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}/400\text{ MHz}$ ) do composto 3.

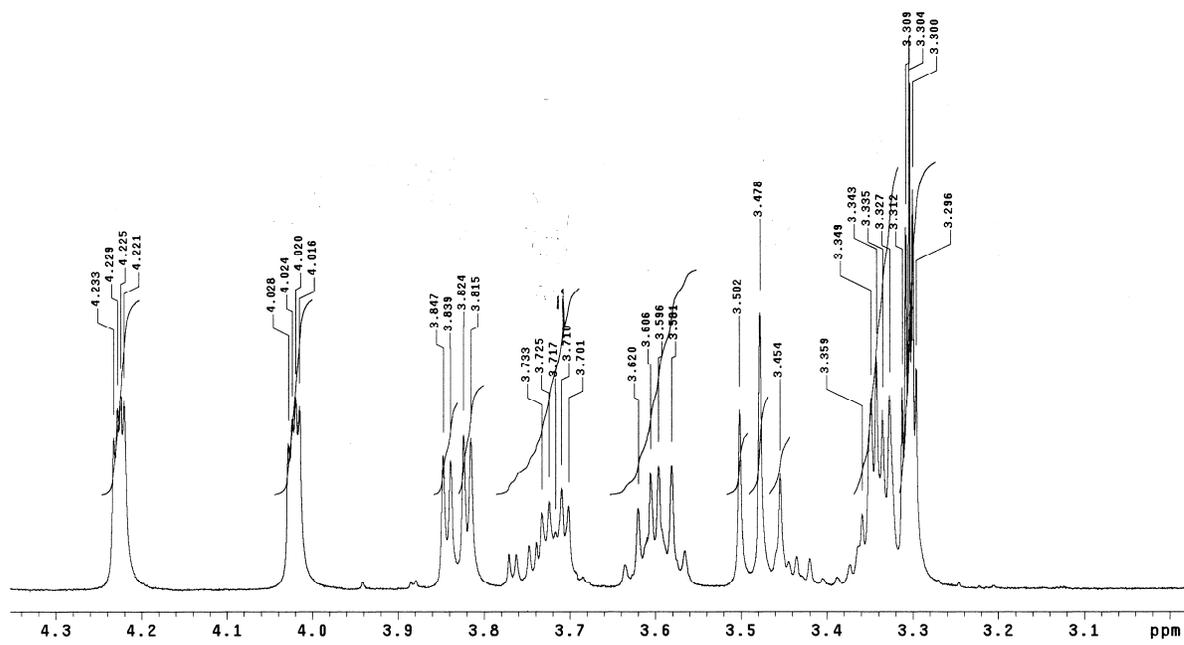


Figura 21: Ampliação da região entre 3,3 ppm e 4,3 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 3

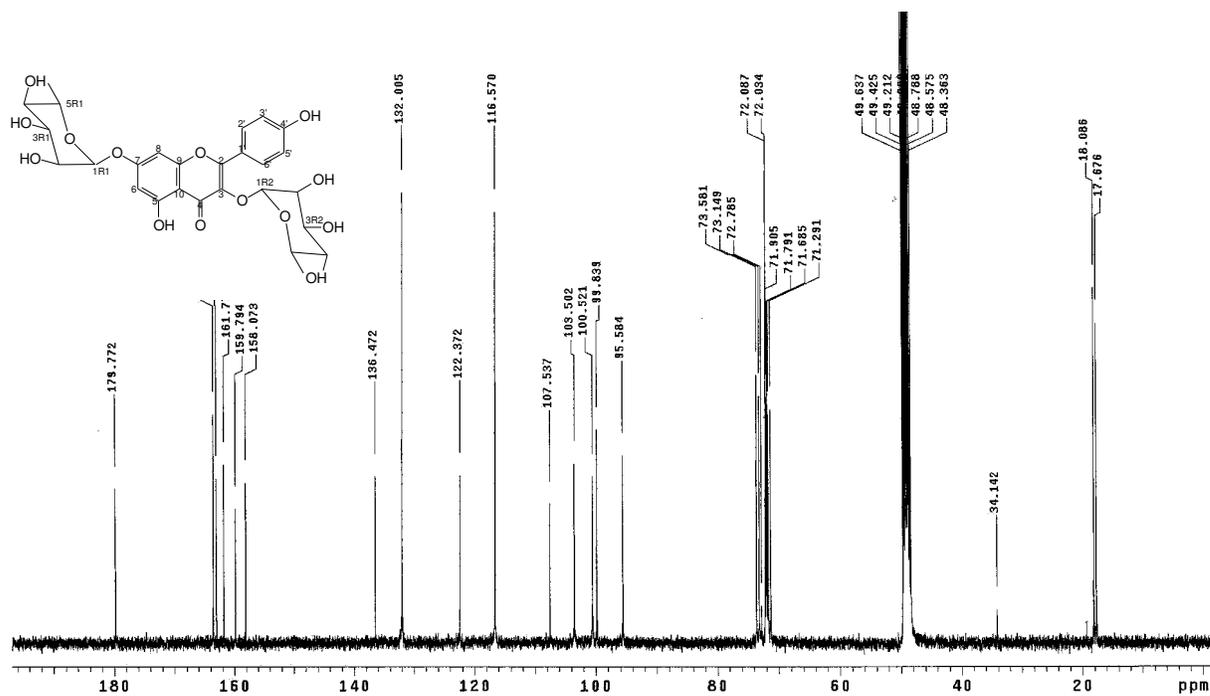
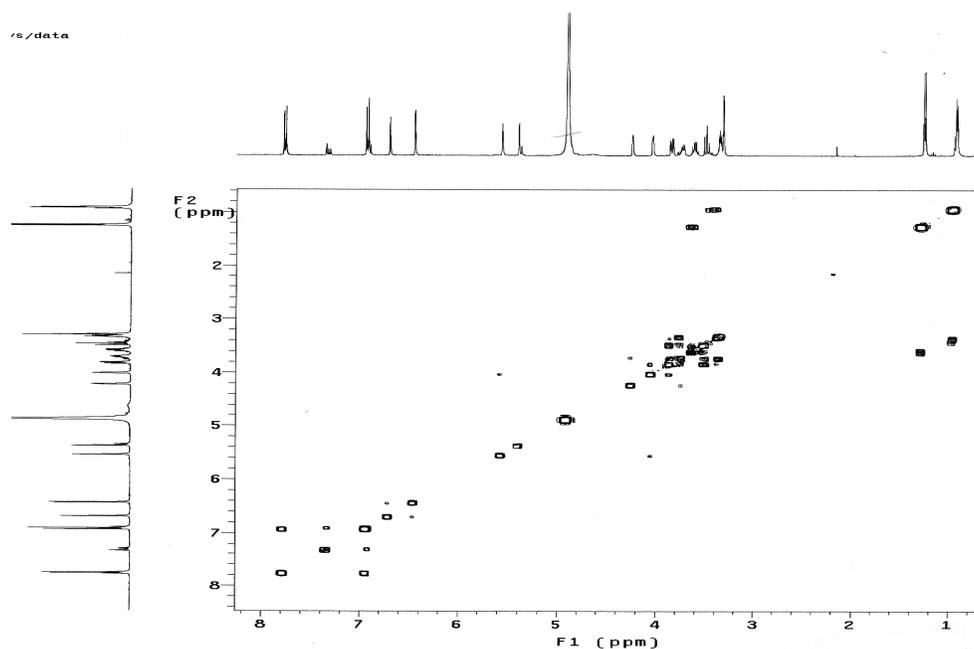
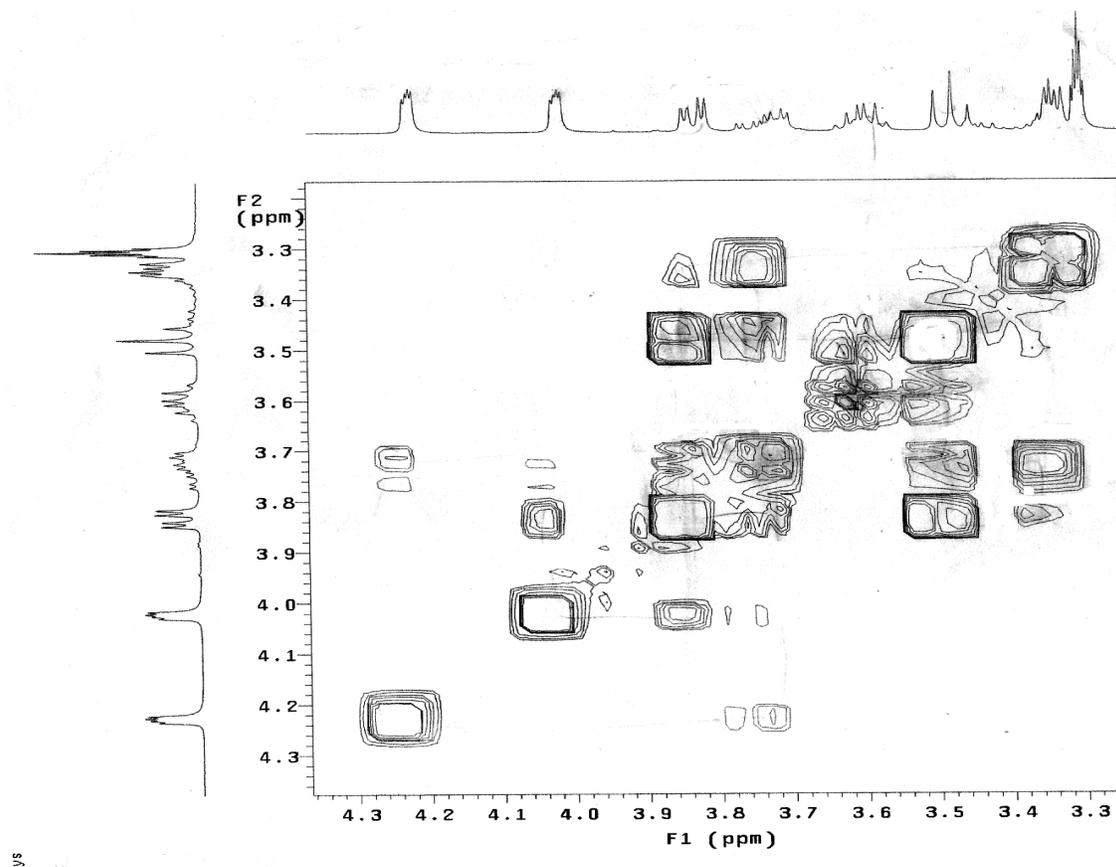


