**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**
**(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biologia Celular e Molecular)**

# IDENTIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO MORFOANATÔMICA E FARMACOGNÓSTICA DAS FOLHAS DE *Solanum scuticum* M. Nee E BIOATIVIDADE DE EXTRATO BRUTO EM MICROORGANISMOS E DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA EM CÉLULAS CULTIVADAS DA LINHAGEM VERO

**LESLIVAN UBIRATAN DE MORAES**
**Dissertação de Mestrado apresentada ao**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:Biologia Celular e Molecular) para obtenção do título Mestre**
**Orientadora: Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais**

**BANCA EXAMINADORA**

1. _____
2. _____
3. _____

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para suportar as dificuldades em todos os momentos e nunca ter me deixado só.

Ao Programa de Pós Graduação da Universidade Federal de Goiás, por ter me acolhido no Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Ao chefe do departamento de medicina da UCG professor MS Paulo Luiz C. Francescantonio pela amizade, compreensão e apoio na difícil tarefa de conciliar trabalho e pós-graduação.

À minha orientadora, professora Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais por ter me aceitado como seu orientando. Agradeço pelo apoio moral e confiança na minha capacidade intelectual. Além das sábias colocações próprias de uma grande orientadora.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula, Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Farmácia/UFG, pelo apoio no desenvolvimento de habilidades na pesquisa de produtos naturais. Obrigado pelo exemplo de humildade e retidão.

À professora Drª Wilia Marta E. D. de Brito, Laboratório de Virologia Animal do IPTESP/UFG, pela oportunidade de aprender a difícil ciência e arte do cultivo celular.

À amiga e professora Drª Daniela Melo e Silva, pelo carinho, atenção e ajuda desde que nos conhecemos.

À Professora Drª Fabiana Cristina Pimenta, IPTESP/UFG, pelas preciosas orientações dos testes antimicrobianos.

À professora Drª Marize Campos Valadares, pelo espaço que abriu na busca das soluções dos problemas operacionais no cultivo celular na execução do meu trabalho.

Ao professor Dr. Áureo Yamada, Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia da Unicamp, pela ajuda na finalização do trabalho com cultivo celular, carinho, amizade e pelo exemplo de professor e pesquisador que almejo um dia ser.

Ao professor Dr. Tomomasa Yano e sua equipe do Laboratório de Antígenos Bacterianos I do Departamento de Microbiologia da Unicamp pelo apoio e suporte em várias etapas da execução deste trabalho.

À professora Drª Maria de Fátima Agra pela prontidão em ajudar da identificação da espécie estudada na presente dissertação.

À professora Drª Rosa Elisa Carvalho Linhares, Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda na obtenção de algumas linhagens celulares utilizadas em meu trinamento.

Aos meus amigos do Laboratório de Comportamento Celular/UFG pela ajuda e companherismo.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFG pelo carinho e paciência com as minhas limitações.

Aos amigos do IPTEST pela amizade sempre constante.

À Coordenadoria de Aperfeicoamento de Pessoal de Ensino Superio (CAPES), pelo apoio no meu desenvolvimento profissional.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pela fé que depositam em mim.

À minha noiva, Francis Lara, pela compreensão e apoio nos meus momentos de ausência.

À minha tia Marli, pelos cuidados que teve comigo durante a vida.

Ao meu tio Iron, pelo apoio e amor que me deu durante a sua passagem aqui na Terra.

Ao meu grande amigo, professor Luiz Murilo Martins Cardoso pelo carinho, amizade e pelo modelo de idoneidade.

À minha estimada amiga professora Drª Vera Saddi, pela sua amizade incondicional.

Ao meu amigo Amilton Sousa Bastos, pela ajuda e exemplo de autruismo.

Ao meu amigo professor Dr Adhemar Longato, pelo exemplo de cientista e apoio no início dessa caminhada.

Aos meus amigos Rogério e Rodolfo Carvalho, pela ajuda em etapas dessa caminhada.

Aos meus amigos Daniel Zata, Tatiana Fiuza e Leonice Tresvenzol, pelo companherismo nos momentos difíceis.

A minha amiga Sônia Yamada, pelo carinho e cuidado, em um dos momentos mais difíceis dessa dissertação.

Ao professor Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela ajuda e atenção.

Aos meus queridos alunos da UCG, pelo apoio e incentivo para realizar ciência.

A todos os meus amigos da Universidade Católica de Goiás e da Universidade Federal de Goiás, pela constância e amizade.

E a que não tive tempo de me referir nesse curto espaço, mas que com certeza, deveria referendar.

***Meus sinceros e profundos agradecimentos***

# EPÍGRAFE

"Lutar com palavras
é a luta mais vã.
Entanto lutamos
mal rompe a manhã.
São muitas, eu pouco."

***Carlos Drummond de Andrade***

## APRESENTAÇÃO

A medicina popular emprega comumente plantas como medicamentos tendo como base as tradições. As pesquisas na área farmacológica descrevem que os usos destes materiais possam ser benéficos, contudo pode haver efeitos colaterais ou mesmo utilizações inadequadas de componentes bioativos. Neste sentido, pesquisas que visem propor modelos de análise para identificação da bioatividade de extratos e frações obtidas de plantas têm sido realizadas amplamente realizadas.

Dentre as pesquisas realizadas temos como modelo biológico as células em cultura. Estas não esbarram em questões éticas de grande relevância, como ocorre com as pesquisas com animais. O modelo de cultivo celular é utilizado freqüentemente tanto no entendimento da formação de células tumorais, pela transformação de células que naturalmente não são imortalizadas, quanto na pesquisa de novos quimioterápicos a partir de recursos naturais tão ameaçados atualmente. Tendo em vista o aumento da incidência de casos de câncer e a resistência de células tumorais à certos quimioterápicos, a busca de novos recursos terapêuticos é fundamental. Assim, pesquisas com tal objetivo devem ser amplamente estimuladas.

## RESUMO

A espécie de jurubeba estudada no presente trabalho é *Solanum scuticum* M. Nee, da qual não eram disponíveis dados farmacognósticos e nem morfoanatômicos para Goiás. Para a avaliação morfoanatômica das folhas *S. scuticum* realizaram-se cortes à mão livre e cortes permanentes como descrito por Kraus e Arduin (1997). Para realização de triagem fitoquímica utilizou-se as metodologias descritas por Costa (2001). Com na triagem fitoquímica, foram identificados alcalóides, flavonóides cumarinas, heterosídios antraquinônicos e heterosídios saponínicos na prospecção fitoquímica. O extrato etanólico das folhas foi obtido e apartir do mesmo procedeu-se o fracionamento por diferença de polaridade, e realizaram-se avaliações dos seus componentes através de cromatografia de camada delgada. Testou-se a esterelidade da droga em pó e a possível atividade antimicrobiana do extrato bruto hidoalcoólico de *S. scuticum.* Tal avaliação não revelou a presença de microrganismos, sendo levantada a possível atividade antimicrobiana do extrato bruto frente a vinte e três cepas de bactérias e duas de leveduras. Os testes demonstraram também a dificuldade de solubilização das frações, as quais seriam utilizadas nos experimentos de cultura de células da linhagem Vero. Sendo averiguada baixa atividade anti-microbiana do extrato hidroalcóolico bruto. Tendo em vista as atividades biológicas do grupo dos alcalóides procedeu-se à obtenção da fração alcaloídica a partir do pó das folhas. Pelos testes antimicrobianos o extrato apresentou características de difícil solubilidade em meio aquoso, a melhor diluição para emprego do extrato foi obtida em dimetilsulfóxido (DMSO) 50%. Das frações a que possuiu melhor solubilidade em DMSO foi à alcaloídica, na concentração de 0,3%. Assim procedeu-se a diluição e a avaliação da atividade da fração alcaloídica em células da linhagem Vero, avaliando-se a morfologia, viabilidade e proliferação celular frente aos tratamentos

realizados. Verificando-se atividade citotóxica da fração alcaloídica tanto nas avaliações estatísticas do teste de vitalidade por azul de Trypan, quanto nas alterações morfológicas compatíveis com alterações citotóxicas.

# ABSTRACT

The jurubeba was identified that such species was *Solanum scuticum* M. Nee, from which pharmacognostic and morphanatomic data were not available to Goiás. Because of that, we tried some complementary data. For the morphoanatomic evaluation of the leaves some cuts were carried out as described by Kraus and Arduin (1997). For the phytochemical trial, it was used some methodologies as described by Costa (2001). With the phytochemical screening, were identified alkaloids, flavonoids, coumarins, anthraquinones and saponins in prospecting phytochemical. Both in phytochemical trial, as in the phytochemical prospection, it was found alkaloids. Due to the biological activities of these secondary metabolites, we obtained the alkaloid fraction, using the dust of the leaves, and we got the ethanol extract. The fractions were divided by polarity and they were evaluated by thin-layer chromatography. Microbiological evaluation was carried out to verify possible contaminants. Such evaluation did not reveal the presence of microorganisms, and it was raised the possibility of antimicrobiotic activity of the raw extract in twenty three strains of bacteria and in two yeasts. According to the antimicrobial tests, the extract presented some features, as the difficult of solubility in aqueous medium, and the best dilution was achieved in dimethyl sulfoxide (DMSO) 50%. These tests also demonstrated the difficult of the solubilization of the fractions, which it will be used in the experiments of Vero cells cultures. It was verified the low antimicrobial activity of the raw hidroethanolic extract. Of all the fractions, the alkaloid fraction presented the best solubility in DMSO 0.3%. So, it was proceeded the dilution and the evaluation of the alkaloid fraction in Vero cells, and it was evaluated morphology, viability and cellular proliferation. We finally verified the citotoxicity of the alkaloid fraction in the statistical analyses, and in the vitality test carried out

by Trypan blue, and also in the morphological alterations compatible to citotoxity alterations.

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO** 1

**1.1. O bioma Cerrado – Fisionomia e importância**

**1.1.1. O enfrentamento das ações preservacionistas e o desafio do desenvolvimento industrial** ..... 16

**1.2. Aspectos gerais das solanáceas e empregos na medicina popular** ..... 12

**1.3. Fitoquímica - princípios básicos e obtenção de compostos para testes** .....

**1.4. Bioensaios para avaliação de atividade dos extratos e frações de plantas** .....

**1.4.1. Atividades anti-microbianas de substâncias obtidas de plantas** .....

**1.4.2. Atividades verificadas in vivo** .....

**1.4.3. Atividade de modelos celulares in vitro** .....

**2. Objetivos** .....

**2.1. Objetivos gerais** .....

**2.2. Objetivos específicos** .....

**3. Materiais e métodos** .....

**3.1. Coleta, taxonomia e processamento do material botânico** .....

**3.2. Fitoprospecção**.....

**3.2.1. Doseamento de Flavonóides** .....

**3.2.2. Determinação do teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis** .....

**3.3. Obtenção dos extratos e frações** .....

**3.3.1. Obtenção do extrato etanólico** .....

**3.3.2. Obtenção das frações do extrato etanólico** .....

**3.3.3. Obtenção da Fração Alcaloídica** .....

**3.4. Análise das frações** .....

**3.5. Bioensaios para averiguação dos efeitos biológicos** .....

**3.5.1 Avaliação de esterilidade e atividade antimicrobiana**

**do extrato etanólico (concentração inibitória mínima) .....**

**3.5.2. Efeitos da fração alcaloídica em células cultivadas da linhagem Vero .....**

**3.5.2.1. Cultivo celular .....**

**3.5.2.2. Avaliação da viabilidade celular .....**

**3.5.2.3. Preparo da solução da fração alcaloídica e dos controles para os testes em cultivo celular .....**

**3.5.2.4. Avaliação da viabilidade celular frente à fração .....**

**3.5.2.5. Coloração pelo Giemsa .....**

**3.5.2.6. Reação de imunocitoquímica para anti-PCNA .....**

**3.6. Obtenção e tratamento das imagens .....**

**3.6.1. Fotomicrografias em microscópio invertido com contraste de fase e microscópio de campo e microscópio de fluorescência .....**

**3.6.1.1. Avaliação qualitativa .....**

**3.6.1.2. Avaliação quantitativa dos núcleos marcados com anti-PCNA .....**

**3.7. Análises Estatísticas .....**

**4. Resultados .....**

**4.1. Dados botânicos e taxonômicos .....**

**4.1.1. Identificação e descrição macroscópica da folha .....**

**4.1.2. Descrição microscópica .....**

**4.1.2.1. Lâmina foliar .....**

**4.1.2.2. Pecíolo .....**

**4.1.2.3. Microscopia de pó de folhas .....**

**4.2. Dados da fitoprospecção .....**

**4.2.1. Índice de espuma .....**

**4.2.2. Doseamento de flavonóides .....**

**4.2.3. Determinação de índice de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis .....**

**4.3. Dados dos extratos e frações .....**

**4.3.1. Rendimento do extrato etanólico .....**

**4.3.2. Rendimento das frações do extrato etanólico .....**

**4.3.3. Rendimento da fração alcaloídica e testes de precipitação de alcalóides .....**

**4.3.4. Análise cromatográfica das frações .....**

**4.4. Efeitos microbiológicos .....**

**4.5. Efeitos em células cultivadas - Linhagem Vero .....**

**4.6. Resultados da imunocitoquímica dos núcleos de Células Vero marcados com anti-PCNA .....**

**4.7. Dados estatísticos teste de viabilidade celular pelo método de azul de Trypan .....**

**5 – DISCUSSÃO .....**

**6 – CONCLUSÕES .....**

**7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....**

**8 – ANEXOS .....**

**LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1 –** Representando os Biomas Brasileiros e suas distrinuições (IBGE, 2004)

**FIGURA 2 –** Fluxograma para obtenção de compostos biologicamente ativos e testes associados como foi esquematizado por Filho e Yune (1998).

**FIGURA 3 –** Folhas e frutos de *S. scuticum* coletados na região de Goiânia – GO.

**FIGURA 4 –** Epiderme de *Solanum Scuticum,* em vista frontal.

**FIGURA 5 –** Cortes seriados e à mâo livre de *Solanum scuticum*.

**FIGURA 6 –** Secção transversais dos bordos da folha de *S. scuticum* em dupla coloração azul de Alcian/Safranina.

**FIGURA 7 –** Secção transversal da nervura principal da folha de *S. scuticum* em dupla coloração.

**FIGURA 8 –** Secção transversal mediana do pecíolo da folha de *S. scuticum* dupla coloração azul de Alcian/safranina.

**FIGURA 9 –** Secção transversal da porção mediana de pecíolo foliar de *S. scuticum*.

**FIGURA 10 –** Microscopia do pó de folhas de *Solanum scuticum*.

**FIGURA 11 –** Reações de precipitação para confirmação da presença de alcalóides na fração alcaloídica.

**FIGURA 12 –** Cromatografia de camada delgada das frações acetato de etila, clorofórmica, hexânica de *S. sucticum,* revelada com NP/PEG, em luz UV.

**FIGURA 13 –** Controles negatigos e de DMSO a 0,3% das células Vero em 24 e 48 horas, em contraste de fase.

**FIGURA 14 –** Tratamentos das células Vero nos tempos de 24 e 48h, expostas à fração alcaloídica nas concentrações de 20 e 50 µg/ml, em microscópio de contraste de fase.

**FIGURA 15 –** Tratamentos das células Vero no tempo de 48h, expostas à fração alcaloídica na concentração de 100 µg/mL, em microscópio de contraste de fase e coradas por Giemsa.

**FIGURA 16 –** Tratamentos das células Vero no tempo de 48h, expostas à fração alcaloídica na concentração de 100 µg/mL, em microscópio de contraste de fase e coradas por Giemsa.

**FIGURA 17 –** Núcleos de células Vero, marcadas com anti-PCNA, expostas à concentração de 200 µg/ml, com 24h de exposição.

## LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1:** Cepas de microrganismos utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *S. scuticum*.

**QUADRO 2:** Resultados da prospecção fitoquímica do pó das folhas de *S. scuticum.*

**QUADRO 3:** Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico bruto das folhas de jurubeba (*Solanum scuticum*) frente a diferentes cepas.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Médias das contagens de células viáveis pelo Azul de Trypan.

**TABELA 2:** Análise de Variância Molecular (ANOVA) baseada no teste de viabilidade celular.

**TABELA 3:** Avaliação da significância entre as médias dos controles e as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey.

**TABELA 4:** Número de núcleos macados com anti-PCNA nos controles e testes, e os valores porcentuais dos testes em relação aos controles em 24h de exposição.

**TABELA 5:** Número de núcleos macados com anti-PCNA nos controles e testes, e os valores porcentuais dos testes em relação aos controles em 48h de exposição.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

NCCLS - Comite Nacional para Padronização do Laboratório Clínico
Ac - acúleo
anti-PCNA - anti-antígeno nuclear de proliferação celular
BHI - infusão de cérebro e coreação
$CCl_4$ - tetracloreto de carbono
Co - colênquima
Cu - cutícula
DLA - células ascíticas de linfoma de Dalton
DMSO - dimetilsulfóxido
DMSOpu - dimetilsulfóxido puro
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EEF - extrato etanólico das folhas de Solanum scuticum
Epa - epiderme abaxial
Epb - epiderme abaxial
Es - estômato
Fl - floema
Gl - gota de material lipídico
HEp-2 - carcinoma de laringe
Ia - idioblastos com amido
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MCF-7 - câncer de mama
MTT - (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium)
PBS - tampão-fosfato salina
Pm - parênquima medular
RD - rabdomiosarcoma humano
S/DMSO - solução de dimetilsulfóxido
SFB - soro fetal bovino
Te - tricoma estrelado
Va - elementos de vaso
Vero - células de rim de macaco verde africano
Xi - xilema

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O Bioma Cerrado – Fisionomia e importância

O termo Cerrado designa uma vegetação de fisionomia e flora próprias, classificada dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana (EITEN, 1994). A biodiversidade do Cerrado enquanto bioma é de grande representatividade, pois ocorrem além de plantas, grande variedades de animais, fungos entre outros grupos, sendo que muitos são endêmicos deste bioma.

O Cerrado tem ocorrência predominante no Brasil Central, porém está distribuído também em pequenas áreas em outras regiões do país, inclusive na Amazônia. Ocupando uma extensão de aproximadamente 2.036.448 $Km^2$, a qual abrange 10 estados da federação correspondendo a 23,92% da área do território brasileiro (IBGE, 2004).

**Mapa de Biomas do Brasil**

**Figura 1:** Representando os Biomas Brasileiros e suas distrinuições (IBGE, 2004)

Ao se considerar todas as características de ocupação espacial e a sua biodiversidade, o Cerrado é considerado a segunda maior formação vegetal

brasileira, superado apenas pela Floresta Amazônica, a qual ocupa um território de 4.239.000 $Km^2$, considerado o de maior bioma em extensão territorial brasileiro (KLINK E MOREIRA, 2005). Possui vegetação herbácea que coexiste com mais de 420 espécies de árvores e arbustos esparsos. O solo é antigo e profundo, ácido e de baixa fertilidade e tem altos níveis de alumínio que podem se acumular nas folhas das espécies vegetais (HARIDASAN, 1982).

A precipitação pluviométrica média anual no Cerrado é de 1.500mm, num clima tropical sazonal caracterizado por chuvas e um período seco que se estende por quatro a sete meses, dependendo da região. Apresentando um clima estacional, no qual o período chuvoso vai de outubro a março, já o período de seca vai de abril a setembro (KLINK E MOREIRA, 2005).

O Cerrado apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, principalmente quando se analisa sua flora. Esta constitui uma parte considerável das espécies que tem ocorrência restrita a essa região. Cerca de 50% dos espécimes são de arbustos e árvores (HENRIQUES, 2003).

A flora do bioma Cerrado é apenas parcialmente conhecida, havendo poucas tentativas de compilação da sua composição florística. As famílias mais representadas são: Leguminosae, seguida de Compositae, Orchidaceae, Gramineae, Rubiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Malpighiaceae e Lythraceae. Estas dez famílias retratam menos de 7% do total de famílias encontradas, e contribuem com mais de 51% da riqueza florística deste bioma. Outros dados ainda indicam que o número de gêneros de fanerógamas e pteridófitas presente neste bioma representam 26% dos 4.200 estimados para a América do Sul como um todo (GENTRY *et al*., 1997, RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER,

1997). A família *Solonaceae* também é encontrada em tal bioma, já tendo catalogadas 51 espécies (MENDONÇA *et al*, 1998).

Algumas espécies de plantas invasoras ou ruderais são registradas com grande freqüência no Cerrado, sendo que algumas são nativas desse bioma e outras introduzidas por atividades como a agricultura. Elas possuem importância nos estádios sucessivos das suas formações vegetais. Dados demonstram pelo menos 456 espécies invasoras/ruderais. Destas são descritas: 3 variedades, 458 *taxa*, 279 gêneros e 84 famílias - incluindo fanerógamas, dentre as quais estão listadas 13 espécies da família *Solonaceae* (MENDONÇA *et al.* 1998)

As plantas nativas do Cerrado produzem mais de 58 tipos de frutas, conhecidas e utilizadas pela população da região e de outras regiões do Brasil. Frutas do Cerrado tais como pequi, proveniente do *Caryocar brasiliensis*, a jurubeba oriunda da *Solanum scuticum* ou da *Solanum paniculatum* são usados na culinária regional para elaboração de diversos pratos. Várias outras frutas também são usadas na fabricação de sorvetes, doces, geléias e compotas de sabor peculiar, tais utilizações agregam valor aos produtos do Cerrado, colaborando para a melhoria de renda das populações rurais e, para maior e melhor preservação do bioma (AVIDOS E FERREIRA, 2000).

### 1.1.1. O enfrentamento das ações preservacionistas e o desafio do desenvolvimento industrial

Em 2002, utilizando imagens do satélite MODIS, Machado *et al* (2004a) concluíram que 55% do Cerrado já foram desmatado ou transformado pela ação humana. Estes autores concluíram também que as taxas anuais de desmatamento variam entre 22.000 e 30.000 $Km^2$.

Entre as principais ações destrutivas que ocorrem no Cerrado, estão carvoejamento intensivo-extensivo em Minas Gerais e no Distrito Federal; as atividades minerometalúrgicas, particularmente garimpagem altamente poluente em Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e a silvicultura de florestas homogêneas e a agropecuária intensiva, em quase todas as áreas de Cerrado. Além disso, a fortíssima pressão populacional, principalmente pela urbanização no Distrito Federal e a descaracterização cultural de sociedades tribais e não-tribais, constituem alguns dos fatores determinantes do padrão de interação homem-natureza que vêm contribuindo para o desequilíbrio do Cerrado. Estes determinates são favoráveis a alguns setores da sociedade e desfavorável para o meio ambiente (CORRÊA, 2000).