Figura 22: espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}/100\text{ MHz}$ ) do composto 3.

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figura 23) exibe dois sistemas de spins na região de hidrogênios aromáticos: correlação entre os hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, com acoplamento meta e correlação entre os hidrogênios H-2'/H-3', H-5'/H-6' do anel B, com acoplamento orto. Na região dos sinais de hidrogênio dos açúcares (Figura 24), observam-se dois sistemas de spins que estão correlacionados aos dois hidrogênios anoméricos 1R1 e 1R2, definindo as duas unidades ramnosídicas: o hidrogênio anomérico 1R1 (5,55 ppm), mostra a seguinte sequência de correlação:  $\delta$  1,25 (6R1) com  $\delta$  3,60 (5R1);  $\delta$  3,60 (5R1) com  $\delta$  3,47 (4R1);  $\delta$  3,47 (4R1) com  $\delta$  3,83 (3R1);  $\delta$  3,83 (3R1) com  $\delta$  4,02 (2R1). O hidrogênio anomérico 1R2 (5,38 ppm), mostra a seguinte sequência de correlação:  $\delta$  0,93 (6R2) com  $\delta$  3,33 (5R2);  $\delta$  3,33 (5R2) com  $\delta$  3,71 (4R2);  $\delta$  3,71 (4R2) com  $\delta$  4,22 (3R2).



**Figura 23:** Espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (400MHz) do composto 3.



**Figura 24:** Ampliação da região entre 3 e 4 ppm do espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY do composto 3.

A análise conjunta dos dados de RMN e destes fornecidos pelos espectros de COSY, permitiram identificar o composto 3. Os deslocamentos químicos dos carbonos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 3 (Figura 25) estão descritos na tabela 5 e comparados com a literatura:

Tabela 5: Valores de deslocamento químico para o composto 3 comparados com a literatura.

Composto 3			
C	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_C$ literatura
2	-	159.79	159.9
3	-	136.47	136.5
4	-	179.77	179.9
5	-	163.00	163.1
6	6.43(d,2.2)	99.83	99.9
7	-	163.52	163.6
8	6.69(d,2.2)	95.58	95.7
9	-	158.07	158.2
10	-	107.53	107.6
1'	-	122.37	122.5
2', 6'	7.76(d,8.8)	132.00	132.0
3', 5'	6.92(d,8.8)	116.57	116.6
4'	-	161.77	161.8
1R1	5.55(d, 1.8)	100.5	100.6
2R1	4.02 (m)	71.90	72.0
3R1	3.83 (dd)	71.29	72.12
4R1	3.47 (t)	73.14	73.2
5R1	3.60 (m)	71.79	71.7
6R1	1.25(d,6.2)	18.08	18.1
1R2	5.38(d, 1.8)	103.52	103.6
2R2	3.30 (m)	72.05	72.14
3R2	4.22 (m)	72.78	72.2
4R2	3.71 (dd)	73.58	76.6
5R2	3.33 (m)	71.68	71.3
6R2	0.93 (d,6.2)	17.67	17.7

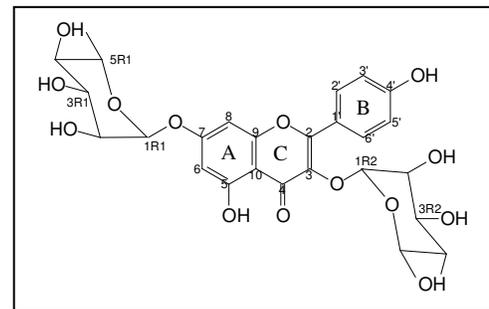


Figura 25. Estrutura do composto 3.

De acordo com as análises cromatográficas e espectrométricas, juntamente com a comparação da literatura (URGAONKAR e SHAW, 2007), podemos concluir que o composto 3 trata-se do flavonóide canferitrina (canferol, 3,7,O,  $\alpha$ -diramnosídeo).

## **5.5 Atividades Biológicas do Extrato, Frações e Compostos Isolados de *L. corniculatus* L.**

A elucidação dos componentes ativos presentes em plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química medicinal, bioquímica e a farmacologia. Os extratos de plantas contem inúmeros metabólitos com estruturas químicas bastante variadas que no conjunto, podem apresentar efeitos sinérgicos aditivos ou antagônicos o que refletirá na atividade biológica observada para o extrato. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de modelos experimentais de bioensaios para a detecção da atividade que deseja estudar. Estes modelos experimentais devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis. Os bioensaios podem envolver organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), animais de laboratório (camundongos, ratos, coelhos, cobaias, etc), ensaios bioquímicos visando diferentes alvos moleculares (enzimas e receptores) e cultura de células animais ou humanas. No presente trabalho foram avaliadas as propriedades antioxidante (*in vitro*), antibacteriana (*in vitro*) e anti-inflamatória (*in vivo*) da *L. corniculatus* cv. São Gabriel.

### **5.5.1 Atividade antioxidante**

#### **Determinação do teor de fenóis e flavonóides totais**

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides foram determinados para a espécie, a fim de se correlacionar estes dados com a atividade antioxidante dos extratos e frações vegetais. A atividade antioxidante foi avaliada a partir de três métodos diferentes: o ensaio com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), a medida do potencial redutor e a capacidade de inibir a peroxidação de um substrato lipídico.

### 5.5.1.1 Fenóis totais

Como a atividade antioxidante está geralmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos nas plantas, avaliou-se o teor destes compostos no extrato e frações estudados. A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2005). O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup>. Quando este reagente entra em contato com agentes redutores como os compostos fenólicos em meio básico, estes são oxidados formando os chamados complexos molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUZA et al., 2007; WATERMAN e MOLE, 1994).

A tabela 6 demonstra os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos do extrato e frações de *L. corniculatus* L. Quanto maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalente por g de extrato ou fração, maior a porcentagem de compostos fenólicos presentes.

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos totais \* presentes no extrato e frações de *L. corniculatus*

Extrato/fração	<i>L. corniculatus</i>
EB**	24,80 ± 1,09
F. HEX**	25,63 ± 1,41
F. AcOEt**	44,51 ± 0,63
F. BuOH**	47,5 ± 0,77
F. Aq**	29,81 ± 0,12

\* O teor de compostos fenólicos totais é expresso em mg de ácido gálico/ g de extrato ou fração seca da planta  
 \*\*EB=Extrato Bruto; F. HEX = fração hexânica; F. AcOEt = fração acetato de etila; F. BuOH = fração n-butanol; F. Aq=fração aquosa

Segundo a tabela 5, pode-se verificar que a fração AcOEt e BuOH foram as frações que apresentaram o maior conteúdo de compostos fenólicos, resultando no equivalente a concentração de  $44,51 \pm 0,63$  e  $47,5 \pm 0,77$  mg de ácido gálico por grama de fração seca, respectivamente. A presença de compostos fenólicos é esperada nas frações mais polares originárias do fracionamento líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente. É importante salientar que, apesar do resultado ser expresso em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples, essa metodologia não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais, e podem ser detectados no teste, além de compostos fenólicos simples, seus polímeros, como os taninos hidrolisáveis, além de flavonóides e catequinas, dentre outros.

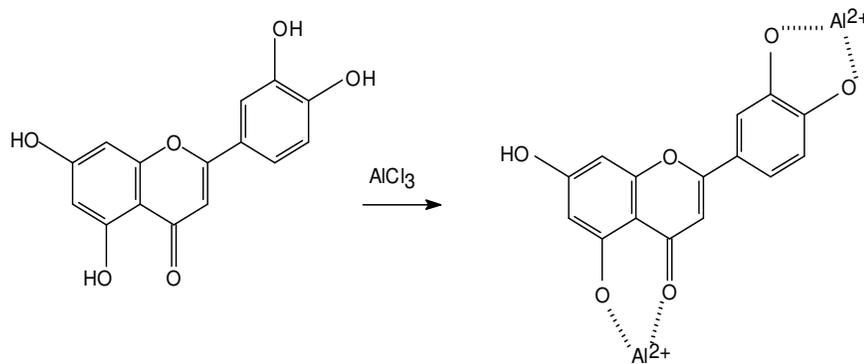
#### **5.5.1.2 Flavonóides totais**

Os flavonóides são um grupo de compostos fenólicos diversificados em estrutura química e características, sendo que ocorrem naturalmente em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e cascas e são partes integrais da dieta humana. Eles têm sido relatados por exibir um amplo leque de efeitos biológicos, incluindo efeitos antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico e ação vasodilatadora. Além disso, flavonóides inibem a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, permeabilidade capilar e atividade de sistemas enzimáticos incluindo: a cicloxigenase e lipoxigenase (CHEN et al., 2004). Os efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos provêm de sua capacidade de transferir elétrons aos radicais livres, estabilizando-os, além de possuírem ação quelante de íons metálicos, a ativarem enzimas antioxidantes, reduzirem a quantidade de radicais livres derivados do tocoferol e inibirem as oxidases (HEIN, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

Na análise da determinação do teor de flavonóides no extrato e frações utilizou-se a complexação com o reagente cloreto de alumínio.

Para melhor determinar o teor de flavonóides por meio de espectroscopia no UV/VIS, sem que ocorra a interferência de compostos lipofílicos, como clorofila e outras substâncias, foi utilizado um reagente complexante como o  $AlCl_3$ . O  $AlCl_3$  se complexa com a estrutura flavonoídica formando um quelato com as hidroxilas orto de grupos catecóis H-3' e H-4' e a HO-5 do anel A formando um quelato envolvendo a carbonila C-

4 (Figura 26), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de UV/VIS para uma região característica (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Vale lembrar também, que os compostos fenólicos que apresentam grupo catecol, apresentam reação positiva com  $\text{AlCl}_3$ , tornando-se um interferente, dando uma reação falso positivo na determinação do teor de flavonóides.



**Figura 26.** Complexo formado entre a estrutura do flavonóide e o reagente  $\text{AlCl}_3$ .

A tabela 7 mostra os resultados para este teste. Quanto maior o equivalente em quercetina encontrado nos extratos e frações testados, maior a porcentagem de flavonóides encontrados por grama de extrato bruto ou fração.

Tabela 7. Teor de flavonóides totais\* presentes no extrato e frações de *L. corniculatus*

Extrato/fração	<i>L. corniculatus</i>
EB**	29,30 ± 7,26
F. HEX	63,4 ± 0,08
F. AcOEt	74,8 ± 3,96
F. BuOH	135,52 ± 6,04
F. Aq	45,23 ± 1,63

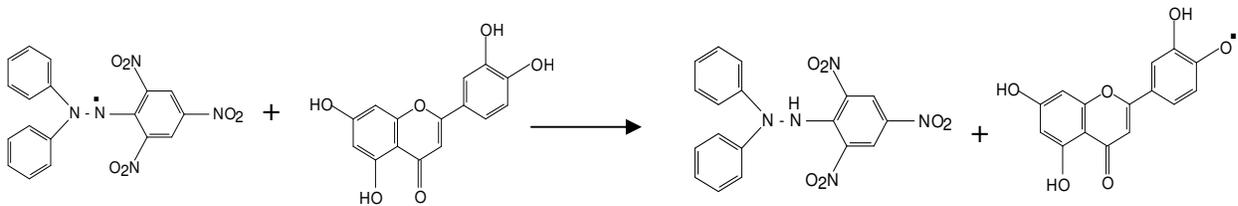
\* O teor de flavonóides totais é expresso em mg de quercetina/ g de extrato ou fração seca da planta.

\*\*EB= Extrato Bruto; F. HEX = fração hexânica; F. AcOEt = fração acetato de etila; F. BuOH = fração n-butanólica; F. Aq=fração aquosa

Analisando a tabela acima, pode-se observar que a fração butanólica apresentou a maior concentração de flavonóides, equivalente a 135,52 ± 6,04 mg de quercetina por grama de fração seca.

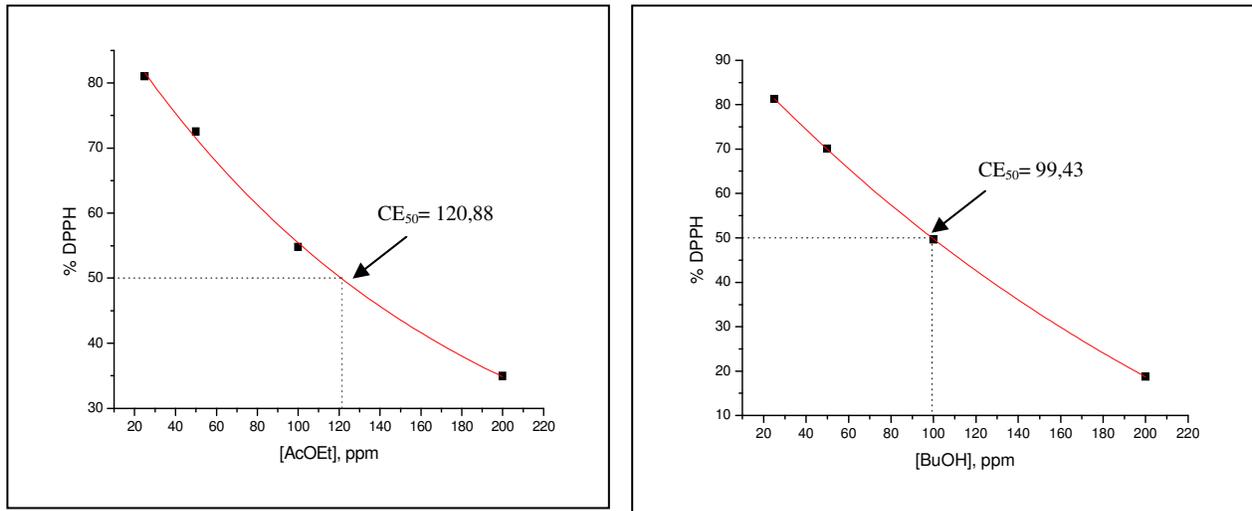
### 5.5.1.3 Avaliação da ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O método de DPPH é usado mundialmente na quantificação da atividade seqüestrante de radicais livres. Esta reação é baseada na diminuição da coloração que ocorre quando um elétron de átomo de nitrogênio do DPPH é reduzido pela recepção de um átomo de hidrogênio do composto antioxidante (Figura 27). O DPPH é conhecido como um radical livre estável, mas é sensível a luz, oxigênio, pH e o tipo de solvente utilizado (SCHERER e GODOY, 2009). Abaixo segue reação:



**Figura 27:** Estabilização radical livre DPPH na presença de um flavonóide.

Considera-se para a interpretação do ensaio, que a diminuição da absorvância em 517 nm e o aumento do aparecimento da coloração amarela em solução correspondem a um maior potencial antioxidante por parte da solução teste. Os resultados (Tabela 8) obtidos são expressos em  $CE_{50}$  (Concentração Efetiva), que significa a concentração de extrato, fração ou composto isolado necessária para reduzir em 50 % a concentração de DPPH em solução, e pode ser obtida através do gráfico de concentração do DPPH em solução *versus* concentração da solução amostra com o extrato ou a fração analisada (Figura 28). Neste caso, quanto menor a concentração necessária para alcançar a  $CE_{50}$ , melhor a capacidade seqüestrante do radical livre por parte da amostra.