Dentre as culturas agrícolas, a que mais contribui para a destruição do Cerrado é a de soja. O Brasil é o principal produtor mundial desse grão e 45% da safra nacional é produzida em em áreas devastadas na região centro-oeste de Cerrado. Para isso, grandes extensões territoriais foram desmatadas e o Cerrado deu lugar à agricultura latifundiária, a qual não permitiu políticas preservacionistas, como ocorreu no sudoeste Goiano, região de Rio Verde e Jataí (HENRIQUES, 2003).

Análises feitas e apresentadas como dados multimídia no sítio da Embrapa Cerrados, na rede mundial de computadores demonstram dados diametralmente opostos aos apresentados nos parágrafos acima. Em estudo financiado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Banco Mundial, permitiu no ano de 2007 mapear 204,7 milhões de hectares por meio de 114 cenas do satélite Landsat do Cerrado, comprovou que a porcentagem de área remanescente no bioma Cerrado é de 61,2%. (http://www.cpac.embrapa.br/materias_pripag/2007/cerrado.html).

De acordo com as considerações apresentadas, mesmo que atualmente haja uma melhor combinação de desenvolvimento sustentável aliado às ações

preservacionistas, é claro que em passado recente muito do bioma Cerrado já foi dizimado, sem chances de recuperação da sua biodiversidade original. No que tange a populações de plantas endêmicas, estas, uma vez destruídas, elas não mais são repostas.

Devido a isto, é notória a necessidade de conservação do Cerrado, por meio de desenvolvimento sustentável. A pesquisa de sua flora para fins farmacêuticos constitui-se em uma das estratégias para sua valorização e preservação.

### 1.2. Aspectos gerais das solanáceas e empregos na medicina popular

O gênero *Solanum* é um dos maiores e mais complexos da família Solanaceae, com cerca de 2.000 espécies. Apresenta-se cosmopolita, sendo a América do Sul, especialmente o Brasil um dos principais centros de diversidade e endemismo do grupo (WHALEN, 1984).

No Brasil, muitas espécies de *Solanum* possuem indicações populares para o tratamento das disfunções hepáticas. Sendo esta apenas uma dentre as várias famílias com aplicações medicinais que podem ser encontradas no Cerrado. O número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% ao ano, considerando todos os biomas brasileiros (BRITO e BRITO 1993). Isso mostra que em um país biologicamente tão rico como o Brasil, mas com ecossistemas tão ameaçados, as pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas. Alguns dados que poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais (em vista da necessidade de sua extração estar associada aos planos de manejo) e à elevação do produto interno bruto (PIB), visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (NETO e MORAIS, 2003).

Além disso, os medicamentos obtidos de plantas necessitam de padronização, avaliando-se parâmetros como: correta identificação do espécime vegetal,

variabilidade genética, condições de crescimento e processos de obtenção de extratos. Uma vez que, a utilização de plantas medicinais sem o devido embasamento em tais critérios pode acarretar reações adversas agudas e de maneira crônica como, por exemplo, doenças renais e câncer (MARCUS e GROLLMAN, 2002).

O levantamento da flora vascular do bioma Cerrado descreveu uma grande variedade de *táxons* (MENDONÇA, 1998). De acordo com Neto (2003) quanto maior for à diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas. Desta forma, deve-se considerar o bioma Cerrado uma área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais.

De acordo com Mendonça (1998) entre as espécies da família Solonaceae, típicas do Cerrado, estão: *Solanum paniculatum* L., *Solanum lycocarpum* St. Hil., *Solanum lanigerum* Dunal e *Solanum macranthum* Dunal. Sendo algumas dessas espécies descritas como de uso medicinal pelas comunidades que habitam a região onde se encontra este bioma.

Vila Verde, Paula e Carneiro (2003) descreveram que *Solanum lycocarpum* é um das espécies mais utilizadas pela população de Mossâmedes no estado de Goiás, sendo utilizada para afecções hepáticas. Além disso, essa espécie possui outras aplicações com o xarope dos frutos utilizado no combate a asma e até mesmo o chá das suas folhas é usado contra a tosse (BRANDÃO, 2004).

Outras espécies da família *Solaneceae* também são utilizadas contra processos infecciosos como furúnculos, sendo popularmente utilizadas as espécies *Solanum americanum* Mill. e *Solanum aculeatissimum* Jacq. (RODRIGUES e CARVALHO, 2001)

A palavra “jurubeba” é uma denominação popular, de origem indígena, aplicada a diferentes espécies do gênero *Solanum* L. (AGRA, 1999), cuja etimologia “Tupi-guarani” refere-se principalmente à presença de espinhos encontrados em alguns de seus representantes (FERREIRA, 1998). Dentre as espécies denominadas “jurubeba” no Brasil, destacam-se *Solanum variabile* Dunal, freqüentemente utilizada como planta medicinal no estado de São Paulo como substituinte de *S. paniculatum* L. (FURLAN et al., 1999), *Solanum crinitum* Lam., *Solanum palinacatum* Dunal e *Solanum torvum* Sw., com atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (SILVA, 2006).

A Farmacopéia Brasileira (1939) refere-se apenas a utilização de raízes e caule de *Solanum paniculatum* L., no tratamento de doenças do fígado e rins. Foram descritos ainda que os frutos são utilizados na alimentação em forma de conservas. Já as raízes são usadas nos problemas de congestão intestinal (BRANDÃO, 2004). Segundo Rodrigues e Carvalho (2001), a pomada das folhas de *Solanum paniculatum* também é utilizada como cicatrizante e a infusão das folhas, raízes e frutos teriam atividades contra tumores internos.

Dentre outras espécies conhecidas popularmente como jurubeba existe a *Solanum scuticum* M. Nee. Esta espécie foi recentemente sinonimizada por Nee, Bohs e Knapp (2006). Ela havia sido descrita por Dunal (1852) como *Solanum tabacifolium.* Trata-se de uma espécie arbustiva a arbórea, pertencente à secção *Torva* Nees, conhecida popularmente no Brasil como “jurubeba” e usada como medicinal. De acordo com Agra (2007), é encontrada em áreas de Cerrado do Centro-Oeste, Sudeste, Bahia, Paraná e Santa Catarina. Desde sua primeira publicação por Dunal (1852), as informações quanto às suas características farmacognósticas são desconhecidas.

Os conhecimentos acerca das atividades dos produtos medicinais do *Solanum scuticum* são baseados, em sua maior parte, pelas aplicações populares. O conhecimento da composição e da bioatividade são de fundamental importância para a segurança e a garantia de eficiência da utilização desses medicamentos (MARCUS e GROLLMAN, 2002).

### 1.3. Fitoquímica – princípios básicos e obtenção de compostos para testes

A busca por fitoterápicos provavelmente está relacionada ao aumento do preço e os efeitos adversos dos medicamentos alopáticos prescritos, além do restrito acesso ao atendimento médico (MARCUS e GROLLMAN, 2002; RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

É importante levar em consideração muitos aspectos quando se trata da utilização correta de fitoterápicos. Entre estes é relevante que se avalie as condições de obtenção de seus extratos e frações e a correta identificação do vegetal e do grupamento químico da droga vegetal que está sendo utilizada.

Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos mais adequado para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v). Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular, onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas.

No caso do extrato apresentar efeitos biológicos de interesse, deve se proceder a um método sistemático de estudo. Desta maneira, o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes,

como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades (FILHO e YUNE, 1998).

As condições de obtenção da matéria prima devem ser levadas em consideração fatores como temperatura, tipo de solo, luminosidade e umidade. Tais variáveis segundo Rodrigues e Carvalho (2001) influenciam a obtenção dos princípios das plantas e devem ser levados em consideração, para que se tenha boa representatividade dos mesmos no material vegetal.

### 1.4. Bioensaios para avaliação de atividade dos extratos e frações de plantas

A maioria das plantas do planeta Terra é desconhecida sob o ponto de vista científico, somente 250-500 mil espécies, cerca de 5%, têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor ainda tiveram suas atividades biológicas avaliadas. Para isso, se faz necessária a presença de equipes multidisciplinares, como está demonstrado no fluxograma o qual descreve os procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos e testes associados como esquematizado por Filho e Yune (1998) (figura 2).

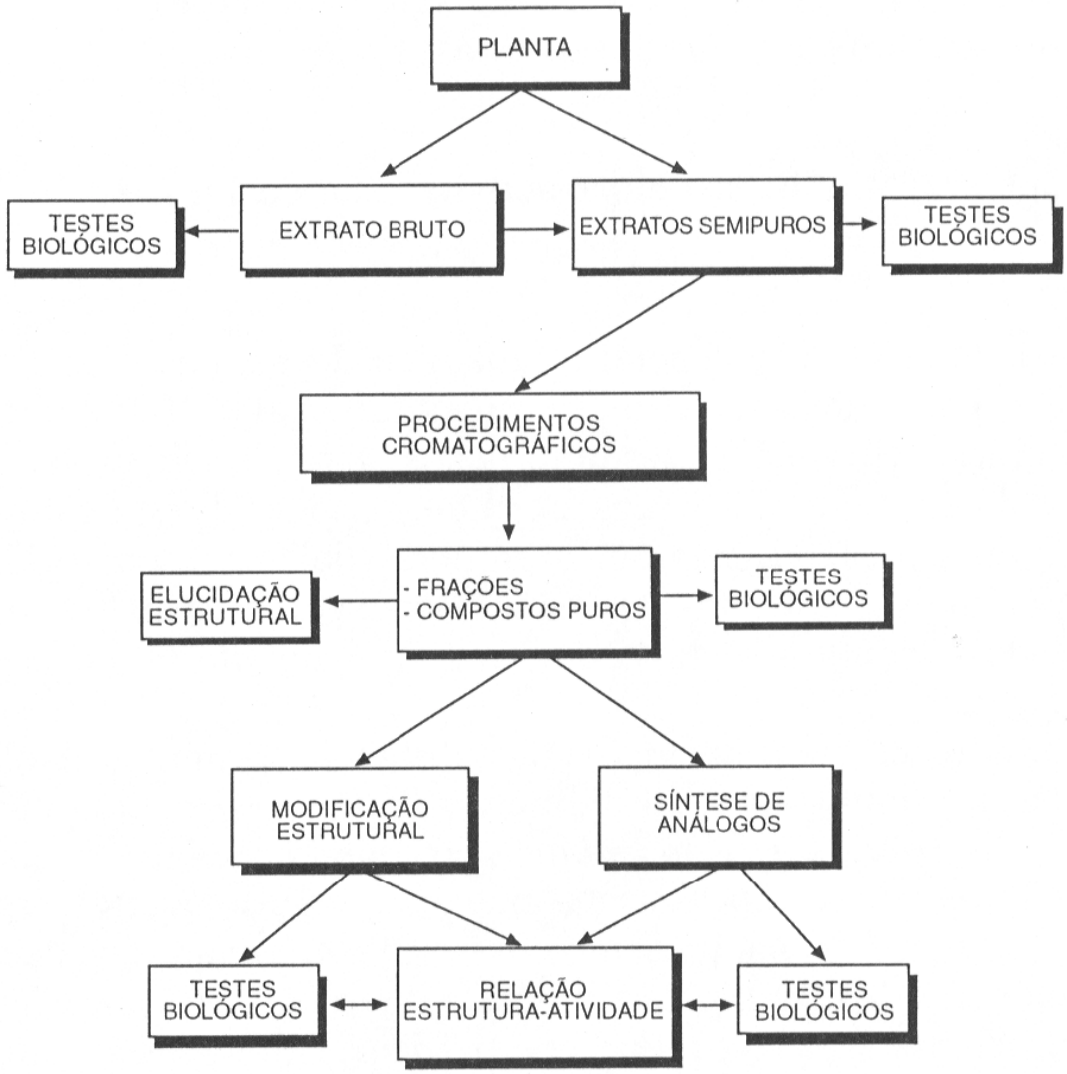



**Figura 2:** Fluxograma para obtenção de compostos biologicamente ativos e testes associados como foi esquematizado por Filho e Yune (1998).

Dentre os testes biológicos podem ser considerados, por exemplo, testes para se avaliar atividades cicatrizante, anti-ulcerativa, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral de fito-compostos utilizados em ensaios *in vitro* e *in viv*o.

### 1.4.1. Atividades anti-microbianas de substâncias obtidas de plantas

As pesquisas de novas substâncias antimicrobianas se fazem necessárias em virtude do reaparecimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas, e também ao aumento da resistência bacteriana. Os fitoterápicos são uma grande alternativa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Sendo importante

considerar considerar tal alternativa em virtude da dificuldade de aquisição de novas moléculas com atividades antimicrobianas, constituindo um dos pontos para a otimização de métodos de triagem usados na identificação de antimicrobianos de fontes naturais (VALGAS *et al*, 2007).

Neste sentido, alguns resultados parecem ser animadores na busca de agentes antimicrobianos. SILVA *et al.* (2007) avaliaram a atividade anti-microbiana do extrato hidroalcoólico da casca de *Anacardium occidentale* Linn. (Cajueiro) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes, e verificaram sensibilidade de todas as cepas avaliadas.

Chah, *et al.* (2000) observaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico dos frutos de *Solanum torvum* Swartz contra cepas bacterianas piogênicas. Além disso, à prospecção fitoquímica observaram nos frutos a presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e glicosídeos. Em *S. incanum* a atividade antimicrobiana foi atribuída à presença de flavonóides (AL-FATIMI, 2007).

Compostos como saponinas também foram avaliados quanto sua atividade anti-fúngica. Yang *et al.*(2006) avaliaram a atividade antifúngica de uma saponina esteroidal de 27 átomos de carbono e verificaram atividade anti-fúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*.

São atribuídas possíveis atividades antimicrobinas a várias outras espécies. Como, por exemplo, *Solanum paniculatum* L. que segundo Fenner *et al.* (2006) possivelmente teriam atividade antifúngica pela utilização popular de suas folhas como cicatrizante.

### 1.4.2. Atividades verificadas *in vivo*

Alguns testes em animais utilizando substâncias obtidas de plantas possuem como objetivo a verificação de possíveis atividades anti-inflamatórias como descritas na medicina popular.

Góes *et al* (2005) avaliaram a atividade cicatrizante do extrato aquoso de *Myracrodruon urundeuva fr. all.* (aroeira-do-sertão), sob a forma de enemas e observaram atividade anti-inflamatória e efeito inibitório na deposição do colágeno nas fases inflamatória e de fibroplasia no processo cicatricial de anastomoses colônicas, em ratos Wistar.

Martins *et al* (2006) testaram a atividade cicatrizante extrato aquoso da *Orbignya phalerata*, aplicado intraperitonealmente, constataram ação estimulante da cicatrização em ferimentos de pele de ratos tanto na avaliação macroscópica como na microscópica.

Já Antonio *et al* (2004) avaliaram a atividade do extrato etanólico de *S. variabile* (falsa "jurubeba"), demonstraram que a dose oral do extrato bruto de *Solanum variabile* (1000 mg/kg), administrada por um período de 14 dias consecutivos,. promovia aceleração do processo de cura da ulceração estomacais em 46%, comparando-se a 55% do efeito da cimetidina. Além disso, a dose de 1000 mg/kg inibiu as lesões duodenais em 64%.

Extratos aquosos obtidos de diferentes partes de *S. paniculatum* L. (flores, frutos, folhas, caule e raiz) foram testados para determinar sua atividade anti-ulcerativa e anti-secretória de ácido clorídrico em estômago em ratos. Os extratos aquosos de raízes, caule e flores inibiram a secreção ácida no ligamento pilórico de ratos. Já os extratos das folhas não afetaram a secreção gástrica, sendo o mesmo efeito observado ao se utilizarem extratos das frutas. O efeito estimulante dos

extratos dos frutos foi inibido pelo tratamento com atropina, sugerindo sua atividade muscarínica na secreção gástrica (MESIA-VELA *et al,* 2002).

Jainu e Devi (2006) constataram atividade protetora do extrato metanólico do fruto de *S. nigrum* contra úlceras estomacais em ratos, sendo tal ação protetora atribuída a inibição da secreção de gastrina e inibição da atividade de $H^+K^+$ATPase.

As atividades anti-inflamatórias dos alcalóides solasodina, sobatum, obtidos das folhas de *Solanum trilobatum*, foram verificadas em edema de patas de ratos (EMMANUEL *et al*., 2006).

Utilizando glicoalcalóides obtidos dos frutos de *Solanum sodomaeum* L. diluídos em DMSO 10%, Cham e Meares (1987) avaliando 62 pacientes e constataram atividades anti-tumorais desses compostos contra tumores benignos (queratosis e queratoacantomas) e malignos da pele (carcinomas basocelular e espinocelular).

A realização de testes *in vivo* é de fundamental importância, a fim de se determinar a toxicidade ou a citotoxicidade dos compostos obtidos de plantas, além da comprovação de suas possíveis atividades farmacológicas.

Mattos Filho *et al* (1997) ao avaliarem a atividade hepatoprotetora do extrato hidroalcoólico bruto de partes aéreas de *S. paniculatum* L. frente à ação hepatotóxica de tetracloreto de carbono ($CCl_4$) em ratos Wistar, observaram que o extrato de tal planta potencializava o efeito hepatotóxico do $CCl_4$. Tal achado é contrário as indicações populares de *S. paniculatum* como planta hepatoprotetora.

O extrato hidroalcoólico bruto *Solanum grandiflorum,* popularmente conhecida como “lobeira” ou “jurubebão”, teve sua toxicidade testada em tratamento sub-crônico. O extrato etanólico obtido dos frutos promoveu nefromegalia, a qual pôde ser verificada macroscopicamente, em 70% dos ratos avaliados, quando

comparados ao grupo controle negativo. Em estudo histopatológico, foi observado necrose glomerular (100%), lesões tubulares (80%) e lesões hipercelulares (100%). A partir desses resultados foi sugerida nefrotoxicidade pela ação do tratamento sub-crônico com extrato hidroalcoólico desta planta (PEREIRA *et al,* 2003).

Como modelo biológico para avaliação toxicológica de alcalóides esteroidais obtidos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), Crawford e Kocan (1993) exporam alevinos de peixes das espécies *Oncorhynchus mykiss* e *Orizius latipes* aos alcalóides α-chaconine, α-solanine, aglicona solanidine, jervine e solasodine, estando os mesmos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à 1%, em virtude da dificuldade de diluição dos alcalóides. Nesse trabalho foi observado efeito tóxico de α-chaconine, α-solanine nas concentrações de 5 µg/ml e 25 µg/ml, sendo letal para 100% dos alevinos nessas concentrações.

Os estudos de citoxicidade realizados no epitélio branquial de revestimento do guaru (*Poecilia vivipara*) exposto ao extrato bruto etanólico de *Solanum scuticum* M. Nee na concentração de 20 µl/L evidenciam aumento significativo de área para as regiões (apical, intermédia e basal) dos filamentos branquiais analisados. Na concentração de 60 µl/L houve aumento apens nas regiões apical e basal. Já na concentração de 100 µl/L, foi evidenciado aumento de área apenas da região apical, com redução para as regiões intermédia e basal (Nascimento *et* al¸ 2004).

### 1.4.3. Atividade de modelos celulares *in vitro*

A utilização de cultura de células como ferramenta dos processos biológicos tem sido muito incentivada, uma vez que podem ser abordadas várias vertentes como: expressão gênica, proliferação, interação célula-célula, adesão e carcinogêse (PERES e CURI, 2005).

A busca da utilização de células em cultivo para ensaios biológicos delonga de muitas tentativas de manterem células vivas em cultura. Os trabalhos de Gey, Coffman e Kubicek (1952) estabeleceram a possibilidade de crescimento de células de carcinoma cervical ou células normais *in vitro*. Os autores relataram que tais células cresciam bem em meio contendo plasma de galinha, extrato de embrião bovino e soro de cordão umbilical. Posteriormente, Hayflick e Moorhead (1961), em diversos ensaios experimentais, descreveram a necessidade de modificação genética de células diplóides, para manutenção das mesmas por longos períodos, a fim de se obter células para o entendimento de processos biológicos.

Vários tipos de linhagens podem ser utilizadas como modelos para testes de atividades de substâncias. Dentre os tipos celulares, há as linhagens permanentes, que podem ser tumorais ou células transformadas. Um exemplo de células aderentes e transformadas é a linhagem celular Vero. Tais células são oriundas de rim de macaco verde africano, sendo as mesmas modificadas em laboratório a fim de se obter a imortalidade celular (REBECCA, 2000). Sua morfologia é semelhante à de fibroblastos, apresentam leve vacuolização citoplasmática, núcleos ovais, cromatina frouxa e nucléolos evidentes (únicos ou múltiplos). Crescem aderidas em mono-camada e depois de certo tempo de divisão essas células passam a perder a inibição por contato, crescendo de forma sobreposta, semelhante ao padrão de crescimento de células tumorais, além de apresentar aumento de granulação citoplasmática, vesículas e morfologia estrelada ou arredondada, comportando-se como células transformadas após um período de 29h (GENARI e WADA, 1995; GENARI, DOLDER e WADA, 1996; GENARI, GOMES e WADA, 1998).

Vijayan *et al* (2002) empregaram extratos metanólicos de frutos de *Solanum pseudocapsicum* para testarem a citotoxicidade sobre culturas das linhagens HEp-2 (carcinoma de laringe), RD (rabdomiosarcoma humano) e Vero e atividade anti-tumoral nas linhagens DLA (células ascíticas de linfoma de Dalton) e HEp-2. A fração alcaloídica total demonstrou uma forte atividade contra todas as linhagens de células testadas.

Outras pesquisas da bioatividade de plantas medicinais referem se à busca de quimioterápicos, contra o câncer. As informações acerca de possíveis atividades anticancerígenas surgem de informações da medicina popular (CRAGG e NEWMAN, 2005).

A busca por substâncias anticancerígenas derivadas de plantas teve início nos anos 50 com as pesquisas de alcalóides da vinca (*Catharanthus roseus*) (vinblastina e vincristina), que marcaram também pesquisas dos efeitos de quimioterápicos com culturas de células (Malawista *et al.*, 1968). Segundo Donoso (1977) esses alcalóides interagem diretamente com microtúbulos ou tubulinas, sendo tal reação responsável pela neurotoxicidade em pacientes. Os alcalóides da vinca possuem atuação em β - tubulinas, sendo o princípio para atividade anti-proliferativa desse grupo de substâncias que são utilizadas, por exemplo, no tratamento de leucemias linfóides agudas (LLA) (KAVALLARIS *et al.,* 2001).

Em outro trabalho avaliaram as atividades anti-proliferativas dos extratos aquosos de sementes e polpas de framboesa (*Rubus idaeus*) de cinco diferentes variedades. Estes apresentaram potenciais anti-proliferativos frente à carcinoma de cólon humano da linhagem K81-6, e essa ação relacionada à alta concentração de ácido elágico encontrado na framboesa (JURANIC, 2005).