**Figura 28:** Porcentagem de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da solução teste.

Tabela 8: Capacidade seqüestrante do radical livre DPPH (CE<sub>50</sub>\* - µg.mL<sup>-1</sup>) no extrato e frações de *L. corniculatus*.

Extrato/fração	<i>L. corniculatus</i>
EB**	> 200
F. HEX**	> 200
F. AcOEt**	120,88
F. BuOH**	99,43
F. Aq**	> 200
Ácido gálico	2,4
Ácido ascórbico	9,2
BHT	17,2

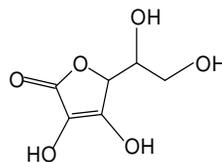
\* CE<sub>50</sub> = Concentração de extrato ou fração necessária em µg/mL, para diminuir a concentração do radical livre DPPH em 50 %

\*\*EB=Extrato Bruto; F. HEX = fração hexânica; F. AcOEt = fração acetato de etila; F. BuOH = fração n-butanólica; F. Aq=fração aquosa

Analisando os resultados acima, observa-se que a fração butanólica apresenta a maior capacidade de captação de radicais livres, com  $CE_{50} = 99,27\mu\text{g/mL}$ , seguida da fração acetato de etila com  $CE_{50} = 109,60 \mu\text{g/mL}$ . Considerando que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela ação antioxidante determinada pelo método do DPPH, este resultado está de acordo com os teores de flavonóides e fenólicos encontrados nas frações de *L. corniculatus*. Pode-se perceber que os valores obtidos não equiparam-se ao valor de  $CE_{50}$  do ácido ascórbico, um antioxidante usado como padrão, que apresentou  $CE_{50} = 9,2 \mu\text{g/mL}$ .

#### 5.5.1.4 Determinação do potencial redutor

O ensaio para a determinação da atividade do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações. Este método baseia-se no fato de que, quando hidroxilas fenólicas presente nos compostos e extratos vegetais é oxidado a íons fenolato, e os íons férricos adicionados à solução na forma de  $\text{FeCl}_3$ , são reduzidos para íons ferrosos, e detectados a partir da formação de um complexo azul ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) com o reagente ferricianeto de potássio (WATERMAN e MOLE, 1994). Para a atribuição de valores de potencial redutor, utilizou-se uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido ascórbico (Figura 29), um composto com potencial redutor.



**Figura 29.** Estrutura do ácido ascórbico.

A tabela 9 apresenta os resultados do ensaio para a determinação do potencial redutor. Valores maiores significam maior capacidade redutora, quando comparados em equivalentes a ácido ascórbico, o padrão utilizado.

Tabela 9. Potencial redutor\* do extrato e frações de *L. corniculatus*.

Extrato/fração	<i>L. corniculatus</i>
EB**	66,71 ± 4,34
F. HEX**	98,72 ± 1,23
F. AcOEt**	212,32 ± 5,58
F. BuOH**	164,95 ± 1,86
F. Aq**	28,55 ± 1,24

\* O potencial redutor é expresso em equivalentes de mg de ácido ascórbico/ g de extrato ou fração seca da planta.

\*\*EB=Extrato Bruto; F. HEX = Fração hexânica; F. AcOEt = acFração etato de etila; F. BuOH = Fração n-butanol; F. Aq=Fração Aquosa

A análise do resultado apresentado pela espécie testada demonstra que, a fração AcOEt apresentou maior capacidade redutora sobre os íons férricos, mostrando o valor de atividade equivalente a 212,32 mg de ácido ascórbico/g de extrato.

### 5.5.1.5 Verificação do potencial protetor contra a peroxidação lipídica

Membranas lipídicas são ricas em ácidos graxos insaturados que são os mais susceptíveis a processos oxidativos. Especialmente, ácido linolêico e ácido araquidônico são alvos de peroxidação lipídica. A cadeia de geração de radicais é amplamente aceita como um mecanismo comum de peroxidação lipídica e sabe-se que a inibição desta peroxidação por antioxidantes, deve-se a sua atividade seqüestrante destes radicais. Seqüestrantes de radicais podem reagir diretamente e quelar os radicais peróxidos para encerrar a reação de peroxidação (SHARIFIFAR et al., 2009).

Este ensaio é baseado em reações de oxi-redução, onde agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio, que, ao atacarem substratos lipídicos (ácido linoléico, neste caso) dão origem a produtos de oxidação que induzem a descoloração do  $\beta$ -caroteno, que pode ser avaliada através da determinação da absorvância da solução em espectrofotômetro UV-VIS em 470 nm. A adição de agentes antioxidantes inibe estas reações, mantendo a cor do  $\beta$ -caroteno, conseqüentemente a absorvância da

solução estável. O método é amplamente usado para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais (SILVA, et al., 1999).

A tabela 10 apresenta a porcentagem de inibição do processo de peroxidação lipídica (descoloração do  $\beta$ -caroteno) por parte do extrato e frações estudados, em relação à solução sem a presença de antioxidantes.

Tabela 10. Inibição da peroxidação lipídica (%)\* pelo extrato e frações de *L. corniculatus*.

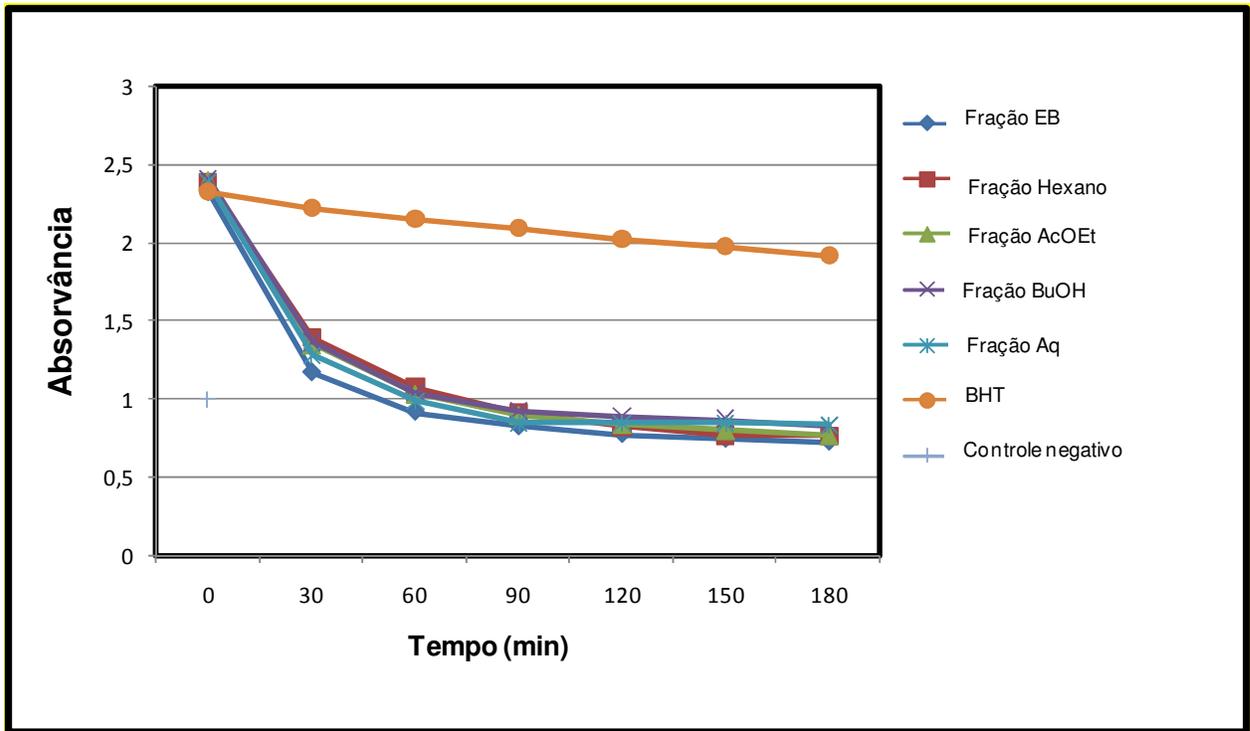
Extrato/fração	<i>L. corniculatus</i>
EB**	5,11
F. HEX**	3,87
F. AcOEt**	2,97
F. BuOH**	6,42
F. Aq**	8,27
BHT	75,92

\* A medida da inibição peroxidação lipídica em porcentagem refere-se à inibição da descoloração do beta-caroteno, na ausência de um antioxidante.

\*\*EB= Extrato Bruto; F. HEX= Fração hexânica; F. AcOEt = Fração acetato de etila; F. BuOH = Fração n-butanol; F. Aq=Fração Aquosa; BHT= 2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno

A figura 30 apresenta o perfil de inibição da peroxidação lipídica pelos extratos e frações testados, em função do tempo, observados através da descoloração do beta-caroteno nas soluções. Neste gráfico, pode-se avaliar que as soluções do controle negativo, ou seja, sem a presença dos antioxidantes apresentam clara descoloração, que pode ser verificado através do decaimento das absorvâncias. Já as soluções contendo BHT<sup>1</sup> como agente antioxidante (controle positivo) mostram a permanência da coloração ao longo do tempo, pois seus valores de absorvância permanecem mais estáveis. Quanto mais semelhantes ao perfil apresentado pelo BHT forem às soluções teste, melhores os resultados de inibição da peroxidação lipídica.

<sup>1</sup> O BHT ou butil-hidroxi-tolueno é um antioxidante utilizado na preservação de alimentos e medicamentos, sendo utilizado principalmente para evitar a rancificação de gorduras.



**Figura 30.** Ação protetora contra peroxidação lipídica do extrato e frações de *L. corniculatus*

De um modo geral, os resultados do ensaio demonstraram que tanto o extrato bruto quanto as frações de *L. corniculatus*, não foram efetivos em inibir a peroxidação lipídica.

Finalmente, observamos que a fração n-BuOH foi a que apresentou os maiores teores de fenólicos e flavonóides, assim como revelou o maior poder antioxidante nos ensaios realizados, mostrando assim a importante participação dos flavonóides na atividade antioxidante.

## 5.5.2 Atividade antibacteriana

### 5.5.2.1 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto, frações e compostos isolados de *L. corniculatus* pela metodologia de microdiluição em caldo

O extrato bruto hidroalcolóico e as frações aquosa e butanólica, foram consideradas inativas contra todas as bactérias testadas, por terem demonstrado CIM superiores a 1000 µg/mL. Segundo os critérios de Machado e colaboradores (2005), a fração HEX apresentou atividade fraca frente às bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Listeria monocytogenes*, e atividade moderada frente à bactéria *Bacillus cereus*, todas estas gram-positivas (Tabela 11).

O β-sitosterol, segundo classificação proposta por Rios e Recio (2005), se mostrou inativo frente às bactérias testadas, resultado também observado por outros autores (HESS et al., 1995; NAZIF, 2002) (Tabela 11). Já o ácido oleanólico, também isolado da fração HEX, apresentou atividade considerada moderada frente às bactérias gram-positivas: *Bacillus cereus* (CIM = 25 µg.mL<sup>-1</sup>) e *Listeria monocytogenes* (CIM = 25 µg.mL<sup>-1</sup>) (Tabela 11). Este resultado poderia explicar, em parte, a atividade antibacteriana apresentada pela fração HEX frente a estas mesmas bactérias. A ruptura da membrana celular bacteriana é o mecanismo de ação provável do ácido oleanólico frente às bactérias gram-positivas. Esta ruptura pode ser entendida pela diminuição da fluidez da membrana bacteriana ao incorporar o ácido oleanólico. Por exemplo, nas membranas biológicas dos animais, elas possuem diferentes concentrações de colesterol, cuja principal função é controlar o grau de fluidez das membranas. Estruturas que necessitam de membranas mais rígidas incorporam uma maior quantidade de colesterol. O provável aumento da rigidez da membrana celular bacteriana devido a incorporação do triterpeno é possível que leve a uma diminuição em sua mobilidade, podendo assim, ocasionar sua ruptura (COWAN, 1999).

A fração AcOEt apresentou atividade antibacteriana considerada fraca frente às bactérias gram-positivas: *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*, e contra a bactéria gram-negativa: *Acinetobacter calcoaceticus* com valores de CIM 800 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 11). Esta atividade pode ser atribuída à presença de flavonóides, ou outros compostos

fenólicos nesta fração, os quais segundo diversos autores possuem a habilidade de se complexar a parede celular bacteriana impedindo o seu crescimento e multiplicação (COWAN, 1999; CUSHNIE e LAMB, 2005).

O flavonóide canferitrina, isolado da fração AcOEt, mostrou atividade antibacteriana considerada excelente segundo critérios propostos por Rios e Récio (2005), frente aos microrganismos gram-positivos: *Enterococcus faecalis* ( $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *Bacillus cereus* ( $8,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Tabela 11). É importante destacar que este flavonóide foi capaz de inibir 1.6 mais potente, que o efeito antibacteriano demonstrado pela gentamicina, considerado fármaco de referência. Em 2001, Abdel-Ghani e colaboradores também demonstraram a atividade antibacteriana deste mesmo flavonóide, e que segundo os autores, foram comparáveis a potência de diversos antibióticos de uso comercial frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, o mecanismo de ação antibacteriano deste flavonóide foi estudado e a proposta é que o mesmo inibe a DNA topoisomerase II (DNA girase) (PIDDOCK et al., 1991), induzindo dano no DNA bacteriano (NORMAN et al., 2006), e conseqüentemente inibindo o crescimento e a multiplicação bacteriana (VOLLMER, 2006), além de inibir a enzima GTPase, sendo esta essencial para divisão celular bacteriana (URGAONKAR e SHAW, 2007).

Com base na classificação proposta por Okusa e colaboradores, 2007 podemos concluir que apenas o resultado apresentado pela canferitrina frente à bactéria *Enterococcus faecalis* pode ser classificada como bactericida, enquanto todos os outros resultados foram considerados como bacteriostáticos, já que apenas para este composto o valor do CBM (Tabela 12) não ultrapassou três diluições sucessivas o valor do seu CIM (Tabela 11).

Com base nestes experimentos, podemos destacar a importante atividade antibacteriana da canferitrina, já que os valores de CIM e CBM assemelham-se aos do antibiótico de referência gentamicina. Futuramente, após estudos *in vivo* de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica do composto, o mesmo poderá se tornar uma opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas pelo *Enterococcus faecalis* multiresistentes. Além disso, o tratamento das infecções causadas por esta bactéria é bastante limitado, devido à presença de diversos mecanismos de resistência intrínsecos

como a produção de enzimas beta-lactamases, por exemplo. É importante também salientar o aumento da resistência desta bactéria frente à Vancomicina e a Teicoplanina, antibióticos pertencentes à classe dos glicopeptídeos, que atualmente restringe praticamente a zero a chance de cura do paciente em infecções graves causadas por esta bactéria (DESHPANDE et al., 2007; CHOU et al., 2008).

Além disso, o canferitrina também demonstrou excelente atividade antibacteriana frente à bactéria *Bacillus cereus*, a qual é responsável por grande número de intoxicações alimentares relativas ao acondicionamento incorreto de alimentos processados e cozidos, como carnes e cereais como o arroz. Embora não seja uma bactéria que apresente grandes problemas de resistência frente aos antimicrobianos, é uma importante causa de óbitos em crianças em países subdesenvolvidos com problemas de saneamento básico, já que a mesma quando infecta o homem produz extensa diarreia comparável às causadas pelo *Vibrio cholerae* altamente debilitantes e geralmente necessitando de re-hidratação oral (OMBUI et al., 2001; OMBUI e NDUHIU, 2005).

Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima (CIM -  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do extrato bruto, frações e compostos isolados de *L. corniculatus* L.cv. São Gabriel

	EBH	F. HEX	F. Aq.	F. BuOH	F. AcOEt	$\beta$ -SIT	AOL	Canf.	Gent.
<b>Bactérias Gram-Positivas</b>									
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	>1000	100	>1000	>1000	800	>1000	25	8,5	0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>1000	600	>1000	>1000	800	300	300	3,9	6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	>1000	800	>1000	>1000	>1000	500	25	300	0,2
MRSA* ATCC 43300	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	100	200	>100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>1000	800	>1000	>1000	>1000	500	600	100	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	500	800	200	1,0
<b>Bactérias Gram-Negativas</b>									
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	6,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	>1000	600	>1000	>1000	800	800	600	100	6,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	6,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	1,0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	200	200	12,0
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC 9886	>1000	800	>1000	>1000	>1000	800	500	500	2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	800	800	500	1,0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	200	100	6,0
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12022	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	400	200	100	3,1

EBH = Extrato bruto hidroalcolico; F. HEX = Fração hexânica; F. Aq. = Fração aquosa; BuOH = Fração butanólica; F.AcOEt = Fração acetato etilica;  $\beta$ -SIT =  $\beta$ -sitosterol; AOL = Ácido Oleanólico; Canf=Canferitrina; Gent = Gentamicina; ATCC – Cepa padrão (*American Type Collection Culture*). MRSA\* = *Saphylococcus aureus* metilicina resistente.