Os vários exemplos na literatura da avaliação da atividade anti-proliferativa de extratos e frações de plantas frente a linhagens tumorais colaboram para identificar os efeitos e a eficácia ou não dos princípios bioativos extraídos de plantas. Como pode ser verificado nos dados de Son *et al* (2003), que pesquisaram as propriedades anti-tumorais de *Solanum nigrum* L., aplicaram extratos etanólicos de frutos de *S. nigrum* em células de câncer de mama (MCF-7) *in vitro*, os extratos apresentaram forte atividade contra a proliferação de células MCF-7. Utilizando células marcadas com trítio, através de cintilografia líquida, foi constatada uma redução dramática da síntese de DNA, além de reduzir o número de células viáveis, no pós-tratamento, tanto pelo método de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium) quanto pela exclusão por azul de Trypan.

Esteves-Souza *et al,* (2002) obtiveram o flavanóide tiliroside, uma fração rica em glicoalcalóides denominada GB e o glicoalcalóide solasonina dos tricomas de galhos jovens de *Solanum crinitum* Lam. Das partes aéreas de *S. jabrense* extraíram o alcalóide estereoidal solasodina. Todos esses compostos tiveram atividade citotóxica avaliada frente a células do carcinoma de Ehrlich e de leucemia humana (K562). Os efeitos anti-proliferativos destas substâncias estão relacionados com comportamentos doses-dependentes após avaliação pelo método do MTT. Além disso, os resultados mostraram a possibilidade de biomonitoramento através do ensaio do MTT na busca de metabólitos com atividade citotóxica.

A avaliação das atividades de extratos e frações de plantas medicinais é muitas vezes dificultada por problemas de solubilidade dos mesmos. Para minimizar este fato solventes como o DMSO, o qual possui dupla polaridade e apresenta capacidade de penetrar em membranas biológicas (DAVI, 1984). Por exemplo, Liu *et al* (2004) diluíram solamargine, obtida de *Solanum khasianum* Clarke, em DMSO a

fim de se avaliar a atividade anti-proliferativa de tal substância em culturas células de carcinomas de pulmão.

Apesar dos estudos já realizados, a literatura relata que existem várias outras espécies de plantas cujas propriedades farmacológicas ainda não foram pesquisadas, apesar de suas utilizações populares serem freqüentes. De acordo com as análises realizadas na literatura consultada o presente trabalho pretende contribuir com a descrição inédita da espécie *S. scuticum* para o Cerrado do estado de Goiás e ainda auxiliar na compreensão dos componentes fitoquímicos e a farmacognósticos da jurubeba, realizando a avaliação de seus efeitos *in vitro* em células da linhagem Vero.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivos gerais

- ✓ Classificar a planta em nível de espécie para estudo por meio de análises taxonômicas. Avaliando os metabólitos secundários encontrados nas folhas de *Solanum scuticum*. Além de investigar o comportamento da linhagem celular Vero frente à fração alcaloídica obtida das folhas de *Solanum scuticum* por meio de tratamento agudo e sub-agudo.

## 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Verificar a qualidade e pureza da droga em p**ó** obtida das folhas de *Solanum*;
- ✓ Testar a esterilidade da droga a fim de afastar possíveis interferentes oriundos do metabolismo de microrganismos. Além de se avaliar a atividade antimicrobiana de extrato bruto obtido das folhas;
- ✓ Avaliar a ação o efeito da fração alcaloídica de *Solanum scuticum* ***in vitro*** e estabelecer correlação com os achados encontrados em experimentos ***in vivo***;
- ✓ Verificar o efeito da fração alcaloídica de *Solanum scuticum* sobre a vitalidade celular, tendo em vista as diferentes concentrações e tempos (pelo método de azul de Trypan);
- ✓ Avaliar a dosagem em função do tempo nos tratamentos agudo e sub-agudo, respectivamente nos tempos de 24 e 48 horas;
- ✓ Comparar as alterações morfológicas promovias pela fração alcaloídica de *Solanum scuticum,* em comparação com os controles negativos e DMSO à 0,3% (análise morfológica por microscopia óptica de campo invertido);
- ✓ Analisar estatisticamente os efeitos das concentrações crescentres da fração alcaloídica de *Solanum scuticum* sobre as células da linhagem Vero.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. Coleta, taxonomia e processamento do material botânico

O material vegetal utilizado no presente trabalho foi coletado na região de Goiânia, no estado de Goiás (16º38'31,91"S, 49º15'43,42"W, 703,17m), no período de janeiro a abril de 2007. A identificação da espécie utilizada no presente trabalho foi realizada pela especialista Maria de Fátima Agra, da Universidade Federal da Paraíba/UFPB, com espécimes depositados no Herbário da Universidade Federal de Goiás, sob o número de registro 30.278, e no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da Universidade Federal da Paraíba.

Para a realização do estudo anatômico de folhas de *Solanum scuticum* foram analisadas secções de bordos da lâmina (base, porção mediana e ápice), nervura principal, região intercostal das lâminas foliares, pecíolo. Secções transversais de lâminas e pecíolos e secções paradérmicas de lâminas foram efetuadas, à mão livre, a partir de material fresco. As secções foram submetidas ao processo de dupla coloração com Azul de Alcian/safranina 9:1 (KRAUS e ARDUIN, 1997) e às reações histoquímicas com os reagentes de Steinmetz (Costa, 2001), Sudan III (KRAUS e ARDUIN, 1997) cloreto férrico e lugol (KRAUS e ARDUIN, 1997). A análise ao microscópio de campo claro do pó das folhas foi realizada empregando-se o reagente de Steinmetz (COSTA, 2001).

Para o preparo das lâminas a partir de cortes seriados em micrótomo rotativo, primeiramente se realizou a coleta das folhas frescas e se representou as porções dos bordos da lâmina foliar (base, porção mediana e ápice), nervura principal, região intercostal das lâminas foliares, pecíolo. Posteriormente as porções foram desidratadas em série butanólica terciária, em concentrações crescentes de butanol terciário (Merck® - EUA), e incluídas em Paraplast (parafina+resina plástica - Merck® - EUA). As secções com 6 μm de espessura foram colhidas de três em três

lâminas de vidro. Após, hidratação os cortes foram corados com o reagente azul de Astra e safranina (Kraus e Arduin, 1997), desidratados e montados com lamínulas e Entellan (MERCK - USA).

O registro fotográfico das estruturas anatômicas foi feito em fotomicroscópio, Zeiss-Axioskop, utilizando-se filme Kodacolor, ASA 100.

### 3.2. Fitoprospecção

Para se identificar os grupos de componentes fitoquímicos em folhas de *Solanum* sp. foram realizados ensaios fitoquímicos para pesquisa de heterosídeos antraquinônicos, taninos, heterosídeos digitálicos, alcalóides, cumarinas, amido, flavonóides e heterosídeos saponínicos (incluindo-se cálculo do índice de espuma), com base nas técnicas descritas por Costa (2001).

#### 3.2.1. Doseamento de flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado em triplicata, de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV (2001).

#### 3.2.2. Determinação do teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis

As determinações de teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico foram efetuadas utilizando as técnicas descritas na Farmacopéia Brasileira IV (1988).

### 3.3. Obtenção dos extratos e frações

#### 3.3.1. Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Solanum scuticum*

Colocou-se 100g de material pulverizado em maceração com etanol 95% PA (Synth®) na proporção de 1:5 com agitação ocasional por 72h. Filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotativo. Repetiu-se o procedimento por mais duas

vezes com o pó remanescente e obtendo-se o extrato etanólico das folhas (EEF) de *Solanum scuticum.*

### 3.3.2. Obtenção das frações do extrato etanólico das folhas de *Solanum scuticum*

Para obtenção das frações, o extrato bruto foi dissolvido em metanol, ao qual foi adicionada água destilada, até obtenção de uma solução MeOH/$H_2O$ 7:3. A solução resultante foi extraída, sucessivamente, três vezes com hexano, clorofórmio e acetato de etila (Ferri, 1988). As frações hexânica, clorofórmica, e acetato de etila foram concentradas em rotaevaporador em temperatura $\leq$ 40º C e posteriormente redissolvidas em etanol absoluto e aplicadas na cromatofolha de alumínio, silicagel 60 F254 (MERCK).

### 3.3.3. Obtenção da fração alcaloídica das folhas de *Solanum scuticum*

A fração alcaloídica foi obtida a partir da adaptação técnica descrita por Alice *et al* (1989) para a extração de alcalóides a partir de frutos de *Solanum granuloso-leprosum* Dun. . Pesou-se 100g de pó da folha *Solanum scuticum* Dunal colocados em 800 mL da solução de etanol PA 96º GL/ácido acético glacial PA (95:5), e agitou-se por 4 horas. Após esse período a solução foi filtrada e o resíduo foi submetido ao mesmo processo por mais duas vezes. Os filtrados foram reunidos e concentrados sob pressão reduzida e acidificados com ácido clorídrico 6% e levados a refluxo por 3 horas a 60ºC. Após este, procedeu-se alcalinização com hidróxido de amônia até pH 9-10. Posteriormente particionou-se com acetato de etila PA por quatro vezes e a fração acetato de etila foi concentrada sob pressão reduzida.

### 3.4. Análise das frações

As avaliações dos grupos de metabólitos secundários encontrados nas frações hexânica clorofórmica e acetato de etila foram feitas pela diluição de uma pequena amostra das frações diluídas em álcool etílico absoluto PA (Synth®). Tais frações foram aplicadas em placas de sílica gel para cromatografia de camada delgada (Merck®). Como fase móvel utilizou-se uma solução de acetona: tolueno:ácido fórmico, na proporção de 3:3:1. Como reveladores utilizou-se a solução de $FeCl_3$ 10% em ácido clorídrico 2M, solução de ácido sulfúrico/vanilina, reagente de produtos naturais (NP/PEG) e solução etanólica de KOH à 10%. Todas as metodologias destas etapas basearam-se nos procedimentos descritos por Bladt e Wagner (2001).

Para se comprovar a presença de alcalóides, na fração alcaloídica, foram realizados seis testes conforme metodologia descrita por Costa (2001), utilizando os seguintes reativos utilizados para precipitação de alcalóides:

- ✓ **Reativo iodados:** reativo de Mayer (precipitado branco), reativo de Drangendorff (precipitado vermelho tijolo), reativo de Bouchardat (precipitado marron-avermelhado);
- ✓ **Reativo de Bertrand (ácido sílico-tungstico a 1%):** precipitado branco;
- ✓ **Reativos a base de ácidos orgânicos:** ácido pícrico a 2% (precipitado amarelo); ácido tânico a 1% (precipitado bege).

### 3.5. Bioensaios para averiguação dos efeitos biológicos

#### 3.5.1 Avaliação de esterilidade e atividade antimicrobiana do extrato etanólico (concentração inibitória mínima)

Para verificação da presença de bactérias no extrato bruto foram colocadas 50µg do extrato em tubo de ensaio com 5 mL de meio BHI (infusão de cérebro e coreação), o qual foi mantido em estufa a 37ºC por 72 horas. Já para verificar a

presença de fungos procedeu a diluição de 50µg do extrato bruto em salina estéril e semeado em tubo com ágar Sabouraud, mantido em estufa à 37ºC por uma semana.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar conforme recomendação do NCCLS (Comite Nacional para Padronização do Laboratório Clínico) (1999).

Foram realizadas diluições seriadas em duplicata com o extrato da seguinte forma: pesou-se, em tubo de ensaio estéril, 1g do extrato etanólico bruto e completou-se para 1 mL com DMSO (1:1) P.A. (tubo 1). Adicionou-se 1 mL de água destilada estéril a uma seqüência de mais sete tubos de ensaio estéreis. Retirou-se uma alíquota de 1 mL do tubo 1, adicionou-se ao tubo 2, retirou-se 1 mL do tubo 2 e adiciona-se ao tubo 3 e, assim, sucessivamente, até o tubo 7, desprezando-se ao final uma alíquota de 1 mL.

**Quadro 1: Cepas de microrganismos utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *S. scuticum*.**

| **Microrganismos (CEPAS) Usados na Avaliação da Atividade Antimicrobiana** | |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus 481* | *Enterobacter aerogenes* |
| *Staphylococcus aureus 937* | *Escherichia coli 8739* |
| *Staphylococcus aureus 912* | *Escherichia coli 11229* |
| *Staphylococcus aureus 897* | *Escherichia coli 25922* |
| *Staphylococcus aureus 934* | *Serratia marcescens* |
| *Staphylococcus aureus 6538* | *Bacillus cereus* |
| *Staphylococcus aureus 5923* | *Bacillus stearoth* |
| *Staphylococcus aureus 915* | *Bacillus atropheus* |
| *Staphylococcus epidermides* | *Pseudomonas aeruginosa 9027* |
| *Micrococcus Roseus 12228* | *Pseudomonas aeruginosa 27853* |
| *Micrococcus luteus* | *Candida albicans** |
| *Enterobacter cloacal* | |

*Cepa fúngica

Em seguida, a cada um destes tubos adicionou-se 19 mL de ágar Müeler-Hinton liquefeito (aproximadamente 50º C), homogeneizou-se e verteu-se rapidamente em placas de Petri estéreis. Desta forma foram obtidas placas contendo o extrato etanólico bruto da espécie em análise em concentrações em diluição seriada variando de 0,55 até 70 mg/mL. Foram preparadas também placas controle contendo o solvente utilizado na extração e contendo apenas ágar Müeller Hinton. A fim de se excluir a possível atividade anti-microbiana do DMSO, preparou-se um controle de DMSO sobre os microrganismos foi dissolvido 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) em 19 mL de ágar Müeler Hinton liquefeito.

Para verificação da possível atividade anti-microbiana do extrato bruto hidro-alcoólico de *S. scuticum* foram utilizadas as cepas (**Quadro 1)** padrão *American Type Culture Collecttion* (ATCC), pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – UFG, descritas na tabela abaixo.

Os microrganismos armazenados foram reativados pelo repique em caldo tioglicolato e incubados a 37º C por 24 – 48 horas. Após a turvação do caldo, realizou-se o repique em placas com meio de cultura e a incubação a 37º C por 24 horas. Após o desenvolvimento microbiano em meio de cultivo, foram preparadas suspensões adicionando-se inóculo microbiano a 2,0 mL de solução salina esterilizada 0,85% (p/v) até a obtenção de uma turvação equivalente a escala 1 de MacFarland. Após esse último procedimento foi transferido uma alíquota da suspensão com cada microrganismo para um aplicador serial, e aplicado o inóculo em cada placa com determinada concentração de extrato bruto das folhas de jurubeba e incubado por 24h.

### 3.5.2. Efeitos da fração alcaloídica em células cultivadas da linhagem VERO

#### 3.5.2.1. Cultivo celular:

A cultura de células Vero de passagem de número 16, mantidas congeladas em nitrogênio líquido, foram inicialmente restauradas em meio MEM (Sigma Chemical Co TM; St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab; Campinas®, SP) e 1% de antibiótico penicilina/streptomicina (Cultilab ®; Campinas, SP ) em frasco de cultura de 25 $cm^2$ (Corning®, EUA), mantidos em estufa de $CO_2$ (Modelo 2123TC, SHELLAB) a uma temperatura de 37$^oC$, em atmosfera umidificada com 5% de $CO_2$.

#### 3.5.2.2. Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi verificada através da coloração supra-vital pelo método de exclusão de azul de Trypan. As células das garrafas de 25 $cm^2$ foram tripsinizadas com 1ml de tripsina-EDTA (Cultilab, Brasil) durante 5 minutos e posteriormente foi adicionado 4mL de MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cult Lab®), para ressuspender o sedimento e anular o efeito da tripsina. O volume final de 5mL foi transferido para tubo estéril e centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 minutos à 1500 rpm. Posteriormente descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o pellet, procedendo-se à contagem em câmara de Neubauer a partir de 50µl da suspensão com 50µl de azul de Trypan.

#### 3.5.2.3. Preparo da solução da fração alcaloídica e dos controles para os testes em cultivo celular

As concentrações de 20, 50, 100 e 200µg/ml de fração alcaloídica foram preparadas utilizadando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma®) a 0,3%. Para a preparação de soluções estoques foram pesados 20.000µg da fração alcaloídica,

sendo as mesmas diluídas em 300µl de dimetilsulfóxido puro (DMSOpu), obtendo-se a solução de dimetilsulfóxido (S/DMSO). Cada concentração utilizada nos testes foi diluída em MEM 10% de SFB, determinado o volume da solução de DMSO, e a fim de se manter a concentração constante de DMSO em 0,3%, em um volume final de 10ml: 20µg/ml (3µl de S/DMSO e 27µl de DMSOpu), 50µg/ml (7,5µl de S/DMSO e 22,5µl de DMSOpu), 100µg/ml (15µl de S/DMSO e 15µl de DMSOpu) e 200µg/ml (30µl de S/DMSO). As soluções estoques foram filtradas em membranas de 0,22µm e mantidas em geladeira.

Nos testes em células foram utilizados dois controles: controle negativo e controle DMSO. Foi aplicado controle negativo o meio MEM com 10% de SFB. Já controle de DMSO foi preparado com meio MEM com 10% de SFB e DMSO estéril a 0,3%.

#### 3.5.2.4. Avaliação da viabilidade celular frente à fração

As células da linhagem Vero foram semeadas em triplicata (100µl por poço), para cada concentração e tempo (24 e 48h) em microplacas de 96 poços (TPP®), na concentração inicial de $1x10^4$, por um período de 24 horas a fim de obter uma semi-confluência. Após esse período, foi retirado sobrenadante e pipetado 100µl das concentrações de 20, 50, 100 e 200µg/ml da fração alcaloídica de *S. scuticum*. Os controle negativo e de DMSO a 0,3% foram adicionados em igual volume nos poços correspondentes. Posteriormente a placa foi mantida em estufa à temperatura de 37$^o$C, em atmosfera umidificada com 5% de $CO_2$.

As células em cultivo foram submetidas às substâncias testes nos períodos de 24 e 48 horas, sendo posteriormente lavadas com tampão-fosfato salina (PBS) 0,05M pH 7,4 e adicionadas de 40µl de tripsina-EDTA (Cultilab, Brasil) durante 10 minutos. Para inibição da ação da tripsina, foram adicionados 40µl de meio

suplementado, com 10% de SFB e após sucessivas pipetagens as células foram suspensas no meio e, alíquotas de 50µl foram adicionadas à 50µl de solução de azul de Trypan. Preencheu-se a câmara de Neubauer com 15µl da solução de células expostas ao azul de Trypan, tendo por finalidade realizar a contagem das células viáveis, contando-se os quatro quadrantes laterais.

#### 3.5.2.5. Coloração pelo Giemsa

Para fins de avaliação morfológica dos efeitos da fração alcaloídica nas concentrações e tempos adotados nos ensaios das células Vero na concentração celular de $5x10^4$, elas foram cultivadas sobre lamínulas estéreis de vidro de 13mm (GlassTécnica®) em placas estéreis de 24 cavidades (TTP®). As culturas com as células em estágio de semi-confluência foram submetidas aos ensaios em iguais concentrações e controles descritos em 3.4.2.2. Após os períodos de 24 e 48h as células foram fixadas em metanol à menos 20ºC por um período de 3 minutos e coradas com corante de Giemsa por 30 minutos. As lamínulas lavadas com água corrente por duas vezes e posteriormente desidratadas em xilol e montadas sobre lâminas com Entellan (MERCK - USA), e fotodocumentadas em microscopia de campo claro (Leica, DMLB).

#### 3.5.2.6. Reação de imunocitoquímica para anti-PCNA (anti-antígeno nuclear de proliferação celular)

Utilizando-se dos mesmos procedimentos descritos no item 3.5.2.4. até o procedimento de lavagem em água corrente, realizou-se procedimento para equilibrar o pH. Desta forma, as lamínulas dos respectivos testes e controle foram lavadas com tampão PBS 0,1M por duas vezes. Com o intuito de bloquear os sítios inespecíficos, as lamínulas com as células coradas por Giemsa foram vertidas sobre lâmina contendo leite Molico® (Nestlé - Suiça) a 5% por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS 0,1M por três vezes e vertidas sobre lâminas

contendo 30µl anti-corpo primário anti-PCNA (1mg/mL, Bethyl Lab®, Canadá) (1:300) por 2h.

A etapa de exposição ao anti-corpo primário anti-PCNA (1:300) não foi realizada para o material destinado a ser o controle negativo da reação. Após as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 0,1M e em seguida vertidas (porção com células para baixo) sobre lâminas contendo 30µl de anti-corpo secundário de cabra anti-coelho, conjugado com CY2 (1mg/mL, Pharmingen, EUA) (1:200) e encubado por 1h, o mesmo foi colocado também no controle negativo da reação. Depois as lamínulas foram lavadas com PBS 0,1M por três vezes e vertidas sobre lâminas contendo DAPI (INVITROGEM®, EUA) (1:1000) por 5 minutos. As lamínulas foram lavadas, montadas com 3µl de *Vectashield* em lâminas e vedadas com esmalte. As lâminas foram fotografadas em microscópio de fluorescência (Eclipse 800, Nikon, EUA) em objetiva de 20x, sendo capturados 10 campos aleatórios para cada lâmina.

### 3.6. Obtenção e tratamento das imagens

#### 3.6.1. Fotomicrografias em microscópio invertido com contraste de fase e microscópio de campo e microscópio de fluorescência

##### 3.6.1.1. Avaliação qualitativa

As avaliações qualitativas foram realizadas utilizando-se de microscópio invertido com contraste de fase (OLYMPUS, IX 71). Além de avaliação morfológica por coloração das lamínulas coradas com Giemsa foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica - DMLB).

##### 3.6.1.2. Avaliação quantitativa dos núcleos marcados com anti-PCNA

Para realização da contagem de núcleos marcados com anticorpo anti-PCNA foram contados, a partir das imagens 10 campos ao aumento de 20x digitalizadas

conforme descrito no sub-item 3.5.2.6. Os núcleos marcados foram contados com o programa Image-pro plus® versão 6.0. Sendo representado no número absoluto de núcleos contados e a porcentagem de redução de núcleos marcados com anti-PCNA.

### 3.7. Análises estatísticas

Para avaliação estatística da viabilidade celular foi utilizou análise de variância com dois critérios, pois este teste compara, além da variação entre os tratamentos, a variabilidade entre os blocos (24 e 48 horas). As amostras devem ter o mesmo tamanho e os escores devem ser mensurados em nível intercalados ou razões. Há, neste modelo dois valores de F dos tratamentos e dos blocos. Tais dados foram elaborados utilizando o software *BioEstat* 3.0. Foram realizados 6 tratamentos distintos, sendo que o último não foi considerado nas análises estatísticas dos dados, pois o programa estatístico (Bioestat 3.0), utilizado nas análises, não reconhece células vazias, não levando em consideração o algarismo zero. Além dos 6 tipos de tratamentos, o número de células foi observado em dois períodos distintos, 24 e 48 horas. Este teste compara, além da variação entre os seis tratamentos utilizados, a variabilidade entre os blocos, ou seja, entre os períodos de 24 e 48 horas. Dois requisitos necessários para este teste estatístico é que as amostras devam ter o mesmo tamanho e os escores devam ser mensurados em intervalos ou razões. Há, neste modelo, dois valores de F (coeficiente de Fisher), o dos tratamentos e o dos blocos.

Além disso, foi utilizado o teste de Tukey, a fim de avaliar diferenças mínimas entre as médias dos tratamentos. A análise de variância permite estabelecer se as médias das populações em estudo são, ou não são, estatisticamente iguais, no entanto, esse tipo de análise não permite detectar quais são as médias estatisticamente deferentes das demais (SÔNIA, V., 2002).

# 4. RESULTADOS

## 4.1. Dados botânicos e taxonômicos

### 4.1.1. Identificação e descrição macroscópica da folha

O material botânico foi identificado como sendo de *Solanum scuticum* Nee, da seção *Torva*. As folhas de *Solanum* sp. apresentam-se geminadas, dimorfas, lâminas 8-20 × 6-18 cm, ovais, deltóides a oval-lanceoladas, cartáceas, inteiras, repandas ou onduladas, ápice agudo a acuminado, base oblíqua, truncada ou sub-cordada, venação craspedódroma, face adaxial áspera, tricomas estrelados sésseis, face abaxial ferrugíneo-tomentosa, tricomas estrelados estipitados, acúleos aciculares, esparsos, ao longo da venação principal; pecíolo 2-3(-5) cm comprimento, tomentoso, acúleos aciculares, 0,6 -1 cm (Figura 3).

**Figura 3:** Folhas e frutos de *S. scuticum* coletados na região de Goiânia - GO

### 4.1.2. Descrição microscópica

#### 4.1.2.1. Lâmina foliar

A folha adulta de *S. scuticum* em sua face adaxial apresenta tricomas porrecto-estrelados, sésseis, com 4-5 raios laterais e o raio central reduzido (Figura 4A e 4C) Já em vista frontal é anfihipoestomática, com estômatos predominantemente anisocíticos, com paredes anticlinais sinuosas (Figura 4 B). Na face abaxial a epiderme possui células epidérmicas com paredes anticlinais ondeadas (Figura 4 D) e tricomas estrelados estipitados, com 6-9 raios.

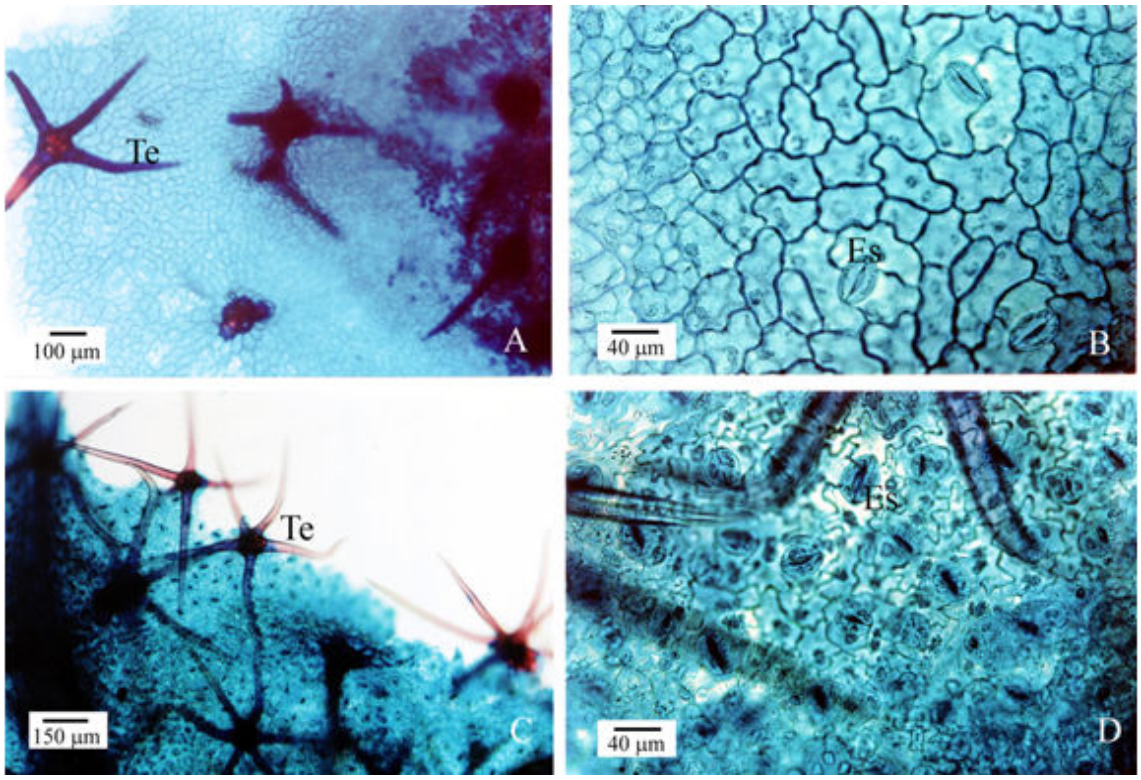



**Figura 4:** Epiderme de *Solanum scuticum,* em vista frontal. **A-B.** Face adaxial: A. **vis**ão geral; B. detalhe evidenciando paredes celulares periclinais sinuosas a ondeadas e estômatos anisocíticos; **C-D.** Face abaxial. C**.** Detalhe evidenciando tricomas estrelados estipitados; D. Detalhe evidenciando paredes celulares periclinais ondeadas e estômatos anisocíticos. **Te** = tricoma estrelado; **Es** = estômatos.

Em secção transversal, a lâmina foliar apresenta estrutura dorsivental (Figuras 5A e 5B). A epiderme é uni-estratificada em ambas as faces. O mesófilo possui o parênquima paliçádico unisseriado, adjacente à epiderme, na face adaxial, e

o parênquima esponjoso 5-6-seriado (Figura 5A). Tricomas porrecto-estrelados são observados na face adaxial e estrelado-estipitados na abaxial. As margens foliares possuem o bordo arredondado e revoluto em toda a sua extensão (Figuras 6 A, B e C), com a epiderme unisseriada. Um pequeno feixe vascular e colênquima ocorrem na porção apical.

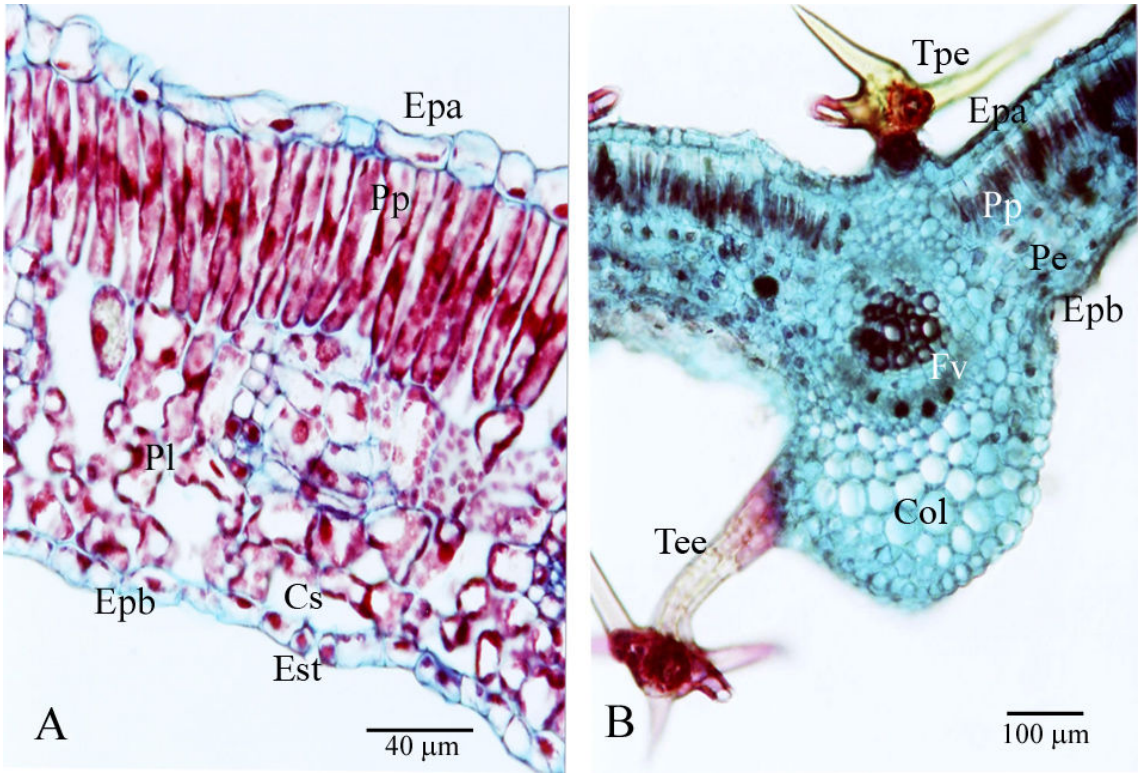



**Figura 5:** Cortes seriados e à mão livre de *Solanum scuticum*. **A.** mesofilo em secção transversal; **B. Nervura central,** em secção transversal, Legendas: **Epa =** epiderme na face adaxial, **Epb =** epiderme na face abaxial, Cs = câmara subestomática, Est = estômatos, **Col** = colênquima, **Pp =** parênquima paliçádico, **Pe =** parênquima esponjoso; **Fv =** feixe vascular; **Tpe =** tricoma porrecto-estrelado, Tee = tricoma estrelado estipitado.

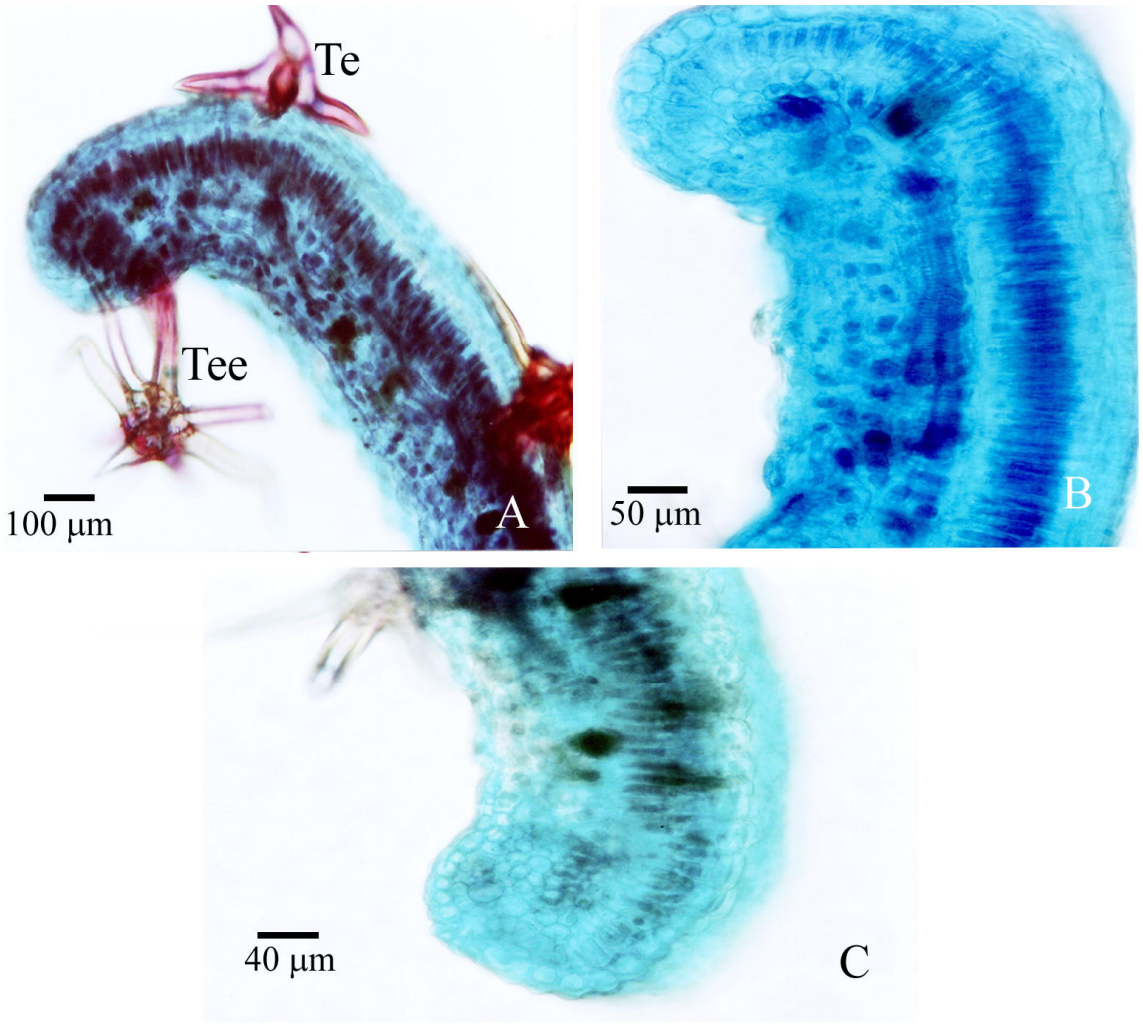



**Figura 6:** Secções transversais dos bordos da folha de *S. scuticum* em dupla coloração azul de Alcian/Safranina. **A –** Bordo da base; **B –** Bordo da base; **C –** Bordo do ápice. **Ep** = epiderme; **Te** = tricoma estrelado; **Pp** = parênquima paliçádico; **Co** = colênquima.

A nervura principal é plano-convexa a biconvexa, em secção transversal no terço médio da porção basal da lâmina foliar. A epiderme é uniestratificada, em ambas as faces, e um colênquima angular 5-estratificado (Figuras 7A e 7C). A vascularização é do tipo colateral, com feixes vasculares arranjados em forma de um arco, voltado para a face adaxial, com o floema externo ao xilema e envolvido por esclerênquima. Em ambas as faces, evidenciam-se tricomas estrelados estipitados (Figura 7A). Na face abaxial observam-se acúleos cônicos e agudos. (Figura 7A e 7B).

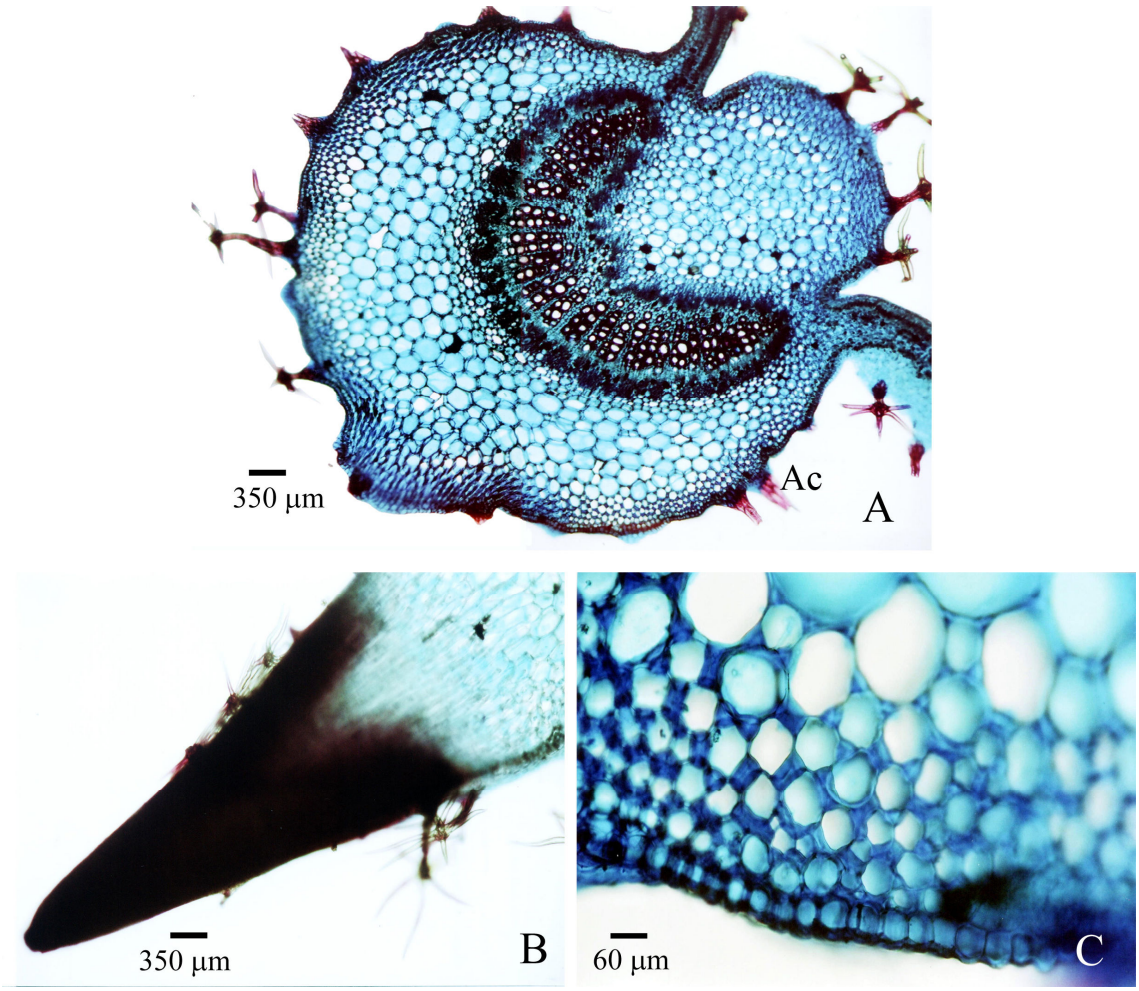



**Figura 7:** Secção transversal da nervura principal da folha de *S. scuticum* em dupla coloração. **A –** Aspecto geral; **B –** Detalhe de aculeo da epiderme abaxial; **C –** Detalhe da epiderme abaxial e colênquima. **Epa** = epiderme abaxial; **Epb** = epiderme abaxial; **Te** = tricoma estrelado**; Co** = colênquima; **Xi** = xilema; **Fl** = floema; **Fv** = feixe vascular.

#### 4.1.2.2. Pecíolo

O pecíolo é biconvexo em secção transversal, com a epiderme unisseriada seguida do colênquima do tipo angular (Figuras 7A e B), observado nas porções basal, mediana e apical. O sistema vascular é colateral, formado por 3-5 feixes, centrais, em forma de arco, voltado para a epiderme adaxial, e dois feixes menores, laterais, voltados para a face adaxial. O floema é envolto por esclerênquima (Figuras 8A e 8D). Pequenos feixes colaterais são observados próximos à epiderme adaxial (Figuras 8A e 8E). Acúleos esparsos ocorrem na face abaxial (Figuras 8A e 8B) e tricomas estrelados são observados em ambas as faces.

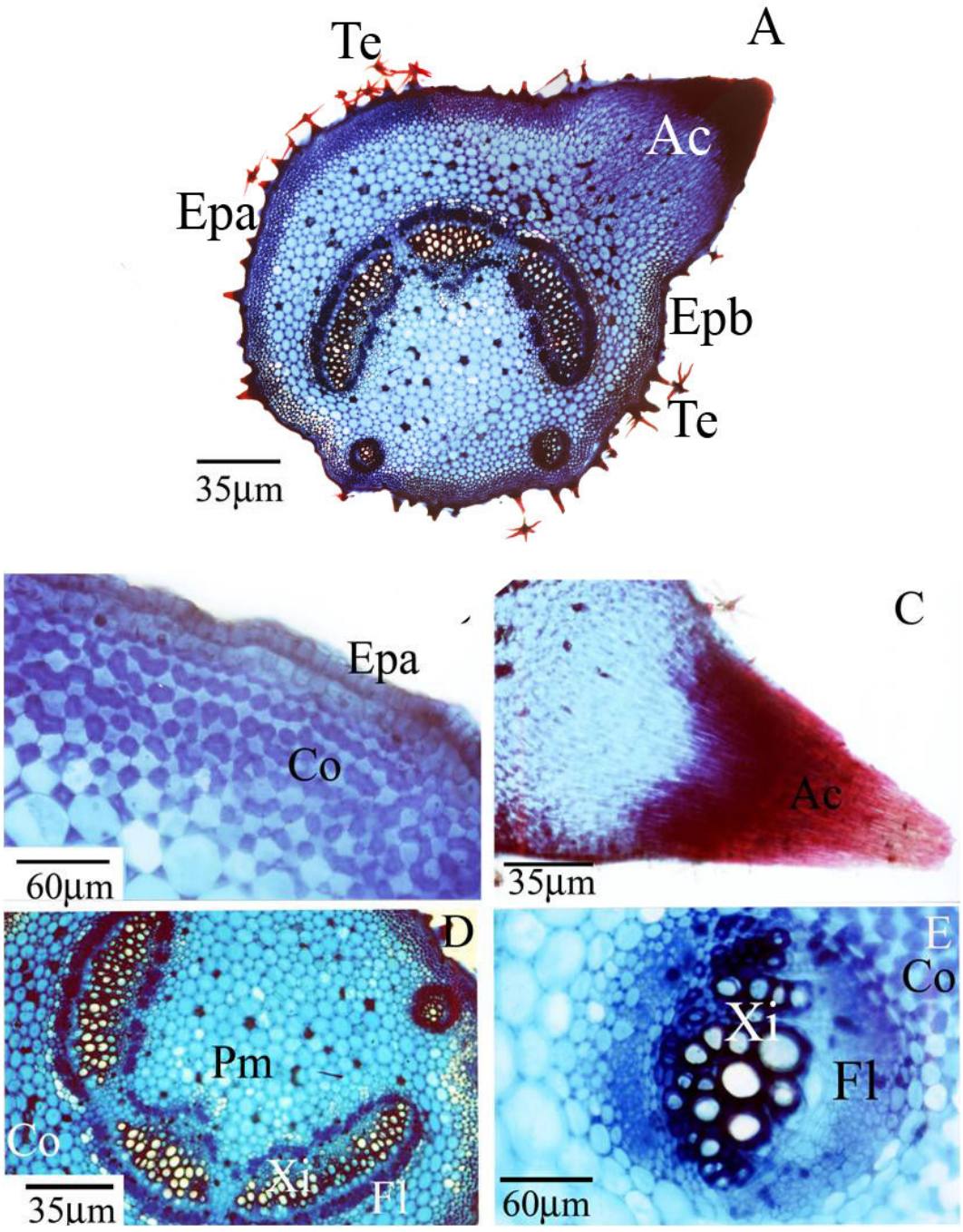



**Figura 8:** Secção transversal mediana do pecíolo da folha de *S. scuticum* dupla coloração azul de Alcian/safranina. **A –** Aspecto geral. **B –** Epiderme adaxial. **C –** Detalhe do acúlio na epiderme abaxial. **D –** Detalhe do sistema vascular central. **E –** Detalhe do feixe vascular lateral próximo à epiderme adaxial. **Epa** = epiderme abaxial; **Epb** = epiderme abaxial; **Te** = tricoma estrelado**; Ac** = acúleo; **Pm** = parênquima medular; **Co** = colênquima; **Xi** = xilema; **Fl** = floema.