Tabela 12. Concentração Bactericida Mínima (CBM -  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do extrato bruto, frações e compostos isolados de *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel

	EBH	F. HEX	F. Aq.	F. BuOH	F. AcOEt	$\beta$ -SIT	AOL	Canf.	Gent.
<b>Bactérias Gram-positivas</b>									
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	>1000	> 1000	>1000	>1000	>1000	>1000	200	34	0,4
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	900	>1000	7,4	12,0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	200	900	0,2
MRSA* ATCC 43300	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	800	800	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	> 1000	800	4,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	400	0,2
<b>Bactérias Gram-negativas</b>									
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	24,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 19606	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	12,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	12,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	4,0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	24,0
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC 9886	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	4,0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	800	12,0
<i>Shigella flexinerii</i> ATCC 12022	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	800	3,1

EBH = Extrato bruto hidroalcolico; F. HEX = Fração hexânica; F. Aq. = Fração aquosa; BuOH = Fração butanólica; F.AcOEt = Fração acetato etílica;  $\beta$ -SIT =  $\beta$ -sitosterol; AOL = Ácido Oleanólico; Canf=Canferitrina; Gent = Gentamicina; ATCC – Cepa padrão (*American Type Collection Culture*). MRSA\* = *Saphylococcus aureus* metilicina resistente.

### 5.5.3 Atividade anti-inflamatória

#### **Efeito da *L. corniculatus* sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos (Pleurisia)**

Inicialmente, neste modelo foram realizadas curvas dose-resposta para avaliar a atividade anti-inflamatória de *L. corniculatus* L. cv. São Gabriel, onde foram escolhidas as menores concentrações (doses) do extrato, frações e compostos isolados, capazes de inibir de forma significativa a migração leucocitária e a exsudação no lavado pleural de camundongos inflamados (Resultados não demonstrados).

A tabela 13 mostra o efeito do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de *L. corniculatus* cv. São Gabriel sobre a migração de leucócitos, exsudação e atividade da Mieloperoxidase, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Estes parâmetros são considerados marcadores da resposta inflamatória aguda (KELLY et al., 2007). Neste estudo da curva dose-resposta, verificou-se que a melhor dose do extrato bruto hidroalcolico, frações e compostos isolados de *L. corniculatus* foram efetivos em inibir a resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos, foram: 200mg/Kg (Extrato bruto e fração acetato etílica) e 100 mg/Kg (Frações Aquosa, Butanólica e Hexânica) (Tabela 13). Os compostos ácido oleanólico e o  $\beta$ -sitosterol, ambos isolados da fração hexânica, foram efetivos na dose de 50 mg/kg, enquanto a canferitrina, isolada da fração acetato etílica foi efetiva na dose de 100 mg/kg (Tabela 13).

Observou-se assim, uma significativa inibição na migração de leucócitos por parte do EB, fração e compostos isolado, quando comparados ao grupo de animais não tratados. Para este parâmetro inflamatório, vale a pena destacar que a canferitrina foi 4,3 vezes mais potente em inibir a MPO que o fármaco de referência dexametasona. A MPO é uma enzima presente no citoplasma dos neutrófilos e está relacionada à atividade fagocítica celular. Também foi observada uma inibição semelhante para os leucócitos do tipo neutrófilos. Neste caso, o ácido oleanólico, que já tinha apresentado uma inibição na migração de leucócitos totais levemente superior aos outros dois metabólitos isolados, mostrou forte inibição na migração de neutrófilos (71,6%) na dose de 50 mg/Kg.

Outro importante parâmetro inflamatório analisado nestes experimentos foi o acúmulo de líquido na cavidade pleural, chamado também de exsudação. Parâmetro este, que por sua vez foi diminuído de forma significativa quando os camundongos foram tratados com o extrato bruto, as frações HEX e AcOEt e com os compostos isolados, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol e canferitrina (Tabela 13). A exsudação está relacionada diretamente ao aumento da permeabilidade capilar, infiltração de células inflamatórias e principalmente com a liberação de óxido nítrico (NO) durante o processo inflamatório (TRIPATHI et al., 2007).

Em nossos experimentos evidenciamos que, as concentrações de nitrito/nitrato, marcadores dos níveis de NO, foram significativamente diminuídas nos animais tratados previamente com o extrato bruto hidroalcolico, frações e compostos isolados da *L. corniculatus* v. São Gabriel (Tabela 14), o que explicaria pelo menos em parte, a diminuição nos níveis de exsudação observado quando os animais foram tratados com o extrato, frações e compostos isolados. Embora esta inibição tenha sido obtida apenas com altas doses do extrato bruto (400 mg/kg) e para as frações hexano (200 mg/kg) e acetato de etila (800 mg/kg) (Tabela 14).

Desta forma, os resultados obtidos para o material vegetal da *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel, demonstraram importante atividade anti-inflamatória, e seus constituintes, canferitrina, ácido oleanólico e  $\beta$ -sitosterol tem uma importante participação nessa atividade. Além disso, os compostos isolados testados representam uma futura possibilidade de tornarem-se protótipos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias.

Tabela 13 – Valores absolutos e percentagem de inibição do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de *L. corniculatus* cv. São Gabriel sobre a migração de leucócitos, exsudação e atividade da Mieloperoxidase, na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Grupos	Leucócitos Totais ( $\times 10^6$ )	% de inibição	Neutrófilos ( $\times 10^6$ )	% de inibição	Exsudação ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% de inibição	MPO ( $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ )	% de inibição
Sal <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,1	-	0,47 $\pm$ 0,1	-	1,48 $\pm$ 0,3	-	42 $\pm$ 2,5	-
Cg <sup>a</sup>	6,20 $\pm$ 0,3	-	5,08 $\pm$ 0,3	-	11,50 $\pm$ 1,0	-	334 $\pm$ 36,7	-
Dexa 0,5 <sup>b</sup>	1,75 $\pm$ 0,3 **	71,7 $\pm$ 5,0	1,33 $\pm$ 0,2 **	73,8 $\pm$ 4,2	6,51 $\pm$ 0,5 **	43,3 $\pm$ 7,8	135 $\pm$ 14,6 **	59,4 $\pm$ 7,0
EBH 200 <sup>b</sup>	3,80 $\pm$ 0,4 **	38,7 $\pm$ 5,8	3,17 $\pm$ 0,2 **	37,7 $\pm$ 5,2	8,58 $\pm$ 0,6 *	25,4 $\pm$ 5,3	121 $\pm$ 19,9 **	65,5 $\pm$ 4,7
HEX 100 <sup>b</sup>	4,58 $\pm$ 0,3 *	26,1 $\pm$ 5,0	3,97 $\pm$ 0,3 *	21,8 $\pm$ 6,7	8,85 $\pm$ 1,5 *	23,0 $\pm$ 9,4	176 $\pm$ 38,8 *	47,4 $\pm$ 11,6
AcOEt 200 <sup>b</sup>	4,91 $\pm$ 0,4 *	20,0 $\pm$ 6,7	4,02 $\pm$ 0,3 *	20,9 $\pm$ 7,4	7,64 $\pm$ 0,7 *	33,6 $\pm$ 6,6	141 $\pm$ 14,8 **	57,9 $\pm$ 4,4
BuOH 100 <sup>b</sup>	4,07 $\pm$ 1,2 *	34,6 $\pm$ 9,3	3,36 $\pm$ 0,5 *	35,7 $\pm$ 9,7	9,59 $\pm$ 1,1	20,4 $\pm$ 7,5	303 $\pm$ 45,7	14,5 $\pm$ 10,4
Aq. 100 <sup>b</sup>	3,73 $\pm$ 0,8 **	39,1 $\pm$ 13,1	2,84 $\pm$ 0,6 **	39,6 $\pm$ 11,8	10,4 $\pm$ 1,2	15,7 $\pm$ 7,3	220 $\pm$ 42,1 *	34,2 $\pm$ 12,6
Canferitrina 100 <sup>b</sup>	4,00 $\pm$ 0,5 *	35,5 $\pm$ 8,0	3,37 $\pm$ 0,4 *	34,4 $\pm$ 8,6	7,25 $\pm$ 0,4*	37,0 $\pm$ 3,3	31,50 $\pm$ 11,3 **	92,0 $\pm$ 2,8
Ác.Oleanólico 50 <sup>b</sup>	3,08 $\pm$ 0,6 **	43,1 $\pm$ 11,3	2,42 $\pm$ 0,6 **	45,5 $\pm$ 7,0	6,61 $\pm$ 0,4 *	42,6 $\pm$ 3,9	182,00 $\pm$ 72,2 **	23,2 $\pm$ 9,9
$\beta$ -sitosterol 50 <sup>b</sup>	4,42 $\pm$ 0,7 **	33,9 $\pm$ 9,4	3,66 $\pm$ 0,7 **	36,7 $\pm$ 12,6	8,26 $\pm$ 1,1 *	33,1 $\pm$ 2,3	85,80 $\pm$ 56,3 **	61,7 $\pm$ 17,6