Nos testes histoquímicos observaram-se idioblastos contendo amido, evidenciados por lugol (Figura 9A). A presença de cutícula espessa na epiderme e

células contendo material lipídico, próximo à epiderme, foram evidenciadas por Sudam III (Figura 9B).

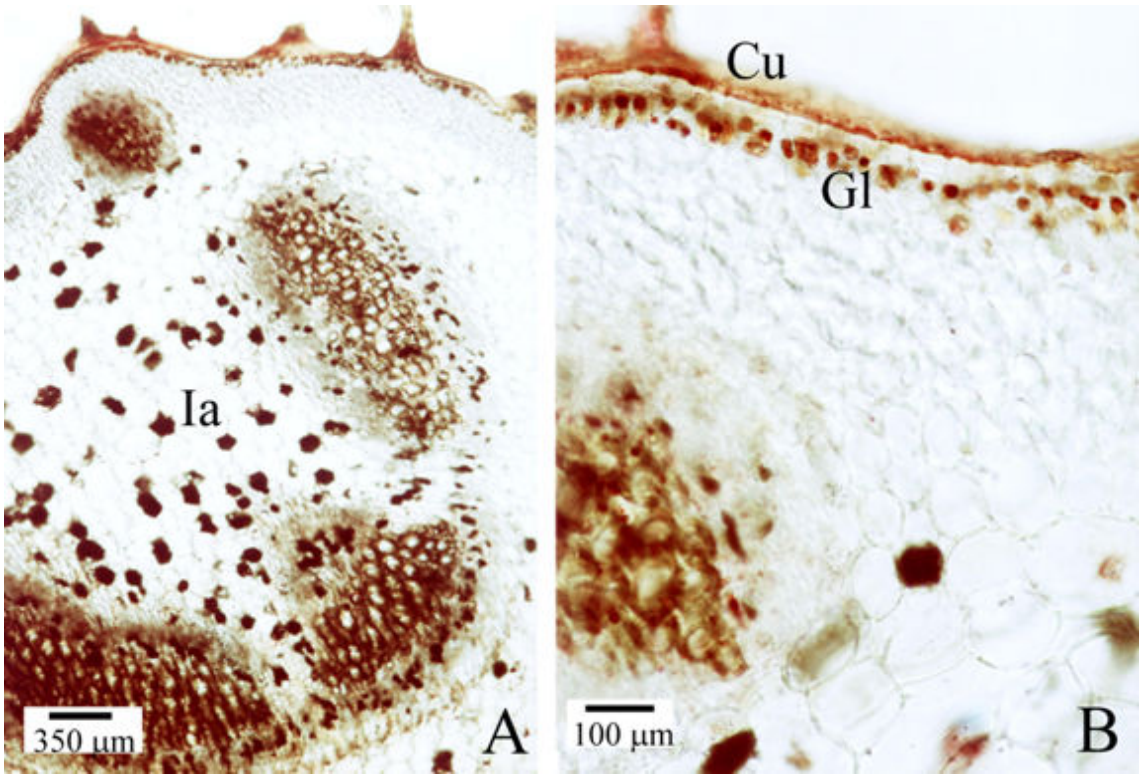



**Figura 9:** Secção transversal da porção mediana de pecíolo foliar de *S. scuticum*. **A.** Teste com lugol; **B**. Teste com Sudam III. Legendas: **Ia** = idioblastos com amido; **Cu** = cutícula; **Gl** = gota de material lipídico.

#### 4.1.2.3. Microscopia de pó de folhas

As folhas de *S. scuticum* reduzidas a pó foram submetidas ao reagente de Steimetz que evidenciou fragmentos de epiderme, estômatos (Figura 10A), tricomas estrelados (Figuras 10B e 10C), elementos de vaso com espessamento em anel (figura 10D).

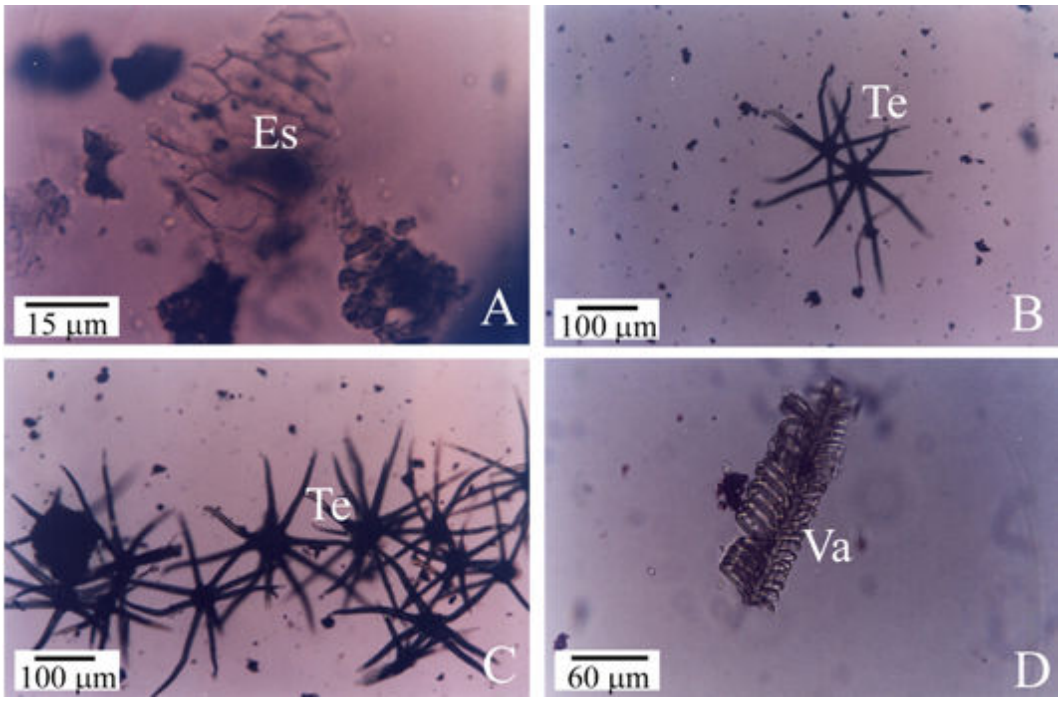



**Figura 10:** Microscopia do pó de folhas de *Solanum scuticum*. **A.** Fragmentos de epiderme. **B e C.** Tricomas estrelados. **D.** Elementos de vaso. Legendas: **Es** = estômato; **Te** = tricoma tector; **Va** = elementos de vaso.

### 4.2. Dados da fitoprospecção

Os resultados da prospecção fitoquímica estão listados no quadro 2.

**Quadro 2: Resultados da prospecção fitoquímica do pó das folhas de *S. scuticum***

| Grupo analisado | Resultado |
|---|---|
| *Heterosídeos antraquinônicos* | Presente |
| *Taninos* | Ausente |
| *Heterosídeos digitálicos* | Ausente |
| *Alcalóides* | Presente |
| *Cumarinas* | Presente |
| *Amido* | Ausente |
| *Heterosídeos saponínicos* | Presente |
| *Flavonóides* | Presente |

#### 4.2.1. Índice de espuma

O índice de espuma obtido para a amostra analisada foi de 200.

#### 4.2.2. Doseamento de flavonóides

O doseamento de flavonóides resultou em um valor de 1,13%.

#### 4.2.3. Determinação de índice de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis

O índice de umidade foi de 5,6%. Já a porcentagem de cinzas totais foi de 7,41% e o de cinzas insolúveis de 0,32%.

### 4.3. Dados dos extratos e frações

#### 4.3.1. Rendimento do extrato etanólico

O rendimento do extrato etanólico foi de 10%

#### 4.3.2. Rendimento das frações do extrato etanólico:

Os rendimentos das frações acetato de etila, clorofórmica e hexânica, obtidos a partir de 10g de extrato etanólico, foram respectivamente de 1,56%, 32% e 14%.

#### 4.3.3. Rendimento da Fração Alcaloídica e testes de precipitação de alcalóides

O rendimento da fração alcaloídica a partir de 100g de pó da folha foi de 1%, equivalendo a 1g da fração alcaloídica.

Os testes de precipitação de alcalóides foram todos fortemente positivos, como representado na figura 11 (A-F).

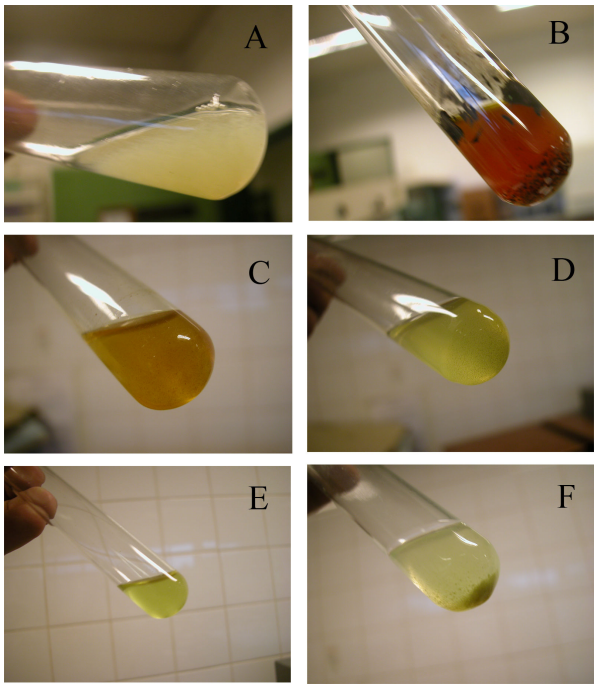



**Figura 11:** Reações de precipitação para confirmação da presença de alcalóides na fração alcaloídica. **A -** reativo de Mayer (precipitado branco); **B -** reativo de Drangendorff (precipitado vermelho tijolo); **C -** reativo de Bouchardat (precipitado marron-avermelhado); **D -** Reativo de Bertrand (ácido sílico-tungstico a 1%); : precipitado branco; **E -** ácido pícrico a 2% (precipitado amarelo); **F -** ácido tânico a 1% (precipitado bege).

### 4.3.4. Análise cromatográfica das frações

A análise em cromatografia de camada delgada (CCD) indicaram a presença de flavonóides e compostos fenólicos nas frações acetato de etila, hexanânica e clorofórmio (figura 12).

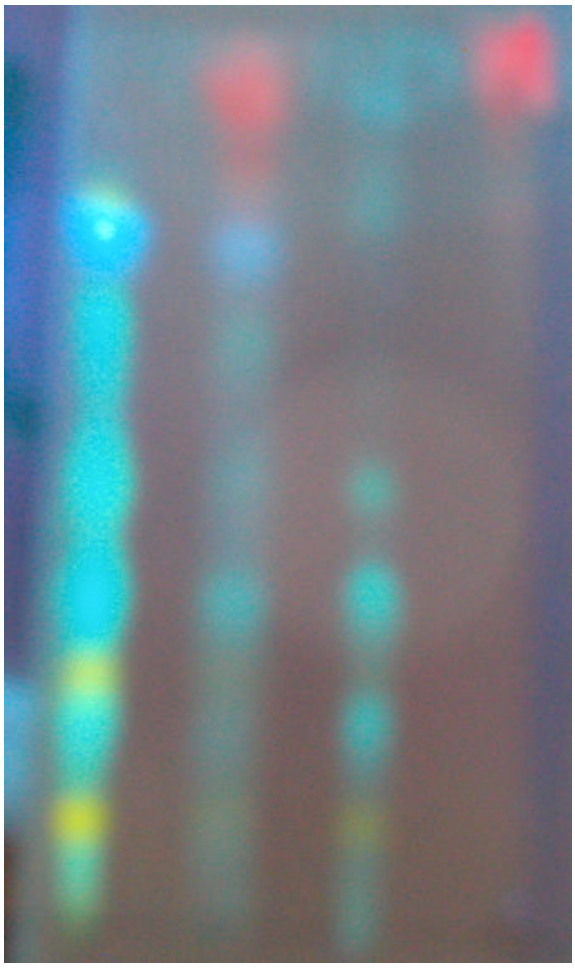


**Figura 12:** Cromatografia de camada delgada das frações acetato de etila, clorofórmica, hexânica de *S. sucticum,* revelada com NP/PEG, em luz UV.

## 4.4. Efeitos microbiológicos

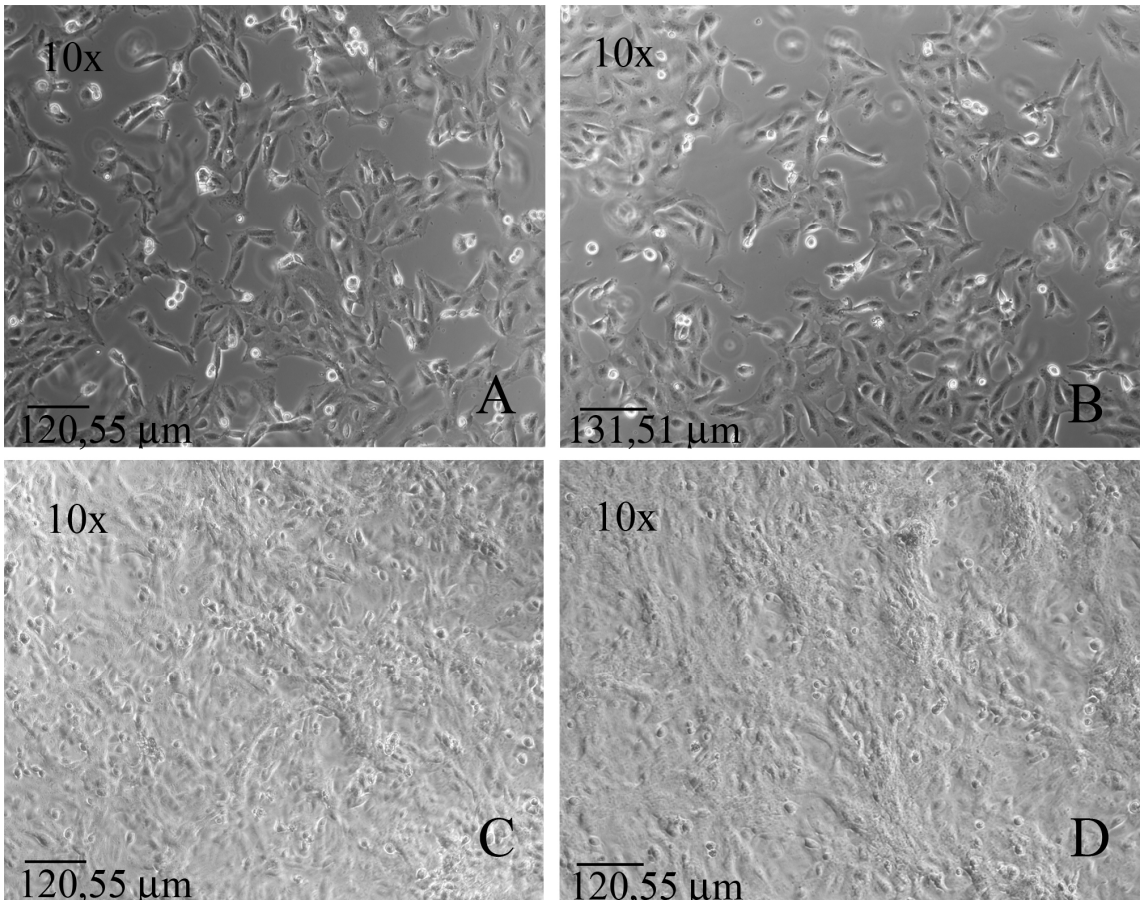
Na avaliação da esterilidade do extrato bruto não foram observados crescimentos de bactérias ou fungos, nos meios descritos no sub-item 3.4.1. Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Solanum* scuticum M. Nee. foram expressos no quadro 3.

**Quadro 3:** Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico bruto das folhas de jurubeba (*Solanum* scuticum) frente a diferentes cepas.

| Microrganismos | CIM |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus 481* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 937* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 912* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 897* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 934* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 6538* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 5923* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus aureus 915* | 70 mg/mL |
| *Staphylococcus epidermides* | 8,8 mg/mL |
| *Micrococcus Roseus 12228* | 8,8 mg/mL |
| *Micrococcus luteus* | 17,5 mg/mL |
| *Enterobacter cloacal* | 70 mg/mL |
| *Enterobacter aerogenes* | 70 mg/mL |
| *Escherichia coli 8739* | 70 mg/mL |
| *Escherichia coli 11229* | 70 mg/mL |
| *Escherichia coli 25922* | 70 mg/mL |
| *Serratia marcescens* | 70 mg/mL |
| *Bacillus cereus* | 8,8 mg/mL |
| *Bacillus stearoth* | 17,5 mg/mL |
| *Bacillus atropheus* | 17,5 mg/mL |
| *Pseudomonas aeruginosa 9027* | 17,5 mg/mL |
| *Pseudomonas aeruginosa 27853* | 17,5 mg/mL |
| *Candida albicans* | 17,5 mg/mL |

### 4.5. Efeitos em células cultivadas - Linhagem Vero

No controle negativo as células Vero cresceram aderidas em mono-camada, apresentaram morfologia semelhante à de fibroblastos, com leve granulação e vesículas citoplasmáticas, núcleos ovais, cromatina frouxa e nucléolos evidentes (únicos ou múltiplos). Depois de 24 horas de crescimento, cresceram de forma sobreposta, semelhante ao padrão de crescimento de células tumorais, além de apresentar aumento de granulação citoplasmática, vesículas e morfologia estrelada ou arredondada (13A e C).

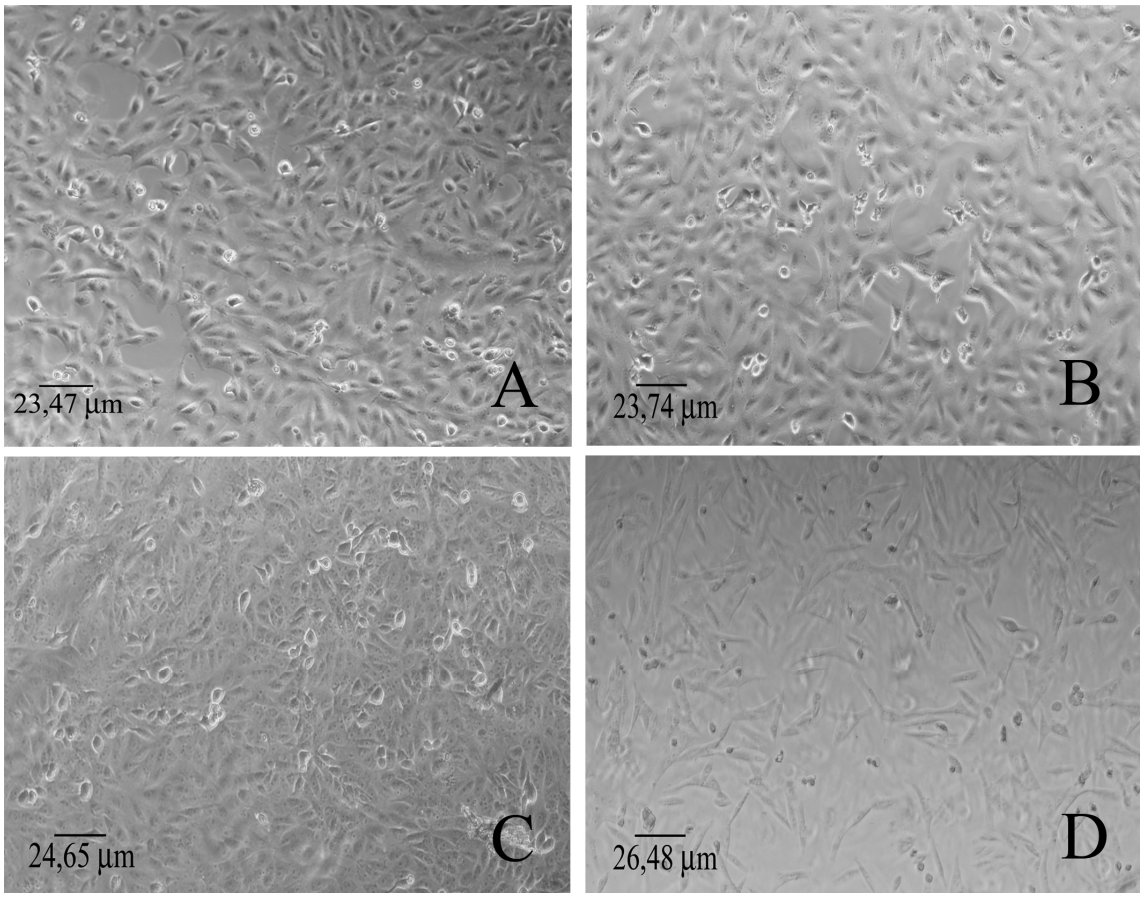



**Figuras 13:** Controles negatigos e de DMSO a 0,3% das células Vero em 24 e 48 horas, em contraste de fase. As figuras **A** e **B** (aumento de 10x, contraste de fase) representam respectivamente os controles negativos e os controles DMSO a 0,3%, em 24h de exposição, demonstrando semelhança morfológica entre os controles, morfologia celular semelhante a fibroblastos. Já as figuras **C** e **D** (aumento de 10x, contraste de fase) representam os mesmos controles, negativo e DMSO 0,3%, porém em 48 horas de exposição, evidenciando-se nos mesmos aumentos nas sobreposições celulares.

Nas observações microscópicas das células Vero, expostas ao controle de DMSO a 0,3%, analisadas em contraste de fase e coradas por Giemsa, não foram observadas alterações morfológicas, e nem alterações no comportamento de crescimento do cultivo nos tempos de 24h e 48h. Sendo que tais células apresentaram a mesmas dinâmicas de crescimento e características microscópicas observadas no controle negativo (13 A e B).

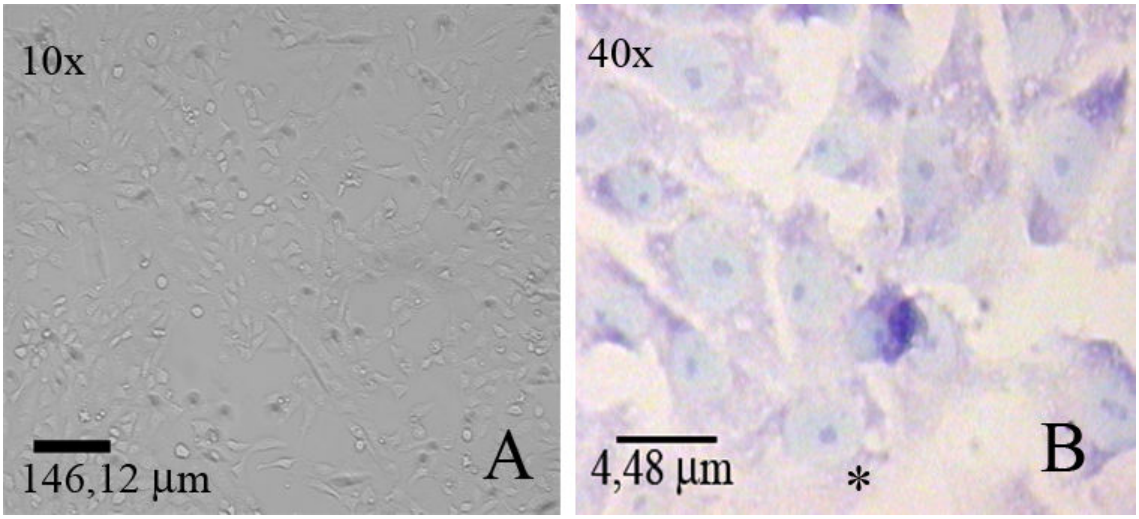
Além, disso os testes nas concentrações de 20 e 50µg/ml não apresentaram variações morfológicas ou de crescimento celular, quando comparadas aos controles

negativos ou controle de DMSO a 0,3% nos tempos de 24 e 48h (figuras 14A, B, C e D)..



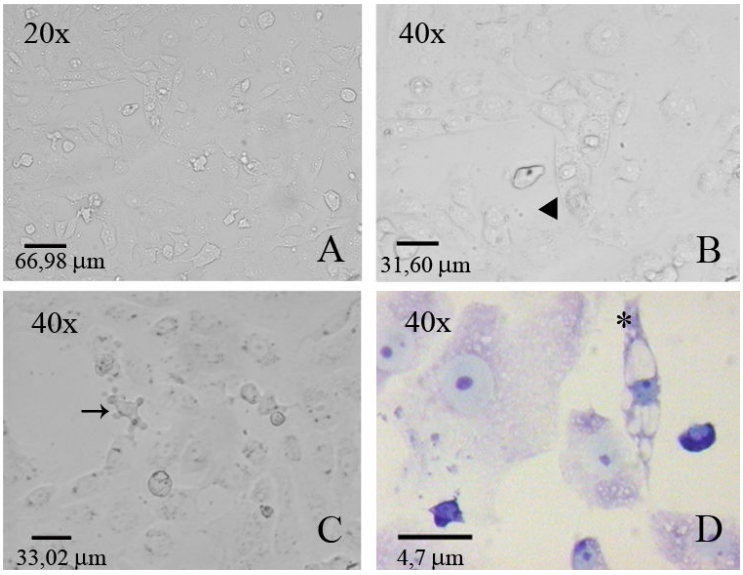

**Figuras 14:** Tratamentos das células Vero nos tempos de 24 e 48h, expostas à fração alcaloídica nas concentrações de 20 e 50 µg/ml, em microscópio de contraste de fase. As figuras **A** e **B** (aumento de 10x, contraste de fase) representam respectivamente os testes de 20 e 50 µg/ml em 24h de exposição, demonstrando semelhança com os controles negativos e DMSO a 0,3%. Já as figuras **C** e **D** (aumento de 10x, contraste de fase) representam as mesmas concentrações testes, porém em 48 horas de exposição, demonstrando semelhança com os controles em tal tempo, nos se evidenciaram aumento nas sobreposições celulares.

Já na concentração de 100 µg/ml não foram observadas alterações morfológicas e no comportamento de crescimento em 24h de exposição à fração alcaloídica mas depois de 48h de exposição observou se a não confluência total, como foi visualizada nos controles, além de moderada vacuolização (figuras 15A e B).




**Figuras 15:** Tratamentos das células Vero no tempo de 48h, expostas à fração alcaloídica na concentração de 100 µg/mL, em microscópio de contraste de fase e coradas por Giemsa. A figura **A** (aumento de 10x, contraste de fase) representa respectivamente o teste na concentração 100 µg/ml em 48h de exposição, demonstrando a não confluência total da monocamada de células, em comparação com os controles negativos e DMSO a 0,3%. **B** (aumento de 40x, campo claro, corada por Giemsa) apresenta células com aumento moderado na vacuolização citoplasmática(*), 48 horas de exposição, na concentração de 100 µg/ml.

Ao se investigar as respostas celulares em placas expostas a concentração de 200µg/ml por 24h constatou-se moderada vacuolização citoplasmática. Com o aumento do tempo para 48h, além da não confluência total como ocorreu nos controles, foi observada intensa vacuolização citoplasmática e menor grau de sobreposição celular (figuras 16A, B, C e D).




**Figuras 16:** Tratamentos das células Vero no tempo de 48h, expostas à fração alcaloídica na concentração de 100 µg/mL, em microscópio de contraste de fase e coradas por Giemsa. **A** (aumento de 20x, contraste de fase) representa o teste na concentração 100 µg/ml em 48h de exposição, demonstrando a não confluência total da monocamada de células, em comparação com os controles negativos e DMSO a 0,3%. **B** (aumento de 40x, contraste de fase) apresenta células com aumento acentuado da vacuolização citoplasmática (ponta de seta), em 48 horas de exposição, na concentração de 100 µg/ml. **C** (aumento de 40x, contraste de fase) apresenta estrutura em conformação apoptótica (seta), em 48 horas de exposição, na concentração de 100 µg/ml. **D** (aumento de 40x, campo claro, corada por Giemsa) apresenta célula com aumento acentuado da vacuolização citoplasmática (*), em 48 horas de exposição, na concentração de 100 µg/ml.

### 4.6. Dados estatísticos teste de viabilidade celular pelo método de azul de Trypan

Os resultados do teste de viabilidade pelo método de azul de Trypan estão expressos na tabela 3, onde estão representadas as médias das triplicatas.

Os resultados do teste de viabilidade celular, realizados pelo método de azul de Trypan, estão descritos na tabela 1. Já o teste de viabilidade celular entre os testes e controles está listado na tabela 2.

Já as avaliações das significâncias entre as médias dos controles e as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey estão listadas na tabela 3.

**Tabela 1: Médias dos controles e testes das contagens de células viáveis pelo azul de Trypan**

| | Média (cél./ml) 24h | Média (cél./ml) 48h |
|---|---|---|
| **Controle Negativo** | 2.666,7 | 5.166,7 |
| **Controle DMSO** | 20000 | 35000 |
| **20µg/ml** | 2.666,7 | 35000 |
| **50µg/ml** | 2.666,7 | 3.1666,7 |
| **100µg/ml** | 20000 | 6.666,7 |
| **200µg/ml** | 0 | 0 |

**Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) baseada no teste de viabilidade celular entre os testes e controle nos tempos de 24 e 48 horas.**

| Fonte de variação | Graus de liberdade | Soma de Quadrado | Quadrado Médio | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Tratamentos** | 5 | 85633 | 120.3333 | 15,6 | <0,001 * |
| **Blocos** | 2 | 50833.333 | 1016.666 | 1,3 | 0,29 |

***** Estatisticamente significativo

**Tabela 3: Avaliação da significância entre as médias dos controles e as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey**

| Relações entre as médias | Q | P |
|---|---|---|
| **Médias ( 1 a 2)** | 3.2567 | > 0.05 |
| **Médias ( 1 a 3)** | 2.3262 | > 0.05 |
| **Médias ( 1 a 4)** | 2.7915 | > 0.05 |
| **Médias ( 1 a 5)** | 7.2113 | < 0.01 |
| **Médias ( 1 a 6)** | 10.9332 | < 0.01 |
| **Médias ( 2 a 3)** | 0.9305 | > 0.05 |
| **Médias ( 2 a 4)** | 0.4652 | > 0.05 |
| **Médias ( 2 a 5)** | 3.9546 | > 0.05 |
| **Médias ( 2 a 6)** | 7.6765 | < 0.01 |
| **Médias ( 3 a 4)** | 0.4652 | > 0.05 |
| **Médias ( 3 a 5)** | 4.8850 | < 0.05 |
| **Médias ( 3 a 6)** | 8.6070 | < 0.01 |
| **Médias ( 4 a 5)** | 4.4198 | < 0.05 |
| **Médias ( 4 a 6)** | 8.1417 | < 0.01 |
| **Médias ( 5 a 6)** | 3.7219 | > 0.05 |

*Onde:

- 1 = controles negativos
- 2 = controles DMSO a 0,3%
- 3 = 20 µg/ml
- 4 = 50 µg/ml
- 5 = 100 µg/ml
- 6 = 50 µg/ml

### 4.7. Resultados da imunocitoquímica dos núcleos de Células Vero marcados com anti-PCNA

O controle negativo da reação não apresentou fluorescência inespecífica. Jás os resultados dos controles e testes nos tempos de 24 (figura 17) e 48h estão representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

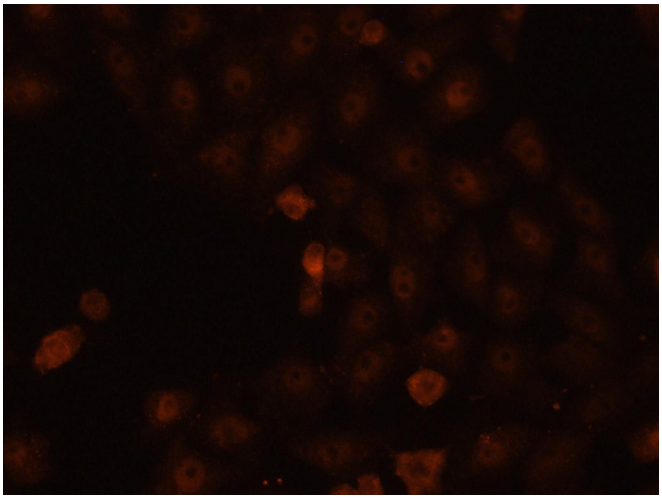


**Figura 17:** Núcleos de células Vero, marcadas com anti-PCNA, expostas à concentração de 200 µg/ml, com 24h de exposição (20x).

**Tabela 4:** Número de núcleos macados com anti-PCNA nos controles e testes, e os valores porcentuais dos testes em relação aos controles em 24h de exposição.

| | **Controle Negativo** | **Controle DMSO 0,3%** | **20 µg/ml** | **50 µg/ml** | **100 µg/ml** | **200 µg/ml** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nº de núcleos marcados com PCNA/24h** | 581 | 434 | 436 | 462 | 417 | 376 |
| **Porcentagem de núcleos marcados em comparação com o controle negativo (%)** | 100 | 74,7 | 75 | 79,5 | 71,8 | 64,7 |
| **Diferença da porcentagem de núcleos marcados em comparação ao controle negativo (%)** | 0 | 25,3 | 24,9 | 20,5 | 28,2 | 35,3 |
| **Diferença da porcentagem de núcleos marcados nos tratamentos em relação ao controle DMSO 0,3% (%)** | | | -0,3 | -4,5 | 7,7 | 7 |

**Tabela 5:** Número de núcleos macados com anti-PCNA nos controles e testes, e os valores porcentuais dos testes em relação aos controles em 48h de exposição.

| | Controle Negativo | Controle DMSO 0,3% | 20 µg/ml | 50 µg/ml | 100 µg/ml | 200 µg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nº de núcleos marcados com PCNA/24h** | 644 | 551 | 551 | 545 | 339 | 331 |
| **Porcentagem de núcleos marcados em comparação com o controle negativo (%)** | 100 | 85,6 | 85,6 | 84,6 | 52,6 | 51,4 |
| **Diferença da porcentagem de núcleos marcados em comparação ao controle negativo (%)** | 0 | 14,4 | 14,4 | 15,4 | 47,4 | 48,6 |
| **Diferença da porcentagem de núcleos marcados nos tratamentos em relação ao controle DMSO 0,3% (%)** | | | 0 | 0,931677 | 32,9 | 33,2 |

Foi observada maior redução na porcentagem de núcleos marcados com anti-PCNA nas concentrações de 100 µg/ml e 200 µg/ml, no tempo de 48 horas de exposição.

## 5 - DISCUSSÃO

A família Solanaceae possui gêneros e espécies de importância medicinal e, é freqüente no Cerrado goiano. Dentre esses gêneros está o *Solanum* scuticum cujas características morfológicas são muito parecidas com outras espécies de jurubebas. Desta forma, diferentes espécies são referenciadas por um mesmo nome popular e são usadas para a alimentação e como fármaco. Contudo, até o presente momento, havia dificuldade em se distinguir a espécie *Solanum scuticum* M. Nee para Goiás. Por isso, a sua classificação foi refeita baseando-se em critérios estabelecidos pela chave taxonômica de Dunal (1852). As características macroscópicas das folhas encontradas no presente trabalho foram compatíveis com as características descritas para esta espécie por Carvalho & Bovini (2006) que as descreveram em espécies coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Elas também estão de acordo às características descritas por Nee, Bohs e Knapp (2006) que relataram a presença desta espécie na Bolívia.

De acordo com os levantamentos bibliográficos realizados, informações acerca das características microscópicas de *S. scuticum* não estão disponibilizadas em artigos científicos. Por isso, no presente trabalho houve a necessidade de descrever as características morfoanatômicas da folha a fim de se colaborar com dados que pudessem consubstanciar as análises posteriores. Uma vez que as características morfoanatômicas apresentadas neste estudo representam a primeira descrição feitas para esta espécie.

Neste sentido, identificou-se epiderme uni-estratificada em ambas as faces da lâmina foliar, averigou-se que o mesofilo possuía o parênquima paliçádico unisseriado, adjacente à epiderme, na face adaxial, e o parênquima esponjoso 5-6-seriado. Investigou-se ainda os tricomas que foram identificados como sendo do tipo

porrecto-estrelados observados na face adaxial e estrelado-estipitados na abaxial. Além destas características descritas há nas folhas outras que são típicas de *Solanum* sp. , tais como: a presença de tricomas estrelados e estômatos em ambas as faces das folhas (SOLEREDER, 1908; METCALFE e CHALK, 1950; FURLAN *et al.*, 1999). Entende-se que a descrição colaborou para fornecer subsídios à identificação desta espécie para o estado de Goiás distinguindo-a das outras espécies que recebem a mesma designação popular, jurubeba.

Ehleringer e Mooney (1978) relataram que a presença de tricomas numa espécie constitui uma importante adaptação fisiológica da planta. Estas estruturas foram descritas em vegetais expostos a períodos de intenso calor, com alta incidência solar, e também com baixa disponibilidade hídrica. Estas são as condições climáticas de Goiânia, a qual possui duas estações bem definidas uma chuvosa e outra seca, sendo que em ambas a temperatura é elevada. Neste sentido, é compreensível que *S. scuticum* apresente grande número de tricomas por área foliar analisada, uma vez que confere a esta planta a capacidade de assimilação de $CO_2$ , a qual ocorre ao se reduzir a temperatura .

As folhas de *S. scuticum* são anfiestomáticas diferentemente do que ocorre com*Solanum variabile, S. paniculatum e S. rhytidoandrum,* que possuem folhas hipoestomáticas (FURLAN *et al.,* 1999; NURIT, AGRA e BASÍLIO, 2007). As folhas anfiestomáticas de acordo com Morretes (1969) são muito freqüentes em plantas do Cerrado, já que esta característica confere as plantas capacidade de regulação hídrica. É provável que esta seja uma característica adaptativa, em resposta as condições climáticas e, que estão bem expressas nas folhas de *S. scuticum*.

No corte transversal do pecíolo de *S. scuticum* foram observados tricomas estrelados e acúlios esparsos. Já no pecíolo foliar de *S. variabile* só foram observados

tricomas estrelados, estando ausentes tricomas glandulares e estrelado-glandulares (FURLAN *et al.* 1999), sendo que os últimos foram escritos em *S. rhytidoandrum* (NURIT *et al.* 2007). Sendo que tais diferenciações são de fundamental importância para diferenciar *S. scuticum* de outras espécies de jurubebas.

Outra característica que permite a diferenciação de *S. scuticum* é a ausência de oxalato de cálcio, do tipo areia cristalina no pecíolo de *S. scuticum*. Tais cristais foram descritos para *S. variabile* (FURLAN *et al.*,1999) *S. paniculatum* e *S. rhytidoandrum* (NURIT *et al*., 2007). Além disso, o presente estudo nas avaliações microquímicas evidenciou a presença de amido e de material lipídico. Segundo Bokovac *et al.* (1990) o material lipídico é um dos componentes da cutícula das folhas e, desempenham o papel de intercâmbio de substâncias e regulação hídrica, funções que são de relevante importância para plantas do Cerrado como a *S. scuticum.*

Na avaliação dos grupos de metabólitos secundário da folhas de *S. scuticum* foram identificados heterosídeos antraquinônicos, alcalóides, flavonóides, cumarinas e heterosídeos saponínicos. Entretanto, apesar de ainda não se encontrarem dados disponíveis dos constituintes fitoquímicos de *S. scuticum,* alguns grupos de metabólitos secundários já foram descritos para algumas espécies de "jurubeba", da seção *Torva*, como os alcalóides observados em *Solanum paniculatum* (MEYER e BERNOULLI, 1961) e *Solanum variabile* (LEEKNING e ROCCA, 1970; FURLAN *et al.*, 1999), ambas da mesma seção de *Solanum scuticum,* e em espécies de outros grupos infragenéricos, como *Solanum asperum* Rich. (SILVA *et al.*, 2003), da seção Brevantherum. Em *S. paniculatum* registrou-se a presença de glicoalcalóides como tomatidenol (BARBOSA-FILHO, 1991), paniculina e jurubina (paniculidina, jurubinina) (VIEIRA e CARVALHO 1993).

Já a presença de substâncias como flavonóides, saponinas esteroidais e cumarinas encontradas no presente trabalho estão em conformidade com as citados por Silva *et al*. (2003) para várias espécies de *Solanum*. As saponinas isojuripidina, isojurubidina, isopaniculidina e juridina foram identificadas em raízes de *S. paniculatum* (RIPPERGER, 1967; SCHREIBER *et al* 1965). Já o índice de espuma, que indica a presença de saponinas encontradas na droga, a partir do pó das partes aéreas de *S. scuticum* apresentou valor inferior ao valor de 400, encontrado em partes aéreas de *S. variabile* por Furlan *et al* (1999).

Não se identificou a presença de taninos na droga em pó de *S. scuticum* como foi verificado por Barbosa-Filho *et al.* (1991) em outras espécies de *Solanum*. Vários tipos de flavonóis, flavonas e seus *O*-heterosídeos foram observadas em outras espécies do gênero, sendo a classe de flavonóides mais comuns (SILVA *et al.*, 2003), também encontrados em tricomas estrelados, porém considerados mais complexos (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Pelo fracionamento por polaridade, observou-se com o uso de cromatografia em camada delgada uma maior reação para flavonóides glicosídicos, na fração acetato de etila. A presença de flavonóides nesta fração acetato de etila é condizente com os dados obtidos por Silva *et al.* (2002) para *Solanum paludosum* Moric., estando os flavonóides em forma de cristais, aciculares, amarelos.

Com base nos resultados obtidos, evidenciou-se a necessidade de estudos químicos adicionais de *Solanum scuticum* M. Nee, a fim de se identificar futuramente os metabólitos secundários dos grupos químicos registrados. Além disso, será necessária uma avaliação de suas atividades farmacológicas, uma vez que esta espécie é utilizada frequetemente na medicina popular, na região de Goiás, com as mesmas indicações de uso para *Solanum paniculatum*.

A avaliação da presença de microrganismos nos extratos vegetais possui grande importância na qualidade da matéria-prima vegetal. Uma vez que, as condições de obtenção das mesmas devem ser levadas em consideração, para a preparação de extratos vegetais que deve seguir as normas descritas na Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004). A qual estabelece que a pesquisa de contaminantes microbiológicos em fitoterápicos deve estar de acordo com especificações da Farmacopéia Brasileira (1988) e da Farmacopéia Americana (The United States Pharmacopeia, 2005). Estas estabelecem que os produtos de uso oral podem apresentar $10^3$ bactérias aeróbias/g ou mL e$10^2$ fungos/g, mas devem estar ausentes as bactérias *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Devendo estar livres também dos microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Tais avaliações devem ser realizadas no sentido de verificar, por exemplo, a presença de componentes micotoxigênico de *Aspergillus* e *Penicillium*, que potencialmente podem ser encontrados em amostras de plantas medicinais e podem causar danos à saúde do consumidor ou interferir em testes biológicos com extratos de plantas (BUGNO *et al*, 2006). Exemplificando, Creppy *et al.* (2004) observaram efeito citotóxico das micotoxinas fucomisina B1 e acratoxina A em células Vero, as quais nas respectivas concentrações de 64.3 e 9.70 µg/ml, levaram à redução da viabilidade de tais células em 50%.

Os dados relatados neste trabalho identificam ausência de fungos e bactérias no extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *S. scuticum*. Tais achados são compatíveis com os descritos por Bugno *et al*. (2006) pois estes autores também não observaram o crescimento de microrganismos no extrato bruto hidroalcoólico das folhas de jurubeba da espécie *S. paniculatum*.

A ausência de microrganismos nas avaliações supracitadas poderia ser explicada pelo baixo teor de umidade da droga, o qual foi de 5,6% a partir das cinzas. Para Simões *et al* (2004) nas farmacopéias brasileiras os teores de umidade variam de 8 a 14%. Valores superiores a essa faixa podem possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias, não sendo recomendos portanto.

Ao se avaliar a questão do crescimento dos microorganismos pode-se considerar que o não crescimento de fungos e bactérias no extrato bruto das folhas de *S. scuticum*, se dê em virtude da atividade anti-microbiana dos extratos. Relatos feitos por Fenner *et al*. (2006) que inferem possível atividade anti-microbiana para *S. paniculatum*. Esta afirmativa encontr respaaldo na medician popular pois as folhas desta planta são utilizadas popularmente como cicatrizante, aplicadas diretamente sobre ferimentos. É possível supor que como não havia ainda a identificação de *S. scuticum* para Goiás que ela ser utilizada popularmente como se fosse *S. paniculatum*, indicando uma vez mais a necessidade de estudos mais detalhados das espécies utilizadas popularmente.

Além disso, o gênero *Solanum* sp. possui espécies as quais são atribuídas atividades antimicrobianas, em virtude da presença de glicoalcalóides e flavonóides (CHAH *et al.*, 2000) os quais foram encontrados na avaliação fitoquímica das folhas de *S. scuticum*. Os glicoalcalóides de *S. nigrum* têm atividades antimicrobianas e para *S. incanum,* esta atividade antimicrobiana deve-se à presença de flavonóides (AL-FATIMI, 2007). Assim por comparação pode-se assumir que as atividades semelhantes ocorram pelo uso dos extratos das folhas de *S. scuticum*.