Sal = Animais tratados com solução salina (Controle negativo); Cg = Animais tratados com carragenina (1 %) (Controle Positivo); Dexa = animais pré-tratados com dexametasona (mg/kg); EBH = animais pré-tratados com extrato bruto hidroalcolico (mg/kg); HEX = animais pré-tratados com fração hexânica (mg/kg); AcOEt = animais pré-tratados com fração acetato etílica (mg/kg); BuOH = animais pré-tratados com fração butanólica (mg/kg); Aq. = animais pré-tratados com fração aquosa (mg/kg). Canferitrina = animais pré-tratados com canferitrina (mg/kg); Ác. Oleanólico = animais pré-tratados com ácido oleanólico (mg/kg);  $\beta$ -sitosterol = animais pré-tratados com  $\beta$ -sitosterol (mg/kg); a = administrado por via intrapleurial; b = administrado por via intraperitoneal; % de inibição = % de inibição entre grupos tratados, em relação ao grupo controle inflamado (Cg). \*: P < 0,05, \*\*: P < 0,01, N = 5 animais por grupo.

Tabela 14: Efeito do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados de *L. corniculatus* cv. São Gabriel sobre as concentrações de óxido nítrico e sua percentagem de inibição em relação ao controle inflamado (Cg), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Grupos	NO <sub>x</sub> (μM)	% de inibição
Sal <sup>a</sup>	2,94 ± 1,33	-
Cg <sup>a</sup>	16,40 ± 1,56	-
Dexa 0,5 <sup>b</sup>	5,80 ± 1,20 **	75,6 ± 2,6
EBH 400 <sup>b</sup>	11,40 ± 0,93 *	29,4 ± 5,6
HEX 200 <sup>b</sup>	10,80 ± 1,63 *	32,8 ± 10,2
AcOEt 800 <sup>b</sup>	10,10 ± 0,89 **	37,0 ± 5,5
BuOH 100 <sup>b</sup>	14,9 ± 0,65	8,6 ± 4,1
Aq. 400 <sup>b</sup>	9,16 ± 0,69 **	44,1 ± 4,2
Canferitrina 100 <sup>b</sup>	11,00 ± 0,69 *	32,9 ± 4,2
Ác.Oleanólico 50 <sup>b</sup>	10,50 ± 0,93 *	35,9 ± 5,6
β-sitosterol 50 <sup>b</sup>	10,60 ± 0,53 *	35,2 ± 3,2

Sal = Animais tratados com solução salina (Controle negativo); Cg = Animais tratados com carragenina (1 %) (Controle Positivo); Dexa = animais pré-tratados com dexametasona (mg/kg); EBH = animais pré-tratados com extrato bruto hidroalcolico (mg/kg); HEX = animais pré-tratados com fração hexânica (mg/kg); AcOEt = animais pré-tratados com fração acetato etílica (mg/kg); BuOH = animais pré-tratados com fração butanólica (mg/kg); Aq. = animais pré-tratados com fração aquosa (mg/kg). Canferitrina = animais pré-tratados com canferitrina (mg/kg); Ác. Oleanólico = animais pré-tratados com ácido oleanólico (mg/kg); β-sitosterol = animais pré-tratados com β-sitosterol (mg/kg); a = administrado por via intrapleurial; b = administrado por via intraperitoneal; % de inibição = % de inibição entre grupos tratados, em relação ao grupo controle inflamado (Cg). \*: P < 0,05, \*\*: P < 0,01, N = 5 animais por grupo.

## 6 CONCLUSÕES

A) Em relação ao estudo fitoquímico:

- A análise fitoquímica preliminar do extrato bruto permitiu a identificação das seguintes classes de compostos: esteróides, terpenos, flavonóides, fenóis, taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonóis, flavononóis, saponinas e xantonas. Embora no estudo fitoquímico, foi possível isolar e identificar-se apenas três compostos: os terpenos  $\beta$ -sitosterol e o ácido oleanólico oriundos da fração HEX e o flavonóide heterosídeo canferitrina isolado da fração AcOEt.

B) Em relação ao estudo das atividades biológicas:

-O extrato bruto e frações de *L. corniculatus* apresentaram discreta atividade antioxidante.

- No estudo da atividade antibacteriana, podemos destacar a boa atividade do ácido oleanólico e a atividade excelente da canferitrina frente à bactéria gram-positiva *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*.

- A *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel demonstrou importante atividade anti-inflamatória. E seus constituintes, canferitrina, ácido oleanólico e  $\beta$ -sitosterol parecem ser os principais responsáveis por essa atividade. A canferitrina apresentou melhor atividade antibacteriana e anti-inflamatória demonstrando ser um importante composto a ser estudado para o desenvolvimento de um novo fármaco com potencial anti-inflamatório e/ou antimicrobiano.

## REFERENCIAS

ABDEL-GHANI, A. E.; HAFEZ, S. S.; ABDEL-AZIZ, E. M.; EL-SHAZLY, A. M. **Phytochemical and Biological Studies of *L. corniculatus* cv. *ternuifolius* L. Growing Egypt**. Alex. Journal Pharmaceutical Science 2001; 15(2): 103-108.

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae**. University of Wisconsin Press: Madison, p.401-405, 1981.

ANAGNOSTOPOULOU, M.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. **Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet Orange peel (*Citrus sinensis*)**. Food Chemistry, v. 94, n.1, p. 19-25, 2006.

ARAÚJO, J. C.; JACQUES, A. V. A. **Características morfológicas e produção de matéria seca de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) colhido em diferentes estádios de crescimento e a duas alturas corte**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.3, n.2, p.138-147, 1974a.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo**. Química Nova, v. 29, n 1, 2006.

BOSIO, K., AVANZINI, C., D'AVOLIO, A., OZINO, O. and SAVOIA, D. **In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes***. Letter in Applied Microbiology, v, 31, p. 174–177, 2000.

BOVE, P.F.; VAN DER VLIET, A. **Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation**. Free Radical Biology & Medicine, v. 41, n. 4, p. 515-527, 2006.

BRUYNE, T. **Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 27, p. 445-459, 1999.

BRADES, D.; FREITAS, E. A. G. de. **Taninos condensados – uma ferramenta para melhorar o desempenho de ruminante**. Agropecuária Catarinense, Lages, v.5, n.3, 1992.

CALIXTO, J.B. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B., **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Moderna**. Editora Argos, 2001, p. 79.

CALIXTO, J.B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos**. Ciência e Cultura, v. 55, n. 3, 2003.

CARNEIRO, M. C. **Relação entre anatomia quantitativa e valor nutritivo de *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. e *Trifolium repens* L. (Leguminosae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Área de concentração: Botânica. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2002.

CAROSO, G. F.; PAIM, N. R.; MARKUS, R. **Avaliação de clones de *Lotus uliginosus* Schkuhr. em blocos de policruzamento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.17, n.4, p.617-622, 1982.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. **Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*** . v. 64, p. 393-396, 1998.

CHEN, Z.; HU, Y.; WU, H.; JIANG, H. **Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents**. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 14, p. 3949-3952, 2004.

CHISOLM, G.M.; STEINBERG, D. **The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview**. Free radical biology and medicine, v. 28, n.12, p. 1815 – 1826, 2000.

CHOU, Y.; LIN, T.; LIN, J.; WANG, N.; PENG, M.; CHANG, F. **Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis***. Journal of Microbiology, Immunology and Infectionh, v. 41, p. 124-129, 2008.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Fifteenth Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA, 2005.

CORSINI, E.; Di PAOLA, R.; VIVIANI, B.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; CUZZOCREA S. **Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats.** *Immunology*, v. 115, p. 253-261, 2005.

COWAN, M. M. **Plant Products as Antimicrobial Agents.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T., LAMB, J. A. **Antimicrobial activity of flavonoids.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.

DABU-BONDOC, S.; FRNACO, S. **Risk-benefit perspectives in COX-2 blockage.** *Current Drug Safety*, v.3, n.1, p. 14-23, 2008.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.** *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy.** *Transplant Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.

DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R. MÓET, G.J.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. **Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, n. 2., p. 163-170, 2007.

DI ROSA, M.; IALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTEBIN, L. **Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 54, n. 4, p. 229-238, 1996.

EL MOUSALLAMI, A.M.D.; AFIFI, M.S.; HUSSEIN, S.A.M. **Acylated flavonol diglucosides from *Lotus polyphyllus*.** *Phytochemistry*, v. 60, p. 807-811, 2002.

FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.** *Mediators of Inflammation*, v. 10, n. 4, p. 223-227, 2001.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B. **Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids.** Analytical Biochemistry, v. 126, p. 131-138, 1982.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** Molecular aspects of medicine, v. 27, p.1-93, 2006.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine.** Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, J.B. **The flavonoids – advances in research since 1986.** London: Chapman & Hall, 1994.

HEIN, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** Journal of Nutritional Biochemistry, v. 13, p. 572-584, 2002.

HESS, S.C.; BRUM, R. L.; HONDA, N.K.; CRUZ, A.B.; MORETTO, E., CRUZ, R.B.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Antibacterial activity and phytochemical analysis of Vochysia divergens (Vochysiaceae).** Journal of Ethnopharmacology, n. 47, v. 2, p. 97-100, 1995.

[http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Lotus\\_corniculatus\\_page.html](http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Lotus_corniculatus_page.html)- Acesso em 17/12/2008.

[http://farm4.static.flickr.com/3058/2530571836\\_7c11140ed2.jpg?v=0](http://farm4.static.flickr.com/3058/2530571836_7c11140ed2.jpg?v=0) – Acesso em 17/12/2008.

HUGHES, H. D. Cuernecillo. In: HUGHES, H. D.; HEATH, M.; METCALFE, D. S. **Forages: la ciencia de la agricultura basada em la producción de pastos.** México: Compañía Editora Continental, 1981, p.215-232.

JOHNSON, T.L.; FORBES, B.A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K.D. **Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction.** American Journal of Clinical Pathology, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 10<sup>a</sup> Edição. Companhia Editora Nacional, SP. 1991.

JORGE, A.P., HORST, H., DE SOUSA, E., PIZZOLATTI, M.G., SILVA, F.R. **Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle**. *Chemico-biological interactions*, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

KAPLAN, M.; MUTLU, E.A.; BENSON, M.; FIELDS, J.; BANAN, A.; KESHAVARZIAN, A.. **Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders**. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 15, n. 3, p. 207-216, 2007.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. **Modulating leukocyte recruitment in inflammation**. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KOVGANKO, N.V.; KASHKAN, N. Zh.; BORISOV, E.V. **<sup>13</sup>C NMR Spectra of functionally substituted 3 $\beta$ -chloroderivatives of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol**. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 36, No. 6, 2000.

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. **Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora***. *Pharmaceutical Biology*, v.43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, C. A.; VEIGA JR., V. F. **Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHATU, S. B.; KUNDU, A. **<sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features**. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2<sup>a</sup> Edição. Fortaleza: UFC, 1997. 141p.

MEAGHER, L. P., LANE, G.; SIVAKUMARAN, S.; TAVENDALE, M.H.; FRASER, K. **Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry**. *Animal Feed and Science Technology*, v. 117, p. 151-163, 2004.

MOKBEL, M.S.; HASHINAGA, F. **Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues.** Food Chemistry, v. 94, n. 4, p. 529-534, 2006.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. **Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model.** Journal of Ethnopharmacology, v. 19, n. 2, p. 281-288, 2007.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** Nature, v. 420, p. 846-852, 2002.

NAZIF, N. M. **Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity.** Food Chemistry, v. 76, Issue 1, p.77-81, 2002.

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. **A flow cytometry-optimized assay using an SOS-green fluorescent protein (SOS-GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments.** Journal of Mutant Research, n 603, v1, p. 164-172, 2006.

OKUSA, P.N., PENGE, O., DEVLEESCHOUWER, M., DUEZ, P. **Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (*Boraginaceae*).** Journal of Ethnopharmacology, v, 112, p. 476-81, 2007.

OLIVEIRA, J. C. P.; PAIM, N. R.; FRIES, L. A. **Comparação entre três procedimentos na seleção de plantas individuais em *Lotus* spp.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.25, n.7, p.955-961, 1990.

OMBUI, J.N.; KAGIKO, M.M.; ARIMI, S.M. **Foodborne diseases in Kenya.** East African Medical Journal, n. 78, v. 1, p. 40-44, 2001.

OMBUI, J.N.; NDUHIU, J.G. **Prevalence of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and its enterotoxins in milk and milk products in and around Nairobi.** East African Medical Journal, n.82, v.6, p. 280-284, 2005.

PAIM, N. R. **Research on *Lotus* spp. In Rio Grande do Sul, Southern Brazil.** Lotus Newsletter, Columbia, v.19, p.37-43, 1988.

PATTISON, D.I.; DAVIES, M.J. **Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases.** Current Medicinal Chemistry, v. 13, n. 27, p. 3271-3290, 2006.

PIDDOCK, L. J. V.; WALTERS, R. N.; DIVER, J. **Phenotypic characterization of quinolone-resistant mutants of Enterobacteriaceae selected from wild type, *gyrA* type and multiply-resistant (*marA*) type strains.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 28 n.2, p.185-98, 1991.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. **Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria.** Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. **Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation .** Inflammation, 1993, v. 17, p. 723-741.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e domesticação de plantas medicinais.** In: SIMÕES, C.M.O. et al. (org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2004, P. 45-74.

REYNAUD, J.; LUSSIGNOL, M. **The flavonoids of *L. corniculatus*.** Lotus Newsletter, v. 35, n.1, p. 75-82, 2005.

RICCIARDOLO, F.L. **Multiple roles of nitric oxide in the airways.** Thorax, v. 58, n. 2, p. 175-182, 2003.

RIOS, J. L.; RECIO, M.C. **Medicinal plants and antimicrobial activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 100, p. 80-84, 2005.

RISSO, D.; CARÁMBULA, M. Lotus El Rincón. **Producción, y utilización de los mejoramientos.** Boletín de Divulgación, n.65, INIA, p 32, 1998.

SALEH, T.S., CALIXTO, J.B., MEDEIROS, Y.S. **Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy.** *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 811-819, 1996.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. **Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan.** *Peptides*, v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SCHENKEL, E.P. et al. **Cuidados com os medicamentos.** 3 ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, p.41-141, 1998.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. **Analysis of Inflammation.** *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 93-151, 2006.

SHARIFIFAR, F.; DEHGH-NUDEH, G.; MIRTAJALDINI, M. **Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L.** *Food Chemistry*, v. 112, p. 885-888, 2009.

SHERER, R., GODOY, H.T. **Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method.** *Food Chemistry*, v. 112, p. 654-658, 2009

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

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERÉNZI, H. **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana.** *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N. **Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts.** *Food Control*, v. 18, p. 409-413, 2007

TAKEUCHI, K.; WATANABE, H.; TRAN, Q.K.; OZEKI, M.; SUMI, D.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; IGNARRO, L.J.; OHASHI, K.; HAYASHI, H. **Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I<sub>2</sub> production and nitric oxide synthase expression.** *Cardiovascular Research*, v. 62, n.1, p.194-201, 2004.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P. KASHYAP, L.; SINGH, V. **The role of nitric oxide in inflammatory reactions**. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 51, n. 3, p. 443-452, 2007.

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; ALLAIS, D.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DUROUX, J. **Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas**. Food Chemistry, v. 80, p. 399-407, 2003.

URGAONKAR, S, SHAW, J.T. **Synthesis of kaempferitrin**. Journal of Organic Chemistry, n. 72, v. 12, p. 4582-4585, 2007.

VARGAS, A.J.; GEREMEIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. **Passiflora alata and Passiflora edulis spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy**. Fitoterapia, v. 78, n. 2, p. 112-119, 2007.

VASS, G.; HORVÁTH, I. **Adenosine and adenosine receptors in the pathomechanism and treatment of respiratory diseases**. Current Medicinal Chemistry, v. 15, n. 9, p. 917-22, 2008.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, v. 29, nº2, 2006.

VOLLMER, W. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 73, p. 37-47, 2006.

WAGHORN, G. **Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – Progress and challenges**. Animal Feed and Science Technology, *In Press*, Corrected Proof, Available online 24 October 2007.

WATERMAN, P.G., MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, p. 238, 1994.

WHO. **World Health Organization**. Bulletin of World Health Organization, v.33, p. 567, 1984.

WOISKY, R. G.; SALANTINO, A. **Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.** Journal of Apiculture Research, v. 37, p. 99-105, 1998.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. **Flavonóides.** In: SIMÕES, C.M.O. et al. (org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2004. P. 576-614