Nesse sentido, foi avaliada a possível atividade anti-microbiana do extrato bruto hidroalcoólico de *S. scuticum*. O crescimento de todas as cepas de microrganismos (bactérias e fungo) foi inibido na concentração de 70 mg/ml. Neste

caso, os microrganismos que apresentaram maior sensibilidade foram *Staphylococcus epidermides*, *Micrococcus roseus* 12228 e *Bacillus cereus* (inibição na concentração de 8,8mg/ml). Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 μg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 μg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 μg/mL, uma vez que afirmam que existe boa relação entre os achados de MIC a partir de plantas e os obtidos com antibióticos comercializados.

Filho *et al.* (2006) relatam que a concentração inibitória mínima deve se encontrar entre 0.5 e 2 mg/mL. De acordo com NCCLS (1999) um MIC de 16 mg/ml é considerado resistente para *Pseudomonas aeruginosa*. Esses valores para o MIC indicam que o extrato bruto hidroalcoólico de *S. scuticum* apresenta leve atividade antimicrobiana. Esse dado é compatível com os achados de Duarte (2006), o qual observou fraca atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de "folha prata" (*Solanum* sp.) planta pertencente à família *Solonaceae* e, é utilizada na medicina popular como antitérmico, diurético e contra "problemas" gástricos. Em geral, a atividade dos glicoalcalóides esteroidais, em algumas espécies do gênero *Solanum*, é antibacteriana leve e anti-fúngica menos pronunciada, estando essas substâncias mais relacionadas à desestabilização das membranas biológicas (SIMÕES, 2004).

Nos vegetais do gênero *Solanum*, os glicoalcalóides esteroidais são utilizados a fim de se eliminar herbívoros (DEY e HARBORNE, 1997). Tal grupo de alcalóides possui cadeia nitrogenada com aproximadamente 27 átomos de carbono. Estas características químicas são responsáveis pela semelhança entre esse grupo de alcalóides e as saponinas esteroidais, conferindo a essas substâncias possíveis propriedades tóxicas (DEWICK, 1997).

Os testes que visem avaliar a bioatividade de extratos e frações de plantas requerem além das atividades microbianas o uso de outros sistemas modelos *in vitro* que possibilitem, em sistema fechado, averiguar-se a eficácia e os efeitos destes extratos sobre outras células.

No presente trabalho foi averiguado o possível papel citóxico dos alcalóides extraídos de *S. scuticum*, utilizando como modelo celular a linhagem Vero. Ascaracterísticas morfológicas e de comportamento proliferativo descritos na literatura para a linhagem Vero são condizentes com as observações nos controles negativos e controle de DMSO a 0,3%, realizados nesse trabalho. Sendo que inicialmente no tempo de 24h as células apresentaram um padrão de crescimento típico de células Vero "normais" e após 48 horas passaram a apresentar características de células Vero transformadas. Uma vez que, as células Vero acrescerem sobrepostas quando perdem a inibição célula a célula, em virtude de poliploidia dessas células após 29 horas de cultivo (GENARI e WADA, 1995).

Uma das dificuldades encontradas nesse estudo foi a solubilização da fração alcaloídica no meio de cultivo. Tal problema solucionado com a solubilização da fração em DMSO, sendo a mesma realizada na menor concentração para solubilização completa dos alcalóides, a qual foi de 0,3%. Na literatura consultada, outros autores também encontraram a mesma dificuldade de solubilização (KUMAR *et al*, 2001; SHIU *et al.*, 2007). Apesar do DMSO ser um composto que pode inibir o crescimento de fibroblastos *in vitro* (DAVIS, 1984). Contudo, segundo Crawford e Kocan (1993) avaliando a ação dos alcalóides esteroidais em embriões de peixes, concluíram que a concentração de DMSO de até 1% não apresentava efeitos tóxicos em animais ou células. Contudo, não foram observadas alterações na viabilidade celular ou na morfologia das células Vero, ao serem expostas ao DMSO a 0,3%.

Ao se observar os dados estatísticos da viabilidade celular por azul de Trypan, não se evidencia diferença estatística entre os controles negativos e DMSO a 0,3%, tanto em 24h quanto em 48h. Permitindo-se inferir que a solubilização do DMSO não influenciou nos resultados dos tratamentos com a fração alcaloídica. Além de não serem notadas variações morfológicas entre os tratamentos. Estando tais achados compatíveis com as colocações de Crawford e Kocan (1993). Sendo compatível também com as observações de Panzer *et al.* (2001) que não observaram efeito citotóxico do DMSO a 0,67% em células Vero, em seus controles.

Na observação microscópica da morfologia das células Vero expostas à fração alcaloídica, nas concentrações de 20 e 50 µg/ml não apresentaram variações morfológicas ou de crescimento celular, quando comparadas aos controles negativos ou controle de DMSO a 0,3% nos tempos de 24 e 48h. Tais resultados apontam para baixa atividade citotóxica da fração alcaloídica de *S. scuticum* nessas concentrações.

As observações morfológicas colaboram com a avaliação estatística da viabilidade células, ao se comparar os controles com os referidos tratamentos, onde, pelo teste estatístico de Tukey não se observou diferença entre os controles e os testes nas concentrações de 20 e 50 µg/ml. Contudo alguns glicoalcalóides possuem atividade citotóxica em concentrações até inferiores, como a solamergine, obtida de *Solanum icanum*, que apresentou letalidade para 50% das células da linhagem Hep3B na concentração de 5 µg/ml, por duas horas de exposição. Além de promover letalidade de quase 100% na concentração de 10 µg/ml, por um período de 15 horas (KOU, K. *et al.*, 2000).. Já Kumar *et al.* (2001) observaram efeito cito-protetor dos extratos da totalidade de *Solanum nigrum* (10, 100 e 1000 µg/ml), para células da linhagem Vero lesadas pela ação de gentamicina.

Ao empregar-se a concentração de 100 µg/ml não foram observadas alterações morfológicas e no comportamento de crescimento em 24h de exposição à fração alcaloídica, mas se observou em 48h de exposição a não confluência total, como foi visualizada nos controles. A avaliação da viabilidade celular demonstrou redução significante do número de células viáveis na concentração de 100 µg/ml da fração alcaloídica de *S. scuticum*, em 48h de exposição, sendo compatíveis com os dados morfológicos indicativos de citotoxicidade. Algumas espécies de *Solanum* como *Solanum trilobatum*, semelhantemente apresentaram atividade citotóxica de frações divididas por polaridade sobre linhagem de células Vero, na concentração de 100 µg/ml (MOHANAN e DEVI, 1996). Já Esteves-Souza *et al.* (2002) observaram atividade citotóxica do glicoalcalóide solasonina para células de carcinoma de Ehrlich e de leucemia K562, respectivamente nas concentrações de 19,5 e 60,35 µg/ml. Os mesmos autores notaram uma baixa atividade da aglicona solasodina frente às células tumorais avaliadas, sendo tal achado atribuído a importância da glicosilação no alcalóide.

Além disso, nas placas expostas a concentração de 200 µg/ml por 24h constatou-se leve vacuolização citoplasmática, com o aumento do tempo para 48h, além da não confluência total como ocorreu nos controles, foi observada intensa vacuolização citoplasmática. Segundo Genari, Dolder e Wada (1996) o aumento de vesículas em células transformadas refere-se à eliminação de substâncias por parte destas através de exocitose. Além disso, a formação de grupos celulares com aspecto de células tumorais permite a utilização desta lihagem como modelo de caracinogênese *in vitro*. Para Vilela *et al.* (2003) é importante investigar a dinâmica de formação destes agregados, já que podem simular a formação de nódulos cancerosos *in vivo*. Sendo que, para formação de grupamentos sobrepostos há

necessidade de interação das células transformadas com a matrix extracelular (PERSKY, MEYSKENS e HENDRIZ, 1989).

Também, nas placas expostas a concentração de 200 µg/ml, nos períodos de 24 e 48h, foram observadas células arredondadas, representação de células semelhantes a células apoptóticas e menor grau de sobreposição celular. Contudo, a fração alcaloídica nessa concentração matou a totalidade das células, quando utilizada uma concentração inicial de $1x10^4$ células, a fim de se realizar o ensaio de azul de Trypan. O que não ocorreu na avaliação morfológica partindo-se de uma concentração celular inicial igual a $5x10^4$ células. Essa diferença poderia ser explicada pelo conceito de crescimento de Skipper (1996) da eliminação logarítimica ou *log kill,* no qual a administração de uma determinada dose de uma droga citotóxica eliminaria uma fração constante e não um número absoluto de células tumorais em um ciclo. Já as figuras apoptóticas, as células arredondadas e o aumento de vacuolização foram evidenciados por Barbieri e Genari (2004) ao observarem a ação do tamoxifeno em culturas de células Vero, o qual em concentrações de microgramas pode induzir apoptose. Assim, a fração alcaloídica de *S. scuticum* provavelmente induziu apoptose de células Vero, sendo que a morte de células se deu em uma fração constante.

Ao se averiguar que houve um decréscimo de células Vero expostas à concentração de 20, 50, 100 e 200 µg/ml no período 24 e 48 horas de exposição, optou-se pelo uso do marcador PCNA. Isto porque a literatura relata que o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) constitui um glicopeptídio nuclear que pode se encontrar tanto associado à cromatina, quanto difuso no nucleoplasma, apresentando um importante papel no funcionamento da DNA polimerase δ,

envolvendo a síntese de DNA (TSURIMOTO e STILLMAN, 1989; BRAVO e BRAVO, 1987; DUCOUX, 2001).

O PCNA pode ser encontrado na fase G1 ou S do ciclo celular, apresentando meia vida longa e, ainda foi descrito tanto em células em proliferação quanto em células em migração, indicando sua presença também em células ativas e pode participar do sistema de reparo do DNA (ONUMA, MASTUI E MOROHASHI, 2001; SAVIO *et al.* 1998). Por isso, o emprego do PCNA teve os dados cruzados com as evidências de alterações celulares observadas nas células coradas pelo azul de Tripan.

Os resultados da imunocitoquímica para anti-PCNA indicaram redução na porcentagem de núcleos marcados com o aumento das concentrações da fração alcaloídica, além da redução em função do tempo. As maiores reduções ocorreram nas concentrações de 100 e 200 µg/ml, em 48 horas de exposição, respectivamente 32,9 e 33,2%. Tais resultados indicam uma possível redução na proliferação celular ou na atividade celular.

Além disso, outra possibilidade para a redução porcentual de núcleos marcados seria a redução no número de células nas maiores concentrações, em 48 horas de exposição, tendo em vista os resultados da avaliação morfológica e os resultados do teste de viabilidade celular, anteriormente discutidos. Ao se comparar com trabalho que analisou a marcação de fibroblastos, para detecção de intensa proliferação celular, por imunofluorescência com PCNA, mesmo após danos pelo agente mutagênico metil metano sulfonato na concentração de 100 µg/ml (SAVIO *et al.* 1998), constatou dados diametralmente oposto aos achados indicando que tais células possuíram capacidade de recuperação frente à exposição do agente

mutagênico. O que não ocorreu no presente trabalho, já houve redução do número de núcleos marcados.

Pode-se notar assim, o aumento da ação citotóxica da fração alcaloídica de *S. scuticum* em função da concentração. Tal achado foi observado por Liu *et al.* (2004) ao avaliarem a ação da somargine, obtida de *Solanum incanum*, que inibiu o crescimento ao induzir apoptose nas células de carcinomas de pulmão. Colaborando para tais dados, Son *et al.* (2003) demonstraram inibição da proliferação celular e aumento de apoptose de células de câncer de mama MCF-7, com o aumento da concentração do extrato etanólico dos frutos de *Solanum nigrum* L.. Além disso, Sheng-yu *et al.* (2007) concluíram que a variação da glicosilação em diversos tipos de glicoalcalóides obtidos de espécies de *Solanum,* é responsável pela menor ou maior atividade anti-proliferativa dos compostos, quando avaliada tal atividade frente à células HCT-8 (carcinoma íleo-cecal humano).

A partir de tais resultados e baseado nas características de comportamento das células Vero, infere-se a necessidade de continuidade de avaliação das atividades anti-proliferativas da fração alcaloídica de *S. scuticum,* em virtude da potencialidade da atividade quimioterápica dos alcalóides do gênero *Solanum*. Aprofundando-se nos efeitos no ciclo celular e se averiguando sua atuação frete a outras linhagens celulares. Tal potencialidade já foi colocada por Silva *et al.* (2007) com relação a várias espécies de jurubebas (*S. crinitum* Lam., *S. diamantinense, S. megalonyx* Sendtn., *S. palinacanthum* Dunal, *S. paludosum* Moric., *S. paniculatum* L., *S. paraibanum* Agra, *S. sisymbrifolium* Lam., *S. stipulaceum* Roem. & Schult., *S. torvum* Sw.). No entanto, as pesquisas a ação desse grupo de substâncias é ainda incipiente. De acordo com Cragg e Newman (2005) as plantas medicinais

contribuem uma das principais fontes para a obtenção de novos compostos que atuem no ciclo celular de células tumorais.

Contudo, os dados obtidos pelos trabalhos científicos apesar de poderem auxiliar grandemente o tratamento de saúde das populações humanas, tal como a potencialidade de tratamento de tipo de câncer de pele por glicoalcalóides de *Solanum sodomaeum* (CHAM e MEARES, 1987), nem sempre são aplicáveis. Pois, os custos industriais para pesquisa e colocação de novos fármacos no mercado são relativamente altos. E o retorno dessas pesquisas para a sociedade poderia ser maior, uma vez que a descoberta de novos fármacos pode ser um dos mecanismos utilizados a fim de se conhecer melhor a flora brasileira e promover a preservação da mesma.

# 6 - CONCLUSÕES

- ✓ A jurubeba utilizada na região de Goiânia não é a mesma descrita na Farmacopéia Brasileira, tratando-se de *S. scuticum*;
- ✓ Existem características morfo-anatômicas dessa espécie que permitem a deiferenciação da mesma de outras espécies de jurubebas.
- ✓ Tal espécie apresenta uma fraca atividade antimicrobiana;
- ✓ Os alcalóides encontrados em *S. scuticum* podem apresentam atividades anti-proliferativas em células transformadas. Havendo a necessidade de novos estudos a fim de se avaliar os mecanismos de atuação de tal grupo de metabólitos secundários encontrados em *S. scuticum.*
- ✓ Tais achados são de fundamental importância para proteção e valorização do bioma Cerrado.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F. **Citação pessoal da especialista identificadora da espécie de *Solanum scuticum* no estado de Goiàs.** 2007.

AGRA, M. F., BHATTACHARYYA, J. **Ethnomedicinal and phytochemical investigation of Solanum species in Northeast of Brazil.** In Nee M, Symon DE Lester RN & Jessop JP (editors). Solanaceae IV, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 341-343, 1999.

AL-FATIMI, M. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 111, p. 657 - 666, maio, 2007.

ALICE, C. B. *et al.*. Avaliação do teor de solasodina em frutos de Solanum granuloso-leprosum Dun.. ***Rev. Bras. Farm.***, v. 70, p.61-63, 1989.

ALIGIANIS N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. ***J. Agric. Food Chem.***, v. 49, p. 4168 - 4170, 2001.

ANTONIO, J. M. *et al.* Antiulcerogenic activity of ethanol extract of Solanum variabile (false "jurubeba"). ***Journal of Ethnopharmacology***, n. 93, p. 83 - 88, 2004.

AVIDOS, M. F. D., FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados: Preservação gera muitos frutos. ***Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento***, n. 1, 2000.

BARBIERI, G. N. F.; GENARI, S. C.. **Ação citotóxica e transformante do antineoplásico tamoxifeno sobre células da linhagem Vero.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Departamento de Morfologia. Campinas: Unicamp, 2004.

BARBOSA-FILHO, J. M. Chemical and pharmacological investigation of Solanum species of Brazil – a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. ***Mem. I. Oswaldo Cruz***, v. 86, p. 189 - 191, 1991.

BOKOVAC, J. M. *et al.*Sorptoion of organic compounds by plant cuticles. ***Weed Science***, v. 38, p. 289 - 298, 1990.

BLANDT, S.; WAGNER, H.. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Cromatography Atlas.** Alemanha: Springer, 2. ed., 2001.

BRANDÃO, C. R., ROCHA, E**. O Jardim da Vida.** Goiânia: Editora UCG, 2004.

BRASIL. Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <http:// www.anvisa.gov.br/legis/resol/2004/48_04rdc.htm>. Acesso em: 28 fev. 2008.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H.. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. ***J. Cell Biol.***, v. 105, p. 1549 – 1554,1987.

BRITO, A. R. M.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. ***Journal of Etnopharmacology***, v. 39, p. 53 - 67, 1993.

BUGO, A. *et al*. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. ***Braz. J. Microbiol.***, v.37, n.1, jan./mar., 2006.

CARVALHO, L. F., BOVINI, M. G. *Solanaceae* na reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro – Brasil. ***Rodrigésia***, v. 57, p. 75 – 98, 2006.

CHAH, K.F. et al. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. ***Fitoterapia***, v. 71, p. 187 - 189, 2000.

CHAM, B. E.; MEARES, H. M.. Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* are effective in the treatment of skin cancers in man. ***Cancer Letters***, v.36, p. 111 - 118, 1987.

CORRÊA, R. A. S.O.S Cerrado: HELP! HELP!. ***Revista de Pedagogia***, n. 1, 2000.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1996.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.. Plants as a source of anti-cancer agents. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 100, p. 72 – 79, 2005.

CRAWFORDA, L.; KOCANB, R. M.. Steroidal alkaloid toxicity to fish embryos. ***Toxicology Letter***, v. 66, n.2, p. 175 - 181, 1993.

CREPPY, E. E. *et al.* Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? ***Toxicology***, v. 201, p. 115 – 123, 2004.

DAVIS, L. E.. Dimethyl sulfoxide. ***J. Am. Vet. Med. Assoc.***, v. 185, p. 1011 - 1014, 1984.

DEWICK, P. M.. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** England: Wiley, 1997.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B**.. Plant Biochemistry**. Londres: Academy Press, 1997.

DONOSO, J. A. *et al.* Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Axonal Fibrillar Organelles in Vitro. ***Cancer Research***, v. 37, p. 1401 - 1407, maio, 1977.

DUARTE, M. C. T.. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. ***MultiCiência*****,** V. 7, 2006.

DUCOUX, M. *et al.* Mediation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-dependent DNA Replication through a Conserved $p21^{Cip1}$ - like PCNA-binding Motif Present in the Third Subunit of Human DNA polymerase δ, ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 276, n. 52, p. 49258 – 49266, 2001.

EHLERINGER, J. R., MOONEY, H. A. Leaf hairs: effect on physiological activity and adaptative value to a desert shrub. ***Oecologia***, v. 37, p. 183 - 200, 1978.

EITEN, G. 1994. **Vegetação do Cerrado.** Pp. 17-73. In: M. N. Pinto (Org.). Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas. Editora Universidade de Brasília. Brasília.

EMBRAPA - CERRADOS. **A área remanescente no bioma Cerrado é de 61,2%.** Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/materias_pripag/2007/cerrado.html>. Acesso em: 25 març. 2008.

EMMANUEL, S. *et al.* Antiinflammatory activity of *Solanum trilobatum*. ***Fitoterapia***, n. 77, p. 611 – 612, 2006.

ESTEVES-SOUZA, A. *et al.* Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human k562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. ***J. Braz. Chem.*** **Soc.**, n. 6, p. 838 - 842, 2002.

**Farmacopéia Brasileira**. São Paulo. Editora Atheneu, 4. ed., Parte II,. Fasc. 3, 2001.

**Farmacopéia Brasileira.** São Paulo: Siqueira, 1939.

**Farmacopéia Brasileira.** São Paulo: Siqueira, 1959.

**Farmacopéia Brasileira.** São Paulo: Atheneu, 4. ed., Parte 1. p., V.5.1.6.-1 – V.5.1.7.-6, , 1988.

FENNER, R. *et al*. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Aurélio Século XXI : O Dicionário da Língua Portuguesa.** São Paulo: Nova Fronteira, 2001.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. ***Química Nova***, n. 21, p. 99 - 105, 1998.

FILHO, G. S. *et al.* Antimicrobial activity and hytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. ***Rev. Bras. Farmacogn.***, v. 16, n. 4, 2006.

FURASTÉ, P. A.. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico. Explicitação das Normas da ABNT.** 13 .ed., Porto Alegre: s.n., 2004.

FURLAN, C. M., KATO, E. T. M., OLIVEIRA, F. Caracterização da droga e do extrato fluido de *Solanum variabile* Mart. Parte I. ***LECTA*** v.17, p. 9-35, 1999.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. ***Cancer Research***, v. 12, p. 264 - 265,1952.

GENARI, S. C., WADA, M. L. F. Behavioural differences and cytogenetical analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line. ***Cytobios***, v. 15, p. 17 - 25, 1995.

GENARI, S. C.; DOLDHER, M. A. H.; WADA, M. L. W.. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. ***J. Sunmicrosc. Cytol. Pathol.,*** v. 28, n. 4, p. 565 – 572, 1996.

GENARI, S. C.; GOMES, L.; WADA, M. L. W.. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero induced by nutritional stress. ***Cell Biology International,*** v. 22, n. 4, p. 285 – 294, 1998.

GENTRY, A. H. *et al.* 1997. Regional overview: South America. Pp. 269-307. In: V.H. Heywood, S.D. Davis (Coord.). Centres of Plant Diversity. WWF/IUCN. Cambridge.

GÓES, A. C. A. M. *et al.* Análise histológica da cicatrização da anastomose colônica, em ratos, sob ação de enema de Aroeira-do-sertão (Myracrodruon urundeuva fr. all.) a 10%. ***Acta Cir. Bras***., v. 20, n. 2, mar.-abr., 2005.

HARIDASAN, M. Aluminum accumulation by some Cerrado native species in Central Brazil. ***Plant and Soil***, v. 65, p. 265 - 273, 1982.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S.. The serial cultivation of human diploid cell strains. ***Experimental Cell Research***, v. 25, p. 585 - 621, 1961.

HENRIQUES, R. P. B. O fututo ameaçado do Cerrado. Ciência Hoje, v.35, julho, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Mapas de Biomas e de Vegetação.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=169> Acessado em: 05 fev. 2008.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S.. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. ***Journal of Ethnopharmacology***, n. 104, p. 156 – 163, 2006.

JURANIC, Z. *et al.* Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. ***Food Chemistry***, n. 93, p. 39 - 45, 2005.

KAVALLARIS, M. *et al.* Multiple Microtubule Alterations Are Associated with Vinca Alkaloid Resistance in Human Leukemia Cells. ***Cancer Research***, v. 61, p. 5803 – 5809, agosto, 2001.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. ***Megadiversidade,*** v. 1, n.1, julh., 2005.

KRAUS, J. E., ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de Janeiro: Editora da Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1997.

KUMAR, V. P.. Cytoprotective role of *Solanum nigrum* against gentamicin-induced kidney cell (Vero cells) damage *in vitro*. ***Fitoterapia***, v. 72, p. 481 - 486, 2001.

KOU, K. *et al.* Anticancer Activity Evaluation of the Solanum Glycoalkaloid Solamargine. ***Biochemical Pharmacology***, v. 60, p. 1865–1873, 2000.

LEEKNING, M. E., ROCCA, M. A., Chemical study of *Solanum variabile* Mart. **Rev. *Fac.Farm. Odontol. Araraquara***, v. 4 p. 343 – 344, 1970.

LIU, L. F.. Action of solamergine on human lung câncer cells – enhancement of the susceptibility of câncer cell to TNFs. ***FEBS Letters***, v.577, p. 67 - 74, 2004.

MACHADO, R. B. *et at*. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. In. Conservation International do Brasil, Brasília, 2004a.

MALAWISTA, S. E.; SATO, H.; BENSCH, K. Vinblastine and Gniseofulvin Reversibly Disrupt the Living Mitotic Spindle. ***Science***, v. 160, p. 770 - 772, 1968.

MARCUS, D. M,; GROLLMAN, A. P.. Botanical medicines – the need for new regulations. ***N. Engl. J. Med.,*** v. 347, n. 25, dezembr., 2002.

MARTINS, N. L. P. *et at.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. ***Acta Cir Bras.***, v. 21, n. 3, p. 66 - 75, 2006.

MATTOS FILHO, T. R. *et al*. Efeito do Pós-Tratamento com o extrato Bruto Hidroalcólico Desidratado de *Solanum paniculatum* L. em Lesões Hepáticas induzidas Pelo Tetracloreto de Carbono. ***Lecta***, v. 15, p. 143 - 175, 1997.

MENDONÇA, R.C. *et al.*1998. Flora vascular do cerrado. Pp. 289-539. In: S. M. Sano, S. P. Almeida (Eds.). Cerrado: Ambiente e Flora. Embrapa CPAC. Planaltina.

MESIA-VELA, S. *et al. Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secreção in mice. ***Phytomedicine***, n. 9, p. 508 - 514, 2002.

METCALFE, C. R., CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Clatendon Press. 1950.

MEYER, V. K., BERNOULLI, F. Über die basischen Inhaltsstoffe von *Solanum paniculatum* L.. ***Pharmaceutica Acta Helvetiae***, v. 36, p. 80–96, 1961.

MOHANAN, P. V.; DEVI, K. S.. Cytotoxic potential of the preparations from Solarium trilobatum and the effect of sobatum on tumour reduction in mice. ***Cancer Letter***, v. 110, p. 7 1 - 76, 1996.

MORRETES, B.L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado III. ***Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP***, v. 24: p.732, 1969.

NASCIMENTO, V. **Investigação da Bioatividade dos Extratos das Plantas (*Eugenia uniflora, Solanum paniculatum e Hyptidendron canun*) do Cerrado de Goiás – Brasil sobre as Brânquias do Guaru.** Dissertação (Mestrado em Biologia) - Departamento de Morfologia. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2004.

NACIMENTO, R. J. B. *et al.* Presençca de flavonóides nos tricomas de *Solanum asperum* Rich. E *Solanum stipulaceum*, *Solanum* sect. *Brevantherum.*. *In. 29ª Reunião Anual. Sociedade Brasileira de Química.* Águas de Lindoia, Brasil, 2006.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). *Performance Standards for Anti**mic**robial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12*. **NCCLS**, Wayne, PA, USA.

NEE, M.; BOHS, L.; KNAPP, S.. New species of *Solanum* and *Capsicum* (Solanaceae) from Bolivia, with clarification of nomenclature in some Bolivian *Solanum*. ***Brittonia,*** v. 34, n. 4, outubr., 2006.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G.. Recursos Medicinais de Eespécies do Cerrado de Mato Grosso: um Estudo Bibliográfico***. Acta Bot. Bras.***, v.17, n. 4, p. 561 - 584, 2003.

NURIT, K., AGRA, M. F., BASÍLIO, I. J. L. D. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Solanum paniculatum* L. e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn.(Solanaceae). ***Revista Brasileira de Biociências***, v. 5 (supl.1), p. 243 - 245, 2007.

PANZER, A. *et al.* The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. ***European Journal of Cell Biology***, v. 80, p. 111 - 118, jan. , 2001.

PEREIRA, M. C. A. *et al.*Toxicity of a subchronic treatment with hydroalcoholic crude extract from *Solanum grandiflorum* (Ruiz et Pav) in rats. ***Journal of Ethnopharmacology***, n. 89, p. 97 - 99, 2003.

PERES, C. M.; CURI, R.. **Como cultivar células.** 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PERSKY, B.; MEYSKENS, F. L.; HENDRIZ, M. J. C.. Immunohistochemical and ultrastructural study of human melanoma colonies grown in soft agar. ***Am. J. Anat.***, v. 184, p. 212 - 224, 1989.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S.. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. ***Annals of Botany***, v. 80, p. 223 - 230, 1997.

REBECCA, S.. History and Characterization of the Vero Cell Line. The Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, maio, 2000. Disponível em: <www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/00/backgrd/3616b1a.pdf > Acesso em: 25 març., 2008.

RIPPERGER, H.. Jurubin, a nitrogen containing steroidsaponin of a new structural type from *Solanum paniculatum* L; concerning the structure of paniculidin. ***Chem. Ber.,*** v. 100, p. 1725 - 1740, 1967.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A.. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. ***Ciênc. Agrotec., Lavras***, v.25, n.1, p.102 - 123, jan./fev., 2001.

SAVIO, M. *et al.* Involvement of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in DNA repair induced by alkylating agents and oxidative damage in human fibroblasts. ***Carcinogenesis***, v.19, n.4, p.591 – 596, 1998.

SEIBERT, F. B. *et al.* DMSO and others combatants against bacteria isolated from leukemia and câncer patients. ***An. N. Y. Acad. Sci.,*** v. 141, p.175, 1967.

SILVA, T. M. S. Constituintes químicos do extrato acetato de etila das partes aéreas de *Solanum palusodum* Moric. ***Rev. Bras. Farm.***, v. 12, p. 85 - 86, 2002.

SILVA, T. M. S. *et al*. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). ***Quím. Nova*** , v.26 p. 517 - 522, 2003.

SILVA, T. M. S. *et al.*. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. ***Rev. Bras. Farm.***, v.17, p. 35 - 38, 2006.

SILVA, J. G. *et al.*. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. ***Rev. Bras. Farmacogn.***, v.17, n. 4, Out./Dez. 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** São Paulo: Editora da UFRGS, 2004.

SHENG-YU, L. *et al.* Modification of sugar chains in glycoalkloids and variation of anticancer activity. ***Chem. Res. Chinese U.***, v. 23, n.3, p. 303 - 309, 2007.

SHIU, L. Y.. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast câncer cells to cisplatin. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 45, p. 2155 – 2164, 2007.

SKIPPER, H. E. Analysis of multiarmed trials in which animals bearing different burdens of L1210 leukemia cells were treated with two, three, and four drug combinations delivered in different ways with varying dose intensities of each drug

and varying average dose intensities. ***Southern Research Institute Booklet***, v. 420, p.87 - 92, 1986.

SOLEREBER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons.** New York: Oxford, 1908.

SON, Y. O. *et al.* Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. ***Food and Chemical Toxicology***, n. 41, p. 1421 - 1428, 2003.

**The United States Pharmacopeia.** 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 3013, 2005.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. ***Braz. J. Microbiol.***, v.38, n.2, p.369-380, jun., 2007.

VIAJAYAN, P. *et al.*. In Vitro Cytotoxicity and Anti-tumor Properties of the Total Alkaloid fraction of Unripe Fruits of *Solanum psudocapsicum*. ***Pharmaceutical Biology***, v. 40, n. 6, p. 456-460, 2002.

VIEIRA, R. F., CARVALHO, L. D. A. F.. Espécies do gênero *Solanum* produtoras de alcalóides esteroidais. ***Rev. Bras. Farm.***, v.74, p. 97 - 111, 1993.

VIEIRA, S.. **Introdução à Bioestatística.** 3 .ed. Rio de Janeiro: Campus, 2002.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CANEIRO, D.M.. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). ***Rev. Bras. Farmacogn.***, v. 13, supl., p. 64 - 66, 2003.

VILELA, M. J. *et al*. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. ***Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial***, v. 39, n. 1, p. 67 - 72, 2003.

TSURIMOTO, T.; STILLMAN, A.. Multiple replication factors augment DNA synthesis by the two eukaryotic DNA polymerases alph ad cells. ***Embo J.***, v. 8, p. 3883 - 3889, 1984.

WHALEN M. D. Conspectus of species groups in *Solanum subgenus* Leptostemonum. ***Gentes Herbarum***, v. 12, p. 179-282, 1984.

YANG, *et al.* Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins***. Antimicrobial agents and chemoterapy.*** v. 50, n. 5, p. 1710 – 1714, 2006.

# 8 – ANEXOS

## 8.1. Microscopia dos pós

Colocar uma pequena quantidade de material pulverizado numa lâmina, adicione 1 gota de reagente de Steinmetz, cobrir com lamínula e observar ao microscópio.

**Reativo de Steinmetz:** coloração diferencial: celulose = incolor, lignina = amarelo-dourado, amido = azul, cutina , suberina, material lipofílico = vermelho, tanino = azul, negra

## 8.2 – Prospecção fitoquímica de folhas de *Solanum* scuticum

**a) Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos:**

Ferver 1g de pó de folha de *Solanum scuticum*, com 30 ml de álcool a 75% v/v, durante 3 minutos. Filtar o líquido obtido, ainda quente.

Transferir 10 ml do filtrado para um béquer (I) de 40 ml e 10 ml para outro béquer (II). Acidificar o conteúdo do béquer I com 0,5 ml de HCl SR e ferver por 2 min.. Fazer o mesmo com o béquer II, porém sem adicionar ácido.

Transferir os líquidos para tubos de ensaio e após resfriar, adicionar a cada 10 ml de éter. Agitar levemente e atentamente separar 5 ml dos tubos de ensaio I e II. Em ambos, adicionar 4 ml de amônia SRl e deixe a reação em repouso, durante 5 min. A camada amoniacal tomará uma coloração rósea, conforme a quantidade de princípio ativo (aglicanas liberadas das cadeias glicídicas).

**b) Pesquisa de heterosídeos digitálicos:**

Ferver durante 4 min. o pó da folha de *Solanum scuticum* com 25 ml de álcool a 50% e 10 ml de solução de acetato de chumbo a 10%. Resfriar e completar o volume para 25 ml e filtre a solução hidroalcóolica. Adicionar ao filtrado, 15 ml de clorofórmio (de 2 vezes), com agitação após a adição do solvente orgânico. Separar a fase clorofórmica.

Para a caracterização dos mesmos utilizamos as seguintes metodologias:

- ✓ **Reação de Liebermann-Burchard:**transferir 3 ml da solução clorofórmica para um tubo de ensaio e evaporar até secura. Juntar ao resíduo 1 ml do

reativo Liebermann-Burchard, recém preparado (50:1, anidrido acético R: $H_2SO_4$ P.A.). Homogeneizar e deixar em repouso por 5 min.. Observar a coloração desenvolvida: "positiva": catanho→ dedadeira; verde→ cila e estrofanto;

- ✓ **Reação de Persez:** Transferir 3 ml da solução clorofórmica para uma cápsula de porcelana e evaporar até secura em chapa aquecedora. Adicionar ao resíduo, após esfriar, 3 a 6 gotas de $H_3PO_4$ P.A.. Misturar com o auxílio de um bastão e observar sob luz UV: positiva→ fluorescência verde-amarelada;
- ✓ **Reação de Keller-Kiliani:** transferir 5 ml da solução clorofórmica para um tubo de ensaio e evaporar em banho Maria até secura. Dissolver o resíduo em 3 ml do seguinte reagente recém preparado: 3 ml de ácido acético glacial e 0,1 ml de $FeCl_2$ 9%. Homogeneizar e verter lentamente esta solução para um tubo de ensaio contendo 2 ml de $H_2SO_4$ P.A.. Observar se a coloração desenvolvida: positiva→ anel castanho-avermelhado na fase de contato; a camada acética vai adquirindo uma coloração esverdeada.
- ✓ **Reação de Kedde:** evaporar à secura, num tubo de ensaio, em banho-Maria, 6 ml da solução clorofórmica. Juntar ao resíduo 2 ml de álcool a 50%, 2 ml de água destilada, 2 ml do reagente ácido 3,5-dinitrobenzóico a 1%, recém preparado em etanol a 96% e 2 ml de KOH 1:10. Após 5 min., observar a coloração desenvolvida: reação positiva para aglicanos→ coloração castanho-avermelhada a vermelho-violeta.

**c) Pesquisa de heterosídeos flavonóides:**

Ferva durante 5 min. o pó da folha de *Solanum scuticum* em 60 ml de álcool a 70%. Filtre em papel de filtro previamente umedecido com etanol a 70%. O filtrado será utilizado nas reações que seguem:

- ✓ **Reação de Cianidina ou de Shinoda:** transferir cerca de 3 ml do filtrado para um tubo de ensaio. Adicionar cerca de 1 ml de fita de magnésio finamente cortada. Juntar cerca de 1 ml de HCl concentrado (com muito cuidado). Observar e anotar a cor.
- ✓ **Reação de Oxalo-Bórica:** evaporar em cápsula de porcelana 5 ml da solução extraída. Juntar ao resíduo semi-seco 3 ml de solução de ácido bórico a 3% e 1 ml de solução de ácido oxálico a 10%. Evaporar até secura. Juntar ao resíduo seco 7 ml de éter etílico. Observar bob luz UV (fluorescência amarelado-esverdeada).

- ✓ **Reação com $H_2SO_4$ concentrado:** adicionar cerca de 3 ml de solução extrativa numa cápsula de porcelana. Evaporar até semi-secura. Adicionar 0,5 ml de $H_2SO_4$ concentrado e observe à luz ultravioleta.
- ✓ **Reação com os hidróxidos alcalinos:** transferir 3 ml da solução extrativa para um tudo de ensaio. Adicionar cerca de 1 ml de NaOH 20%. Agitar o tubo e observar a coloração.
- ✓ **Reação com cloreto de alumínio:** transferir cerca de 5 ml de solução extrativa para um béquer ou cápsula de porcelana. Concentrar até mais ou menos a metade. Transferir esta solução concentrada para um pedaço de papel de filtro espalhando sobre toda a superfície do mesmo. A seguir, umedeça uma das regiões do papel com solução de cloreto de alumínio à 5% e observe a fluorescência sob luz ultravioleta.
- ✓ **Reação com cloreto férrico:** transferir cerca de 3 ml da solução extrativa para um tubo de ensaio. Juntar 2 gotas de cloreto férrico a 4,5%. Anotar a cor.

**d) Pesquisa de heterosídeos saponínicos:**

Pesar exatamente 1g do pó da folha de *Solanum scuticum* e transferir para erlenmeyer contendo 50 ml de água fervente. Manter sob fervura moderada durante 30 min.. Resfriar e filtrar para um balão volumétrico de 100 ml. Repetir a extração do mesmo material utilizando porções sucessivas de 10 ml de água fervente até completar o volume de 100 ml. Distribuir o decocto obtido em 10 tubos de ensaio com tampa (16 cm de diâmetro por 16 cm de altura), em uma série sucessiva de 1, 2, 3 até 10 ml e ajustar o volume do líquido em cada tubo a 10 ml com água. Tampar os tubos e agitá-los com movimentos verticais por 15 segundos. Deixar em repouso por 15 min. e medir a altura da espuma.

Caso a altura da espuma de todos os tubos seja inferior a 1 cm, o índice de espuma é menor do que 100. Se a em qualquer dos tubos a altura da espuma for de 1 cm, a diluição do material vegetal nesse tubo é o índice de espuma observado. Já, se a altura da espuma for maior do que 1 cm em todos os tubos, o índice de espuma é maior do que 1000.

IE = 1000; a , onde a representa o volume em ml do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

**e) Pesquisa de Taninos:**

Ferver durante 5 minutos, 2g da droga em pó em 50 ml de água destilada, filtrar ainda quente e completar o volume para 100 ml. Tomar 6 tubos de ensaio.

Transferir para cada tubo 5 ml da solução extrativa. A cada tubo proceder de acordo com as seguintes reações:

- ✓ **Reação com gelatina:** adicionar ao primeiro tubo de ensaio, 4 a 5 gotas de solução de gelatina a 2,5% em solução de cloreto de sódio a 5%. Observar o desenvolvimento de precipitado.
- ✓ **Reação com alcalóides:** adicionar no segundo tubo de ensaio, 4 a 5 gotas de solução alcoólica de brucina. Anotar o resultado.
- ✓ **Reação com sais metálicos:** adicionar ao quarto tubo de ensaio 3 a 5 gotas de acetato de cobre a 4%. Anotar o resultado. Adicionar ao quinto tubo 1 a 2 gotas de cloreto férrico a 2%. Anotar o resultado. Diluir com 10 ml de água destilada. Anotar a cor.
- ✓ **Reação com hidróxidos alcalinos:** no sexto tubo adicione 4 a 5 gotas de solução de hidróxido de sódio ou potássio a 20%. Anotar o resultado.

**f) Pesquisa de alcalóides:**

Ferver, por 3 minutos, cerca de 2g da droga em pó ou fragmentada em 20 ml de ácido sulfúrico a 5%. Filtrar com algodão e resfriar o filtrado. Transferir para funil de separação e alcalinizar com $NH_4OH$ a 10%. Extrair com duas porções de 10 ml de clorofórmio e filtrar em algodão. Evaporar o clorofórmio em rotaevaporador. Dissolva o resíduo em 2 ml de ácido sulfúrico a 5%. Distribuir 2 a 3 gotas do filtrado em tubos de ensaio pequenos. Juntamente com o teste, realizar controles com sulfato de quina. Em cada tubo gotejar 3 a 6 gotas dos reativos gerais dos alcalóides:

- ✓ **Reativo iodados:** reativo de Mayer (precipitado branco), reativo de Drangendorff (precipitado vermelho tijolo), reativo de Bouchardat (precipitado marron-avermelhado);
- ✓ **Reativo de Bertrand (ácido sílico-tungstico a 1%):** precipitado branco;
- ✓ **Reativos a base de ácidos orgânicos:** ácido pícrico a 2% (precipitado amarelo); ácido tânico a 1% (precipitado bege).

**g) Pesquisa de amido:**

Pesar 1,0 g do pó da folha de *Solanum scuticum* e ferver em 20 ml de água. Deixar esfriar e filtrá-lo utilizando papel de filtro. O volume do filtrado foi completado para 20 ml.

Transferir 5 ml da solução extrativa para um tubo de ensaio. Adicionar 2 gotas de lugol. Em caso positivo formar-se-á um produto de coloração azul arroxeado.

**h) Pesquisa de cumarinas:**

Pesar 2 g da amostra e ferver com 30 ml de água por 5 minutos. Filtrar em papel de filtro.

Adicionar 1 ml de HCl 1 N ao filtrado de maneira a acidificá-lo até pH igual a 1. Posteriormente transferir o filtrado para um funil de separação e adicionar 10 ml de éter etílico, agitar e extrair a fração etérea em um béquer. Colocar o béquer em chapa quente na capela de fluxo laminar e reduzir o volume da fração pela metade. Logo depois gotejar sobre papel de filtro. Acrescentar uma gota de NaOH 1 N em uma das regiões onde foi aplicado o extrato etéreo e observar à luz ultra violeta (UV). Quando a cumarina está na forma de heterosídeo, a hidrólise ácida cliva a ligação glicosídica, liberando a aglicona com núcleo fundamental cumarínico. Em meio básico sob luz UV, o núcleo fundamental cumarínico apresenta fluorescência verde devido aos grupos cromóforos.

**8.5. Doseamento de flavonóides totais:**

Pese exatamente cerca de 0,4 g da droga pulverizada (800mm) e colocar em balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentar 1 mL de uma solução aquosa de hexametilenotetramina a 0,5% (p/V), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aquecer em banho-maria, sob refluxo, por 30 min. Filtrar a mistura em algodão, para balão volumétrico de 100 mL, retornando o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, adicionado de 20 mL de acetona. Colocar em refluxo, por 10 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, filtrar a solução para balão volumétrico de 100 mL. Repetir a operação. Após, completar o volume do balão volumétrico com acetona. Em funil de separação, tratar 20 mL desta solução com 20 mL de água e após, extrair com 15 mL de acetato de etila, repetindo-se por 3 x, com porções de 10 mL de acetato de etila. Reunir as fases de acetato de etila e lava-las em funil de separação, com duas porções de 50 mL de água, transferindo a seguir para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetato de etila (solução-mãe = SM). Pipetar 10 mL desta solução, adicionar 1 mL do reagente de

cloreto de alumínio, diluindo-se em balão volumétrico de 25 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Preparar o branco diluindo 10 mL da SM para 25 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Após 30 min, medir a absorvância da solução a 425 nm, em cubeta de 1 cm, utilizando o branco para ajuste do zero. Calcular a porcentagem de flavonóides totais segundo a fórmula:

**% FT = A x 625 / 500 x m**

onde: A = absorvância
m = massa da droga (g)
500 = absortividade (a) do hiperosídeo **ou**

**% FT = A x 62.500 / 500 x m x (100 – PD) ,**

onde: PD = perda por dessecação (%; p/p)

O resultado é fornecido em porcentagem (p/p) de flavonóides calculados como hiperosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$). MM = 464

### 8.8. Determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido

#### 8.8.1. Determinação do teor de cinzas:

Pese exatamente cerca de 3g - ou a quantidade especificada na monografia - da droga pulverizada, transferir para cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado. Distribua a droga de maneira uniforme, incinere-a aumentando gradativamente a temperatura, não ultrapassando 450° C, até que o carvão seja eliminado. Resfrie em dessecador e pese. Calcular a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar.

#### 8.8.2. Determinação de cinzas insolúveis em ácido:

Ferva o resíduo obtido na determinação de cinzas totais durante 5 minutos com 25ml de HCl SR em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavar o vidro de

relógio com 5ml de água quente, juntando-a ao cadinho. Recolher o resíduo insolúvel em ácido sobre papel de filtro isento de cinza, lavando com água quente até que o filtrado se torne neutro. Transfira o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secar sobre chapa quente e incinerar a cerca de 500° C até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar.

**8.9. Teor de umidade**

Transferir cerca de 2 a 5g exatamente pesados, de amostra para pesa-filtro tarado, previamente dessecado a 100-105° C / 30min. Dessecar a amostra em estufa a 100-105° C durante 5 horas antes da primeira pesagem. Resfrie em dessecador e pese. Continue a dessecação, pesando o material em intervalos de 1 hora. O ensaio é dado por concluido quando duas pesagens sucessivas não diferirem entre si por mais de 5mg. Calcular a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

$$\% \text{ umidade} = Pu - Ps / P a \quad x \quad 100$$

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:


Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo