UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

JULIANA AZEVEDO DA PAIXÃO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* EM ABACAXIZEIROS SILVESTRES

FEIRA DE SANTANA-BA
2016

JULIANA AZEVEDO DA PAIXÃO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro* EM ABACAXIZEIROS SILVESTRES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Co-orientadora: Profª Dra. Juceni Pereira de Lima David

FEIRA DE SANTANA – BA
2016

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Paixão, Juliana Azevedo da
P172c Caracterização química e testes de atividade biológica *in vitro* em abacaxizeiros silvestres / Juliana Azevedo da Paixão. – Feira de Santana, 2016.
132 f. : il.

Orientador: Hugo Neves Brandão.
Co-orientadora: Juceni Pereira de Lima David.

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

1. Abacaxi – Composição química. 2. Abacaxi – Atividades biológicas. 3. Abacaxi – Atividades terapêuticas. 4. Ananas. I. Brandão, Hugo Neves, orient. II. David, Juceni Pereira de Lima, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.564

BANCA EXAMINADORA

Ademir Evangelista do Vale

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale
(UFBA)

Dr. Fernanda Vidigal Duarte Souza
(Embrapa Mandioca e Fruticultura)

Hugo Neves Brandão

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
(UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

Aos que sonham junto comigo,

Dedico.

“Nunca perca a fé na humanidade, pois ela é como um oceano. Só porque existem algumas gotas de água suja nele, não quer dizer que ele esteja sujo por completo”.

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela existência.

A Universidade Federal da Bahia e a Universidade Estadual de Feira de Santana.

Aos meus pais Paulo Rocha da Paixão e Valdenilda Santana Azevedo da Paixão (in memoriam), pela educação, incentivo e suporte à minha formação.

Aos professores, pelo compartilhamento dos saberes, por facilitar e proporcionar a construção do perfil profissional.

Aos amigos e companheiros de laboratório especiais, principalmente a Jota, Uili, Diego, MIgor, Carine, Jéssica, Lara e Tino pelos momentos inesquecíveis, apoio, carinho, confiança e ajuda em todas as ocasiões.

Aos Profs. Juceni Pereira de Lima David, Hugo Neves Brandão, Ademir Evangelista do Vale e Clayton Queiroz Alves, os quais me permitiram o crescimento intelectual e profissional.

Aos Grupos de pesquisa GPPN-Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais e Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais.

RESUMO

Caracterização química de plantas e testes de atividades biológicas são abordagens importantes na descoberta de novos medicamentos e para o aproveitamento racional de elementos de nossa biodiversidade, tendo em vista que a variedade de plantas reflete a diversidade dos seus metabólitos secundários e seu potencial terapêutico. O Brasil é fonte inestimável de recursos naturais para obtenção de farmácos, contudo as espécies nativas têm sido pouco estudadas quanto ao potencial farmacológico. A família Bromeliaceae inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies. O Brasil abriga cerca de 40% do total de espécies, sendo a mais conhecida o *Ananas comosus*. Algumas plantas desta família são utilizadas para tratamento de diversas afecções e existem relatos da presença de metabólitos secundários, como: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinâmico e outros. Este estudo teve como objetivo conhecer a composição química e as atividades biológicas de acessos e híbridos de diferentes variedades botânicas do gênero *Ananas*, em parceria com (EMBRAPA). As folhas dos espécimes coletadas foram secas, moídas, submetidas ao procedimento de extração com metanol e pré-selecionadas via *screening* e triagem biológica, com a finalidade de obter espécies com o melhor perfil. Foram selecionados 3 acessos e 1 híbrido, estes foram submetidos a extração com metanol, posteriormente particionados com solventes de diferentes polaridades e realizados testes de letalidade frente à letalidade frente à *Artemia salina*, atividade antioxidantes e anticolinesterásica, o fracionamento cromatográfico das espécies com melhor perfil foi realizado utilizando diferentes técnicas de cromatografia. Os resultados revelaram que os 21 acessos coletados apresentam diferentes metabólitos secundários e uma variação grande entre si, não apresentando nenhum padrão. Com relação aos testes biológicos vários acessos mostraram letalidade frente à *Artemia salina*, atividade antioxidantes e anticolinesterásica. Os resultados obtidos indicam que os extratos dos acessos contêm constituintes ativos que apresentam tais atividades, confirmando seu potencial biológico. Como resultado dos estudos preliminares os acessos BGA- 739, BGA-804, BGA-820 e híbrido HE foram selecionados para continuação dos estudos, sendo realizado os testes biológicos. O acesso BGA-804, frações clorofórmio (CL) e acetato de etila (ACT) demonstrou ter alto potencial antioxidante representado pela EC_{50} em $\mu g.ml^{-1}$ 804-CL (203,5±0,528) e 804-ACT 192,5±0,193, letalidade representado pela LC_{50} em $\mu g.ml^{-1}$ 804-CL (69,3±0,47) e 804-ACT (87,7±0,49) e inibição da enzima colinesterase em % 804-ACT (53.230 ± 4,44). O fracionamento, perfil químico por CLAE/DAD e a caracterização química do acesso BGA-804, resultou na verificação da presença de compostos fenólicos, flavonoides e no isolamento e identificação do daucosterol oriundo da fração 804 CL.

Palavras-chave: *Ananas*. *Screnning*. AChE. DPPH. *Artemia*. CLAE.

ABSTRACT

Chemical characterization and biological activity tests of plants are important approaches to drug discovery, rational use of elements of our biodiversity in view of the variety of plants reflects the diversity of their secondary metabolites and therapeutic potential. Brazil is an invaluable source of natural resources to obtain drugs, however, little study has been done on the pharmacological potential of native species. The Bromeliaceae family includes about 58 genera and about 3,352 species. Brazil comprises about 40% of the total species with *Ananas comosus* being the best known. Some plants of this family are used for the treatment of various diseases and there are reports on the presence of secondary metabolites such as triterpenoids, steroids, flavonoids, glycerols, cinnamic acid derivatives and others. This study aimed to know the chemical composition and biological activities of accessions and hybrids of different botanical varieties of *Ananas* genus in partnership with (EMBRAPA). The leaves of the harvested specimens were dried, ground, and subjected to an extraction procedure with methanol and were pre-selected via the screening and biological screening in order to obtain the best species profile. Three accessions and one hybrid were selected, they were subjected to extraction with methanol, then partitioned with solvents of different polarities. *Artemia salina* lethality, antioxidants and acetylcholinesterase activity tests were performed. The chromatographic fractionation of the species with better chromatography profile was performed using different techniques. The results revealed that 21 collected accessions have different secondary metabolites, and a wide variation among themselves showing no standard. In relation to biological testing several accessions showed lethality to *Artemia salina*, antioxidants and acetylcholinesterase activity. The results indicate that extracts of accessions contain active constituents that present such activities confirming its biological potential. As a result of preliminary studies the accessions BGA-739, BGA-804, BGA-820 and hybrid HE were selected for further study, and biological tests were conducted. The BGA-804 access, chloroform fractions (CL) and ethyl acetate (ACT) has been shown to have high potential antioxidant represented by the EC_{50} in $\mu g.ml^{-1}$ 804-CL (203,5±0,528) e 804-ACT 192,5±0,193, lethality represented by the LC_{50} in $\mu g.ml^{-1}$ 804-CL (69,3±0,47) and 804-ACT (87,7±0,49) and inhibition of the enzyme cholinesterase in % 804-ACT (53.230 ± 4,44). Fractionation, chemical profile by HPLC / DAD and chemical characterization of the BGA-804 access, resulted in the finding of the presence of phenolic compounds, flavonoids and the isolation and identification of daucosterol originating from 804 CL fraction.

Keywords: *Ananas.* Screening. AChE. DPPH. *Artemia*. HPLC.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg- microgramas.

A^0- Absorbância inicial da amostra.

A_0^0- Absorbância inicial do branco.

Aam- Decaimento da absorbância das amostras.

AAs- Atividade antioxidante.

Ac- Absorbância do controle.

ACh- Acetilcolina.

AChE- Acetilcolinesterase.

ACT, AcOEt- acetato de etila.

$AlCl_3$- Cloreto de alumínio.

AM- Atividade antimicrobiana.

A^t- Absorbância final da amostra

A_t^0- Absorbância final do branco.

BAG- Banco ativo de germoplasma.

BGA- Banco de germoplasma de abacaxi.

BHT- 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol.

CCD- Cromatografia em camada delgada.

CL, $CHCl_3$- Clorofórmio.

CLAE/DAD- Cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de arranjo de

CLAE/HPLC- Cromatografia à líquido de alta eficiência.

CTx- Atividade citotóxica.

D- Reagente de Dragendorff.

DA- Doença de Alzheimer.

DL50- Dose letal capaz de matar 50% da população.

DMSO- Dimetilsulfóxido.

DPPH- 2,2-difenil-1picrilhidrazila.

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.

DTNB- 3,3'-dithio-bis(6- nitrobenzoic acid).

EAG- Equivalentes de ácido gálico.

EC50- Percentual de inibição do sequestro de radicais livres.

EM- Espectrometria de Massa.

g- gramas.

H_2O- Água.

Hex- hexano.

HPLC/DAD/MS- Cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplada a espectrofotômetro de massa.

iAChE- Atividade inibidora da acetilcolinesterase.

IV- Infravermelho.

M- Reagente de Meyer.

MeOH- Metanol.

mg- Miligramas.

Na_2CO_3- Carbonato de sódio.

ng- nanogramas.

pH- Potencial hidrogeniônico.

Piridina d_5- Piridina deuterada.

QE- Equivalentes de quercetina.

RMN- Ressonância magnética nuclear.

SPE-C18- Cartucho para extração em fase sólica

SRL- Sequestro de Radicais Livres.

UFC- Unidades formadoras de colônia.

UV- Ultravioleta.

UV-B- Radiação ultravioleta com comprimento de onda entre 290 e 320 nanômetros.

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1: Distribuição dos principais compostos fenólicos no reino vegetal segundo o *Filo*.....20

CAPÍTULO I

Tabela 1: Acessos de abacaxizeiros utilizados nas análises fitoquímicas.....51
Tabela 2: Testes fitoquímicos nos diferentes acessos de abacaxizeiros.....57
Tabela 3: Concentração de flavonoides totais nos 21 acessos de abacaxizeiros.....59

CAPÍTULO II

Tabela 1: Acessos coletados no BAG-Abacaxi.....71
Tabela 2: Rendimento dos extratos brutos dos 21 acessos de abacaxizeiros em porcentagem.....75
Tabela 3: Porcentagens: de letalidade frente à *Artemia salina* dos 21 extratos, sequestro do radical DPPH, inibição da auto-oxidação do β-caroteno.....76
Tabela 4: Variação em porcentagem da atividade anticolinesterásica dos 21 extratos dos acessos do BAG-Abacaxi nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.....78

CAPÍTULO III

Tabela 1: Acessos de abacaxizeiros utilizados.....93
Tabela 2: Total fenolicos em g equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato, total Flavonoides em g de quercetina (EQ) por 100 g de extrato das, letalidade frente *Artemia salina* em LC_{50} e atividade antioxidante em EC_{50} partições dos extratos brutos BGA 739, 804, 820 e HE, acompanhada do desvio padrão.....96
Tabela 3. Atividade Anticolinesterásica das partições dos extratos brutos de BGA 739, 804, 820 e HE, nos primeiros 10 minutos de teste.....98

CAPITULO IV

Tabela 1: Gradiente de eluição.....113

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO
Figura 1: Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos.....24
Figura 2: Distribuição geográfica mundial da família Bromeliaceae.....29
Figura 3: Estrutura da saponina daucosterol.....33
Figura 4: Estrutura química do ferulato de 2-glicerila.....33
Figura 5: Estrutura química do p-cumarato de 2-glicerila.....34
Figura 6: Estrutura química do 5, 7, 4'-tri-idroxi-3,3',5'-trimetoxiflavona.....34
Figura 7: Estrutura proposta para fenilpropanos diglicerídeos.....35
Figura 8: Isovitexina, flavonoide proposto.....36

CAPÍTULO I
Figura 1: Imagens dos acessos coletados no BAG- Abacaxi. A-BGA 25, B-BGA 45, C-BGA 16, D-BGA 17, E-BGA 81, F-BGA 82, G-BGA 83, H-BGA 126, I-BGA 197, J-BGA 324, L-BGA 385, M-BGA 739, N-BGA 804, O-BGA 01, P-BGA 376, Q-BAG 820, R-HÍBRIDO E, S- HÍBRIDO F.....50
Figura 2. Verificação da presença de alcaloides pelo teste de Meyer e Dragendorf em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado para alcaloides negativo, positivo para Meyer, positivo para Dragendorf, respectivamente. B) Todos os acessos ensaiados.....55
Figura 3. Verificação da presença de Triterpenos em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo para triterpenos, mudança de coloração. B) Todos os acessos ensaiados.....55
Figura 4. A) Resultado positivo para a análise de saponinas. B) Resultado positivo para análise de taninos.....55
Figura 5. Verificação da presença de antraquinonas em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo para atraquinonas. B) Resultado negativo para antraquinonas.....56
Figura 6. Verificação da presença de flavonoides em acessos de abacaxizeiros, todos os acessos negativos.....56
Figura 7. Verificação da presença de derivados de cumarinas em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo. B) Comparação de resultados negativos e positivo.....56
Figura 8. Curva padrão da quercetina.....59

CAPÍTULO II
Figura 1: A: Preparo dos extratos; B: Rotaevaporação dos extratos.....72
Figura 2: A- Solução diluída de DPPH, utilizada para realização do teste; B– Amostras durante a realização do teste.....73
Figura 3: A- Microplaca sendo preenchida com solução oxidante. B- Leitura em espectrofotômetro.....74
Figura 4: A- Preparo dos reagentes e diluição de amostras; B- Placa de 96 poços utilizada durante o teste para verificação da atividade anticolinesterásica.....75

CAPÍTULO IV
Figura 1: Estrutura do daucosterol.....111

Figura 2: Cromatogramas de 804 ACT e 804 CL, respectivamente.....115
Figura 3: *Fingerprint* cromatográfico das frações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em cada um dos seus extratos. A- 804 ACT; B- 804 CL, nos diferentes comprimentos de onda.....116
Figura 4: Cromatogramas e espectros no DAD A- 804 ACT, B-804 CL.....117
Figura 5: Comparação de frações e padrões através de Cromatografia em camada delgada (CCD).....119

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 16
2. REFERENCIAL TEÓRICO..... 18
2.1. PLANTAS MEDICINAIS..... 18
2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..... 20
2.2.1 Terpenos..... 21
2.2.2 Compostos Fenólicos..... 21
2.2.2.1 Flavonoides..... 22
2.2.2.2 Taninos..... 22
2.2.3 Compostos Nitrogenados..... 23
2.3. ESTUDO FITOQUÍMICO..... 23
2.3.1 *Screenning* Fitoquímico, Identificação e Isolamento de Substâncias 25

2.4. TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 26
2.4.1 Teste de Citotoxidade..... 26
2.4.2 Atividade Antioxidante..... 27
2.4.3 Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase..... 28
2.5. FAMÍLIA BROMELIACEAE..... 28
2.5.1 Gênero *Ananas*..... 30
2.5.2 Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiro..... 30
2.5.3 Química da família Bromeliaceae..... 31
3. REFERÊNCIAS..... 37

CAPÍTULO I
SCREENNING FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES
1. INTRODUÇÃO..... 48
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 49
3. Coleta e preparo do material..... 49
3.1. *Screenning*..... 51
3.2. Flavonoides Totais..... 53
4. RESULTADOS..... 54
4.1. *Screenning*..... 54
4.2. Flavonoides Totais..... 59
5. DISCUSSÃO..... 60
5.1. *Screenning*..... 60
5.2. Flavonoides Totais..... 61
6. CONCLUSÃO..... 62
7. REFERÊNCIAS..... 63

CAPÍTULO II
TRIAGEM BIOLÓGICA EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES DO BGA-ABACAXI
1. INTRODUÇÃO..... 69
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 71

2.1. Coleta e Preparo de Material..... 71
2.2. Teste de Letalidade frente à *Artemia salina*..... 72
2.3. Atividade Antioxidante (AA) DPPH..... 72
2.4. Atividade Antioxidante (AA): Teste de inibição da co-oxidação do β-caroteno..... 73
2.5. Avaliação da Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase 74
3. RESULTADOS..... 75
4. TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS BRUTOS..... 76
4.1. Teste de Citotoxidade.....77
4.2. Atividade Antioxidante AA..... 77
4.3. Atividade Antioxidante (AA): Teste de inibição da co-oxidação do β-caroteno..... 78
4.4. Avaliação da Atividade Inibitória frente à Acetilcolinesterase.....78
5. DISCUSSÃO..... 80
6. CONCLUSÃO..... 83
7. REFERÊNCIAS..... 85

CAPÍTULO III
ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* E TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS EM ABACAXIZEIROS
1. INTRODUÇÃO..... 91
2. MATERIAIS E MÉTODOS..... 92
2.1. Coleta do material..... 92
2.2. Preparação das amostras..... 93
2.3. Quantificação de fenólicos e flavonoides totais..... 93
2.4. Teste de letalidade frente a *Artemia salina*..... 94
2.5. Determinação do sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila..... 94
2.6. Atividade Anticolinesterásica..... 95
3. RESULTADOS..... 96
3.1. Quantificação de fenólicos e flavonoides totais..... 96
3.2. Teste de letalidade frente a *Artemia salina* e atividade antioxidante..... 97
3.3. Atividade Anticolinesterásica..... 97
4. DISCUSSÃO..... 98
5. CONCLUSÃO..... 102
6. REFERÊNCIAS..... 104

CAPÍTULO IV
AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE *Ananas comosus* var *erectifolius* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FITOESTEROL DAUCOSTEROL
1. INTRODUÇÃO..... 111
2. MATERIAIS E MÉTODOS..... 112
2.1. Coleta e preparação das amostras..... 112
2.2. Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD..... 112
2.3. Estudo fitoquímico..... 114
2.4. Análise por RMN..... 114
3. RESULTADOS..... 114
3.1. Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD..... 114

3.2. Estudo fitoquímico..... 118
3.3. Análise por RMN..... 119
4. DISCUSSÃO..... 120
5. CONCLUSÃO..... 122
6. REFERÊNCIAS..... 124
APÊNDICE A..... 126
APÊNDICE B..... 127
APÊNDICE C..... 128
APÊNDICE D..... 129
APÊNDICE E..... 130

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estudos fitoquímicos associados a ensaios biológicos representam uma abordagem alternativa na descoberta de novos fármacos e para o aproveitamento racional de elementos de nossa biodiversidade, tendo em vista a variedade de plantas existentes. Além disso, o uso de plantas como recurso terapêutico pode ser verificado desde a antiguidade até os dias atuais (SOUZA, 2008, WHO, 2013). O Brasil é detentor de fonte inestimável de recursos naturais para obtenção de fármacos, ainda que, nossas espécies nativas têm sido pouco estudadas quanto ao potencial farmacológico (BRASIL, 2005; FRIAS, 2011).

Uma família muito presente no território brasileiro é a Bromeliaceae. Segundo Luther, (2012), inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3352 espécies, que são divididas em subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae. O Brasil abriga cerca de 40% do total de espécies de Bromeliaceae, sendo 40 gêneros registrados no território nacional. A espécie mais conhecida é o *Ananas comosus* (L.) Merr., conhecido como abacaxi, uma da fruta tropical consumida mundialmente. Comumente, algumas das plantas desta família são utilizadas para tratamento de diversas afecções, como: bronquites, aftas, tosses e inflamações em geral. Além de existir relatos da presença de bromelina, proteases de cisteína, metabólitos secundários como: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinâmico, entre outros (FORZZA, 2005; MANETTI, 2009).

Dessa maneira, sabendo da riqueza da família Bromeliaceae, devido à presença dos metabólitos citados e de estudos que relatam as diversas propriedades medicinais, faz-se indispensável à realização de pesquisas que avaliem a constituição química e as atividades: de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, sequestro do radical DPPH, inibição da auto-oxidação do β-caroteno e de inibição da acetilcolinesterase das folhas de espécies de Bromeliaceae.

O presente estudo tem como tema a caracterização química e testes de atividade biológica *in vitro* de diferentes variedades botânicas e híbridos do gênero *Ananas*. Tal estudo tem como objetivo conhecer a composição química e as atividades:

antioxidante, acetilcolinesterásica e citotóxica dos acessos, utilizando diferentes extratos, em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que conta com uma gama de espécies, variedades e híbridos de Bromeliaceae, em seu Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com aproximadamente 600 acessos do gênero *Ananas* e outras bromeliáceas. Estes espécimes são cultivados para diferentes finalidades, incluindo fins alimentícios ou ornamentais. Assim, o conhecimento da composição química e moléculas bioativas, terão impactos gerados agregando valor aos espécimes cultivados, motivando outras aplicabilidades.

O trabalho faz parte do projeto intitulado: “CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE”, aprovado em edital da FAPESB (2668/2014).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. PLANTAS MEDICINAIS

A natureza tem sido fonte de medicamentos por milênios, com muitas drogas úteis desenvolvidas a partir de fontes vegetais e utilizadas pela medicina tradicional (HARVEY, 2010). Os produtos naturais, são compostos orgânicos, que com auxílio de diversas áreas que incluem a química, biologia, farmácia, agronomia, podem ser utilizados para prevenção e tratamento de diversas enfermidades ao redor do mundo, além da possibilidade de uso nas diversas indústrias, sejam de alimentos, farmacêutica, cosmética, entre outros (CRAGG, NEWMANN, 2013; SOUZA, 2008).

O uso de plantas na recuperação da saúde ao decorrer dos tempos tem evoluído, desde as formas mais simples utilizadas pelos homens das cavernas, incluindo as formas sofisticadas de fabricação industrial dos medicamentos utilizados pelo homem moderno (OLIVEIRA, 2009). As plantas medicinais são parte integrante da medicina chinesa, o que é registrado no mais antigo texto botânico-medicinal, o Pen Tsao (2800 a.C.). Apesar das diferenças entre as maneiras de uso das plantas há um fato comum entre elas: sua aplicação por diferentes vias como substância pura isolada ou não, tem propriedade de provocar reações variadas, podendo ser capazes de levar a recuperação da saúde (FRANÇA et. al.,2008; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma gama de produtos de importância econômica. Dentre eles destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos, originados dos recursos genéticos vegetais, sendo as plantas um reservatório de várias substâncias biológicas ativas e fontes para tais medicamentos (GUERRA; NODARI 2007; COSTA; MAYWORM, 2011). O reino vegetal contribui grandemente para o fornecimento de metabolitos secundários, que podem servir como protótipos para a elaboração de drogas eficazes para uma variedade de indicações, sendo, antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitários, anticancerígenos e outros (GAYOSO et al., 2004; CRAGG, NEWMANN, 2012).

O conhecimento popular sobre as plantas medicinais dá embasamento para a realização de pesquisas científicas que buscam novas drogas. Ocorre, a cada dia, um estreitamento das relações entre o conhecimento popular e o científico, sendo que ao compararmos ambos, observamos que estes utilizam praticamente dos mesmos critérios para a investigação de novas substâncias ativas, como, por exemplo, a coleta baseada na informação tradicional, que tem como foco a bioprospecção (RODRIGUES, 2005; BADKE, 2011).

Muitos medicamentos que estão disponíveis, aproximadamente 44% foram desenvolvidos com base no conhecimento popular, de alguma forma, a partir de fontes naturais, como plantas, microrganismos ou animais. Além disso, até o ano de 2005 das 252 substâncias que são consideradas básicas pela OMS, 11% foram originadas a partir de plantas e entre os novos medicamentos aprovados pela FDA entre 1981-2010, 34% são oriundos de produtos naturais (HOSTETTMANN, 2003; BRASIL, 2005; SCHENKEL, 2005; HARVEY, 2015). De acordo com Braz Filho, (2010) a medicina mundial utiliza 119 princípios ativos que são extraídos de cerca de 90 espécies de plantas superiores, sendo que 74% dos principais produtos medicinais obtidos de vegetais foram descobertos através de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular.

Butler (2008) mostra que a maior parte dos medicamentos antitumorais e anti-infecciosos são obtidos de origem natural. Das 175 moléculas antitumorais desenvolvidas, 48,6% são originadas de produtos naturais ou derivados (CRAGG, NEWMANN, 2012). Nos países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos são originados de plantas. Além disso, durante muito tempo, o uso de plantas medicinais foi o principal e único recurso utilizado para tratar a saúde de diversas comunidades (BRASIL, 2005, BADKE, 2011). Isso mostra que o uso de plantas com o intuito medicinal deixou de ser apenas um conhecimento popular para virar realidade, necessitando assim de mais estudos científicos em relação aos produtos naturais.

2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OU ESPECIAIS

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que são realizadas pelas células dos seres vivos para sintetizar substâncias complexas, utilizando outras mais simples ou para degradar as complexas. Boa parte do carbono, nitrogênio e energia é destinado a formação de moléculas importantes para o funcionamento do organismo (GARCÍA; CARRIL, 2009). Ainda segundo os autores diferentemente de outros organismos as plantas destinam grande parte do carbono e da energia que não é utilizada em reações fundamentais para a formação dos metabólitos secundários que também podem ser denominados de produtos naturais.

Para Stransburger et al. (1994), estes compostos são "*substâncias ecologicamente eficazes,* frente aos compostos primários que são as *substâncias fisiologicamente eficazes".* Assim os metabólitos primários são sintetizados em todas as condições para manutenção dos processos fundamentais do vegetal, enquanto os secundários ou especiais são produzidos em determinados casos para beneficiamento do organismo (DEWICK, 2009).

Estes metabólitos secundários são encontrados principalmente em plantas, no entanto cada estrutura básica varia de acordo com o Filo, como pode ser verificado na Tabela 1, que mostra a distribuição de uma classe de produtos naturais.

Tabela 1: Distribuição dos principais compostos fenólicos no reino vegetal segundo o *Filo.* (Adaptado de Harborne, 1990).

Filo	Compostos fenólicos
Bactérias	Fenóis derivados de policétidos e quinonas (ocasionalmente presentes).
Fungos	Fenóis simples, fenilpropanoides e quinonas (regularmente reportadas).
Algas	Fenóis iodados e bromados, derivados de floroglucinol na parede celular.
Líquens	Antraquinonas, dépsideos, depsidonas e xantonas
Briófitas	Fenóis na parede celular, fenilpropanoides, estilbenos e alguns

	flavonoides.
Coníferas e plantas que florescem	Ligninas na parede celular, presença de fenóis de todo tipo.

As principais classes de metabólitos secundário de acordo Taiz e Zeiger (2013) são os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Diversas são as rotas envolvidas em sua biossíntese. Já segundo Simões, 2007, as principais classes de metabólitos secundários de interesse são: alcaloides, glIcosídeos cardíacos, cumarinas, flavonoides, taninos, triterpenos, derivados antracênicos livres. Ainda de acordo com o autor, esses produtos naturais são compostos relativamente complexos, que apresentam funções específicas, como: proteção contra pragas, pigmentação de folhas e flores, polinização, etc.

2.2.1 Terpenos

Os terpenos constituem o maior grupo de produtos naturais, sendo derivados da rota do ácido mevalônico e methylerythritol phosphate (MEP) e formados por unidades de cinco carbonos, as chamadas unidades isoprênicas. São classificados a partir da quantidade de unidades isoprênicas em: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpernos ($_{C15}$), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenoides $[C_5]_n$, sendo n maior que 8 (DEWICK, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Segundo Bennett et. al. (1994); Harborne, (1988); Taiz e Zeiger (2013), alguns terpenos possuem diversas ações no desenvolvimento do vegetal, como os carotenoides que agem como pigmentos na fotossíntese e protegem contra fotoxidação, também são importantes na resistência contra insetos e microrganismos por suas ações inseticida e antimicrobiana, tendo como exemplo os monoterpenos piretroides. Os monoterpenos e sesquiterpenos são bastante utilizados nas indústrias cosméticas e farmacêuticas pelas propriedades odoríferas e antimicrobiana de seus óleos essenciais.

2.2.2 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são produtos naturais que apresentam em seu esqueleto um anel aromático ligado a uma hidroxila funcional, sendo um grupo muito amplo de compostos. Apresentam diversas atividades nos vegetais, como polinização, deterrência e proteção contra raios UV e funções farmacológicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatoria (DEWICK, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013). São derivados das rotas biosintética do ácido chiquimico e ácido mevalônico, esta última é menos significativa nos vegetais superiores (HERMAN; WEAVER, 1999). Dentre os compostos fenólicos, existem classes de metabólitos secundários importantes, com flavonoides e taninos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2.3 Flavonoides

São compostos abundantes e podem ser específicos de determinadas espécies ou gêneros. São de grande importância nos vegetais, possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais. Atuam nos vegetais e possuem diversas atividades farmacológicas, tais como: proteção contra raios UV e visível, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais (polinização); atividade antioxidante; controle da ação de hormônios; agentes alelopáticos; inibidores de enzimas e outros (SIMÕES, 2007; TAIZ; ZEIGER 2013).

2.2.4 Taninos

Os taninos são polifenóis de alto peso molecular e sua classificação é de acordo com a ligação entre ácido elágico ou gálico em condensados ou hidrolisados respectivamente (SIMÕES, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e participam da defesa contra pragas, pois complexam com proteínas digestivas (SIMÕES, 2007). Esses compostos também são denominados proantocianidinas (taninos condensados), devido ao fato de produzirem pigmentos avermelhados (antocianidinas) após degradação. Também são importantes no curtimento do couro e possuem diversas atividade farmacológicas, como: formação de membranas; diminuição de irritação; diminuição de inflamação; ação anestésica local; diminuição de secreções, tratamento de feridas; ação bactericida (MELLO; SANTOS, 2001; TAIZ; ZEIGER 2013).

2.2.5 Compostos Nitrogenados

Compostos nitrogenados são representados principalmente pelos alcaloides que são, via de regra, sintetizados a partir de aminoácidos e possuem em sua estrutura básica um nitrogênio que pode estar ou não no heterociclo (BENNETT et. al., 1994). São classificados em alcaloides verdadeiros, pseudoalcaloides e protoalcaloides, de acordo com sua origem se de aminoácidos ou não, bem como da posição do nitrogênio na estrutura. Comumente são derivados de um aminoácido, porém os pseudoalcaloides não provem dos aminoácidos, por isso o seu nome. (SIMÕES, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013)

Segundo Taiz e Zeiger (2013); Hartmann, (1999) Cragg; Newmann, (2012) os alcaloides apresentam diversas propriedades tanto biológicas quanto farmacológicas. Exibem grande importância na defesa dos vegetais contra predadores, por conta da capacidade repelente, além de serem tóxicos para os humanos. Suas propriedades farmacológicas são muitas, podendo ser estimulantes, sedativos, antitumorais, analgésicos, antiespasmódicos, entre outros. Alguns compostos nitrogenados muito conhecidos por suas funções importantes na farmacologia são, escopolamina, atropina, codeína, morfina, vincristina e vimblastina, esses dois últimos são importantes antitumorais (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.3. ESTUDO FITOQUÍMICO

A pesquisa com plantas medicinais envolve diferentes áreas do conhecimento científico e o crescente interesse interdisciplinar em suas substâncias contribui para o desenvolvimento das mesmas (BRAZ FILHO, 2010). A busca pela composição química tem aumentado, e paralelo a isso, existe a possibilidade de descoberta de novos bioativos promissores. Dessa maneira, a fitoquímica tem se aliado a outros ramos da ciência, colaborando para o conhecimento da constituição química dos vegetais e suas respectivas propriedades e funções (BEZERRA et. al., 2010).

Um aspecto a ser levado em consideração é a imensa quantidade de fontes de produtos naturais, principalmente plantas, sendo a maioria desconhecida sob o ponto de vista cientifico. Apenas 6% das espécies de plantas existentes têm sido investigadas farmacologicamente, e somente cerca de 15% fitoquimicamente.

Devido ao aparecimento de novas doenças e reaparecimento de outras, há necessidade de desenvolvimento de fármacos mais potentes e próximos ao fármaco ideal. Assim, a cada ano têm surgido grupos de pesquisadores, cujos objetivos são o isolamento, a caracterização ou mesmo a síntese de produtos naturais possuindo algum tipo de ação farmacológica. (ABELSON, 1990 apud LUCCHESE et al., 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013).

De acordo Barbosa et. al. (2001) e Cechinel; Yunes (1998) existem procedimentos gerais (figura 1) para a obtenção dos produtos naturais de plantas, são citados a seguir: identificação do material desejado, coleta, preparo de extratos para análise fitoquímica, análise cromatográfica, testes de bioatividade e identificação estrutural.

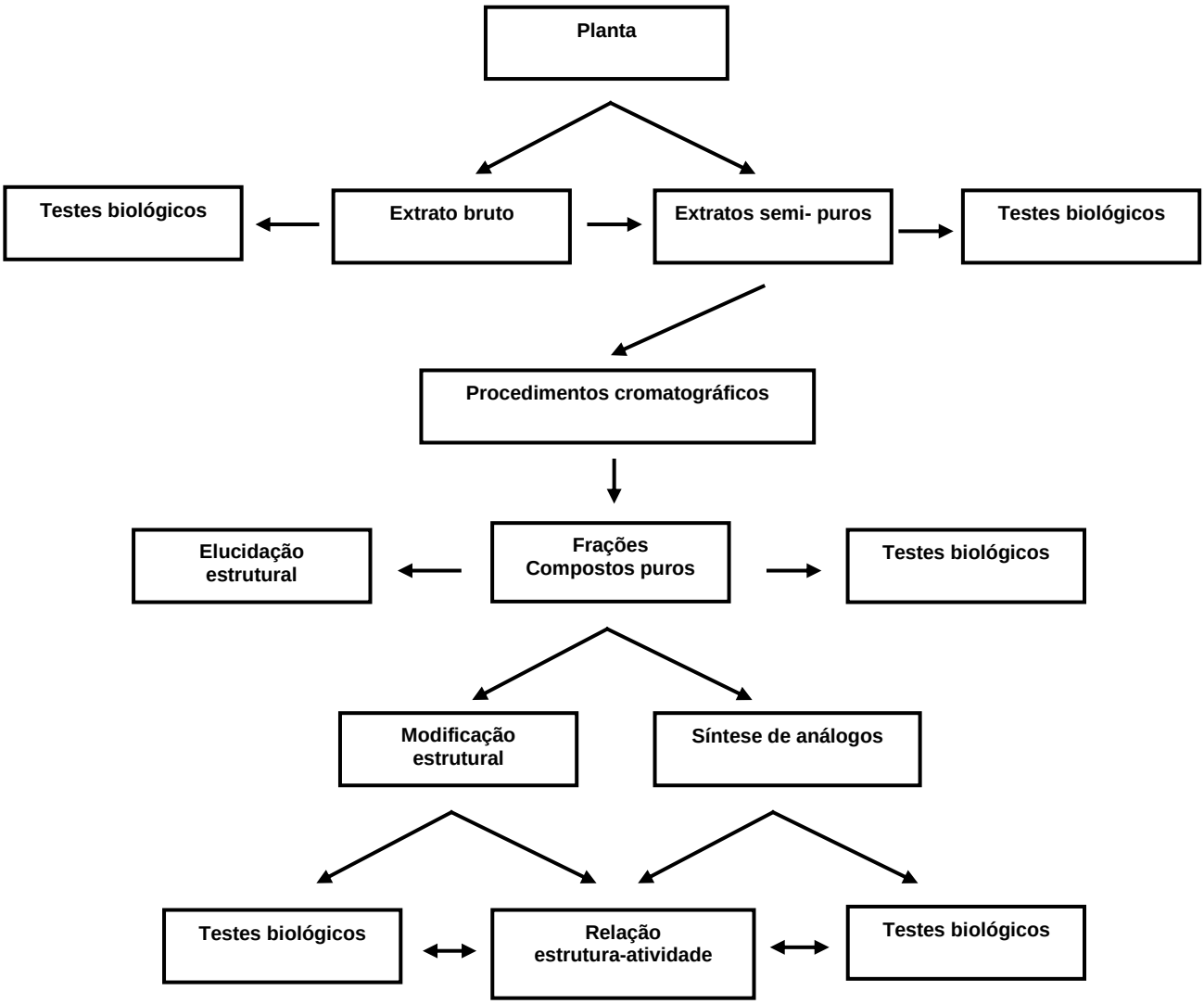


Figura 1: Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos. (Adaptado de Cechinel , Yunes 1998).

2.3.1. *Screening*, Isolamento e identificação de substâncias

Para que o isolamento e a identificação de compostos de fontes naturais proporcionem um número cada vez maior de novas estruturas químicas bioativas utilizadas em diversas indicações terapêuticas, são necessárias metodologias cada vez mais modernas (BRANDÃO, 2010), que incluem as técnicas cromatográficas descritas a seguir.

A triagem fitoquímica ou *screening* é um procedimento de grande relevância e um método usual para bioprospecção das espécies vegetais de interesse farmacológico e/ou toxicológico. A composição química de um extrato pode ser conhecida através de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo, sugerindo as possíveis classes de metabólitos secundários de interesse (MATTOS, 1997). Desta forma, orienta nas etapas seguintes do estudo fitoquímico, como isolamento e identificação.

Diversas técnicas podem ser empregadas para o isolamento e ou fracionamento de substâncias extraídas de plantas. Técnicas cromatográficas variadas, com diferentes graus de inovação tecnológica, desde colunas abertas com suportes diversos, até técnicas instrumentais, tais como, Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade, seja em escala preparativa ou semipreparativa, podem ser utilizadas (BRAGA, 2009). Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder à elucidação estrutural.

Uma série de métodos permitem a identificação de moléculas orgânicas. Estas determinam os constituintes da molécula, sendo possível deduzir sua estrutura. Os meios que possibilitam a identificação utilizam diferentes regiões do espectro de radiação eletromagnéticas, como: infravermelho, ultravioleta, micro-onda, radio, raios X, e também visível. Os métodos espectroscópicos frequentemente utilizados pelos químicos orgânicos são: o infravermelho (IV, ou IR), a ressonância magnética nuclear (RMN, ou NMR), o ultravioleta (UV) e a espectrometria de massa (EM) (MAGNO, 2007; BRAGA, 2009). Tradicionalmente, a elucidação estrutural é realizada após o isolamento da substância. No entanto, atualmente, é possível

identificar os constituintes de um extrato vegetal sem a necessidade do isolamento, com o uso de técnicas hifenadas (BRAGA, 2009).

2.4. TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICAS

Ensaios de atividade biológica são de fundamental importância na triagem de um vegetal (BEDNARCZUK, 2010). Testes *in vitro* são utilizados como estudo preliminar de bioatividade de plantas, em que os extratos são diretamente colocados em contato com um meio que será analisado. Avaliações importantes como: antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e acetilcolinesterasica, são popularmente realizadas em pesquisa, estes testes são relevantes, devido a possível descoberta de novas substâncias que possuam propriedades como: Inibição de radicais livres; atividade contra diferentes patógenos; inibição do aparecimento de células cancerígenas; tratamento frente doença de Alzheimer, respectivamente. Além de serem simples e de fácil execução (ALVES *et al.*, 2010).

2.4.1. Teste de citotoxidade

Segundo Forbes; Forbes, (1994) e Maclaughlin, (1998) os testes de citoxicidade tem como objetivo prever os efeitos citotóxicos nos sistemas biológicos e dessa forma dimensionar a toxicidade relativa das substâncias apresentando correlação com a presença de alguns tumores sólidos humanos, potencial antimicrobiano, parasiticida, tripanocida e antimalárico. O ensaio de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* Leach pode ser realizado para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982). A *A. salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca e este nauplii é utilizado como bioindicador de toxicidade. De acordo com (CALOW, 1993) é uma espécie de fácil manipulação em laboratório e o teste possui baixo custo econômico.

Ensaios biológicos como o teste de toxicidade frente à *A. salina* podem ser considerados como indicadores confiáveis quanto à toxicidade de extratos vegetais e/ou substâncias puras isoladas (ANDERSON et al. 1991).

Maclaughlin, (1998) afirma que quanto menor o valor de DL_{50}/CL_{50}, mais tóxico é o extrato/fração e/ ou substância pura frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral.

2.4.2. Atividade antioxidante

Os radicais livres de oxigênio são produzidos nas reações bioquímicas e fisiológicas do corpo humano. Todavia, se houver produção excessiva destes radicais durante os processos patológicos, fisiológicos e devido aos fatores ambientais, podem ocorrer diversas doenças e danos profundos nos tecidos (MOLYNEUX, 2004; HUANG; PRIOR, 2005). Desta maneira, os antioxidantes são substâncias de grande importância biológica, tendo em vista, que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, como, inibição de radicais livres e complexação de metais, podendo ser sintéticos ou naturais (BARBOSA *et al.*, 2010).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante, permitindo selecionar substâncias potencialmente interessantes com essas características. Para avaliação da atividade antioxidante, o método mais comumente empregado em laboratório, envolve a geração de espécies oxidantes, geralmente radicais, e a concentração destes é monitorada na presença de antioxidantes que possam sequestrá-lo, como é o caso do teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, (DPPH). Também são empregados outros testes, como o teste de auto oxidação do β-caroteno (ALVES et al., 2007; LIMA et al.2006).

A avaliação da atividade antioxidante realizada através da capacidade dos extratos em sequestrar os radicais DPPH, ocorre quando este radical reage com o antioxidante, convertendo-se à sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH é descorada e monitorada através do espectrofotômetro (CHANDRASEKAR *et al*., 2006). Uma forma de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade do antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH presentes na solução. Esse índice denomina-se EC50 e quanto menor este valor apresentado pelo extrato, menor será a quantidade necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH (HUANG; PRIOR 2005, LIMA et al. 2006).

2.4.3. Atividade Inibidora da Aceticolinesterase.

Medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais, principalmente plantas, são eficazes no tratamento de diversas patologias, tais como, a doença de Alzheimer (DA). O mal de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa que atinge a memória e a capacidade de raciocínio. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 35,6 milhões de pessoas sofriam de DA no ano de 2010, sendo 7,7 milhões de novos casos de demência por ano (WHO, 2012).

Um importante tratamento para a DA é aumentar os níveis de Acetilcolina (ACh) no cérebro. A AChE é a principal enzima que está envolvida na hidrólise do neurotransmissor ACh. Dessa maneira substâncias capazes de inibir a AChE têm sido utilizadas para o tratamento da doença de Alzheimer (DOHI et. al., 2009). Artigos relatam que alguns extratos de plantas possuem atividade inibitória frente à AChE. (HOUGHTON et. al., 2004; VINHUTA et. al., 2007).

Vários métodos podem ser realizados para a avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase (iAChE). Os testes para a detecção de atividade anticolinesterásica estão centralizados em adaptações do método que foi desenvolvido por Ellmann (1961) e na reação com acetato de 1-naftil desenvolvido por Marston (2002), no qual a atividade da enzima é monitorada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetiltiocolina a acetato e tiocolina (RHEE et. al., 2001).

2.5. FAMÍLIA BROMELIACEAE

A família Bromeliaceae Juss, é uma família de monocotiledôneas que pertence à ordem Poales, apresenta distribuição neotropical, possui três centros de diversidade: a costa leste do Brasil, o Escudo das Guianas e o Planalto Andino (Figura 2) (FORZZA, 2005; LUTHER, 2012). De acordo Vasconcelos, et. al. (2013) e Luther, (2012) as plantas desta família possuem cerca de 58 gêneros e 3. 352 espécies e são divididas em subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae.

Figura 2: Distribuição geográfica mundial da família Bromeliaceae. (Fonte: Benzing, 2000)

O Brasil é o centro de origem e dispersão desta família, abriga cerca de 40% do total destas espécies, sendo 22% restritos ao Brasil (FORZZA, 2005; SOUZA et. al., 2007). De acordo com Monteiro e Forzza (2008), estes números demonstram a importância do país na conservação desta família, o que mostra a necessidade de investir na catalogação de suas espécies e em estratégias diversificadas de conservação.

Foi descrita pela primeira vez pelo padre francês Charles Plumier no final do século XVII, quando se deparou com um conjunto de plantas que apresentavam uma aparência diferente e resolveu batizá-las de bromélias, em homenagem ao botânico sueco Olaf Bromel. Atualmente a família Bromeliaceae é considerada a segunda maior entre as monocotiledôneas epífitas, sendo superada, em número, apenas pela família Orchidaceae (MANETTI et. al., 2009). Apresentam uma longa história de uso pelos povos nativos americanos, em que eram utilizadas como fonte de fibras, alimentos, forragens e medicamentos, ornamental e místico (BENZING *et al.*, 2000).

O gênero *Ananas* pertence à família Bromeliaceae e juntamente com outros gêneros, constitui a maior família de distribuição natural restrita (SMITH, 1934; SMITH; DOWNS, 1979; LUTHER, 2006). Segundo Paula e Silva, (2004) no Brasil são encontrados cerca de 1.500 espécies, sendo 650 delas endêmicas do território

brasileiro. Tem ocorrência praticamente em todo território nacional, sendo que na região Sudeste apresenta maior diversidade, principalmente, na região da Mata Atlântica.

2.5.1. Gênero *Ananas*

Coppens d'Eeckembrugge e Leal (2003), classificaram o gênero *Ananas* em duas espécies, *Ananas comosus* (Linneaus.) Merril e *Ananas macrodontes* Morren, de acordo com as características morfológicas, bioquímicas, moleculares e, em dados de biologia reprodutiva.

O centro de origem de *Ananas* é a região Amazônica entre 10º N e 10º S de latitude e 55º L e 75º W de longitude (FERREIRA; CABRAL 1993). O maior representante econômico deste gênero é o abacaxi, uma fruta tropical muito explorada e encontra-se entre as 11 mais produzidas no mundo. Sendo o Brasil o maior produtor mundial de abacaxi e a Bahia ocupa o 4° lugar nesta produção (CRESTANI et. al., 2010; FAO, 2014; IBGE, 2013). Outros potenciais são explorados neste gênero, como a produção de fibras, cordas e tecidos, na indústria automotiva, fabricação de papel, enzimas de ação proteolítica, metabólitos secundários com atividades antioxidantes para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, além do seu grande potencial ornamental. (BALDINI et. al., 1993; ZAH, 2007; OLIVEIRA, 2008; LEÃO et. al., 2009; MARQUES et. al., 2007, BENNETT, 2000; MANETTI et. al.,2009; SOUZA et. al.; 2004; SOUZA et. al. 2009; SANEWSKI, 2009).

2.5.2 Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) é o maior do mundo e foi estabelecido há quase trinta anos mediante a realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional (CABRAL et al., 2004; MACHADO et al., 2009). A conservação do germoplasma está estreitamente relacionada ao seu uso e para melhor aproveitamento da variabilidade existente dentro do Banco Ativo de

Germoplasma, desde 2003, são realizados trabalhos com objetivo de identificar e selecionar genótipos com valor ornamental, gerando subsídios para a realização de cruzamentos controlados visando à geração de novas variedades ornamentais, com características diferenciadas e resistentes a pragas (SOUZA et al., 2005; CABRAL; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2009). Além disso, estudos voltados à caracterização de vários acessos quanto à qualidade de suas fibras para uso como reforço para aplicação em indústrias estão em andamento (SENA et. al. 2013; 2015).

Esta pesquisa foi realizada com o apoio da EMBRAPA, que cedeu gentilmente os acessos e híbridos utilizados. Assim, o conhecimento da composição química e moléculas bioativas, terão impactos gerados agregando valor aos espécimes cultivados, motivando outras aplicabilidades, permitindo o conhecimento, melhoramento e valorização da biodiversidade.

2.5.3 Química e atividades biológicas da família Bromeliaceae

Dentre o grande número de espécies da família Bromeliaceae, poucas delas foram estudadas quimicamente até o momento. Porém, existe um grande número de compostos identificados, os quais pertencem principalmente às classes dos triterpenoides e flavonoides. Outras classes de compostos como esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, lignanas, compostos nitrogenados, entre outros, também foram identificados nesta família, embora em pequeno número. (MANETTI et. al., 2009).

Uma das espécies mais estudadas da família é o abacaxi, que tornou-se popular pelo seu sabor e aroma marcantes. Seus frutos contêm a bromelina, uma enzima que protege da infestação por larvas de insetos e apresenta grande valor comercial, cujo uso se encontra em ascensão na indústria farmacêutica, devido as atividades anti-helmíntica, anti-inflamatória, mucolítica e anticancerígena e na indústria alimentícia, como amaciante de carnes vermelhas, hidrolizante de complexos proteína-taninos na produção de cerveja, pães, leite de soja e ovos desidratados e na indústria cosmética (MANETTI et. al., 2009; VARGHESEAND; VALARSELVAN, 2015).

Além da bromelina, outras enzimas, como as proteases de cisteína estão presentes no abacaxizeiro e muitas já foram isoladas e identificadas na família, no qual também apresentam grande potencialidade de ser empregada nos segmentos industriais (KETNAWA; RAWDKUEN; CHAIWUT, 2010; SOUZA et. al. 2012, 2014).

Alguns estudos relatam que as folhas dos *A. comosus* além de serem utilizadas como ornamentação e alimento, possuem atividades farmacológicas valiosas, como: atividade antifúngica, antiparasitária, antidispéptica, antidiarreica, hipoglicemiante, antidislipidêmica e antioxidantes (MA *et al.,* 2007; JUN HU *et al.*, 2011).

Para compreender as atividades farmacológicas apresentadas pelas espécies de Bromeliaceae, estudos sobre a composição química têm sido realizados e resultaram no isolamento e identificação de metabólitos secundários (MANETTI et. al., 2009).

Em estudo com o extrato etanólico da casca de *A. comosus*, realizado por Kalaiselvi et. al., (2012) quantificaram algumas classes de metabólitos secundários. Em seus resultados, observaram o alto teor de flavonoides, fenólicos, taninos, carotenoides e licopeno, os autores relacionaram a presença desses compostos fitoquímicos à atividade antioxidante expressada, sendo possível usá-lo com agente farmacoterapêutico no futuro.

Manetti et. al., (2010a) isolaram a saponina glicosilada daucosterol (Figura 3) do extrato metanólico das folhas de *Bromelia antiacantha* e atribuem a atividade hemolítica da espécie, à presença desse fitoesterol. Essa mesma planta teve sua atividade antioxidante avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH, sendo considerada modesta pelos autores que atribuíram tal atividade à presença de compostos fenólicos no extrato bruto da espécie (MANETTI et al., 2010 b).

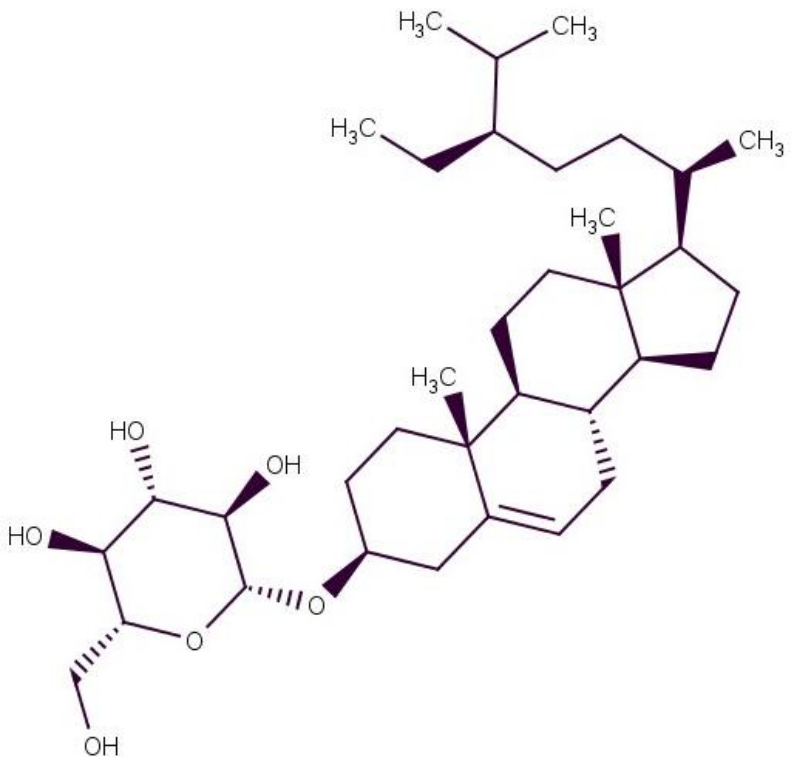


Figura 3: Estrutura química do daucosterol.

Rocha et. al. (2010) avaliando a atividade antioxidante do extrato bruto das folhas de *Ananas bracteatus*, verificou atividade significativa acima de 60%. O processo de purificação desse extrato resultou na identificação dos metabólitos: ferulato de 2-glicerila (Figura 4); p-cumarato de 2-glicerila (Figura 5); 5,7,4'-tri-idroxi-3,3',5'-trimetoxiflavona (Figura 6).

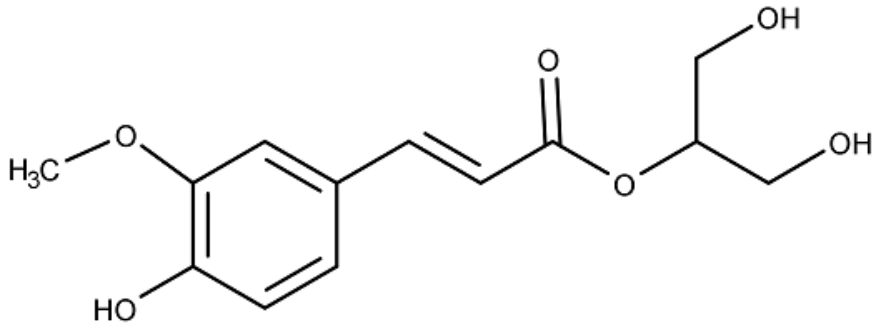


FIGURA 4: Estrutura química do ferulato de 2-glicerila

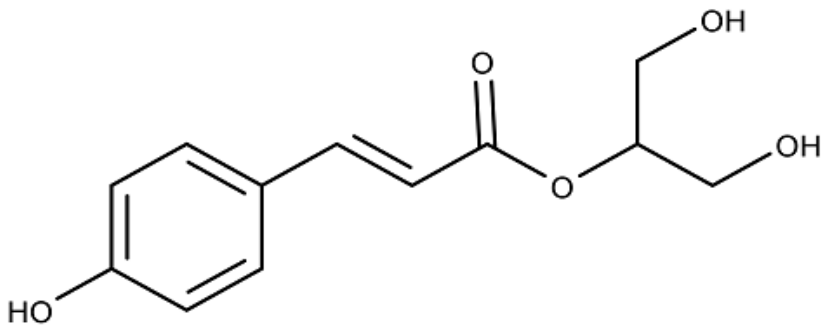


FIGURA 5: Estrutura química do p-cumarato de 2-glicerila

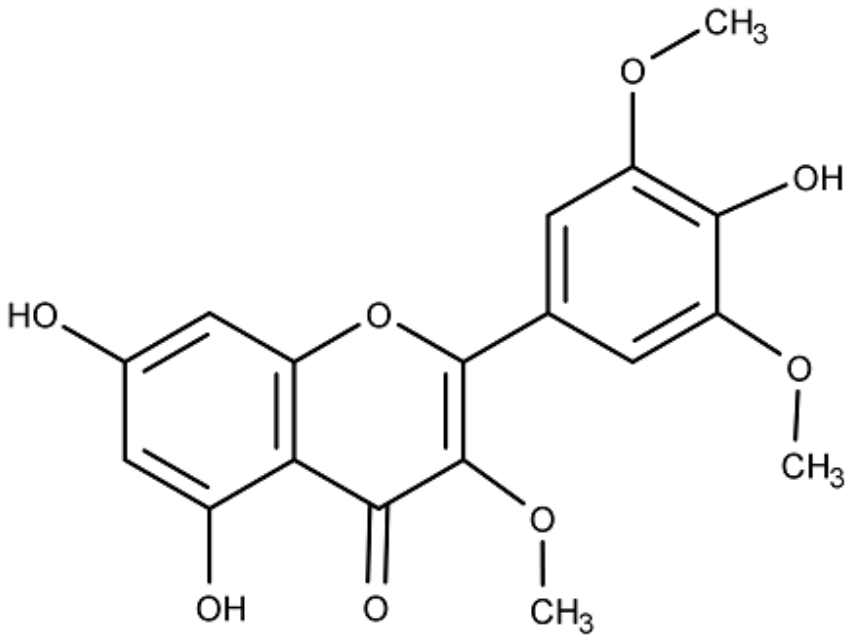


FIGURA 6: Estrutura química do 5,7,4’-tri-idroxi-3,3’,5’- trimetoxiflavona

Ma e col. (2007) realizaram investigação fitoquímica do extrato etanólico de *A. comosus*, com o intuito de identificar os componentes responsáveis pelas atividades antidiabética, antioxidante e anti-hiperlipidêmica. Entre as substâncias detectadas, algumas estruturas propostas foram para os fenilpropanos (Figura 7).

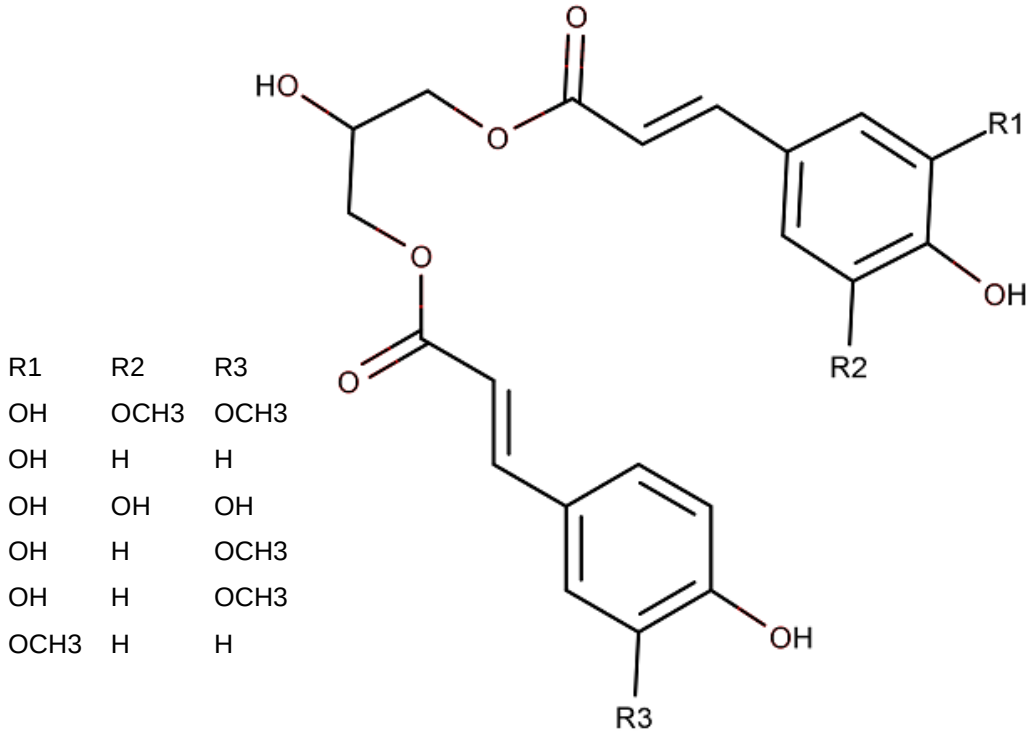


FIGURA 7: Estrutura proposta para fenilpropanos.

Manetti et. al., (2009) afirmam a presença de triterpenoides isolados em Bromeliaceae, sendo esses restritos às subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae. Dentre os triterpenoides isolados, foi constatada a presença de cicloartanos, lanostanos, labdanos, derivados do arborinol, a friedelina, esteroides, ácido cinâmico e lignanas. Além da ocorrência de flavonoides (Figura 8), destacando a importância química dos mesmos como possíveis agentes farmacológicos e potenciais marcadores quimiotaxonômicos.

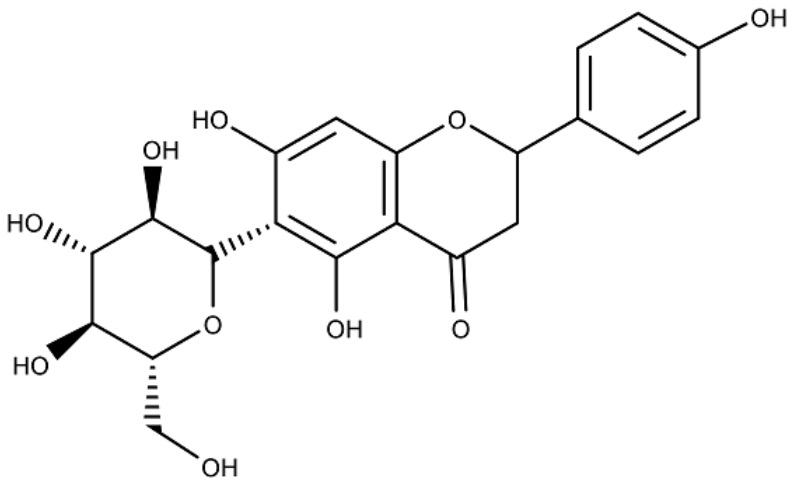


FIGURA 8: Isovitexina, flavonoide proposto.

3. REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Revista da Rede de Ensino FTC**, ano 5, p. 1-8, 2007.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M. V., AGUIAR, R. M. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10 p.2202-2210, 2010.

ANDERSON, JE, GOETZ, CM, MCLAUGHLIN, JL, SUFFNESS, M. A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**. v. 2, p. 107-111, 1991.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B.Medicinal plants: the knowledge sustained by daily life practice Plantas medicinales: el saber sustentado en la pratica del cotidiano popular. **Pesquisa research – investigación**. v. 15, n.1, p.132-139. 2011.

BALDINI, V. L. S.; IADEROZA, M.; FERREIRA, E. A. H.; SALES, A. M.; RAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina e cultivares do abacaxizeiro. **Coletânea do Ital,** v. 23, n. 1, p. 44-55, 1993.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais.** Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.

BEDNARCZUK, V.; VERDAM, M.C.S; MIGUEL, M.D; MIGUEL, O.G. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, jul/dez. 2010.

BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING. D. H. (Ed.). **Bromeliaceae:** profile of an adaptative radiation. Cambridge: University: Cambridge, 2000.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms **New Phytology.** n. 72, v. 127, p. 617-633,1994.

BENZING, D. H. **The Biology of Bromeliads***.* Mad River Press: Eureka, California, 1980.

BENZING, D. H. et al. **Bromeliaceae:** profile of na adaptative radiation. New York: Cambridge University, 2000.

BRAGA, F. C. Pesquisa fitoquímica. In: LEITE, J. P. V. (Ed.). **Fitoterapia:** bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. v. 33, n. 6. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasilia, DF, 2005.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Report.** v. 25, p. 475-516. 2008.

CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; MATOS, A. P.; SANCHES, N. F. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas. Embrapa – CNPMF, 2004. 30p.

CABRAL, J. R. S.; SOUZA, F. V. D. Breeding for ornamental pineapple. **Pineapple News**, Hawaii, n. 13, p. 14-16, 2006.

CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. Handbook in cytotoxicology. Oxford: **Blackwell Scientific Publication**. v. 1. p. 1-5. 1993.

CECHINEL FILHO, V.; 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**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHANDRASEKAR, D. *et al.* Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 460-464. 2006.

MA, C. XIAO, S.; LI, Z.; WANG, W.; DU, L. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography**. v. 1165, p. 39–44, 2007.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K.G. (Eds.): **The Pineapple:** botany, production and uses. New York, CABI Publishing, 2003. p.13-32.

COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mededicinais Botucatu**, v. 13, n. 3, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta.** v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das américas para o mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural.** v.40, n.6, 2010.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products:** a biosynthetic approach. 3 ed. London: John Wiley & Sons, 2009. 539 p.

DOHI, S., TERASAKI, M., MAKINO, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4313–4318, 2009.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES VJR., FEATHERSTONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, p. 88-95, 1961.

FAO, FAOSTAT. **Agricultural statistics database**. Rome: Wold Agricultural Information Center, 2014. Disponível em: < http://faostat.fao.org/site/567/Desktop Default.aspx?PageID=567#ancor.> Acesso em: 22 Janeiro 2015.

FAURÉ, M, LESSI, E, TORRES, R, VIDELA, L. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**. v. 29, p. 3773-3775, 1990.

FERREIRA, F. R.; CABRAL. J. R. S. Pineapple Germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, Honolulu, v. 334, p. 23-26, 1993.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de Encholirium Mart. Ex Schult. E Shult. F. (Pitcairnioideae- Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**. v. 23, p. 1 – 49, 2005.

FRANÇA, I. S. X. *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, p. 201-208, 2008.

FRIAS, U. A.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI J. A. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 2011:16(1)60-71.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P.U**.** Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología).** Serie Fisiología Vegetal. N. 2 V.3, P. 119-145, 2009.

GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O.Acao inibitoria do oleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α-pipeno e β-pipeno sobre os fungos isolados de onicomicose. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.4, p.25-29, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.;

Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS. 2007.

HARBONE, JB. **Phytochemical Methods**: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2 ed. Chapaman and Hall - London. 1988.

HARBORNE, J. B. 1990. **General procedure and measurement of total phenolics**. In: Methods in plant biochemistry I. Academic Press, USA. p. 1

HARTMAN T. Chemical ecology of piroolizidine alkaloidy. **Planta**. 1999.

HARVEY, L. A.; EBEL, R. E.; QUINN R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era **Nature Reviews Drug Discovery***, v.*14, p.111–129 2015.

HERMANN KM, WEAVER LM. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Biology**, 50: 473-503, 1999.

HIDALGO, ME, FERNÁNDEZ, E, QUILHOT, W, LISSI, E. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Sao Carlos: Edufscar, 2003.

HOSTETTMANN, K, MARSTON, A. Modern Separation Methods**. Natural Product Reports**. v.8 p. 391-413.1991.

HOUGHTON, P. J., AGBEDAHUNSI, J. M., AGBEDAHUNSI, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian Crinum species, **Phytochemistry,** 65, 2893, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agriculture Food Chemistry.**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro v.26, n.1 p.1-83, jan, 2013.

JUN HU *et al*. Developmental toxicity of orally administered pineapple leaf extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 1455–1463, 2011.

KALAISELVI, M.; GOMATHI, D.; UMA, C. Occurrence of Bioactive compounds in *Ananus comosus* (L.): A quality Standardization by HPTLC. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1341-S1346, 2012.

KETWANA, S; RAWDKUEN, S; CHAIWUT, P. Two phase partintioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 205-2011, 2010.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 227-238, 2009.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.

LUCCHESE, Angélica Maria; et al. Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, **IMSEAR** (Instituto do Milênio do Semi-árido), 2006.

LUTHER, H. E. *Neuregelia johnsoniae*, an extraordinary new specie from EasternPeru. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 39, p. 70-71, 2006.

LUTHER H.E. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials**. 13 ed Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens. 2012.

MA, C. XIAO, S.; LI, Z.; WANG, W.; DU, L. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry**. Journal of Chromatography**. v. 1165, p. 39–44, 2007.

MACHADO, C. F.; SOUZA, F. V. D. CABRA, J. R. S.; SOUZA, E. H. Estado da arte do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**. Guarapari: SBMP, 2009.

MACLAUGHLIN JL, ROGERS LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal** v. 32. n.2, p.513-524. 1998.

MAGNO, C.R.; R.; SOUZA, N. A. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química. Nova**, v. 30, n. 4, 1026-1031, 2007.

MANETTI, L. M. *et al.* Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Arquivo de Ciência e Saúde UNIPAR**, v. 14, p. 43-47, 2010a.

MANETTI, L. M. *et al.* Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, p.406-413, 2010b.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MARSTON A, KISSLING, J, HOSTETTMANN K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 51-54, 2002.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.

MONTEIRO, R. F.; FORZZA, R. C. A família Bromeliaceae no parque estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**, v. 26, p. 7-33, 2008.

NEWMAN, DAVID J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from1981 to 2010. **Natural Products Branch**, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer. 2012.

OLIVEIRA A. H. **Atividade antimicrobiana e imunológica in vitro dos extratos *de Senna reticulata* (willd.) irwin & barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (aubl.) (lacre).** Dissertação: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara – sp. 2009.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; SOUSA, F. I. B.; SILVA, R. J. F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 2, p. 163-169, 2008.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélia**. Viçosa: UFV, 2004.106p.

RHEE, I. K., MEENT, M. VAN DE, INGKANINAN, K., VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**. v.915, 217-223, 2001.

ROCHA, F. D. *et al.* Brazilian Bromeliaceae species: isolation of arylpropanoid acid derivatives and antiradical potential. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 240-245, 2010.

RODRIGUES, R.S.; FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S.; BAPTISTA, L.R.M. O gênero Senna (Legunimosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.19, n.1, p.1-16, 2005.

SANEWSKI, G. M. Breeding A*nanas* for the cut-flower and garden markets. **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 71-78, 2009.

SCHENKEL, E.P.; SIMOES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STRHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na

medicina cientifica. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, São Paulo, v.3, n.4, p.139-141, 2005.

SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. Artemia salina bioassay: A revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, 1996.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2007.

SMETANSKA L. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. v.111, p.187-228, 2008.

SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. **Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, Stuttgart, v. 66, p. 446-448. 1934.

SMITH, L. B. Notes on the taxonomy os *Ananas* and *Pseudananas*. **Botanical Museum Leaflet**, Harvard, v. 7, p. 73-81, 1939.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioides (Bromeliaceae). **Flora Neotropical Monograph**, New York, v. 14, n. 3, p. 1493-2141, 1979.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. de; SANTOS, O. S. N.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; FERREIRA, F. R.; SILVA, M. de J. da. Abacaxi ornamental: uma riqueza a ser explorada. **Abacaxi em Foco.** Cruz das Almas: Embrapa/Mandioca e Fruticultura Tropical, dez. 2007.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; NEPOMUCENO, O. S.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius.* **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 79-84, 2009

SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CABRAL, J. R. S. Fruteiras ornamentais: beleza rara. **Cultivar**, Rio Grande do Sul, v. 5, n. 28, p. 6-8, 2004.

SOUZA, P. R. T. de. **Terpenos isolados de *Trichilia casaretti* e *Trichilia silvativa* (Meliaceae).** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Dissertação de Mestrado, 2008, p.133.

SENA NETO, A. R; ARAUJO, M. A. M; HAGE JR, E; MATTOSO, L. H. C; MARCONCINI , J. M. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fiber varieties for use in composites. **Industrial Crops and Products**. v. 43, n. 1. 2013.

SENA NETO, A. R; ARAUJO, M. A. M; HAGE JR, E; MATTOSO, L. H. C; MARCONCINI , J. M. Curaua leaf fiber (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) reinforcing poly(lactic acid) biocomposites: Formulation and performance. **Polymer Composites**. v. 36, n 8. 2015.

STRANSBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENK, H. SCHIMPER, A.F.W. **Tratado de Botánica**. Marín. Barcelona, España. 1994. 520 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

VARGHESEAND, V.; VALARSELVAN, S. Phytconstituents of Different Maturity Period fruits of *Ananas comosus* (Pineapple). **International Journal of Comprehensive Research in Biological Sciences.** v.7, n.2, p.10-15. 2015.

VASCONCELOS, A. L. *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.** v. 34, p. 151-159, 2013.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VINUTHA B.; PRASHANTH D.; SALMA K.; SREEJA S.L.; PRATITI D.; PADMAJA R.; RADHIKA S.; AMIT A.; VENKATESHWARLU K.; DEEPAK M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.109 p.359–363. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dementia: a public healthpriority**. World Health Organization. 2012.

WORLD HEART ORGANIZATION. **WHO traditional medicine strategy**: 2014-2023. 2013.

ZAH, R.; HISCHIER, R.; LEÃO, A. L.; BRAUN, I. Curauá fibers in the automobile industry – a sustainability assessment. **Journal of Cleaner Production**. Amsterdam, v. 15. p. 1032-1040, 2007.

CAPÍTULO I

SCREENNING FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES

SCREENNING FITOQUÍMICO E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES

Juliana Azevedo da Paixão[1], José Fernando de Araújo Neto[2], Diego Costa[3], Fernanda Vidigal Duarte Souza[4], Everton Hilo de Souza[5], Juceni Pereira de Lima David[6], Hugo Neves Brandão[7]

1 - Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, bolsista FAPES - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. juli.azevedo87@gmail.com
2 - Mestrando em Química - Instituto de Química, UFBA. jfernandoaraujo@hotmail.com
3-Estudante de Graduação-Faculdade de Farmácia-UEFS
4- Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura. fernanda.souza@embrapa.br
5- Pós-doutorando da Embrapa Mandioca e Fruticultura. hilosouza@gmail.com
6 - Prof[a]. Dr[a]. da Faculdade de Farmácia, UFBA. jucenidavid@gmail.com
7 - Prof. Orientador, Dr. do Departamento de Saúde, UEFS. hugo@uefs.br

RESUMO

O estudo fitoquímico desperta o interesse de pesquisadores, devido a diversidade de metabólitos secundários que são uma alternativa para obtenção de novos fármacos. Muitas das espécies vegetais nativas que são utilizadas pela população para fins medicinais, não tiveram qualquer avaliação científica quanto a sua caracterização química e avaliação biológica. A família Bromeliaceae inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies. O Brasil abriga aproximadamente 40% do total destas espécies, sendo 40 gêneros registrados no território nacional. A espécie mais conhecida é o *Ananas comosus*, chamada de abacaxi. Para espécies desta família existem relatos da presença de metabólitos secundários como: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinamico, entre outros. As espécies em estudo foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) que conta com uma gama de espécies, variedades e híbridos de bromeliáceas, em seu Banco Ativo de Germoplasma (BAG). O presente trabalho teve como objetivo realizar a triagem fitoquímica dos extratos metanólicos de folhas de acessos e híbridos pertencente à família Bromeliaceae. Foram utilizados 21 acessos de diferentes variedades botânicas do gênero *Ananas*, oriundos do Banco ativo de Germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Os extratos foram elaborados utilizando a técnica de maceração e posteriormente concentrados em rota evaporador. Reações de caracterização foram utilizadas para identificação qualitativa dos produtos naturais. Foi realizado a quantificação de flavonoides totais, por espectrofotometria. Através da triagem fitoquímica observou-se a presença de diversos metabólitos secundários nos acessos, saponinas em 11 amostras, taninos em 14 amostras, triterpenos e esteroides em 11, 17 amostras apresentaram reação positiva para pelo menos um dos testes para alcaloides, 13 apresentaram reação positiva para a presença de antraquinonas, 7 apresentaram reação positiva para cumarinas, nenhuma amostra apresentou flavonoides no teste qualitativo, no entanto na quantificação de flavonoides, foi encontrada quantidades em miligramas de

quercetina QE/100g em todos os acessos. Os extratos metanólicos das folhas apresentaram a presença de diferentes metabólitos secundários motivando a continuidade de novos estudos, para a obtenção de moléculas bioativas que podem servir como protótipos de fármacos.

Palavras-chave: Bromeliaceae. *Ananas*. Triagem. Metabólitos secundários. Variabilidade.

ABSTRACT

The phytochemical study aroused the interest of researchers because of the diversity of secondary metabolites that are an alternative to obtain new drugs. Many of the native plant species that are used by people for medicinal purposes, had no scientific assessment, so the chemical and biological characterization is still unknown. The Bromeliaceae family includes about 58 genera and about 3,352 species. Brazil is home to approximately 40% of these species, 40 genera registered in the national territory. The best known species is the Ananas comosus, called pineapple. The presence of secondary metabolites, triterpenes, steroid, flavonoid, glycerols, cinnamic acid derivatives, among others are reported. The species studied were provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), which has a range of species, varieties and hybrids of bromeliads in its Active Germplasm Bank (BAG). The aim of the research was to give a new application for the cultivated specimens with ornamental purposes, adding value to production. This study aimed to carry out the phytochemical screening of the methanol extracts of accession and hybrid leaves belongs to the bromeliaceae family. The 21 plant specimens were collected at EMBRAPA Cassava and Fruit. The extracts were prepared using maceration technique and subsequently concentrated in evaporator route. For qualitative identification of natural products, characterization reactions were used. Quantitation of total flavonoids was carried out by spectrophotometry. Through phytochemical screening was observed the presence of many secondary metabolites in access, saponins in 11 samples, tannins in 14 samples, triterpenes and steroids 11, 17 samples showed positive reaction to at least one of the tests for alkaloids, 13 showed a positive reaction for the presence of anthraquinones, 7 showed positive reaction to coumarins, flavonoids showed no sample in a qualitative test, however quantification of flavonoid found in milligram quantities of quercetin QE / 100g in all accessions. The methanolic extracts of leaves show the presence of different secondary metabolites encouraging the continuation of further studies for obtaining bioactive molecules that can serve as drug prototypes.

Keywords: Bromeliaceae. *Ananas*. *Screening*. Secondary metabolites. Variability.

1. INTRODUÇÃO:

O estudo da constituição química de plantas, desperta ao longo da história o interesse de diversos profissionais, sejam farmacêuticos, químicos, médicos, agrônomos, entre outros, devido a presença dos metabólitos secundários (SOUZA, 2008). As plantas medicinais vêm sendo estudadas na tentativa de descoberta de novos princípios ativos e são assim chamadas por apresentarem propriedades curativas e/ou preventivas para determinadas doenças (CZELUSNIAK et. al., 2012). A biodiversidade pode fornecer uma gama de produtos de importância econômica, dentre eles estão destacados os fitoterápicos e os fitofármacos, que são de origem vegetal (GUERRA; NODARI, 2007).

A contribuição dos produtos naturais é expressiva, aproximadamente 44% dos medicamentos foram desenvolvidos, a partir destes, (HOSTETTMANN, 2003; SCHENKEL, 2005). Dos novos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), entre 1981 e 2010, 34% foram baseados em pequenas moléculas de produtos naturais ou derivados de produtos naturais (HARVEY, 2015). Sendo a maior parte antitumorais, anti-infecciosos, antivirais e antibacterianos obtidos de origem natural ou derivados (CRAGG; NEWMAN, 2013; BUTLER, 2008).

A família Bromeliaceae possui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies (LUTTER, 2012) e é uma fonte potencial de produtos naturais. O Brasil é o centro de origem e dispersão e abriga aproximadamente 40% do total das espécies desta família, sendo 40 gêneros registrados no território nacional (FORZZA, 2005; SOUZA *et al.,* 2007).

A mais conhecida das bromélias é o abacaxi, que tornou-se popular principalmente pelo seu sabor e aroma marcantes. Seus frutos contêm a bromelina, uma enzima que apresenta grande valor comercial, cujo uso encontra-se em ascensão na indústria farmacêutica (BITANGE *et al*., 2008; MANETTI et. al., (2009)). Além da bromelina, muitas outras enzimas, como as proteases de cisteína e metabólitos secundários, os quais pertencem principalmente às classes dos triterpenoides, flavonoides, esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, ligninas,

alcaloides, entre outros já foram identificados no abacaxizeiro (MANETTI, et. al., 2009; KETNAWA; RAWDKUEN; CHAIWUT, 2010).

Aproximadamente 678 acessos desta família são conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi), sendo o maior do mundo, foi estabelecido através da realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional (SOUZA et. al., 2012). A caracterização desses acessos é um passo fundamental para identificar novos usos, bem como para servir como protótipos para desenvolvimento de terapias medicamentosas a diversas patologias. Desta maneira, este estudo mostra-se relevante para a comunidade científica, tendo em vista que o conhecimento sobre plantas medicinais representa importante recurso terapêutico. Este é o primeiro estudo realizado com variedades silvestres de abacaxizeiros.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de metabólitos secundários em acessos diferentes variedades botânicas de abacaxi, oriundas do BAG Abacaxi, bem como realizar comparação entre os acessos pertencentes em uma mesma espécie/ variedade botânica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Coleta e preparo do material*

Foram coletadas folhas de 21 acessos e híbridos (Figura 1) de diferentes variedades botânicas de abacaxizeiros do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas (Tabela 1).

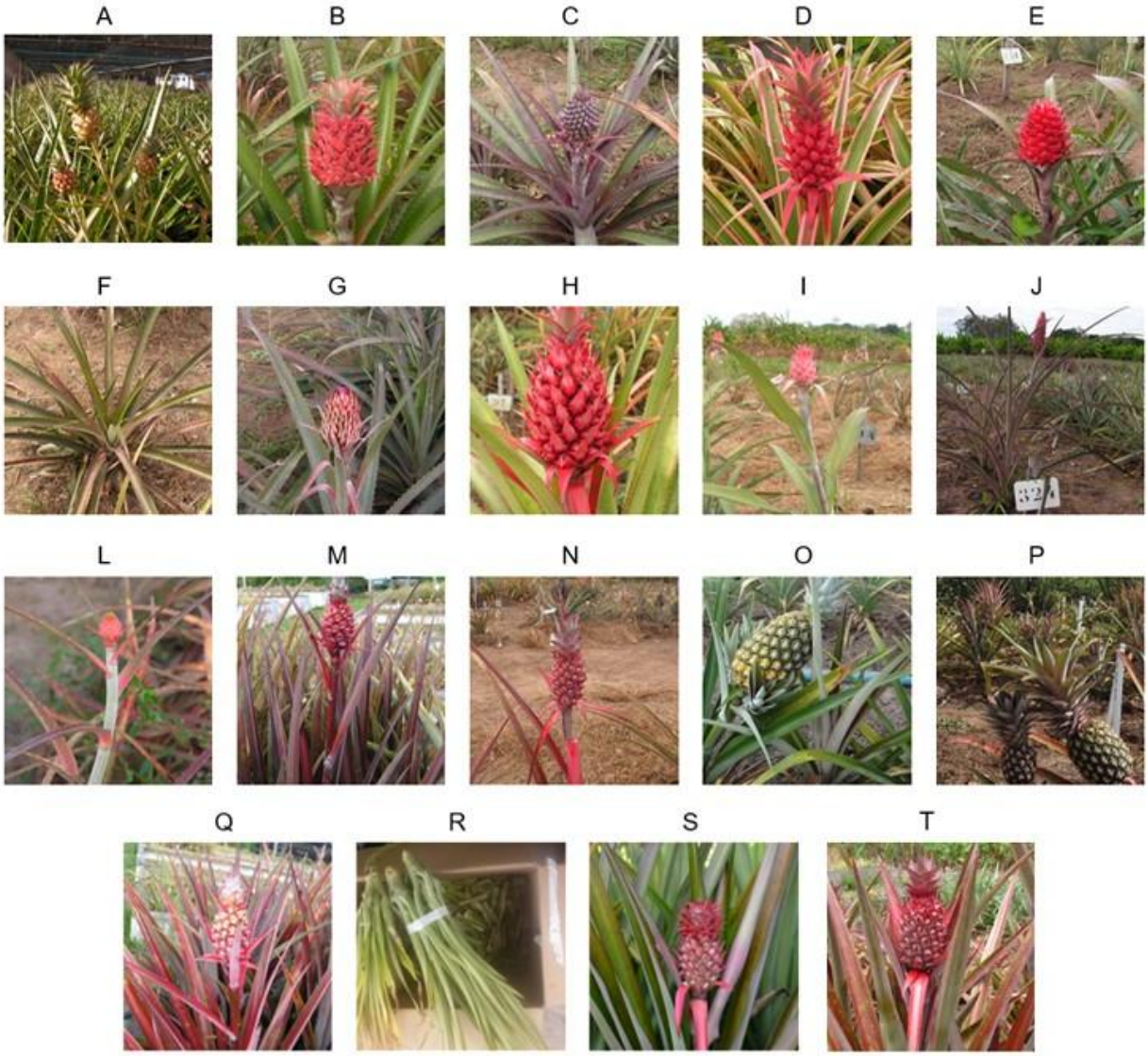


Figura 1: Imagens dos acessos coletados no BAG- Abacaxi. A-BGA 25, B-BGA 45, C-BGA 16, D-BGA 17, E-BGA 81, F-BGA 82, G-BGA 83, H-BGA 126, I-BGA 197, J-BGA 324, L-BGA 385, M-BGA 739, N-BGA 804, O-BGA 01, P-BGA 376, Q-BAG 820, R-HÍBRIDO E, S- HÍBRIDO F, T- HÍBRIDO G. (Fonte: Imagens cedidas por Hilo Souza)

Tabela 1. Acessos de abacaxizeiros utilizados nas análises fitoquímicas.

Nome do Acesso	Espécie/ Variedade botânica
1 – BGA-820	*A. comosus* var. *erectifolius*
2 – BGA-739	*A. comosus* var. *erectifolius*
3 – BGA-804	*A. comosus* var. *erectifolius*
4 – BGA-197	*Ananas* sp.
5 – Híbrido F	*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*
6 – BGA-81	*A. macrodontes*
7 – BGA-82	*A. macrodontes*
8 – BGA-83	*A. macrodontes*
9 – BGA-25	*A. comosus* var. *ananassoides*
10 – BGA-385	*A. comosus* var. *ananassoides*
11 – BGA-324	*A. comosus* var. *ananassoides*
12 – Híbrido G	*A. comosus* var. *ananassoides* X *A. comosus* var. *erectifolius*
13 – BGA-737	*A. comosus* var. *comosus*
14 – BGA-01	*A. comosus* var. *comosus*
15 – BGA-16	*A. comosus* var. *comosus*
16 – Híbrido E	*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*
17 – BGA-45	*A. comosus* var. *bracteatus*
18 – BGA-17	*A. comosus* var. *bracteatus*
19 – BGA-126	*A. comosus* var. *bracteatus*
20 – BGA-419	*A. comosus* var. *parguazensis*
21 – BGA-376	*A. comosus* var. *parguazensis*

Após a coleta as folhas dos espécimes vegetais foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar com temperatura de 40 ^{o}C até manterem um peso constante. Em seguida, foram moídas e colocados para maceração por 72h, 20 g do material vegetal moído em 250 mL de metanol, posteriormente rota-evaporados, sendo realizadas três repetições para cada.

2.2. *Screening* fitoquímico

Para a realização do *Screening* fitoquímico utilizou-se o extrato metanólico das folhas. Foram realizadas reações de caracterização adaptadas daquelas descritas por Alice et. al., (1985) e Mattos (1997), para alcaloides (Mayer- M, Dragendorf-D), cardiotonicos, cumarinas, flavonoides, taninos e fenóis, saponinas, triterpenos e esteroides e antraquinonas.

Alcaloides – foi evaporado até secura, em banho maria, aproximadamente 30 mL de extrato metanólico da planta, adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico a 10 % e aqueceu-se por 10 min. Após resfriamento e filtração, o filtrado foi dividido em dois tubos de ensaio. Ao primeiro tubo foi adicionado algumas gotas do reativo de Mayer (M) e ao outro Dragendorf (D).

Cardiotônicos - Adicionou-se 5 mL de solução de acetato neutro de chumbo a 10 % e 4 mL de água destilada a 10 mL do extrato metanólico da planta, levando a mistura ao banho-maria fervente, durante 10 min. Posteriormente filtrado, adicionado 20 mL de clorofórmio em funil de separação e deixado em repouso. A fase clorofórmica foi distribuída em tubos e evaporado em banho-maria, até a obtenção de resíduo seco. Aos tubos foram adicionados os seguintes reagentes, reativo de Baljet; reativo de Kedde.

Cumarinas voláteis - Em tubo de ensaio, adicionou-se 2 mL de extrato metanólico, com papel filtro embebido em solução diluída de hidróxido de sódio tampou-se o tubo e levado ao banho-maria fervente, por alguns minutos. O papel de filtro removido foi examinado à luz UV, sendo a fluorescência amarela indicativa da presença de cumarinas.

Flavonoides - Em tubo de ensaio, colocou-se 2 mL de extrato metanólico, alguns fragmentos de magnésio e verteu-se pelas paredes do tubo, gotas de ácido clorídrico diluído. Foi observado as colorações, que variam para as diferentes estruturas dos flavonoides.

Taninos e fenóis - O extrato metanólico dos acessos foram aplicados em placa de cromatografia em camada delgada (CCD), em seguida borrifada nestas placas solução de cloreto férrico a 10 %. A coloração azul ou verde indicou a provável presença de taninos.

Saponinas - 5 mL do extrato metanólico foi evaporado e retomado com água fervente. Após resfriamento, foi realizada agitação vigorosa, deixando em repouso por 20 minutos. A presença de saponinas foi classificada pela altura da espuma, 1 cm = +; 2 cm = ++; 3 cm = +++.

Triterpenos e/ou esteróides - O resíduo de 10 mL de extrato metanólico foi tratado com 10 mL de clorofórmio anidro e filtrado, dividido em duas porções, sendo testado pelas reações de Liebermann-Burchard e Salkowski.

Antraquinonas - em um tubo de ensaio foi colocado 0,20 g de extrato bruto e adicionado 5 mL de clorofórmio, após agitação foi deixado durante 15 minutos em repouso, posteriormente recolhida a fração clorofórmica, adicionado 1 mL de solução de hidróxido de amônio diluído sob agitação. A fase aquosa colore-se de vermelho em presença de antraquinonas livres.

Todas as reações foram classificadas em: Fortemente Positivas (++); Positivas (+); Fracamente Positivas (+-); Negativas (-).

Flavonoides totais

Para comparação do *screening* fitoquímico foi avaliada a concentração de flavonoides totais. Neste teste a concentração de flavonoides totais é determinada pela complexação dos flavonoides com o cátion alumínio, formando complexos estáveis entre o cátion alumínio com os flavonoides em meio metanólico. A formação deste complexo entre o alumínio e flavonoide em metanol promove um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de

flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (PELISSARI, 2008).

Utilizou-se como padrão a quercetina, sendo preparadas soluções com concentrações diferentes para realização da curva de calibração. Pesou-se 10 mg das amostras, que foram dissolvidos em 20 mL de metanol. Foi preparada uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%. Adicionou-se 150 µL da amostra ou padrão a 150 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio. Posteriormente após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro Multiskan GO 3.2 em λ = 415 nm. Para o controle, procedeu-se da mesma forma que as demais amostras, no entanto, adicionado metanol no lugar da amostra. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina (PORTHITIRAT, 2009).

3. **RESULTADOS**

3.1.Screening fitoquímico

As figuras 2, 3, 4, 5 e 6 são referentes aos testes ensaiados. Não foi observada a presença de flavonoides e cardiotônicos em nenhuma das 21 amostras estudadas. A presença de saponinas foi verificada em 11 amostras, taninos em 14 amostras, triterpenos e esteroides em 11 amostras, 17 apresentaram reação positiva para pelo menos um dos testes para alcaloides, 13 apresentaram reação positiva para a presença de antraquinonas, 7 apresentaram reação positiva para cumarinas (Tabela 2).

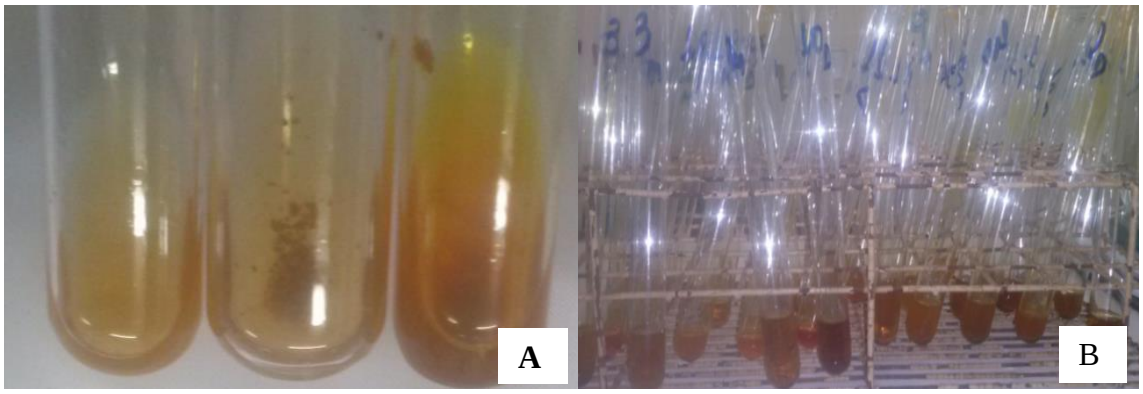


Figura 2. Verificação da presença de alcaloides pelo teste de Meyer e Dragendorf em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado para alcaloides negativo, positivo para Meyer, positivo para Dragendorf, respectivamente. B) Todos os acessos ensaiados. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

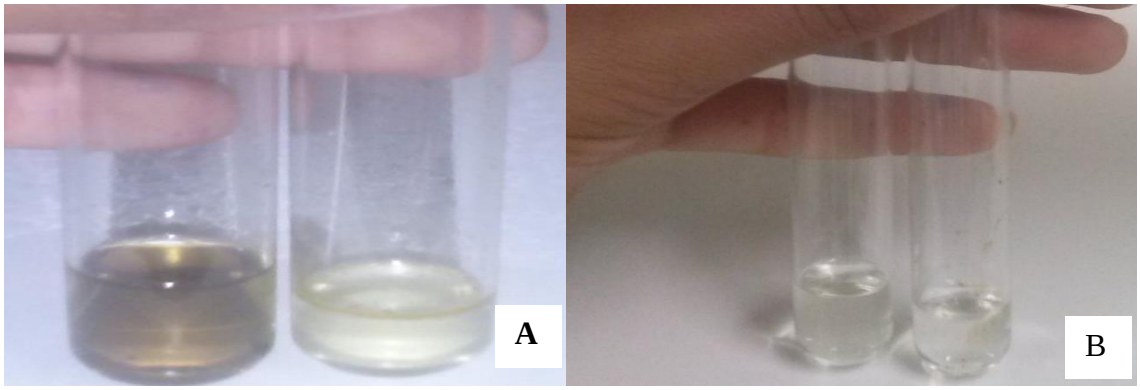


Figura 3. Verificação da presença de Triterpenos em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo para triterpenos, mudança de coloração. B) Resultado negativo para triterpenos. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

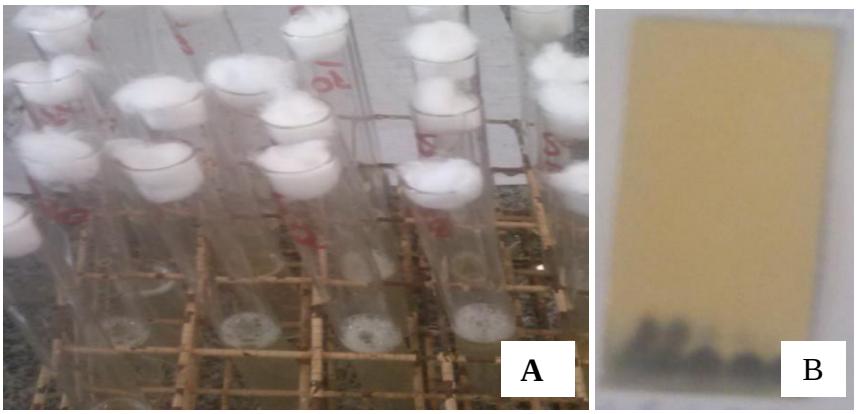


Figura 4. A) Resultado positivo para a análise de saponinas. B) Resultado positivo para análise de taninos. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

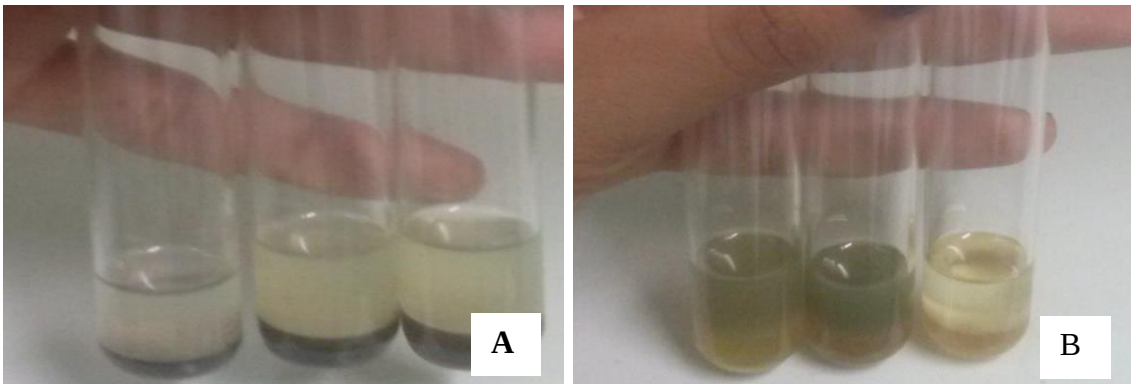


Figura 5. Verificação da presença de antraquinonas em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo para antraquinonas. B) Resultado negativo para antraquinonas. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

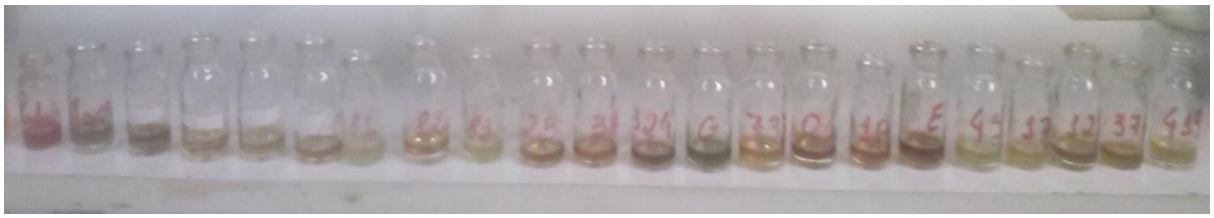


Figura 6. Verificação da presença de flavonoides em acessos de abacaxizeiros, resultado negativo para todos os acessos. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

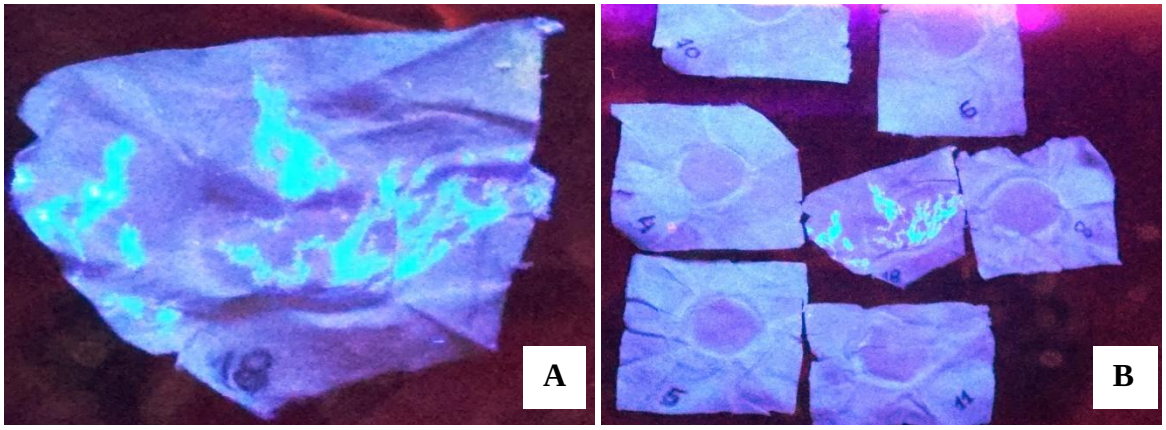


Figura 7. Verificação da presença de derivados de cumarinas em acessos de abacaxizeiros. A) Resultado positivo. B) Comparação de resultados negativos e positivo. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

Tabela 2. Testes fitoquímicos nos diferentes acessos de abacaxizeiros.

Acessos	SAP	TAN	FLA	TRI	ALC	ANT	CUM	CAR
1 – BGA-820	+	+	-	++	M(+-) D(+-)	-	-	-
2 – BGA-739	+	+	-	+-	M(+) D(+)	-	-	-
3 – BGA-804	++	-	-	+	M(+) D(++)	+-	-	-
4 – BGA-197	-	-	-	+	M(+) D(+)	+-	+-	-
5 – Híbrido F	++	-	-	-	M(+) D(+)	++	+-	-
6 – BGA-81	++	-	-	+	M(-) D(-)	-	+-	-
7 – BGA-82	+	+-	-	-	M(+-) D(+-)	-	-	-
8 – BGA-83	++	+-	-	+	M(-) D(-)	-	+-	-
9 – BGA-25	-	-	-	-	M(+) D(+)	+-	-	-
10 – BGA-385	+	+	-	-	M(+) D(+-)	+	+-	-
11 – BGA-324	++	+	-	-	M(+) D(+)	+	+-	-
12 – Híbrido G	++	+	-	+	M(+) D(+)	+-	-	-
13 – BGA-737	-	+-	-	+-	M(+-) D(+-)	+-	-	-
14 – BGA-01	-	+	-	-	M(+) D(+)	+-	-	-
15 – BGA-16	-	+	-	-	M(-) D(+-)	+	-	-
16 – Híbrido E	+	+	-	-	M(+) D(+)	-	-	-
17 – BGA-45	-	+	-	+	M(-) D(-)	-	-	-
18 – BGA-17	-	+-	-	-	M(-) D(+-)	-	+	-
19 – BGA-126	-	+-	-	-	M(+) D(+)	++	-	-
20 – BGA-419	-	-	-	+	M(+-) D(+)	+-	-	-
21 – BGA-376	-	+-	-	+	M(+-) D(+-)	+-	-	-
Padrão	++	++	++	++	++	++	++	++

SAP: saponinas; TAN: taninos e fenóis; FLA: flavonoides; TRI: triterpenos e esteroides; ALC: alcaloides; ANT: antraquinonas; CUM: cumarinas; CAR: cardiotônicos.
As reações foram classificadas como: fortemente positivas (++), positivas (+), fracamente positivas (+) e negativas (-).

Dentre os acessos estudados foi possível notar que divergências entre a presença e ausência de determinado metabólito secundário são encontradas em acessos pertencentes a mesma variedade. Os acessos BGA-820, BGA-739, BGA-804 pertencem a *Ananas comosus* var. *erectifolius,* apresentaram saponinas, taninos,

triterpenos e esteroides, alcaloides, e antraquinonas, no entanto o acesso BGA-804 foi o único que apresentou antraquinonas e não apresentou taninos (Tabela 2).

A espécies *A. macrodontes*, apresentou saponinas, taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides e cumarinas. No entanto o acesso BGA-82, apresentou um maior número de diferenças, tendo em vista que foi o único que apresentou alcaloides entre os três e não apresentou triterpenos, esteroide e cumarinas, já o acesso BGA-81 não apresentou a presença de taninos (Tabela 2).

A variedade botânica *A. comosus* var. *ananassoides* apresentou saponinas, taninos, alcaloides, antraquinonas e cumarinas. No entanto o acesso BGA-25 diferiu dos demais pela ausência dos seguintes metabólitos secundários: saponinas, triterpenos e cumarinas (Tabela 2).

Entre os acessos de *A. comosus* var. *comosus*, foram observados à presença de taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides e antraquinonas, sendo que os triterpenos e esteroides foram observados apenas no acesso BGA-737 (Tabela 2).
A variedade *A. comosus* var. *bracteatus* apresentou os seguintes metabólitos secundários: taninos, triterpenos e esteroides, alcaloides, antraquinonas e cumarinas. Porém o acesso BAG-45 apresentou várias diferenças entre os outros dois acessos, pois foi o único que apresentou triterpenos, esteroides e cumarinas e não apresentou alcaloides e antraquinonas. Já os acessos de *A. comosus* var. *parguazensis* apresentou triterpenos e esteroides, alcaloides e antraquinonas. Os taninos foram observados apenas no acesso BAG-376.

Com relação ao híbrido F apresentou metabólitos dos seus parentais *Ananas comosus* var*. erectifolius e Ananas comosus* var*. bracteatus*, exceto pela ausência de triterpenos e taninos. Já o híbrido E apresentou apenas saponinas, taninos e alcaloides, metabólitos estes presentes nos seus parentais *Ananas comosus* var*. erectifolius e Ananas comosus* var*. bracteatus.* Enquanto o híbrido G apresentou os metabólitos dos parentais *Ananas comosus* var*. erectifolius e Ananas comosus* var*. ananassoides*, exceto pela presença ausência de cumarinas.

3.2. *Flavonoides totais*

Como pode ser verificado na tabela 2, não foi detectado a presença de flavonoides na avaliação fitoquímica qualitativa. Como a ausência de flavonoides em testes fitoquímicos não é comum, foi realizada uma quantificação de flavonoides totais nos 21 acessos em comparação com o padrão quercetina. Utilizando uma curva do padrão quercetina com reta y = 32.033x – 0.0369 e R^2= 0,9991, expressa na figura 8, temos as concentrações dos flavonoides totais nos extratos em QE.100g^{-1} (Tabela 3).

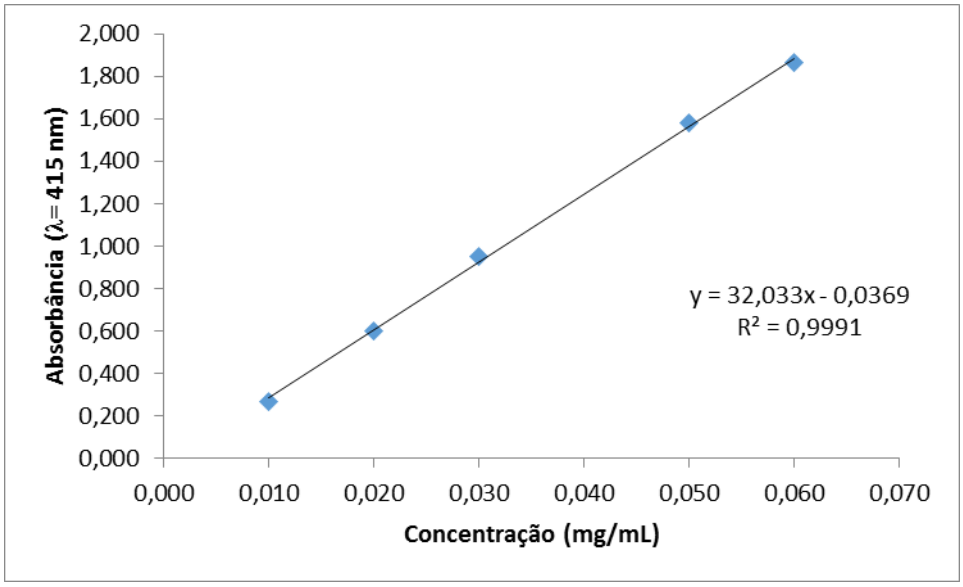


Figura 8. Curva padrão da quercetina.

Tabela 3. Concentração de flavonoides totais nos 21 acessos de abacaxizeiros.

Acessos	QE/100g	Acessos	QE/100g	Acessos	QE/100g
BGA-820	1,66±0,002	BGA-83	2,10±0,000	BGA-16	2,20±0,002
BGA-739	1, 64±0,001	BGA-25	1,60±0,001	Híbrido E	1,00±0,003
BGA-804	1,48±0,003	BGA-385	2,56±0,002	BGA-45	1,00±0,001
BGA-197	1,45±0,002	BGA-324	1,40±0,001	BGA-17	1,00±0,002
Híbrido F	1,15±0,003	Híbrido G	1,24±0,003	BGA-126	1,10±0,002
BGA-81	1,13±0,001	BGA-737	1,30±0,002	BGA-419	1,54±0,001
BGA-82	1.30±0,002	BGA-01	1,23±0,003	BGA-376	2,65±0,003

Resultado expresso em mg de quercetina QE/100g

De acordo com os dados obtidos de concentração de flavonoides nos acessos estudados, foi possível verificar a presença deste metabolito secundário em todos eles, o que não corroboram com o *screening* fitoquímico.

4. **DISCUSSÃO**

4.1Screening fitoquímico

De acordo com o estudo realizado, foram encontrados a presença de diferentes metabólitos secundários nas amostras, ocorrendo diferenças inter e/ou intravariedades botânicas, não sendo identificado nenhum padrão dentro das variedades. Em estudo realizado por Varghese, 2015, utilizando o fruto de *Ananas comosus* (L.) Merr., foi verificado a presença dos seguintes produtos naturais: saponinas, taninos, fitoesteróis e esteroides, alcaloides e flavonoides. Já em Manetti, (2009) são relatados os seguintes metabólitos esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, lignanas, compostos nitrogenados, presentes nas espécies de Bromeliaceae.

A presença dos metabólitos foi verificada em todos os acessos, no entanto divergem na presença destes entre as espécies e/ ou variedade botânica. Isso pode ser explicado devido a vários fatores, uma vez que seu acúmulo é uma resposta comum das plantas a estresses bióticos e abióticos (SMETANSKA, 2008).

A biossíntese de produtos naturais é fortemente influenciada por fatores ambientais, bem como genéticos. De acordo Gobbo; Lopes (2007), os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Ainda segundo Rezaeieh; Uyanık (2012) apud Ravishankar; Ramachandra; Rao, (2000), foi demonstrado que a biossíntese da atividade das células pode ser melhorada com a regulação dos

fatores ambientais, além da possível seleção artificial ou a indução para a produção dos metabólitos desejados.

Dessa maneira e diante das afirmações, é possível verificar que muitos fatores podem ter influenciado as diferenças encontradas na triagem fitoquímica, tendo em vista que os acessos ou variedades silvestres pertencem a mesma espécie que foram coletados originalmente em localidades diferentes e atualmente estão submetidas as mesmas condições ambientais, tornando a possibilidade de variação ambiental mínima, justificando uma maior atividade genética nestas condições.

Apesar dos acessos de variedades silvestres serem cultivados no mesmo local após clonagem, os metabólitos secundários são fundamentalmente produzidos pelo processamento genético, assim, a variabilidade genética influencia na produção dos metabólitos. De acordo com Duval et. al., (2001) e Souza et. al*.,* (2012) os acessos de abacaxizeiros apresentam grande variabilidade genética. Dessa maneira, além da influência ambiental, existe a genética que é crucial para presença ou ausência de determinados produtos naturais.

Kato, (2004) avaliando o grau de variação genética em *Ananas comosus*, utilizando a técnica de *fingerprint* de DNA com marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), verificou-se que os resultados sugeriram abundante variação genética dentro do germoplasma de abacaxi avaliado, devido aos altos níveis de mutação somática. Além disso, o mesmo autor relata que existem elevadas variações em acessos selvagens, enquanto as variedades cultivadas apresentam-se mais homogêneas. Justificando assim os resultados encontrados neste estudo.

4.2 Flavonoides totais

De acordo com o estudo foram encontrados a presença de flavonoides em todos os extratos. No entanto, as concentrações encontradas nos acessos em QE $100g^{-1}$, são de quatro a oito vezes menor se comparando com estudos realizados por Chakraborty; Mishra; Rao (2015) utilizando o purê do fruto de *Ananas comosus* L. Esses autores encontraram um teor de flavonoides totais igual a 8,67 mg QE/100g.

Já em estudo realizado por Hossain, Rahman (2011) com três extratos do fruto de abacaxi, os teores de flavonoides variaram entre 39,4 a 55,2 mg quercetina/g de peso, não foram encontrados estudos utilizando folhas de Ananas. A variação encontrada pode ser justificada devido às condições ambientais, a parte da planta utilizada, tempo de extração, polaridade do solvente utilizado na extração, e outros, o que pode modificar os constituintes presentes no extrato da planta. Dessa maneira, esse baixo teor de flavonoides pode ter dificultado sua detecção pelo teste qualitativo.

5. **CONCLUSÕES**

Os dados obtidos com os acessos estudados corroboram com dados da literatura, tendo em vista a presença de metabólitos secundários já encontrados como: triterpenos e esteroides, flavonoides, alcaloides, entre outros. Além disso, foi possível verificar a variabilidade entre os acessos que ocorre pela presença ou ausência de determinado metabólito, sendo influenciado principalmente pela diversidade genética. São necessários mais estudos fitoquímicos, a fim de verificar os constituintes químicos e o potencial farmacológico desses acessos, tendo em vista a falta de estudos usando o mesmo material conservado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, e desta forma os impactos gerados podem agregar valor aos espécimes.

6. REFERÊNCIAS

ALICE C. B, SILVA G. A. A. B, SIQUEIRA N. C. S, MENTZ L. A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). **Cadernos de Farmácia.** v.1, p. 83-94, 1985.

BITANGE, N. T. *et al.* Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain). **Pakistan Journal of Nutrition,** v. 7, p. 513–520, 2008.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports.** v. 25, p. 475-516. 2008.

CHAKRABORTY S.; MISHRA R.; RAO P. S. Effect of combined high pressure–temperature treatments on color and nutritional quality attributes of pineapple (*Ananas comosus L.)* puree. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 28, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophysica Acta.** v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira Plantas Mededicinais Botucatu**, v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DURVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; FONTAINE, A.; HORRY, J. P. Ornamental pineapple: perspective from clonal and hybrid breeding. **Pineapple News**, Hawaii, n. 8, p. 13-14, 2001.

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de Encholirium Mart. Ex Schult. E Shult. F. (Pitcairnioideae- Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**. v. 23, p. 1 – 49, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova**, v.30, p. 374-381, 2007.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS. 2007.

HARVEY, L. A.; EBEL, R. E.; QUINN R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era **Nature Reviews Drug Discovery***, v.*14, p.111–129 2015.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. S. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**. v.44. Bangladesh, 2011.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Sao Carlos: Edufscar, 2003.

KATO, C. Y; NAGAI, C; MOORE, P. H; ZEE, F; KIM, M. S; STEIGER, D. L; MING, R. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p 815–825, 2004.

KETWANA, S; RAWDKUEN, S; CHAIWUT, P. Two phase partintioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 205-2011, 2010.

LUTHER H.E. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials.** 13 ed Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens. 2012.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MATTOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from1981 to 2010. **Natural Products Branch**, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer. 2012.

PELISSARI, G. P. **Estudo Farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (RICH. IN PERS.) DC. (ASTERACEAE)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008. 176p.

POTHITIRAT, W. *et al.* Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 442–447, 2009.

REZAEIEH K. A. P.; UYANIK B. G. Biotic and abiotic stresses mediated changes in secondary metabolites induction of medicinal plants. **Tıbbı ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu**. Eylül. 2012.

SCHENKEL, E.P.; SIMOES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STRHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina.** São Paulo, v.3, n.4, p.139-141, 2005.

SMETANSKA L. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. v.111, p.187-228, 2008.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. de; SANTOS, O. S. N.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; FERREIRA, F. R.; SILVA, M. de J. da. Abacaxi ornamental: uma riqueza a ser explorada. **Abacaxi em Foco.** Cruz das Almas: Embrapa/Mandioca e Fruticultura Tropical, dez. 2007.

SOUZA, P. R. T. de. **Terpenos isolados de *Trichilia casaretti* e *Trichilia silvativa* (Meliaceae).** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Dissertação de Mestrado, 2008.

SOUZA, E. H. ; SOUZA, F. V. D, ; CARVALHO C., M. A. P. ; COSTA, D. S. ; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P. ; SILVA LEDO, C. A. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 59, p. 1357-1376, 2012.

VARGHESEAND, V.; VALARSELVAN, S. Phytconstituents of Different Maturity Period fruits of *Ananas comosus* (Pineapple). **International Journal of Comprehensive Research in Biological Sciences.** v.7, n.2, p.10-15. 2015.

VASCONCELOS, A. L. *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.** v. 34, p. 151-159 2013.

CAPÍTULO II

TRIAGEM BIOLÓGICA EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES

TRIAGEM BIOLÓGICA EM ACESSOS DE ABACAXIZEIROS SILVESTRES

Juliana Azevedo da Paixão[1]; Diego Mota da Costa[2]; Jessica Lima de Souza[2]; Igor Kennedy Pereira de Oliveira [2]; José Fernando Araújo Neto[3]; Everton Hilo de Souza[4]; Fernanda Vidigal de Souza[4]; Juceni Pereira de Lima David[3]; Hugo Neves Brandão[2]*

[1.] Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: juli.azevedo87@gmail.com

[2.] Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: jessica_uefs2011@hotmail.com, diegocost@live.com, igor.kennedy@gmail.com, hugo@uefs.com

[3.] Departamento do Medicamento, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, 40170-115, Salvador. jfernandoaraujo@hotmail.com, juceni@gmail.com

[4.] Embrapa, Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n/ Chapadinha, Cruz das Almas, Bahia,Brasil, e-mail: hilosouza@gmail.com, fernanda.souza@embrapa.br
*e-mail de correspondência: hugo@uefs.com

RESUMO

Estudos fitoquímicos e ensaios biológicos representam uma abordagem alternativa na indústria farmacêutica. O Brasil é detentor de uma fonte imensa de recursos naturais para obtenção de produtos farmacêuticos, contudo, nossas espécies nativas têm sido pouco estudadas. A família Bromeliaceae inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3352 espécies, sendo a espécie mais conhecida o *Ananas comosus*. Comumente, algumas das plantas desta família são utilizadas para tratamento de diversas afecções, como bronquites, aftas, tosses e inflamações. Além de existirem relatos da presença de produtos naturais: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinâmico. Ensaios biológicos como o teste de toxicidade frente à *Artemia salina,* potencial antioxidante e anticolinetserásico podem ser considerados como indicadores confiáveis quanto as prováveis atividades biológicas de extratos vegetais e/ou substâncias puras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de citotoxidade, antioxidante e anticolinesterásico dos extratos metanólicos das folhas de 21 acessos e híbridos de espécies pertencente ao gênero *Ananas*. Os espécimes coletados em parceria com a EMBRAPA, foram secos e moídos, e os extratos elaborados utilizando a técnica de maceração, posteriormente concentrados em rota evaporador. A metodologia utilizada para avaliar a atividade citotóxica, foi o teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. A atividade antioxidante foi verificada através do sequestro do radical DPPH e oxidação do β-caroteno, já a atividade anticolinesterasica foi verificada pelo método de Elman, através da inibição da

enzima acetilcolinesterase. Os extratos apresentaram potencial de toxicidade frente à *Artemia salina* variando de 10 a 100%, sendo que seis extratos dos acessos analisados apresentaram %SRL comparável ao controle positivo utilizado (BHT), que apresentou 100% de SRL, enquanto para o ensaio com o β-caroteno, as amostras apresentaram inibição entre 21 e 57 %. Apenas o Híbrido E não apresentou mudança significativa desde o minuto 10 ao 60, frente à enzima, com valores acima de 50%**.** Os extratos metanólicos, revelaram possuir substâncias bioativas com possíveis atividades citotóxicas, antioxidante e anticolinesterásicas, indicando a necessidade de continuação dos estudos, bem como isolamentos e caracterização de substâncias.

Palavras-chave: Bromeliaceae. *Ananas*. Citotoxidade. Antioxidante. Anticolinesterase.

ABSTRACT

Phytochemical studies and biological tests represent an alternative approach in the pharmaceutical industry. Brazil is the holder of an immense source of natural resources for obtaining pharmaceutical products, however, in the scientific field, our native species have not been studied in a great detail. The Bromeliaceae family includes about 58 genera and about 3352 species, the best known being the *Ananas comosus* species. Commonly, some of the plants of this family are used for the treatment of various diseases such as bronchitis, ulcers, coughing and inflammation. In addition, the presence of natural products: triterpenes, steroid, flavonoid, glycerols, cinnamic acid derivatives are reported. Biological assays such as *Artemia salina* bioassay, antioxidant potential and anticolinetserasic can be considered as reliable as indicators of the likely biological activities of plant extracts and / or pure substances. This study aimed to evaluate the potential for cytotoxicity, antioxidant and anticholinesterase of methanol extracts of leaves of 21 accessions and hybrid species belonging to the Bromeliaceae family. Specimens collected in partnership with EMBRAPA, were dried and ground, and extracts were prepared using maceration technique subsequently concentrated in evaporator route. The methodology used to assess the cytotoxic activity was Artemia salina Biossay. The antioxidant activity was checked by the scavenge of DPPH radical and oxidation of β-carotene, since the acetylcholinesterase activity was checked by Elman method, by inhibiting the enzyme cholinesterase. The extracts have potential toxicity at Artemia salina ranging from 10 to 100%, being six extracts of analyzed accessions presented %SRF comparable to the positive control (BHT) presenting SRL 100%, while for the β-carotene test, samples were inhibited between 21 and 57%. Only the Hybrid E showed no significant change from the minute 10-60, opposite the enzyme cholinesterase, with values above 50%. The methanol extracts revealed to have bioactive substances with potential cytotoxic activity, antioxidant and anticholinesterase, indicating the need for further study, isolation and characterization of substances.

Keywords: Bromeliaceae. *Ananas*. Cytotoxicity. Antioxidant. Anticholinesterase.

1. INTRODUÇÃO

Caracterização química e ensaios biológicos são alternativas importantes na descoberta de novos fármacos. O Brasil é detentor de fonte inestimável de recursos naturais para obtenção destes, ainda que, nossas espécies nativas têm sido pouco estudadas (SASIDHARAN et. al., 2011; FRIAS, 2011). Dados de Cragg; Newman (2012) mostram que durante 30 anos de análise metade dos medicamentos foram provenientes de produtos naturais ou derivados, sendo em sua maioria anticancerígenos, anti-infecciosos, antivirais e antibacterianos. Testes que avaliam estas atividades são muito utilizados como estudo preliminar (BEDNARCZUK, 2010).

Testes de avaliação da capacidade anticancerígena de extratos ou de substâncias puras são de elevado custo. No entanto, bioensaios comparativos entre testes efetuados *in vitro* com linhagens de células cancerígenas e o teste da letalidade frente à *Artemia salina,* que foi desenvolvido por Meyer (1982), mostraram grande concordância com diversas substâncias que apresentam atividade citotóxica. Dessa maneira, tonando o teste frente à *A. salina*, um indicador confiável quanto à toxicidade de extratos vegetais e/ou substâncias puras isoladas (ANDERSON et al., 1991; MEYER, 1982).

Um teste muito realizado em laboratório é o de atividade antioxidante. Este ensaio pode ser realizado através da capacidade de retardar a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (DUARTE; ALMEIDA, 2006). Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado no último orbital, o que as torna muito instáveis, reativas, e com enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (GASPARRI, 2005). Esta capacidade de combinação com estruturas celulares é associada a vários processos patológicos, como: câncer, arteriosclerose, e mal de Alzheimer, entre outras desordens, como também, ao processo normal do envelhecimento (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). Segundo Gasparri (2005) e Sugiyama et al. (2008), extratos vegetais que contêm fenólicos, principalmente os flavonoides e taninos, apresentam importante atividade

antioxidante, capazes de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres. Estudos mostram que uma dieta rica em compostos fenólicos exibe propriedades pró-oxidantes e citotóxicas, sob certas condições.

Outro teste importante é o de inibição da acetilcolinesterase (AChE), a inibição da AChE humana tem várias aplicações importantes em tratamentos médicos, especialmente na doença de Alzheimer (DA), que é uma das principais causadoras de demência em idosos e afeta cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo (PETRONILHO et al., 2011; WHO, 2012). De acordo com Viegas (2004), fármacos com atividade anticolinesterásica são de grande valor no tratamento da doença de Alzheimer, o qual é caracterizado por uma diminuição na funcionalidade do sistema central colinérgico. A utilização de inibidores da acetilcolinesterase pode resultar em importante melhora na memória dos pacientes. A fisostigmina é um produto natural da classe dos alcaloides, presente no feijão-de-calabar (*Physostigma venenosum*) e possui atividade anticolinesterasica importante (GILMAN, 2005; DE LÚCIA, 2014).

Espécies da família Bromeliaceae apresentam diversas utilizações na medicina popular para tratamento de diversas afecções: bronquites, aftas, tosses e inflamações (MANETTI et. al., 2009). A família Bromeliaceae inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3352 espécies, a espécie mais conhecida é o *Ananas comosus* (LUTHER, 2012). Em espécies desta família existem relatos da presença de metabólitos secundários: triterpenos, esteroides, flavonoides, gliceróis, derivados do ácido cinâmico, alcaloides, entre outros que podem estar associados as atividades farmacológicas (LUTHER, 2012; MANETTI et. al., 2009).

Em estudo realizado pelo grupo de pesquisa Estudos Químico e Atividades Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana foram encontrados a presença de diversas classes de metabólitos secundários em acessos e híbridos do gênero *Ananas*, o que justifica estudos de verificação das atividades biológicas deste gênero.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, antioxidante e anticolinesterásico de 21 extratos brutos de folhas de diferentes variedades botânicas do gênero *Ananas* e três híbridos oriundos de melhoramento genético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e Preparo do Material

Como material vegetal foram utilizadas folhas de 18 acessos de variedades silvestres de diferentes variedades botânicas e 3 híbridos (Tabela 1) Os acessos foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e os híbridos são oriundos do melhoramento genético. Estes foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar com temperatura de 40 graus até peso constante. Após a secagem foram iniciadas as moagens das amostras e colocados para maceração 20g do material vegetal em 250 ml de metanol e posteriormente rota-evaporadas (Figura 1 A e B), sendo este processo repetido por duas vezes.

Tabela 1: Acessos e híbridos coletados no BAG-Abacaxi

Nome do Acesso	Espécie/ Variedade botânica
1 – BGA-820	*A. comosus* var. *erectifolius*
2 – BGA-739	*A. comosus* var. *erectifolius*
3 – BGA-804	*A. comosus* var. *erectifolius*
4 – BGA-197	*Ananas* sp.
5 – Híbrido F	*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*
6 – BGA-81	*A. macrodontes*
7 – BGA-82	*A. macrodontes*
8 – BGA-83	*A. macrodontes*
9 – BGA-25	*A. comosus* var. *ananassoides*
10 – BGA-385	*A. comosus* var. *ananassoides*
11 – BGA-324	*A. comosus* var. *ananassoides*
12 – Híbrido G	*A. comosus* var. *ananassoides* X *A. comosus* var. *erectifolius*
13 – BGA-737	*A. comosus* var. *comosus*
14 – BGA-01	*A. comosus* var. *comosus*
15 – BGA-16	*A. comosus* var. *comosus*
16 – Híbrido E	*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*

17 – BGA-45	*A. comosus* var. *bracteatus*
18 – BGA-17	*A. comosus* var. *bracteatus*
19 – BGA-126	*A. comosus* var. *bracteatus*
20 – BGA-419	*A. comosus* var. *parguazensis*
21 – BGA-376	*A. comosus* var. *parguazensis*

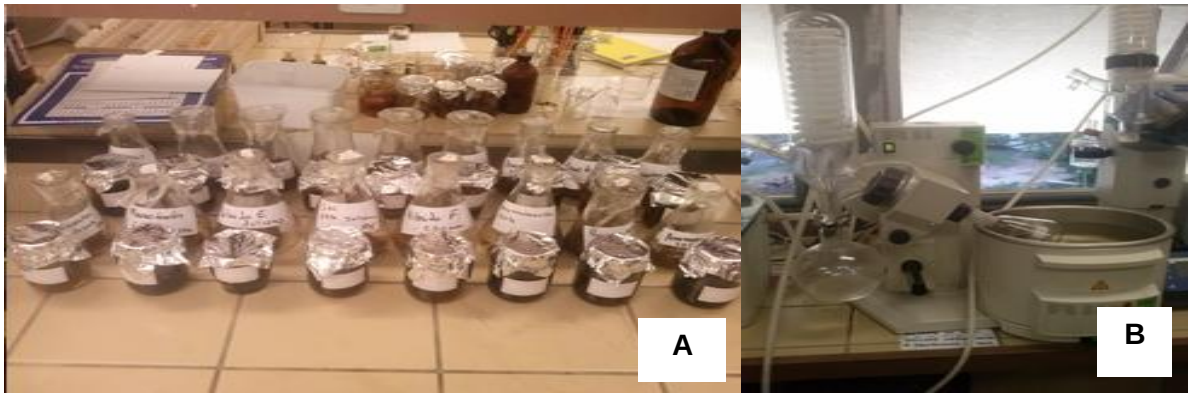


Figura 1: A: Preparo dos extratos; B: Rotaevaporação dos extratos. (IMAGEM: PAIXÃO, J.A,)

2.2. Teste de letalidade frente à Artemia salina (CTx)

O teste de letalidade frente à *Artemia salina* foi realizado a partir do método adaptado por Serrano et al. (1996). Os *naupliis* recém-eclodidos em salina, foram colocados em contato com o extrato bruto seco em concentração 500 µg/mL e diluído em 5mL de salina, posteriormente incubados por 24 horas com luz intensa. Após esse período foram contados os *naupliis* sobreviventes, com auxílio de lupa. Os *naupliis* eram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação. Todo o teste foi realizado em triplicata.

2.3. Atividade Antioxidante (AA): Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante dos extratos, foi determinada pela metodologia de Hidalgo (1994), através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH. As determinações da atividade antioxidante

foram realizadas adicionando-se a cada cubeta 250 µL da solução de DPPH (40 mg/mL), 50 µL de metanol para o controle, 50 µL de BHT (500µg/Ml) para o padrão e 50 µL das amostras em concentração de 500µg/mL em MeOH. As leituras das absorbâncias foram realizadas no minuto inicial e após 30 minutos de reação em espectrofotômetro com incubação a 25ºC em ambiente escuro. As análises foram feitas em triplicatas, em comprimento de onda 517 nm.

O decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte equação 1:

Equação 1: %SRL= (Ac - Aam / Ac) x 100, Segundo Lima *et al*., 2006.

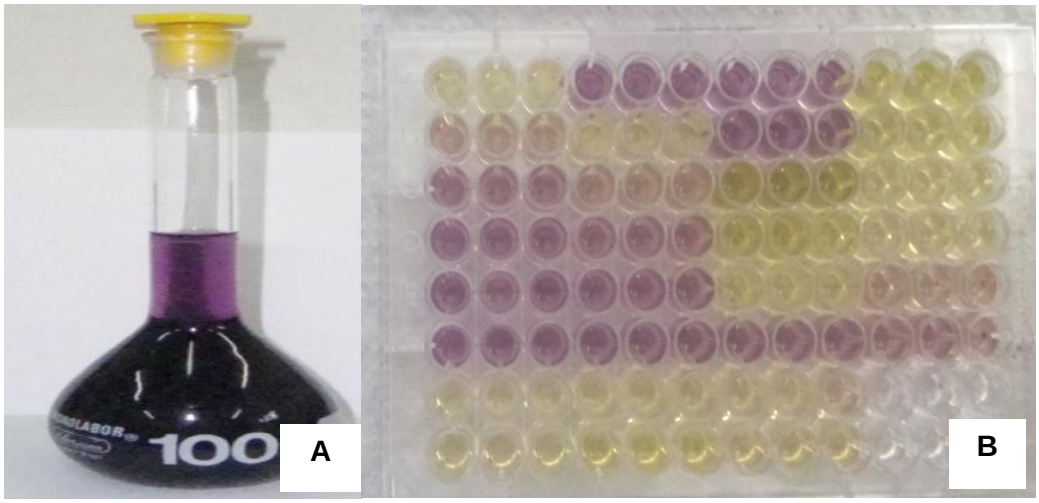


Figura 2: A- Solução diluída de DPPH, utilizada para realização do teste; B – Amostras durante a realização do teste. (IMAGEM: PAIXÃO, J.A,)

2.4. Teste de inibição da co-oxidação do β-caroteno

A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelo método da inibição da reação de co-oxidação do β-caroteno, provocada pela adição de ácido linoleico. Este método foi desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). 10 mg do β-caroteno foi dissolvido em 1 mL de $CHCl_3$, 10 mg de ácido linoléico e 0,4 mL de Tween 40, posteriormente submetida a completa evaporação do clorofórmio. Em seguida, então adicionados 100 mL de água destilada, agitando-se vigorosamente para obter aeração. Em seguida, 20 µL das amostras (10mg/ml) foram adicionadas aos micropoços contendo 250 µL da emulsão β-caroteno/ ácido linoleico, sendo a

reação acompanhada por espectrofotômetro em comprimento de onda 470 nm, com leitura imediata e a cada 10 minutos, durante 120 minutos, incubando as cubetas a 50°C. As análises foram realizadas em triplicata, empregando-se propilgalato como padrão positivo, acompanhada por branco empregando-se etanol. A capacidade antioxidante foi expressa por percentual de inibição através do decaimento da absorbância, medido em relação ao controle. A atividade antioxidante (AA) foi calculada através da seguinte equação 2:

Equação 2: $AA = 100\ [1- (A_0 – A_t) / (A_0^0 – A_t^0)]$

Onde:

A_0 = Absorbância inicial da amostra

A_t = Absorbância final da amostra

A_0^0 = Absorbância inicial do branco

A_t^0 = Absorbância final do branco

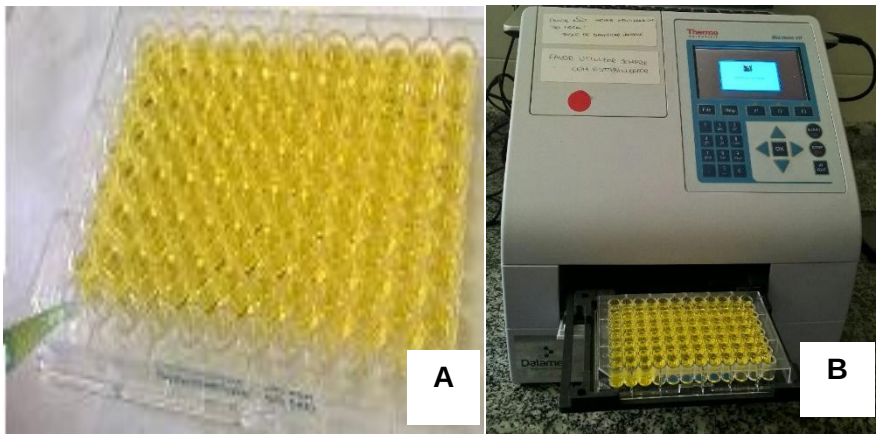


Figura 3: A- Microplaca sendo preenchida com solução oxidante; B- Leitura em espectrofotômetro. (IMAGEM: PAIXÃO, J.A,)

2.5. Avaliação da atividade inibitória da acetil-colinesterase (iAChE)

O teste foi realizado pelo método de Ellmann, 1961; Marston, 1991; Marston, 2002 e Lima, 2009. De acordo com o método a aceticolinesterase bovina (AchE), iodeto de acetilcolina e ácido 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoico] (DTNB), foram usados para verificar a atividade inibitória da enzima conforme descrito. O sistema, contendo

tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7, DTNB 0,1 mM, AChE (0,22 U) e as amostras-teste em concentração de 1000 µg/mL, foram incubados por 15 min a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de iodeto de acetilcolina. A hidrólise de acetiltiocolina foi monitorada no comprimento de onda 405 nm após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, através da formação do 5-tio-2-nitrobenzoato (cor amarela), resultante da reação do DTNB com a tiocolina, liberada pela hidrólise enzimática da acetiltiocolina. A figura 3 mostra o preparo dos reagentes e a placa de 96 poços empregada para realizar o ensaio com as amostras, foram realizadas quatro repetições por amostra.

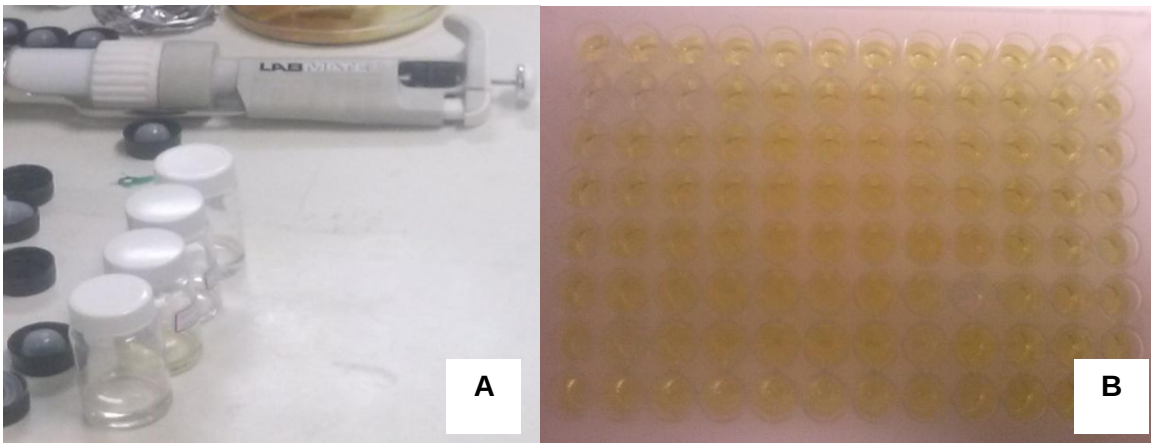


Figura 4: A- Preparo dos reagentes e diluição de amostras; B- Placa de 96 poços utilizada durante o teste para verificação da atividade anticolinesterásica. (IMAGEM: PAIXÃO, J.A,)

3. RESULTADOS

Os rendimentos em porcentagem massa/massa de cada extrato bruto variaram entre 5,4% até 9,3%, seguem abaixo na Tabela 2:

Tabela 2: Rendimento dos extratos brutos dos de abacaxizeiros em porcentagem

Amostras	Rend	Amostras	Rend	Amostras	Rend	Amostras	Rend	Amostras	Rend
BAG -820	7,4	6-81	8,1	BAG -324	8,3	BAG -HE	6,8	BAG -376	8,1
BAG -739	6,75	7-82	8,2	BAG –HG	9,3	BAG -45	8,2		

BAG -804	8,2	8-83	5,4	BAG -737	9,3	BAG -17	8,1
BAG -197	8,2	9-25	8,1	BAG -01	9,0	BAG -126	8,2
BAG -HF	8,1	10-385	8,2	BAG -16	8,2	BAG -419	8,1

3.1. Teste de citotoxidade: Letalidade frente à Artemia salina

Os dados na tabela 3, mostram os potenciais de toxidade dos extratos brutos das 21 amostras frente à *Artemia salina*. Os resultados variaram de 10 a 100% de letalidade. Sendo os acessos BGA-197, BAG- 739 e BGA-324 apresentaram valor máximo de letalidade (100%). Outros genótipos também apresentaram valores interessantes, variando de 96,7% a 63,3%. Dentre os genótipos que apresentaram alta atividade, apenas o BGA- 16 ou Roxo de Tefé (*Ananas comosus* var*. comosus*) que exibiu atividade de 96,7%, pode ser utilizado na alimentação (CARVALHO et. al., 2009).

Tabela 3: Resultados de letalidade frente à *Artemia salina*, sequestro do radical DPPH e inibição da auto-oxidação do β-caroteno.

Amostras	**% Letalidade± SD**	**%SRL± SD**	**%Inibição± SD**
	500µg/ml	500µg/ml	10.000µg/ml
BGA-25	93.3±10.0	89.8±0.26	40.91±0.820
BGA-385	30.0±7.07	51.2±0.45	43.36±0.1540
BGA-324	100.0±0	100.0±1.06	29.58±0.137
BGA-739	100.0±0	71.2±0.96	33.3±0.219
BGA-804	63.3±5.77	100.0±0.5	47.35±0.093

BGA-820	65.0±5.77	96.8±0.46	45.06±0.291
BGA-81	23.0±5.77	62.1±0.73	31.2±0.233
BGA-82	96.7±0	84.1±0.45	45.75±0.31
BGA-83	16.7±5.77	76.2±1.10	37.45±0.093
BGA-01	26.7±5.77	100.0±1.0	23.3±0.616
BGA-16	96.7±5.77	100.0±0.64	57.52±0.333
BGA-737	16.7±5.77	98.2±0.90	34.34±0.281
BGA-126	63.3±15.27	60.1±0.45	28.77±0.143
BGA-376	86.7±15.27	39.7±0.68	27.51±0.093
BGA-17	76.7±15.27	47.9±0.75	49.8±0.233
BGA-45	46.7±14.14	77.9±1.12	43.45±0.075
BGA-419	10.0±5.77	100.0±1.52	21.69±0.040
BGA-197	100.0±0	94.0±0.57	45.42±0.266
BGA-HF	56.7±5.77	100.0±1.0	31.61±0.883
BGA-HG	56.7±11.54	93.5±0.90	45.39±0.425
BGA-HE	93.3±11.54	71.3±1.86	43.06±0.094
Padrão	-------	100.0±0.01	87.31±0.0014

3.2. Atividade Antioxidante (AA): Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Os resultados do sequestro do radical DPPH para as amostras estão expressos na tabela 3. Seis extratos dos acessos analisados apresentaram %SRL comparável ao controle positivo utilizado (BHT), que apresentou 100% de atividade.

Neste ensaio DPPH, as %SRL variaram de 39,7% para o extrato que obteve o menor índice e 100% para os maiores, sendo que 18 genótipos dos 21 apresentaram altos níveis de sequestro de DPPH, acima de 60% e apenas três extratos obtiveram níveis abaixo de 50%. Dentre os acessos que exibiram 100% de sequestro, temos o BGA- 01 (*Ananas comosus* var. *comosus*), conhecido como Pérola, uma variedade importante e a mais utilizada como alimento no país (CARVALHO et. al., 2009).

3.3. Atividade Antioxidante (AA): Teste de inibição da co-oxidação do β-caroteno

Os resultados da atividade antioxidante das amostras avaliadas foram expressos como percentual de inibição da oxidação (tabela 3) e é possível verificar que as amostras apresentam potencial antioxidante.

De acordo com a tabela 3 é possível observar a variação das amostras, sendo que o BGA-419 21,69%, apresentou menor percentual de inibição e BGA-16 57,52% apresentou maior percentual, porém nenhum deles comparados ao padrão propilgalato 87,31%.

3.4. Avaliação da atividade inibitória da acetil-colinesterase

Na avaliação da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, foram utilizados os 21 extratos brutos de *Ananas* o registro foi realizado partir do minuto 10, a cada 10 minutos e finalizado em 60 minutos, com o intuito de verificar o decaimento da inibição, esses resultados são verificados em porcentagem de inibição na tabela 4.

Tabela 4: Variação em porcentagem da atividade anticolinesterásica dos 21 extratos dos acessos do BGA-Abacaxi.

Amostras	T=10min	T=20min	T=30min	T=40min	T=50min	T=60min

BRANCO	0	0	0	0	0	0
ESERINA	81.49	85.10	88.34	92.61	93.24	91.97
BGA 25	45.16	36.01	24.76	20.75	18.70	20.30
BGA 385	57.89	48.70	38.73	31.16	28.87	29.99
BGA 324	53.99	43.52	34.20	32.19	34.19	32.34
BGA 739	64.68	52.46	39.88	29.17	26.21	27.06
BGA 804	67.57	60.23	50.38	42.29	40.41	41.11
BGA 820	53.99	43.65	26.88	22.49	20.20	21.50
BGA 81	51.44	39.89	39.88	39.98	33.51	32.91
BGA 82	44.99	31.99	31.98	21.78	20,00	25.23
BGA 83	43.46	30.31	29.09	27.50	32.83	23.39
BGA 01	42.61	29.66	25.91	22.33	21.29	18.69
BGA 16	59.42	46.89	39.02	27.90	24.91	25.40
BGA 737	73.00	57.25	44.22	37.84	40.89	32.17
BGA 126	54.49	39.25	40.85	27.26	27.37	25.28
BGA 376	77.07	61.53	51.25	50.79	39.04	35.89
BGA 17	33.45	22.28	24.66	17.48	13.04	15.14
BGA 45	56.88	42.36	39.69	35.05	30.37	31.19
BGA 419	68.76	57.64	53.08	44.67	39.45	38.30
BGA HF	45.33	36.66	36.32	36.72	36.65	34.46
BGA HG	69.78	57.38	52.89	43.322	40.14	40.31

BGA HE	62.65	58.55	59.34	62.00	62.25	57.63
BGA 197	53.82	40.93	37.572	36.41	35.63	38.88

Na tabela 4 é possível verificar que no minuto 10 apenas os acessos BGA-737 (73,00%), BGA- 376 (77,03%), BGA-419 (68,76%), Híbridos G (69,78%) e E (62,65%), apresentaram valores em porcentagens próximas ao padrão Eserina (81,49%). No entanto todos os acessos mostraram decréscimo de inibição com o passar do tempo, ao contrário do padrão Eserina que no minuto 60 apresentou a maior inibição (91,97%).

4. DISCUSSÃO

4.1. Teste de citotoxidade: Letalidade frente à Artemia salina

Este ensaio tem boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos, podendo ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos. Quanto menor o valor de CL_{50}, mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral (MCLAUGHLIN et al., 1998).

Em estudo realizado por Manetti et al. (2010), utilizando a *Bromelia antiacantha* Bertol., que pertence a família Bromeliaceae, mostrou que os extratos alcoólicos das folhas e frutos desta espécie exibiram atividade citotóxica avaliada por bioensaio de toxicidade sobre náuplios, com valores de DL_{50} variando cerca de 620 ug mL-1 e 360 ng mL-1 para extratos alcoólicos das folhas e frutos, respectivamente.

Já em estudo realizado por Fabri; Costa (2012) que investigou o potencial químico-terapêutico para as atividades citotóxica e antibacteriana de *B. antiacantha*, mostrou-se que o teste de citotoxicidade dos extratos e partições das folhas e frutos de *B. antiacantha* tiveram moderada toxicidade, sendo a partição diclorometano dos frutos a mais efetiva.

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* mostrou ser um teste rápido, de baixo custo e eficiente, requerendo uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favoreceu sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório, assim como o verificado por Siqueira et al. (1998).

Estes resultados revelam que os extratos testados apresentam compostos bioativos com possível atividade citotóxica, indicando a necessidade da realização de outros estudos para confirmar o seu potencial, bem como verificação de sua dose capaz de induzir 50% de letalidade.

4.2. Atividade Antioxidante (AA): Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Em avaliação da atividade antioxidante realizada por Fabri; Costa, (2012) com *B. antiacantha,* as propriedades antioxidantes dos extratos investigadas *in vitro* mediante o método de DPPH foram consideradas modestas, com aproximadamente 35% de inibição na concentração de 1000 µg mL^{-1}, concentração esta, maior do que a verificada no presente estudo.

Em outro estudo realizado por Melo et al., (2008), com o objetivo de verificar a capacidade antioxidante de diferentes frutas tropicais utilizando o método DPPH, foi possível observar que o extrato de laranja cravo, manga rosa, melão espanhol, melão japonês, melão orange flesh, pinha e abacaxi, apresentaram ação moderada entre 60-70% de sequestro do radical DPPH.

Hossain; Rahman, (2011), avaliando os fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos frutos de abacaxi, verificaram que a atividade antioxidante do extrato, está de acordo com a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato do fruto de *Ananas comosus* que é rico em compostos fenólicos o que proporciona uma boa fonte de antioxidante.

Os resultados demostraram que os acessos cultivados BGA-737 (Gomo de mel), BGA-16 (Roxo de Tefé) e BGA- 01 (Pérola) que são utilizados como alimento apresentaram 100% de SRL, demonstrando seu potencial antioxidante. Além de revelarem que os extratos testados apresentam substâncias bioativas com atividades antioxidantes, indicando a necessidade da realização de outros estudos para confirmar o potencial e estabelecimento da segurança do uso, bem como a identificação das substâncias ativas.

4.3. Atividade Antioxidante (AA): Teste de inibição da co-oxidação do β-caroteno

Neste ensaio é verificado o potencial antioxidante da substância teste, através da capacidade em inibir a autoxidação β-caroteno pelo radical livre gerado na peroxidação do ácido linoleico (DUARTE; ALMEIDA, 2006).

Em avaliação da atividade antioxidante, utilizando a técnica de oxidação do β-caroteno, utilizando resíduos de frutas, realizada por Infante et. al. (2013), foi encontrado valor modesto para o resíduo de abacaxi 47,66%, valor este próximo aos encontrados no teste para as folhas de *Ananas*.

Já em estudo realizado por Santana et. al. (2012), utilizando folhas de uma espécie da mesma família *Encholirium spectabile* nos extratos de diferentes polaridades, foram encontrados valores entre 28,95% e 64,81% para os extratos etanólico e hexânico respectivamente, valores estes próximos aos do estudo.

Apesar de modestos os dados mostram que existe a presença de substancias ativas que conferem atividade antioxidante aos extratos estudados.

4.4. Avaliação da atividade inibitória da acetil-colinesterase

De acordo com o teste os acessos BGA-737 (73,00%), BGA- 376 (77,03%), BGA-419 (68,76%) e Híbridos G (69,78%) e E (62,65%) apresentaram elevada atividade anticolinesterásica se comparada ao estudo realizado por Vinhuta et al. (2007), em que foram investigadas a atividade anticolinesterásica de 37 plantas medicinais indianas, no qual, de acordo autor foram considerados extratos com potente atividade os que apresentaram inibição > 50%, inibição moderada entre 30-50% e os inativos ou baixa atividade aqueles que apresentaram inibição <30%. No entanto apenas o Híbrido E apresentou valores acima de 50% após o tempo de 60 minutos, sendo o acesso de maior estabilidade da inibição da enzima. Em estudo realizado por Lee, (2010) utilizando diferentes extratos do fruto de *Ananas comosus,* apenas o extrato aquoso apresentou inibição de 4,3%, baixa se avaliada segundo Vinhuta et al. (2007) e em comparação com os dados encontrados neste trabalho.

No trabalho realizado por Barbosa Filho et al. (2006), foram levantadas 309 plantas e 260 substâncias isoladas de plantas, foi verificado que a maior parte dos extratos de plantas apresentaram atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, podendo assim ser considerada para estudos frente ao tratamento de DA. A maioria das substâncias que tiveram atividades como inibidores da acetilcolinesterase são conhecidas por possuírem nitrogênio, dessa maneira esses extratos geraram atividade devido ao seu rico teor em alcaloides que mostram boa atividade inibidora contra a enzima.

Em trabalho realizado pelo grupo de pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, foi verificado por triagem química dos 21 acessos coletados no BGA-Abacaxi da EMBRAPA, que 17 deles apresentam reação positiva para pelo menos um dos testes para alcaloides, o que torna tais acessos promissores para a pesquisa de inibidores da colinesterase.

5. CONCLUSÕES

Os resultados observados neste trabalho motivam a continuidade de novos estudos relacionados ao fracionamento cromatográfico e avaliação biológica, considerando as classes de metabólitos identificados. Além disso, os dados indicam que os

extratos dos acessos estudados contêm constituintes ativos que apresentam atividades CTx, iAChE e AAs confirmando seu potencial farmacológico.

Além disso, este trabalho tem grande relevância devido à falta de estudos que usem este material conservado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, e dessa forma os impactos gerados podem agregar valor aos espécimes. Dessa maneira, fica evidente a necessidade do prosseguimento deste estudo para a realização das atividades biológicas das partições dos extratos mais promissores, a fim de verificar as DL_{50}% em cada um dos testes, bem como de isolamentos e caracterização de substâncias.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, JE, GOETZ, CM, MCLAUGHLIN, JL, SUFFNESS, M. A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**. v. 2, p. 107-111, 1991.

BARBOSA FILHO, J.M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.258-85, 2006.

CARVALHO, A.C.P.P.; PINHEIRO, M.V.M.; DIAS, G.M.G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira. v.** 27, p. 103-108, 2009.

DE LÚCIA, R. D. Org. **Farmacologia integrada.** Uso Racional de Medicamentos V. I, 5. Ed São Paulo: Clube de Autores. 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES VJR., FEATHERSTONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, p. 88-95, 1961.

FABRI, L. R.; COSTA, J. A. B. M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia antiacantha* bertol. **Revista eletrônica de farmácia.** v.9, n.2, 2012.

FRIAS, U. A.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI J. A. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales,** v.16, n. 1, 60-71, 2011

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante emutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas. 2005, 79 p.

GILMAN, A. G GOODMAN*;* **As bases farmacológicas da terapêutica***.* 10 ed., McGraw-Hill, 2005*.*

HIDALGO, ME, FERNÁNDEZ, E, QUILHOT, W, LISSI, E. Antioxidant Activity of Depsides and Depisidones. **Phytochemistry**. v.37, p. 1585-87, 1994.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. S. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**. v.44. Bangladesh, 2011.

INFANTE, J. SELANI, M. M. TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduosagroindustriais de frutas

tropicais. **Alimentos e Nutrição - Brazilian. Journal of Food and Nutrition.**, Araraquara v. 24, n. 1, p. 87-91, jan./mar. 2013.

LEE, E. N., SONG, J. H.; LEE, J. S. Screening of a Potent Antidementia Acetylcholinesterase Inhibitor-containing Fruits and Optimal Extraction Conditions. **Korean Journal Food e Nutrition.** v. 23. n. 3, p.318-323, 2010.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.

LIMA, M. M. C, LÓPEZ, J. A, DAVID, J. M, SILVA, E. P., GIULIETTI, AM, QUEIROZ, LP DE, DAVID, JP. Acetylcholinesterase Activity of Alkaloids from the Leaves of *Waltheria brachypetala.* **Planta Médica**. v.75, p. 335-337, 2009.

LUTHER H.E. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials**. 13 ed. Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens. 2012.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.** v.12 no.4 Botucatu Oct./Dec. 2010.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARSTON A, KISSLING, J, HOSTETTMANN K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 51-54, 2002.

MELO, E. DE A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA V. L. A. G.; NASCIMENTO R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MEYER, B. N; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E; JACOBSEN, L. B; NICHOLS, D. E.; McLaughlin, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Medicinal Plant Research**. v.45, p.31-34, 1982.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.48, p. 91-92, 1971.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from1981 to 2010. **Natural Products Branch**, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer. 2012.

PETRONILLHO E. C., PINTO, A. C. E; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase : Alzheimer e guerra química **Revista Militar de Ciência e Tecnólogia.** v. 28, 2011.

SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. 1 ed: ULBRA, Canoas, 2004. 200p.

SANTANA, C. R. R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G.; ARAÚJO, C. S.; SOUZA, G. R.; SARAIVA, S.R. G. L.; GUIMARÃES, A. L..; OLIVEIRA, A. P.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; PACHECO, A. G. M.; ALMEIDA, J R. G. S. Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae). **International Journal of Sciences.** 2012.

SASIDHARAN, Y. C.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts**. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines.** v.8, n.1, p. 1-10. 2011.

SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: A revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, 1996.

SIQUEIRA JM, Bomm MD, PEREIRA NFG, GARCEZ WS, Boaventura MAD. Estudo Fitoquímico de Unonopsis lindmanii –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v.21, 1998.

SUGIYAMA, K-I., IZAWA, S., INOUE, Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry***,* v. 275, p. 15535-15540, 2000.

VIEGAS Jr., C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v.27, n.4, p.655-60, 2004.

VINUTHA B. PRASHANTH D., SALMA K.; SREEJA S.L.; PRATITI D.; PADMAJA R.; RADHIKA S.; AMIT A.; VENKATESHWARLU K.; DEEPAK M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.109 p.359-363. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dementia:** a public health priority*.* World Health Organization, 2012.

CAPITULO III

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* E TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS EM ABACAXIZEIROS

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* E TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS EM ABACAXIZEIROS

Juliana Azevedo da Paixão[1]; Diego Mota da Costa; Danielle Figuerêdo da Silva[2]; Jessica Lima de Souza[2];; José Fernando Araújo Neto[3]; Everton Hilo de Souza[4]; Fernanda Vidigal de Souza[4]; Juceni Pereira de Lima David[3]; Hugo Neves Brandão[2]*

[1.] Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: juli.azevedo87@gmail.com

[2.] Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: danyfigs@hotmail.com, jessica_uefs2011@hotmail.com, diegocost@live.com, hugo@uefs.com

[3.] Departamento do Medicamento, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, 40170-115, Salvador. jfernandoaraujo@hotmail.com, juceni@gmail.com

[4.] Embrapa, Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n/ Chapadinha, Cruz das Almas, Bahia,Brasil, e-mail: hilosouza@gmail.com, fernanda.souza@embrapa.br

*e-mail de correspondência: hugo@uefs.com

RESUMO

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas – Bahia, conta com um Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros (BGA Abacaxi) sendo o de maior representatividade do gênero no mundo. Atualmente tem aumentado suas variedades, principalmente para o mercado externo. Sabendo do uso popular de espécies de Bromeliaceae, a caracterização química e biológica dos acessos pode resultar em uma nova aplicação para os genótipos cultivados. Assim, o presente trabalho objetivou comparar as atividades *in vitro* de três acessos e um híbrido, bem como determinar o teor de fenólicos e flavonoides totais. Para isso, foram realizados os testes do sequestro do radical livre *2,2-difenil-1-picril-hidrazila (*DPPH) e de letalidade frente à *Artemia salina,* teste de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de fenólicos totais e de complexação do cloreto de alumínio para flavonoides totais. Os extratos clorofórmio e acetato de etila do acesso BGA-804 foram os mais promissores quanto às atividades, também apresentando altos teores de fenólicos e flavonoides totais. Apesar dos acessos estarem sujeitos ao mesmo ambiente de cultivo, apresentaram diferentes atividades e composição química, o que pode ser justificado pela variabilidade genética. Os genótipos mostraram interessante composição química e atividades biológicas, no entanto faz-se necessário a realização de outros estudos para confirmar o seu potencial farmacológico e

estabelecimento da segurança do uso, bem como a identificação das substâncias ativas.

Palavras-chave: Bromeliaceae, *Artemia salina*, DPPH, Genótipos, Fenólicos.

ABSTRACT

Embrapa Cassava e Fruit, located in Cruz das Almas – Bahia - Brazil, has an Active Germplasm Bank of Pineapple (in portuguese:abacaxi) being the most representative of its kind in the world. Recently, varieties have increased, mostly in part for the export market. Knowing the popular use of Bromeliaceae, chemical and biological characterization of the accession could result in a new application for the genotypes cultivated. Thus, this study aimed to compare the activities *in vitro* of three accessions and a hybrid as well as determine the phenolic content and total flavonoids. For this purpose, free radical scavenging test was performed using 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila (DPPH) and *Artemia salina* lethality, Folin-Ciocalteu assay was used for determination of total phenolic content and complexation of aluminum chloride to the total flavonoids. The chloroform and ethyl acetate extracts of the BGA-804 accession was the most promising related to the activities, also featuring high phenolic content and total flavonoids. Although the accession are subject to the same environmental growing, they showed different activities and chemical composition, which can be explained by the genetic variability. The genotypes showed interesting chemical composition and biological activities, however it is necessary to carry out further studies to confirm its pharmacological potential and the establishment of safe use as well as the identification of active substances.

Keywords: Bromeliaceae, *Artemia salina*, DPPH, Genotypes, Phenolics.

1. INTRODUCÃO

Entre os anos de 1981 e 2010 metade dos medicamentos foram provenientes de produtos naturais ou derivados, sendo em sua maioria anticancerígenos, anti-infecciosos, antivirais e antibacterianos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre os produtos naturais utilizados destacam-se os vegetais, cujo estudo tem como fatores primordiais a caracterização química atrelada aos ensaios biológicos. No entanto, apesar do grande aumento de pesquisas nesta área, as plantas continuam subutilizadas. O Brasil é detentor de imensa diversidade genética em espécies vegetais, porém, menos de 10 % foram avaliadas quanto as suas características biológicas e, menos de 5 % foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (KALT; COCK, 2014; LUCCHESE, 2006; GUERRA; NODARI, 2007).

O Brasil é o centro de origem e dispersão da família Bromeliaceae, abriga cerca de 40 % do total destas espécies (FORZZA, 2005; SOUZA, et. al., 2007). A família Bromeliaceae inclui aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies (LUTHER, 2012), a espécie mais conhecida é o *Ananas comosus* que possui ampla utilidade e importância econômica, que vão desde a alimentação humana e animal, uso ornamental, uso de fibras na indústria a propriedades biológicas (MANETTI, 2009; SOUZA et. al. 2012; SENA et. al. 2013, 2015).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros (BAG Abacaxi), com mais de 600 acessos do gênero *Ananas* e outras Bromeliaceae. O Banco foi estabelecido há quase três décadas mediante coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional (SOUZA, et. al., 2007; MACHADO, et. al., 2009; SOUZA, et. al., 2012).

Comumente, algumas das plantas desta família são utilizadas para tratamento de diversas afecções: bronquites, aftas, tosses e inflamações. Além de existirem relatos da presença de metabólitos secundários já identificados: triterpenoides, flavonoides, esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos, ligninas, alcaloides, entre outros com importantes atividades biológicas, sendo de grande valor para

indústria farmacêutica e cosmética (MANETTI et. al., 2009; BENNETT; WALLSGROVE, 1994; HARVEY, 2000).

A variabilidade genética do gênero conservado nesse banco tem sido alvo de diversos estudos, visando ampliar e diversificar o uso dos acessos conservados (SOUZA et. al. 2012; SENA et. al. 2013, 2015). Os estudos fitoquímicos existentes com abacaxi são restritos, de forma geral, aos genótipos cultivados, já que poucas instituições de pesquisa têm acesso à outros materiais do gênero.

Dessa forma a caracterização de genótipos pertencentes a diferentes variedades botânicas é um passo fundamental para identificar o potencial para desenvolvimento de alternativas terapêuticas medicamentosas e dar uma nova aplicação para o germoplasma conservado, agregando valor à coleção. Vale ressaltar que o fato do abacaxi ser uma fruta nativa, os resultados deste trabalho valorizam espécies da nossa biodiversidade para uso medicinal.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo comparar as atividades biológicas *in vitro*, bem como quantificar o conteúdo de flavonoides e fenólicos totais das folhas de três acessos do BAG Abacaxi e um híbrido do programa de melhoramento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação

Folhas maduras de três acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BGA 739, BGA 804 e BGA 820, *A. comosus* var. erectifolius) e um híbrido (HIB-E, *A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*), tabela 1, do Programa de Melhoramento Genético de Abacaxizeiros foram coletadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, no período de janeiro de 2015. As plantas estavam mantidas em condições de campo com os tratos culturais recomendados para a cultura.

Tabela 1. Acessos de abacaxizeiros utilizados.

Código	Nome do acesso	Variedade botânica
BGA-739	Curauá Roxo	*A. comosus* var. *erectifolius*
BGA-804	FFR-1387	*A. comosus* var. *erectifolius*
BGA-820	FRF-1240	*A. comosus* var. *erectifolius*
HIB-E	Híbrido E	*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*

2.2 Preparo das amostras

As folhas foram coletadas, secas em estufa à 40 ^{0}C, moídas e submetidas ao procedimento de extração por maceração com metanol com troca de solvente a cada 3 dias, por 5 vezes. O extrato bruto obtido foi submetido a sucessivas partições entre Hexano:MeOH/H_2O, $CHCl_3$:MeOH/H_2O e AcOEt:H_2O. O que originou as seguintes partições em Acetato de Etila, Clorofórmio e Hexano (739 ACT, 739 CL, 739 HEX, 804 ACT, 804 CL, 804 HEX, 820 ACT, 820 CL, 820 HEX, HIB-E ACT, HIB-E CL, HIB-E HEX).

2.3 Quantificação de fenólicos e flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi realizado empregando-se o método espectrofotométrico, utilizando como reagente cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (POTHITIRAT, et. al., 2009).

O padrão utilizado foi a quercetina, sendo preparadas soluções com concentrações diferentes para realização da curva de calibração. Para o preparo das amostras, pesou-se, aproximadamente, 10 mg dos extratos, que foram dissolvidos em 20 mL de metanol. Foi preparada também uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%. Para o teste, adicionou-se 150 µL da amostra ou padrão a 150 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio. Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro Multiskan GO 3.2 em λ = 415 nm. Para o controle, procedeu-se da mesma forma que as demais amostras, no entanto foi

adicionado metanol no lugar da amostra. Os resultados foram expressos em µg de quercetina equivalente (EQ).100 g^{-1} de extrato.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada utilizando o método de Folin Ciocalteu, com algumas modificações (OLIVEIRA, 2009). Uma alíquota de 100 µL de cada extrato foi misturado com 500 µL de reagente de Folin Ciocalteu e 6 mL de água destilada. Após 60 s, 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura e agitadas novamente durante 30 s. Finalmente, o volume foi ajustado para 10 mL com água destilada. As amostras foram mantidas no escuro durante 2 h. Após este período, as absorbâncias foram verificadas em espectrofotômetro Multiskan GO 3.2 em λ = 750 nm, utilizando-se como branco uma solução contendo todos os reagentes e metanol substituindo as amostras. O conteúdo fenólico total foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração linear construída com ácido gálico padrão. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes em ácido gálico (EAG).100 g^{-1} de extrato.

2.4 Teste de Letalidade frente à Artemia salina

O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi realizado para verificar o potencial tóxico (SERRANO, 1996). Os *nauplii* recém-eclodidos foram colocados em contato com as partições em hexano, acetato de etila e clorofórmio dos quatro extratos brutos dos genótipos: BGA-820, BGA-739, BGA-804 e HIB-E, em dez concentrações diferentes (31.25 a 500.00 $\mu g.mL^{-1}$), e incubados por 24 horas. Após esse período foram contados os *nauplii* sobreviventes. Os *nauplii* foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação.

2.5 Determinação do sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O sequestro do radical DPPH foi determinado pela metodologia de Hidalgo, (1994) em concentrações diferentes (15.6 a 5000.0 $\mu g.mL^{-1}$), através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH. As determinações da atividade antioxidante foram realizadas adicionando-se a cada cubeta 250 µL da solução de DPPH (40 mg. mL^{-1}), 50 µL de metanol para o controle, 50 µL de BHT para o padrão e 50 µL das amostras. As leituras das absorbâncias

foram realizadas no minuto inicial e após 30 minutos de reação em espectrofotômetro com incubação a 25 ºC em ambiente escuro. As análises foram realizadas em espectrofotômetro Multiskan GO 3.2 em λ = 515 nm.

O decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte equação 1: %SRL= (Ac - Aam / Ac) x 100 (LIMA, 2006).

2.6 *Atividade anticolinesterásica*

O teste foi realizado pelo método de (ELLMANN, 1961; MARSTON, 2002). De acordo com o método a Aceticolinesterase bovina (AchE), iodeto de acetilcolina e ácido 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoico] (DTNB) foram usados para verificar a atividade inibitória da enzima conforme descrito. O sistema, contendo tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7, DTNB 0,1 mM, AChE (0,22 U) e as amostras-teste em concentração de 1000 µg/mL, foi incubado por 15 min a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de iodeto de acetiltiocolina. A hidrólise de acetiltiocolina foi monitorada no comprimento de onda 405 nm após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, através da formação do 5-tio-2-nitrobenzoato (cor amarela), resultante da reação do DTNB com a tiocolina, liberada pela hidrólise enzimática da acetiltiocolina.

2.7 Análise estatística

Todas os ensaios foram em triplicatas. Os dados deste estudo foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Bioestat e Microsoft Excel 2010, as curvas para análise do teor de fenólicos e flavonoides foram respectivamente, $y = 0{,}0194x + 0{,}0144$, com $R^2 = 0{,}9969$ e $y = 0{,}0447x - 0{,}104$, com $R^2 = 0{,}9987$. Utilizou-se a regressão linear para os cálculos de LC_{50} e EC_{50}, sendo considerados valores de $R^2 \geq 0{,}9$ para os testes de letalidade frente a *A. salina* e $R^2 \geq 0{,}99$ para as quantificações e atividade antioxidante. Os resultados da análise

são apresentados como LC_{50} e EC_{50} ± desvio padrão e para anticolinesterase estão representadas em percentagem ± desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Quantificação de fenólicos e flavonoides totais

O teor de fenólicos totais dos extratos obtidos utilizando o método de Folin Ciocalteau nos extratos variou entre 2,83 g EAG.100g^{-1} de extrato para HIB-E HEX e 10,26 g EAG.100g^{-1} de extrato para 820 CL, enquanto que o teor de flavonoides totais variou entre 0,972 g QE. 100g^{-1} de extrato para 820 CL e 3,14 g QE.100g^{-1} de extrato para 739 CL (Tabela 2).

Tabela 2: Total fenolicos em g equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato, total Flavonoides em g de quercetina (EQ) por 100 g de extrato das, letalidade frente *Artemia salina* em LC_{50} e atividade antioxidante em EC_{50} partições dos extratos brutos BGA 739, 804, 820 e HE , acompanhada do desvio padrão.

Amostras	gEAG.100g^{-1}±SD	gQE.100g^{-1}±SD	LC_{50}(µg.mL^{-1})±SD	EC_{50} (µg.mL^{-1}) ± SD
739 ACT	8,95 ± 0,022	1,77± 0,029	366 ± 5.12^{b}	221,4± 0,918^{ab}
739 CL	7,34± 0,042	3,14± 0,016	487 ± 4.08^{e}	228,4± 0,380^{ab}
739 HEX	4,91± 0,010	2,27± 0,039	459 ± 5.45^{d}	3813,0± 0,869^{g}
804 ACT	6,94± 0,27	1,43± 0,054	87,7 ± 0.49^{a}	192,5± 0,193^{a}
804 Cl	6,00± 0,18	1,37± 0,029	69,3 ± 0.47^{a}	203,5± 0,528^{ab}
804 HEX	3,71± 0,32	1,48± 0,020	413,8 ± 3.20^{c}	3.004,8± 2,471^{f}
820 ACT	8,48± 0,013	1,23± 0,078	382,6 ± 1,40^{b}	514,8± 0,490^{c}
820 Cl	10,26± 0,100	0,97± 0,009	867,8 ± 3,90^{g}	283,4± 0,290^{b}
820 HEX	4,18± 0,038	1,19± 0,024	811,9 ± 5,78^{f}	2.624,9± 1,233^{e}
HIB-E ACT	6,05± 0,070	1,23± 0,014	944,7 ± 4.87^{h}	288,9± 0,370^{b}
HIB-E Cl	5,83± 0,011	1,30± 0,047	1.492,7 ± 5.63^{i}	762.3± 0,690^{d}
HIB-E HEX	2,83± 0,029	1,37± 0,013	818,8 ± 3.27^{g}	3.021,5± 1,052

LC_{50}- Concentração letal em µg.mL^{-1} capaz de matar 50% dos microcrustáceos.
EC_{50}- Concentração efetiva em µg.mL^{-1} capaz de sequestrar 50% do radical DPPH.
Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tukey (P <0,05).

3.2 Atividade de letalidade frente à A. salina e atividade antioxidante

Todos as partições em Acetato de Etila, Clorofórmio e Hexano, apresentaram atividade frente a *A. salina*, as porcentagens variaram entre 3,3% e 100,0% de letalidade frente aos *nauplii*. A avaliação da letalidade permitiu a obtenção de CL_{50} para as partições, utilizando as curvas lineares, os R^2 variaram de 0.9013 e 0.9904, sendo as partições Acetato de Etila e Clorofórmio do acesso BGA-804 as que apresentaram as menores CL_{50}, de 87.7 e 69.3 $\mu g.mL^{-1}$ respectivamente (Tabela 2).

A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi avaliada para identificar potenciais fontes de substâncias possivelmente úteis contra efeitos deletérios dos radicais livres. Todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante variando entre 3,0% até 100,0% de atividade, os R^2 foram entre 0.9908 até 0.9990. Na tabela 3, seguem as CE_{50}, sendo as menores apresentadas pelas partições Acetato de Etila e Clorofórmio do acesso BGA 804, 192,5 $\mu g\ mL^{-1}$ e 203,5 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente.

3.3 Atividade inibitória da AChE

Os resultados do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase (tabela 3), demostram a atividade de inibição nos primeiros 10 minutos de teste, os extratos apresentaram diferença significativa com relação ao padrão 95,18% (Eserina) utilizado. As partições 804 ACT 53,23%, HE ACT 53,97% e 820 ACT 66,38%, não apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si pelo Teste Tukey, $p<0,05$, sendo a partição 820 ACT a que apresentou melhor resultado.

Tabela 3. Atividade Anticolinesterásica das partições dos extratos brutos de BGA 739, 804, 820 e HE, nos primeiros 10 minutos de teste.

AMOSTRAS	VARIAÇÃO EM % ± SD
804 CL	24.023 ± 0.12 [a]
739 CL	27.253 ± 2.88 [a]
820 CL	38.200 ± 8.46 [a b]
739 HEX	40.060 ± 8.05 [a b]
804 HEX	40.737 ± 8.94 [a b]
820 HEX	41.167 ± 1.53 [a b]
HIB-E CL	42.010 ± 1.47 [a b]
HIB-E HEX	42.303 ± 0.62 [a b]
739 ACT	42.563 ± 1.05 [a b]
804 ACT	53.230 ± 4,44 [b c]
HIB-E ACT	53.973 ± 1.42 [b c]
820 ACT	66.38 ± 0.78 [c]
Eserina	95, 18 ± 0.89 [d]

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tukey (P <0,05).

4. DISCUSSÃO

Os extratos das folhas dos três acessos e do híbrido de abacaxi avaliados neste estudo apresentaram altos teores de compostos fenólicos e flavonoides, valores esses superiores aos relatados na literatura para outras partes da planta da cultura.

Em estudo realizado por Sousa e Lima, (2011) na determinação da concentração de compostos fenólicos de resíduos de polpa de fruta de abacaxi, os autores observaram valores de 0,0860 ±0,0145 g de EAG. 100 g^{-1} em extrato aquoso e 0,0911 ± 0,0099 g de EAG. 100 g^{-1} em extratos hidroalcóolico. Em contra partida Yuris e Siow, (2014) realizando o mesmo estudo em três cultivares de abacaxis, observaram valores bem superiores em torno de 0,30 ± 0,003 a 0,492 ± 0.4 g de EAG. 100 g^{-1} de frutos para o extrato metanólico a 70 %.

Na quantificação de flavonoides no purê do fruto de abacaxi, Chakraborty e col., (2015) encontraram valores para o teor de flavonoides totais igual a 0,0867 g QE. 100 g^{-1}. Já Hossain e Rahman, (2011) estudando três extratos (acetato de etila, metanol e água) do fruto de abacaxi, observaram que os teores de flavonoides variaram de 0,394 a 0,552 g QE.g^{-1} de peso, enquanto para fenólicos os valores variaram de 0,026 a 0,561g QE. g^{-1} de peso. Ainda neste mesmo estudo, os autores avaliando os fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos frutos de

abacaxi, verificaram que a extensão da atividade antioxidante do extrato, está de acordo com a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato da fruta de abacaxi que é rico nestes compostos, o que proporciona uma boa fonte de antioxidante.

A variação encontrada nos estudos pode ser justificada por diversos fatores, dentre eles, as partes da planta utilizadas, diferentes polaridades dos solventes usados nos estudos, bem como, suas condições ambientais, o que resulta na modificação dos constituintes da planta presentes nos extratos. No entanto, vale ressaltar que a maior probabilidade de encontrar esses compostos nas folhas, devido à função de proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim, a danificação dos tecidos mais internos pela radiação ultravioleta UV-B (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Não foram encontrados trabalhos utilizando folhas de abacaxizeiros, o que torna este estudo relevante.

À *A. salina* apresenta uma boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tumores sólidos humanos, apresenta também potencial antimicrobiano, parasiticida, tripanocida e antimalárico, bem como pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos. Quanto menor o valor de CL_{50}, mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, sugerindo maior potencial como antitumoral (MACLAUGHLIN; ROGERS, 1998). A toxicidade pode ser considerada baixa quando a CL_{50} é superior a 500 µg mL^{-1}; moderada para valores entre 100 a 500 µg mL^{-1} e elevada quando a CL_{50} é inferior a 100 µg mL^{-1} (AMARANTE, et. al., 2011). Na tabela 3 estão os valores de CL_{50} para as amostras estudadas, os extratos 804 ACT e 804 CL podem ser consideradas muito tóxicas, os demais apresentaram toxicidade baixa ou moderada.

Evangelista, (2012), verificou a atividade citotóxica da polpa e casca de *Ananas comosus,* as CL_{50} encontradas foram as seguintes, 25 µg mL^{-1} e 29,6 µg mL^{-1}**.** Em estudo realizado utilizando a *Bromelia antiacantha* Bertol., verificou-se que os extratos alcoólicos das folhas e frutos desta espécie exibiram atividade citotóxica com valores de CL_{50} variando entre 618,3 µg mL^{-1} e 275,9 µg mL^{-1} respectivamente

(MANETTI, 2010). Já em outro estudo utilizando os extratos e frações das folhas e frutos de *B. antiacantha* apresentaram toxicidade moderada a alta, variando 29,8; 53,9; 112,4 e 241,6 µg mL^{-1} para os diferentes extratos, sendo a fração diclorometano do fruto CL_{50} de 29,8 µg mL^{-1} a mais efetiva (FABRI; COSTA, 2012). Dessa maneira, os resultados deste estudo corroboram com estudos anteriores, devido a variação dos resultados utilizando espécies da mesma família e mostrando que os acessos silvestres apresentam atividade antioxidante.

A avaliação da atividade antioxidante expressa como CE_{50} na tabela 3, que corresponde à quantidade de extrato necessária para reduzir o radical DPPH em 50 %. Assim quanto menor o CE_{50}, melhor é a capacidade antioxidante do extrato. Dentre os genótipos estudados, o acesso BGA-804 foi o que apresentou os menores valores de CE_{50} para as frações acetato de etila e clorofórmio, o que pode ser justificado pelo alto teor de fenólicos totais presentes nessas amostras. Os compostos fenólicos possuem reconhecida atividade antioxidante devido às suas propriedades redutoras e estrutura química (HOSSAIN; RAHMAN, 2011), assim pode-se observar que os extratos que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos foram àqueles que tiveram atividade frente ao radical DPPH mais pronunciada.

Em estudo realizado por Sousa e Lima com o objetivo de verificar a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e hidroalcoólico de resíduos de polpas de abacaxi, utilizando o radical livre DPPH, encontraram CE_{50} variando de 7486,5 µg.mL^{-1} e 3293,92 µg.mL^{-1}, respectivamente (SOUZA; LIMA, 2011). Já na análise de folhas de diferentes espécies da família Bromeliaceae, Rocha encontrou os seguintes valores de CE_{50} para os extratos metanólicos de *A. comosus* var*. bracteatus* 64.24 µg mL^{-1}, *Neoregelia cruenta* (Graham) L.B.Sm. 109.08 µg mL^{-1}, *Pitcairnia flammea* Lindl. 160.32 µg mL^{-1} e *Alcantarea brasiliana* (L.B.Sm.) J.R.Grant 188.53µg mL^{-1} (ROCHA, et. al., 2010). Através desses estudos é possível correlacionar que assim como no teste de fenólicos totais, os melhores resultados de CE_{50} foram encontrados para folhas das espécies de Bromeliaceae, devido à presença de maior teor de substâncias que possam expressar essa atividade nesse órgão vegetal, o que

corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, nos quais, com exceção dos extratos hexânicos, que apresentam um menor perfil de fenólicos, os demais extratos apresentaram baixa CE_{50}.

Com relação a avaliação da inibição da enzima AChE de acordo com estudo realizado por Vinhuta et al. (2007), em que foram investigadas a atividade anticolinesterásica de 37 plantas medicinais indianas, no qual foram considerados extratos com potente atividade os que apresentaram inibição > 50%, inibição moderada entre 30-50% e os inativos ou baixa atividade aqueles que apresentaram inibição <30%. Dessa maneira, os resultados indicam que 16,6% das partições utilizadas no teste são inativas frente a colinesterase, 58,3% das partições apresentam inibição moderada, enquanto 25% apresentam potente atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Em estudo realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa, foi verificado o potencial de inibição dos extratos brutos frente a AChE. O aumento da inibição da AChE foi evidenciado após fracionamento em alguns extratos, indicando que a purificação resultou no aumento da concentração dos metabólitos com ação anticolinesterásica, a exemplo de terpenoides, fenólicos, cumarinas e alcalóides. Desta forma, a continuidade do fracionamento e realização do teste de Ellman proporcionará a identificação das frações mais ativas, bem como o isolamento e identificação das substâncias presentes nessas frações.

Os acessos estudados pertencem à mesma variedade botânica (*Ananas comosus* var. *erectifolius*), coletados em diferentes regiões do Brasil (SOUZA, 2012), exceto o Híbrido E (*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*), obtido através do cruzamento entre duas variedades, fruto do melhoramento genético. Após a clonagem dos acessos, estes encontram-se no mesmo campo experimental e nas mesmas condições de temperatura, luminosidade, umidade, precipitação, entre outros. Rezaeie e Uyanik, (2012) demonstram que a biossíntese da atividade das células cultivadas pode ser melhorada com a regulação dos fatores ambientais, além da possível seleção artificial ou a indução de cultivares que possuam a produção dos metabólitos desejados.

Dessa maneira, é possível verificar que muitos fatores podem influenciar as diferenças encontradas entre os acessos nas diferentes análises realizadas, tendo em vista que as espécies cultivadas são da mesma variação que foram ambientadas ao meio e melhoradas geneticamente. Apesar dos acessos de abacaxizeiros serem cultivados no mesmo local, os metabolitos secundários são fundamentalmente produzidos pelo processamento genético, dessa maneira, a variabilidade genética pode estar influenciando a produção de diferentes tipos de metabólitos, sendo assim, estes genótipos diferem entre si, por conta principalmente da expressão genética (SOUZA, 2012; DURVAL et. al., 2001).

De acordo com Duval et. al., (2001), Kato, (2004) e Souza et. al*.,* (2012) os acessos de abacaxizeiros apresentam grande variabilidade genética, apresentando altos níveis de mutação somática e elevadas variações em acessos selvagens, enquanto as variedades cultivadas apresentam-se mais homogêneas. Os mesmos autores verificando a similaridade genética de variações do gênero *Ananas,* incluindo as em questão *Ananas comosus* var. *erectifolius* e *Ananas comosus* var. *bracteatus,* identificaram que a maior diversidade genética encontrada foi entre as variações acima citadas, o que justifica os resultados encontrados neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que os genótipos de abacaxizeiros apresentam tanto a presença de compostos fenólicos, quanto flavonoides, bem como atividade de sequestro do radical livre DPPH. Sendo assim, esses acessos apresentam possível potencial antioxidante.

A média e alta letalidade dos extratos frente à *Artemia salina* também tornam esses genótipos fonte de interesse para futuros estudos, bem como para comprovação da toxicidade, fornecendo potenciais agentes citotóxicos.

O acesso BGA-804, partições Acetato de etila e Clorofórmio mostraram-se mais promissores quanto às atividades testadas, indicando a necessidade da realização

de outros estudos para confirmar o seu potencial farmacológico e estabelecimento da segurança do uso, bem como a identificação das substâncias ativas.

Este trabalho apresenta grande relevância, devido à falta de estudos usando o mesmo material conservado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, e desta forma os impactos gerados podem agregar valor aos espécimes, motivando outra aplicabilidade além dos fins ornamentais, permitindo o conhecimento, aperfeiçoamento e melhoramento da biodiversidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos as instituições: Universidade Estadual de Feira de Santana, Universidade Federal da Bahia, Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária, Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia e Coordenação de apoio à Pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **ACTA AMAZONICA**. v. 41, n.3 p. 431-434, 2011.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist.** v. 127, n. 72, p. 617-633,1994.

CHAKRABORTY S.; MISHRA R.; RAO P. S. Effect of combined high pressure–temperature treatments on color and nutritional quality attributes of pineapple (*Ananas comosus* L.) puree. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 28, 2015.

DURVAL, M. F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; FONTAINE, A.; HORRY, J. P. Ornamental pineapple: perspective from clonal and hybrid breeding. **Pineapple News**, Hawaii, n. 8, p. 13-14, 2001.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES VJR., FEATHERSTONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, p. 88-95, 1961.

EVANGELISTA, J.H., VERA, M.J. DE; GARCIA, R.S.; JOVEN, M.G.; NEROSA, M. J.A.; SOLIDUM, J.N. Preliminary Assessment of In vitro Anticoagulant Activity vs. Heparin 1,000I.U. and Cytotoxicity of Selected Philippine Medicinal Plants. **International Journal of Chemical and Environmental Engineering.** v.3, n.6. 2012.

ROCHA, F. D., MAMI YANO, CUNHA, R.M., FELIPE T. G., CORDEIRO R. S. B., MENEZES, F. S. Brazilian Bromeliaceae species: isolation of arylpropanoid acid derivatives and antiradical potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.20, n.2, Abr./Mai. 2010.

FABRI, L. R., COSTA, J. A. B. M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia antiacantha* bertol. **Revista eletrônica de farmácia.** v.9, n.2, 2012**.**

FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de Encholirium Mart. Ex Schult. E Shult. F. (Pitcairnioideae- Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade São Paulo**. v. 23, p. 1-49, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova**, v.30, p. 374-381, 2007.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS. 2007.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored naturalproducts. **Drug Discovery Today**, London, v. 5, p. 294-300, 2000.

HIDALGO, ME, FERNÁNDEZ, E, QUILHOT, W, LISSI, E. Antioxidant Activity of Depsides and Depisidones. **Phytochemistry**. v.37, p. 1585-87, 1994.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. S. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**. v.44. Bangladesh, 2011.

KALT FR, COCK IE. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of bioactive petalostigma extracts: Toxicity, antibacterial and antiviral activities. **Pharmacognosy Magazine.** v.10, (Suppl 1), p.37-49. 2014.

KATO, C. Y; NAGAI, C; MOORE, P. H; ZEE, F; KIM, M. S; STEIGER, D. L; MING, R. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p 815–825, 2004.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.

LUCCHESE, Angélica Maria; et al. Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, **IMSEAR** (Instituto do Milênio do Semi-árido), 2006.

LUTHER, H. E. **An Alphabetical list of Bromeliad binomials.** 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society international, 2012.

MACHADO, C. F.; SOUZA, F. V. D. CABRA, J. R. S.; SOUZA, E. H. Estado da arte do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**. Guarapari: SBMP, 2009.

MACLAUGHLIN JL, ROGERS LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal** v. 32, n.2, p.513-524. 1998.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) **Revista brasileira de plantas mededicinais de Botucatu.** v.12, n.4, 2010.

MARSTON A, KISSLING, J, HOSTETTMANN K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 51-54, 2002.

NEWMAN, DAVID J.; CRAGG, GORDON M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from1981 to 2010. **Natural Products Branch**, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer. 2010.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova***,* v. 32, p. 689-702, 2009.

POTHITIRAT, W. *et al.* Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 80, p. 442–447, 2009.

REZAEIE, H K. A. P.; UYANIK, B. G. Biotic and abiotic stresses mediated changes in secondary metabolites induction of medicinal plants. **Tibbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu**. Eylül. 2012.

SENA NETO, A. R; ARAÚJO, M. A. M; HAGE JR, E; MATTOSO, L. H. C; MARCONCINI , J. M. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fiber varieties for use in composites. **Industrial Crops and Products**. v. 43, n. 1. 2013.

SENA NETO, A. R; ARAÚJO, M. A. M; HAGE JR, E; MATTOSO, L. H. C; MARCONCINI , J. M. Curaua leaf fiber (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) reinforcing poly(lactic acid) biocomposites: Formulation and performance. **Polymer Composites**. v. 36, n 8. 2015.

SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: A revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, 1996.

SOUSA, M. S. B.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Technology**., Campinas, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SOUZA, E. H. ; SOUZA, F. V. D, ; CARVALHO C., M. A. P. ; COSTA, D. S. ; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P. ; SILVA LEDO, C. A. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 59, p. 1357-1376, 2012.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. de; SANTOS, O. S. N.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; FERREIRA, F. R.; SILVA, M. de J. da. Abacaxi ornamental: uma riqueza a ser explorada. **Abacaxi em Foco.** Cruz das Almas: Embrapa/Mandioca e Fruticultura Tropical, dez. 2007.

VINUTHA B. PRASHANTH D., SALMA K.; SREEJA S.L.; PRATITI D. , PADMAJA R.,RADHIKA S. , AMIT A., VENKATESHWARLU K. , DEEPAK M. . Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.109, p.359–363. 2007.

YURIS, A. A.; SIOW, L. F. Comparative Study of the Antioxidant Properties of Three Pineapple (*Ananas comosus* L.) Varieties. **Journal of Food Studies**. v. 3, n. 1. 2014.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE *Ananas comosus* var *erectifolius* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FITOESTEROL DAUCOSTEROL

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE *Ananas comosus* var *erectifolius* POR CROMATOGRAFIA À LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO FITOESTEROL DAUCOSTEROL.

Juliana Azevedo da Paixão[1]; Diego Mota da Costa[2]; Jessica Lima de Souza[2]; José Luiz Carneiro da Rocha[2];; José Fernando Araújo Neto[3]; Everton Hilo de Souza[4]; Fernanda Vidigal de Souza[4;] Clayton Queiroz Alves[5]; Juceni Pereira de Lima David[3]; Hugo Neves Brandão[2]*

[1.] Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: juli.azevedo87@gmail.com

[2.] Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: jessica_uefs2011@hotmail.com, diegocost@live.com, hugo@uefs.com

[3.] Departamento do Medicamento, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, 40170-115, Salvador. jfernandoaraujo@hotmail.com, juceni@gmail.com

[4.] Embrapa, Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa, s/n/ Chapadinha, Cruz das Almas, Bahia,Brasil, e-mail: hilosouza@gmail.com, fernanda.souza@embrapa.br

[5.] Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, Novo Horizonte, CEP: 44036-900, Bahia, Brasil, e-mail: cleiroz@gmail.com

*e-mail de correspondência: hugo@uefs.com

RESUMO

A família Bromeliaceae fascina por sua beleza e diversidade, sendo o *Ananas comosus* a espécie mais conhecida. Produtos naturais como, triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis, antocianinas, ésteres de derivados de ácido arilpropiónico já foram relatados em espécies da família. O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil fitoquímico através de Cromatografia à líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), realizar estudo químico das folhas de *Ananas comosus* var*. erectifolius* (BGA-804), coletado na EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, através de métodos cromatográficos. Os extratos obtidos foram submetidos a CLAE-DAD para determinação do perfil químico e fracionados por cromatografia em coluna, sendo a fração pura identificada por comparação entre padrões e RMN ^{1}H. O *fingerprint* das frações mostrou que os extratos são ricos em compostos fenólicos, e flavonoides, o fracionamento resultou

em isolamento do daucosterol, um fitoesterol glicosilado. Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que o acesso BGA-804 apresenta-se promissor para a realização de novos estudos químicos e biológicos que levem ao isolamento de outras substâncias.

Palavras-chave: Bromeliaceae, Cromatografia, *Fingerprint*, RMN.

ABSTRACT

The Bromeliaceae fascinates with its beauty and diversity, and the *Ananas comosus* is the best known species. In species of the family, natural products such as triterpenoids, steroids, flavonoids, cinnamic acid derivatives, glycerols, anthocyanins, arylpropionic acid ester derivatives have been reported. The aim of this study was to trace the phytochemical profile using High Pressure Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), perform chemical study of leaves of *Ananas comosus* var. *erectifolius* (BGA-804) that were collected at EMBRAPA-Cassava and Fruit by chromatographic methods. Os extratos obtidos foram submetidos a CLAE-DAD para determinação do perfil químico e fracionados por cromatografia em coluna, sendo a fração pura identificada por comparação entre padrões e NMR ^{1}H. The fingerprint of the fractions showed that the extracts are rich in phenolic compounds and flavonoids, fractionation resulted in isolation of daucosterol, a glycosylated phytosterol. The results of this study show that the BGA-804 access presents promise for the realization of new chemical and biological studies that lead to the isolation of other substances.

Keywords: Bromeliaceae, Chromatography, *Fingerprint*, NMR.

1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae fascina pela sua beleza e diversidade e apresenta aproximadamente 58 gêneros e cerca de 3.352 espécies. Muitas destas plantas têm importância econômica como *Ananas comosus*, o abacaxi (MANETTI et. al., 2009, LUTHER, 2012). O perfil químico da família é especial entre as monocotiledôneas e diferentes classes de compostos orgânicos existentes nessas espécies foram relatadas, incluindo triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis, antocianinas, ésteres de derivados de ácido arilpropiónico (MANETTI et. al., 2009; SCOGIN, 1985; ROCHA, 1999).

Diversos estudos já relataram o isolamento do fitoesterol glicosilado daucosterol (Figura 1) de diferentes extratos de espécies da família Bromeliaceae, e atribuem à presença desse fitoesterol, a variadas atividades biológicas, como: hipoglicemiante, antioxidante, antidespéptica, entre outras (MANETTI et. al. 2010; WANG, 2006; RIYA, 2014).

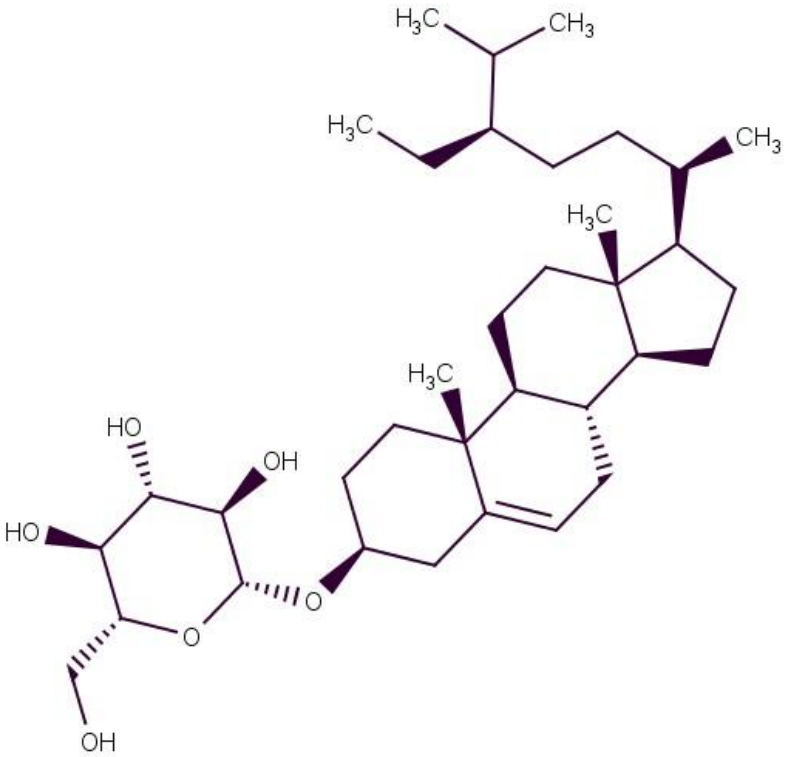


Figura 1: Estrutura química do daucosterol.

Quando se fala sobre o isolamento de compostos bioativos, variadas técnicas podem estar envolvidas. O procedimento pode abranger desde uma recristalização do composto até sucessivas separações como utilização de solventes de diferentes polaridades para realizar partições, seguidas do fracionamento, no qual empregam-se técnicas cromatográficas diversas, com diferentes graus de inovação tecnológicas, desde a utilização de colunas abertas, até técnicas instrumentais, como: Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade e outras, seja em escala preparativa ou semi-preparativa (NIERO et al., 2003; BRAGA, 2009). Uma vez que os compostos foram isolados, deve-se realizar a elucidação estrutural. Para isso, são empregadas técnicas de identificação, como, Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo traçar o perfil fitoquímico através de Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), do acesso *Ananas comosus* var *erectifolius* (BGA-804), bem como o estudo químico dos extratos clorofórmico e acetato de etila.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Coleta e preparação das amostras*

Folhas maduras do acesso, BGA 804- *Ananas comosus* var. *erectifolius* do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, no período de janeiro de 2015. As plantas estavam mantidas em condições de campo com os tratos culturais recomendados para a cultura.

As folhas foram coletadas, secas em estufa à 40 ^{0}C, moídas e submetidas ao procedimento de extração por maceração com metanol com troca de solvente a cada 3 dias, por 5 vezes. O extrato bruto obtido foi submetido a sucessivas partições entre Hexano:MeOH/H_2O, $CHCl_3$:MeOH/H_2O e AcOEt:H_2O. Originando as seguintes partições em acetato de etila, clorofórmio e hexano (804 ACT, 804 CL, 804 HEX).

2.2. *Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD*

Os extratos secos 804 ACT, 804 CL, foram submetidos à técnica de CLAE-DAD para traçar o perfil químico da espécie em estudo pelo método determinado. Os extratos foram diluídos com a fase móvel orgânica (acetonitrila-MeCN: ácido acético 0,7% (8:2)) e filtrados em cartucho de extração em fase sólida (SPE-C18), sendo analisados em cromatógrafo Varian e detector de arranjo de diodo Varian ProStar. A separação cromatográfica foi realizada em coluna fase reversa LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmastad, Germany) combinado com pré-coluna a da Merck. O gradiente de eluição utilizado foi solução de ácido acético 0,7% e acetonitrila (MeCN): ácido acético 0,7% (8:2), especificados na Tabela 1 para cada um dos extratos. As condições cromatográficas incluíram: fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20µL, faixa de comprimento de onda de 200-600 nm. Os cromatogramas foram comparados, em diferentes comprimentos de onda, quanto ao número de picos e a resolução dos mesmos. Para as análises em CLAE foram usados solventes de grau cromatográfico de pureza (Merck® e Vetec®) e água ultra purificada.

Tabela 1 – Gradiente de eluição.

AMOSTRAS	804 ACT		804 CL		
Tempo (min)	**Ácido Acético %**	**Ácido Acético + MeCN %**	**Tempo (min)**	**Ácido Acético %**	**Ácido Acético + MeCN %**
0:00	80	20	**0:00**	80	20
1:00	80	20	**1:00**	80	20
2:30	70	30	**4:00**	60	40
8:00	70	30	**12:00**	60	40
12:00	60	40	**18:00**	30	70
18:00	20	80	**18:01**	5	95

18:01	20	80	**22:00**	0	100
22:00	0	100	**25:00**	0	100
25:00	0	100	____	_____	____

2.3. *Estudo fitoquímico*

As partições clorofórmio e acetato de etila foram fracionadas por métodos cromatográficos tais como: coluna cromatográfica utilizando-se sílica 60 H; gel de Sephadex LH 20 com misturas de solventes de diferentes polaridades.

O extrato clorofórmico (7,5 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60, usando como sistema de solventes $CHCl_3$:MeOH em ordem crescente de polaridade, foram coletadas 117 frações que foram agrupadas em 24 frações. O extrato acetato de etila (5,2303 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60, usando como sistema de solventes Hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH e foram coletadas 138 frações que posteriormente foram agrupadas em 22 frações.

Foi realizada cromatografia planar (CCD) das frações em placas de alumínio cobertas de sílica-gel (sílica F254, 0.25 mm, Merck, Darmstadt, Germany) com detecção por luz UV (254 e 366 nm) e com os reagentes de Dragendorff, Liebermann-Burchard e Iodo, preparados segundo Sthal (1969). Através das CCDs foi avaliada a pureza das frações, sendo a fração 804 Cl F111 identificada pela comparação entre os padrões, como sendo provavelmente o fitoesterol daucosterol.

2.4. *Análises de RMN*

Os espectros de RMN de 1H foram obtidos em espectrômetro AIII500, operando a 500,0075 MHz para 1H. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, utilizando-se como solvente piridina deuterada (C_5D_5N).

3. RESULTADOS

3.1. *Fingerprint*

A aquisição dos cromatogramas (figura 2) foi feita em diferentes comprimentos de onda entre 220-600 nm para a determinação do melhor comprimento para análise de cada extrato, levando-se em consideração o número de picos e a resolução dos mesmos (Figura 3). As amostras 804 ACT e 804 CL apresentaram melhor resolução dos cromatogramas em 280 nm,

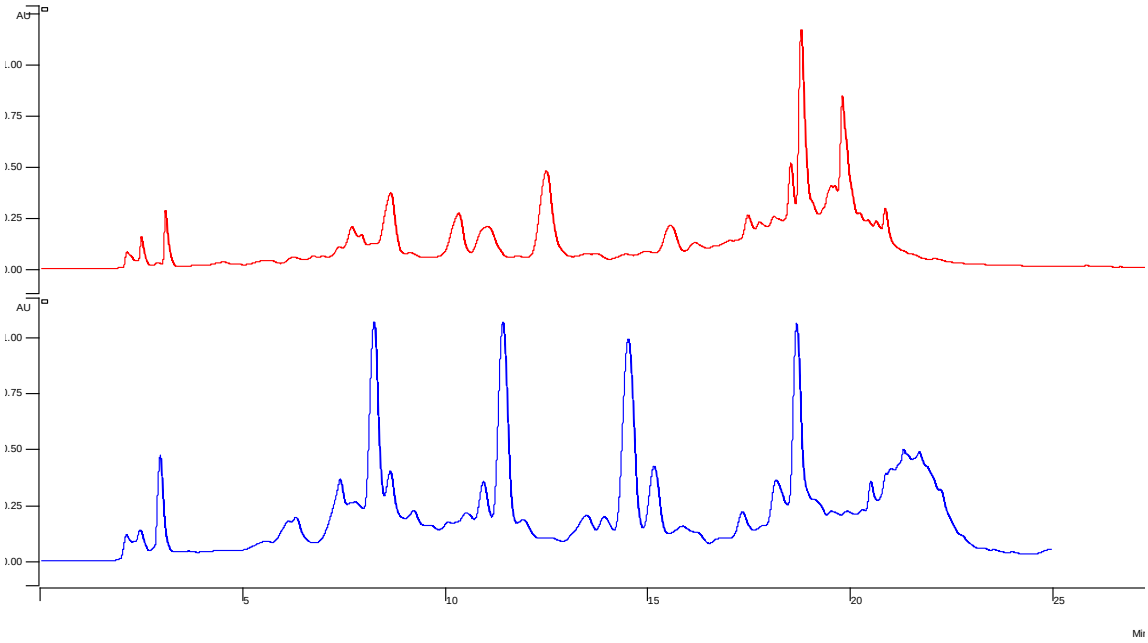
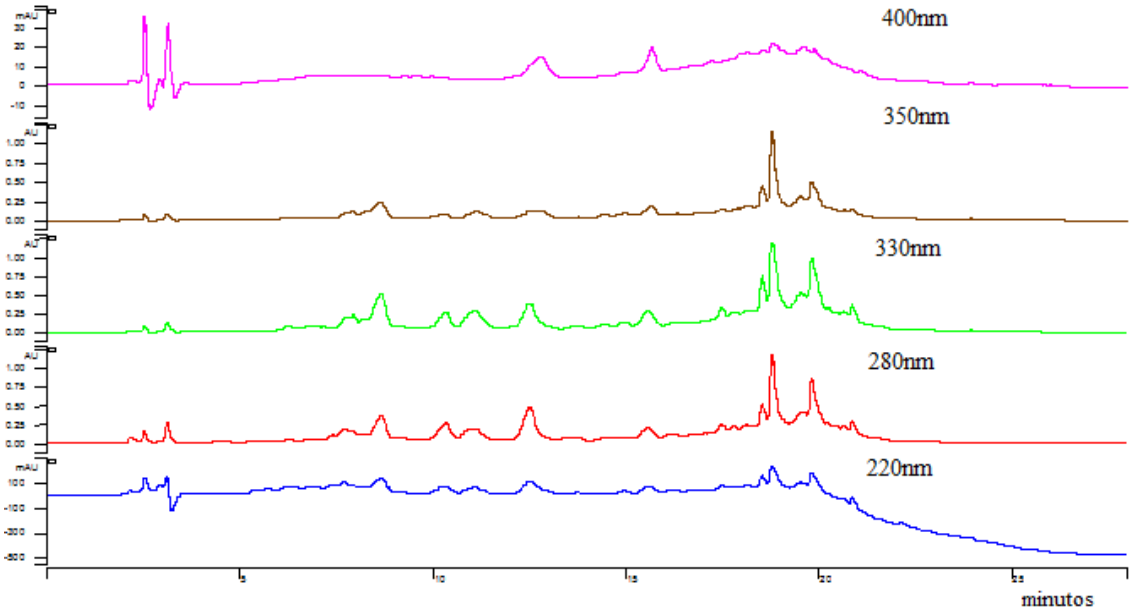


FIGURA 2: Cromatogramas de 804 ACT E 804 CL, respectivamente.

A análise cromatográfica mostrou variação no perfil dos extratos. Foi possível observar a presença de diversos compostos fenólicos (λmáx=220-290 nm e λmáx= 330 aprox.) (TERMENTZI, 2008) e flavonoides (λmáx=240-285 nm e λmáx=300-400 nm) (ZUANAZZI, 2000) (Figuras 4).

Não foi possível obter o perfil cromatográfico do extrato hexânico, tendo em vista que o método utilizado é o da cromatografia em fase reversa, assim, a presença de substâncias de baixa polaridade dificulta a separação de seus compostos,

(A)


400nm
350nm
330nm
280nm
220nm
minutos

(B)

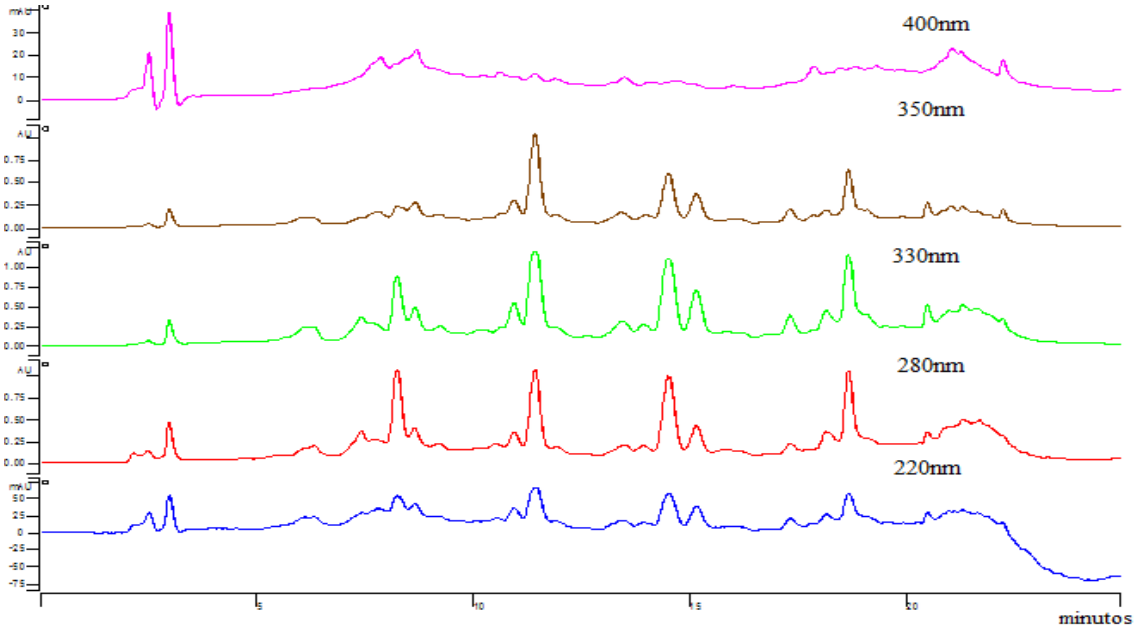
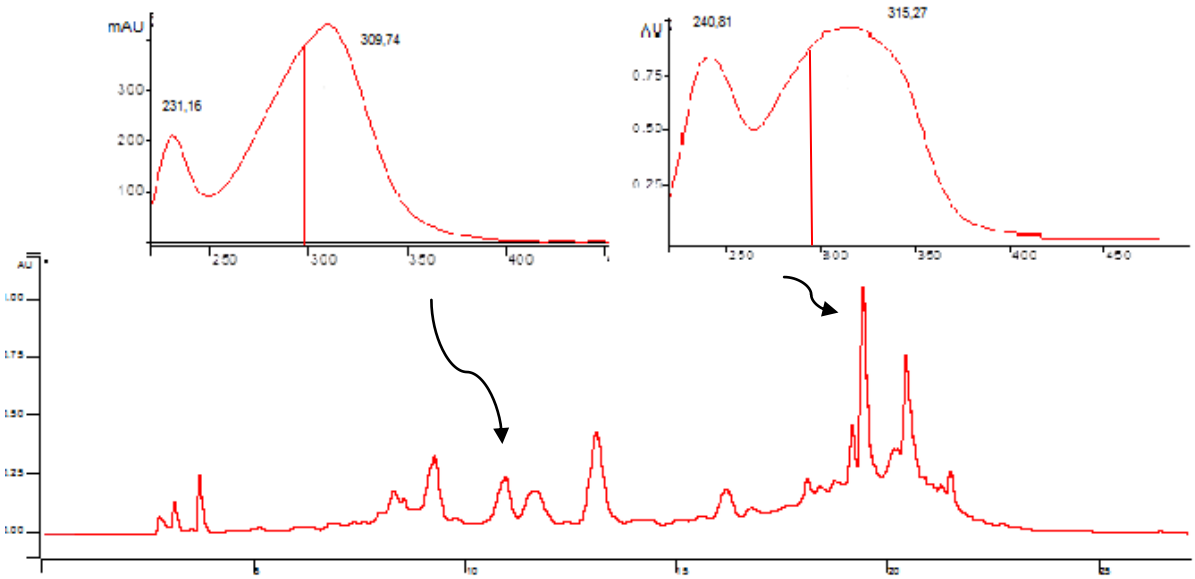

400nm
350nm
330nm
280nm
220nm
minutos

FIGURA 3: *Fingerprint* cromatográfico das frações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em cada um dos seus extratos. A- 804 ACT; B- 804 CL, nos diferentes comprimentos de onda.

(A)



(B)

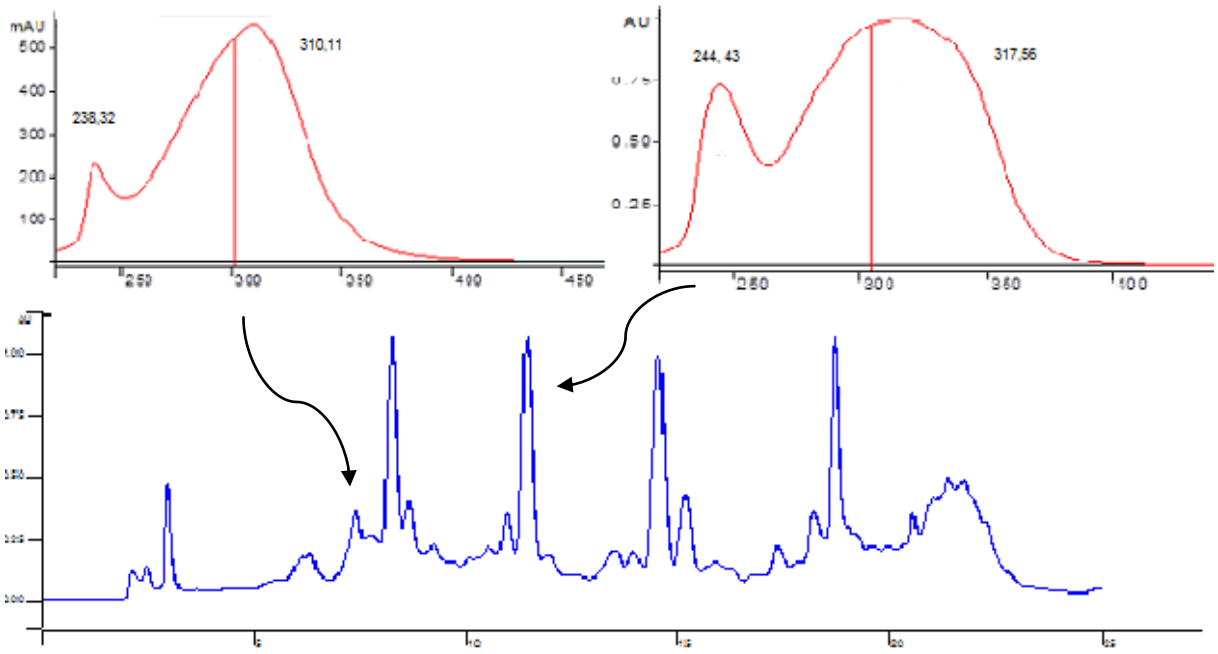


FIGURA 4: Cromatogramas e Espectros no DAD, A-804 ACT; B-804 CL.

3.2. *Estudo fitoquímico*

Os extratos 804 ACT e 804 CL foram fracionados em coluna cromatográfica resultando em 138 e 117 sub-frações respectivamente. Após as análises de CCD, detecção por luz UV (254 e 366 nm) e com os reagentes de Dragendorff, Liebermann-Burchard e Iodo, foi verificado o possível isolamento de um composto branco amorfo. Este foi denominado de fração 804 CL- F-111 e através da comparação com padrões conhecidos (cedidos pelo Professor Clayton Queiroz Alvez) e seu respectivo fator de retenção (Rf), (Figura 5 A; B; C), sugerindo tratar do fitoesterol daucosterol, que foi confirmado pela análise de RMN ^{1}H.

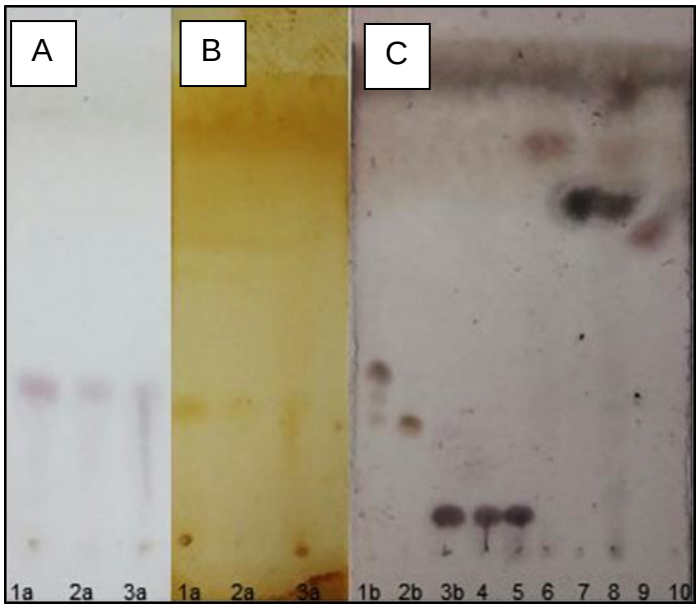


FIGURA 5: Comparação de frações e padrões através de Cromatografia em camada delgada (CCD): A:CCD ($CHCl_3$:MeOH, 9:1) comparando a fração 1a (804 CL F111), com padrões da saponina Daucosterol 2a e 3a, utilizando o revelador Liebermann-Burchard.; B: CCD ($CHCl_3$:MeOH, 9:1) comparando a fração 1a (804 CL F111), com padrões da saponina Daucosterol 2a e 3a, utilizando o revelador Iodo: C: CCD ($CHCl_3$:MeOH, 98:0,2) comparando as frações 1b(804 CL F 48), 2b(804 CL F 61) e 3b(804 CL F111), com padrões 4 e 5 Daucosterol, 6-lupeol, 7-β-sitosterol, 8-ácido ursólico, 9-estigmasterol e 10-ácido betulínico utilizando o revelador Liebermann-Burchard. (IMAGEM: PAIXÃO, J. A.)

3.3. *Análises por RMN*

A substância 804 CL- F-11 (20mg), um sólido branco amorfo, solúvel em piridina, foi isolado da fração clorofórmica das folhas de *Ananas comosus* var*. erectifolius* (BGA-804).

Através da análise dos dados fornecidos no espectro de RMN de ^{1}H e comparação com dados da literatura, foi possível identificar sinais característicos de um fitoesteroide glicosilado. Os sinais observados na região entre 0,6 e 2,8ppm foram atribuídos aos hidrogênios de natureza alquílica. Além destes, foi possível observar um dubleto em δ 5,36 (1H, *J*= 4Hz), característico de hidrogênio olefínico. O sinal em δ 5,07 (1H, *d*, *J*= 7,5Hz), atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico do açúcar, e os sinais na região entre 3,8 e 4,7 ppm caracterizaram a presença de um β-glicosídeo como parte da estrutura desta substância. Assim, através da análise

dos dados e comparação com dados da literatura (Moghaddam, et. al., 2006; Alves, 2012) a substância 804 CL-F-11 foi identificada como sendo o β-sitosterol 3-*O*-β-*D*-glicopiranosideo (Daucosterol) (Figura 1).

4. DISCUSSÃO

4.1. *Fingerprint*

Com os resultados obtidos da análise do perfil químico por CLAE-DAD, foram observados a presença de compostos fenólicos o que corrobora com dados encontrados na literatura, Ma, (2007), realizou a caracterização química das folhas de *Ananas comosus*, utilizando HPLC/DAD/MS e foram encontrados 26 componentes, dentre eles, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos quínico, fenilpropanos, fenilpropanoides e flavonas, além de ter suas estruturas elucidadas.

Já em estudo realizado por Yapo, (2011) foi avaliado o perfil de fenólicos do fruto de *Ananas comosus* de diferentes origens com o objetivo de avaliar a qualidade dos frutos, foram encontrados a presença dos seguintes ácidos fenólicos e flavonoides: ácido gálico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido isoferúlico, ácido p-cumaroilquínico, ácido o-cumárico, ácido protocatecóico, seringaldeído, genistina, taxifolina, ácido hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, epicatequina, quercetina, ácido trans-metoxicinâmico, vanilina, caempferol, miricetina e chavicol, o que corrobora com os perfis encontrados no estudo realizado.

Em estudo realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa Estudos Fitoquímicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais, foi verificado que os extratos estudados apresentam atividades antioxidante, citotóxica e anticolinesterásica, o que pode estar correlacionado a presença dos componentes encontrados no perfil fitoquímico.

Segundo Ferreira, (2010) as substâncias fenólicas são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes. Os compostos fenólicos, como, flavonoides apresentam

diferentes atividades farmacológica. Além da atividade antioxidante, diversos estudos sobre atividade antiviral, anti-inflamatoria, antitumoral, hormonal e anticolinesterásica, também são relatados (ZUAZZANI; MONTANHA, 2007; SUBHASHINI et. al., 2011).

Não foi possível detectar todos as classes de metabólitos secundários na triagem, devido às limitações do método, como por exemplo a necessidade de cromóforos na estrutura das moléculas para serem detectadas pelo DAD.

4.2. *Estudo fitoquímico e Análise por RMN*

Algumas espécies da família Bromeliaceae foram e estão sendo estudadas farmacologicamente e quimicamente, assim, muitos compostos já foram isolados e identificados. Diferentes classes de compostos já foram evidenciadas nesta família, incluindo triterpenos, esteroides, flavonoides, derivados de ácidos cinâmicos, gliceróis, entre outros (MANNETTI, 2010). Ainda segundo o autor, o *Ananas comosus* e *Tillandsia usneoides* são as espécies mais estudadas, a primeira em função do seu valor comercial e a segunda por seu uso pelos povos americanos. Diversos constituintes foram encontrados e alguns podem ser utilizados na medicina tradicional.

Espécies de Bromeliaceae são utilizadas na medicina popular contra diversas patologias, desde problemas respiratórios, como agentes anti-helmíntico, antidiarréico, antidiabético e anti-inflamatório (DUKE, 2000). Alguns estudos com a tentativa de provar seu uso medicinal são realizados, como, os estudos de Xie et. al., (2005) e (2006), no qual verificou que *Ananas comosus* possui atividades, como, antidiabético, anti-hiperlipidêmico e antioxidante. Já para espécie *Tillandsia usneoides* que também apresenta atividade antidiabética, foi sugerido por Whiterup, (1995) apud Mannetti, (2009) que o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico seja responsável pela atividade hipoglicemiante da espécie.

De acordo com os estudos realizados com espécies desta família, é possível verificar que duas classes de substâncias são características: os flavonoides e os cicloartanos, sendo os flavonoides em especial, por apresentarem ligação de O no

C_6, dessa maneira podem ser utilizadas para distinção entre as subfamílias de Bromeliaceae (WILLIANS, 1978; MANNETTI, 2009).

Apesar dos flavonoides serem a principal classe encontrada nesta família, outras classes também já foram identificadas. Como por exemplo o fitoesterol daucosterol, sendo um dos fitoesteróis mais comuns encontrados na natureza em que representa a forma glicosilada do β-sitosterol (HASSAN et. al., 2010).

Em estudo realizado por Riya, (2014) utilizando o *A. comosus*, foram identificadas as seguintes substâncias: ácido sinapínico, daucosterol e ergosterol, correlacionando com as seguintes atividades farmacológicas, imunomoduladora, anti-hiperglicêmica e antifúngica. Wang, (2006), isolou 7 compostos das folhas de *Ananas comosus*, ácido caféico, ananasate, *O*-cafeilglicerol, *O*-cumarilglicerol, ácido p - cumarico, β-sitosterol e daucosterol.

Já Mannetti et. al., (2010), isolou o esteroide glicosilado daucosterol da espécie *Bromelia antiacantha* e verificou que a atividade hemolítica do extrato da planta pode estar relacionada com o componente isolado.
Além deste fitoesterol, outros compostos isolados deverão ser analisados por RMN, identificados e provavelmente estarão relacionados a outras classes químicas, como compostos fenólicos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o acesso BGA-804 *Ananas comosus* var. *erectifolius* apresenta uma variedade de substâncias com destaque para os compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides. Sendo assim, apresenta atividade biológicas em potencial.

O extrato clorofórmico das folhas de BGA-804 *Ananas comosus* var. *erectifolius*, resultou no isolamento e identificação do esteroide glicosilado daucosterol e as atividades deste esteroide já foram relatadas por diversos autores.

O presente trabalho contribuiu com o conhecimento da composição química de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, podendo servir como base para estudos posteriores.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos as instituições: Universidade Estadual de Feira de Santana, Universidade Federal da Bahia, Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária, Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia e Coordenação de apoio à Pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum.*** Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA. Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2012. 227p.

BRAGA, F. C. **Pesquisa fitoquímica**. In: LEITE, J. P. V. (Ed.). Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 4.

DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCELLIER, J.; DUKE, P.-A. K.; **Handbook of medicinal herbs**, 2 ed., CRC Press: Boca Raton, 2000, p. 570.

FERREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante.** Monografia (Curso de graduação em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 77p.

HASSAN, S. M. et al. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guarmeal. **Food Chemistry**, v. 119, p. 600-605, 2010.

LUTHER H.E. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials**. 13 ed Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens. 2012.

MA, C. *et al.* Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, n. 1165, p. 39-44, 2007.

MANETTI, L. M. et al. Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Arquivo de Ciência e Saúde UNIPAR**. v.14, p. 43-47, 2010.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MOGHADDAM, F. M.; FARIMANI, M. M.; SALAHVARZI, S.; AMIN, G. Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*. **Advance Access Publication**. v. 4, n.1. 2006.

NIERO, R. et al. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. (Org.). Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univalle, p. 11-56, 2003.

RIYA, M. P.; ANTU, K. A.; CHANDRAKANTH, K. C; SASIKALA, K.; RAGHUA, K. G. An *in vitro* study reveals nutraceutical properties of *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *Mauritius* fruit residue beneficial to diabetes. **Journal Science Food Agriculture**. v.94, p.943–950, 2014.

ROCHA F.D. ***Ananas bracteatus* (Lindley): Aspectos químico e farmacológico.** Rio de Janeiro, 133 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Rio de Janeiro. 1999

SCOGIN R. Floral anthocyanins in the genus Puya. **Biochemical Systematics and Ecology.** v.13, p. 387-389. 1985.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography - a laboratory handbook**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1969.

SUBHASHINI, N.; NAGARAJAN, G; KAVIMANI, S. IN VITRO ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES OF GARCINIA COMBOGIA. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** v.3, n. 3. 2011.

TERMENTZI A., KEFALAS P., KOKKALOU E. LC–DAD–MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. **Food Chemistry.** v.106, p.1234–1245. 2008.

WANG, W.; DING, Y.; XING, D. M.; WANG, J. P.; DU, L. J. Studies on phenolics constituints from leaves of pineapple (*Ananas comosus*). **China Journal of Chinese Materia Medica.** v. 31. n. 15. 2006.

WHITERUP, K. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; JUDD, R. L.; ZIEGLER, M. H.; MEDON, P. J.; KELLER, W. J. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*)**. Journal Natural Products.** v.58, 1995.

WILLIAMS, C. A. The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the bromeliaceae. **Phytochemistry***.* v.17, n.4, 1978.

XIE, W. U. D.; XING, D. M.; SUN, H.; WANG, W.; DING, Y.; DU, L. J. The effects of *Ananas comosus* L. leaves on diabetic-dyslipidemic rats induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet. **American Journal Chinese Medicine,** v.33, 2005.

XIE, W. U. D.; WANG, W.; SU, H.; XING, D.; CAI, G.; DU, L.; *J.* Hypolipidemic mechanisms of Ananas comosus L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. **Pharmacology Science***.* v.*103*, 2007.

YAPO, E. S; KOUAKOU, H. T.; KOUAKOU, L. K.; KOUADIO, J Y.; KOUAMÉ, P.; Mérillon, J. M. Phenolic profiles of pineapple fruits (*Ananas comosus* L. Merrill) Influence of the origin of suckers. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n.6, p. 1372-1378, 2011.

ZUANAZZI JAS. FLAVONOIDES. IN: SIMÕES CMO, SEBENKEL EP, GOSMANN G., MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS/ Ed. Da UFSC, 2000. p. 489-515.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento (Org.). Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. cap. 23.

APÊNDICE

(A) Teste tukey para AChE

Arquivo analisado:

C:\Users\Juliana\Documents\ACHE 2.DB

Variável analisada: TUKEY

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
EXTRATOS	13	5547.317569	462.276464	11.967	0.0000
erro	23	888.438553	38.627763		
Total corrigido	35	6435.756122			

CV (%) = 14.88
Média geral: 45.875890923 Número de observações: 36

Teste Tukey para a FV EXTRATOS

DMS: 20.0496754977396 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 2.6
Erro padrão: 3.85445612084324

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
	0.000000	a1
804 CHCL3	24.023333	a2
739 CHCL3	27.253333	a2
IGOR CHCL3	38.200000	a2 a3
739 HEX	40.060000	a2 a3
804 HEX	40.736667	a2 a3
IGOR HEX	41.166667	a2 a3
HE CHCL3	42.010000	a2 a3
HE HEX	42.303333	a2 a3
739 ACT	42.563333	a2 a3
HE ACT	43.273333	a2 a3
804 ACT	53.230000	a3 a4
IGOR ACT	66.386667	a4
ESERINA	95.180000	a5

APÊNDICE

(B) Teste tukey para *Artemia salina*

Arquivo analisado:

C:\Users\Juliana\Documents\ananas1.DB

Variável analisada: ic 50

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
acessos	12	5336180.289722	485107.299066	6731.965	0.0000
erro	24	1729.446667	72.060278		
Total corrigido	35	5337909.736389			

CV (%) = 1.42
Média geral: 600.197221830 Número de observações: 36

Teste Tukey para a FV acessos

DMS: 24.9952566816769 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 4.90102974818482

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
804 cl	69.300000	a1
804 act	87.766667	a1
739 act	366.000000	a2
820 act	382.666667	a2
804 hex	413.800000	a3
739 hex	459.666667	a4
739 cl	487.000000	a5
820 hex	811.966667	a6
HE hex	818.866667	a6
820 cl	867.866667	a7
HE act	944.766666	a8
HE cl	1492.700000	a9

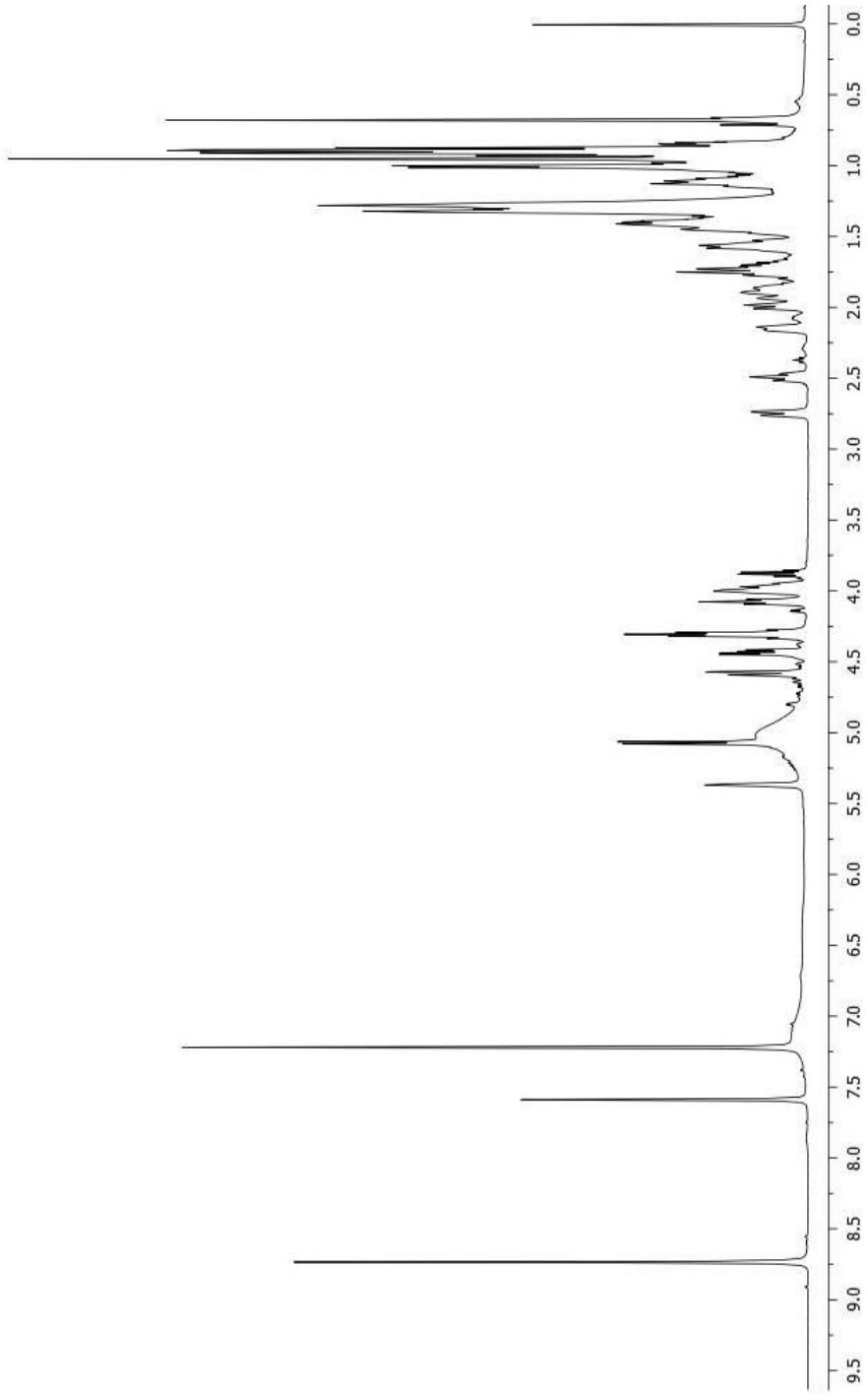
APÊNDICE

(C) Teste tukey para DPPH

```
Arquivo analisado:

C:\Users\Juliana\Documents\ananas1.DB

--------------------------------------------------------------------------------

 Variável analisada: ic 50

 Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

--------------------------------------------------------------------------------


                     TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA


--------------------------------------------------------------------------------
FV                     GL                SQ                QM         Fc  Pr>Fc
--------------------------------------------------------------------------------
acessos                12    63496189.643056    5772380.876641   5383.893 0.0000
erro                   24       25731.780000       1072.157500
--------------------------------------------------------------------------------
Total corrigido        35    63521921.423056
--------------------------------------------------------------------------------
CV  (%) =               2.59
Média geral:       1263.3166382      Número de observações:           36
--------------------------------------------------------------------------------




--------------------------------------------------------------------------------
   Teste Tukey para a FV acessos
--------------------------------------------------------------------------------


DMS: 96.413739781274  NMS: 0.05
--------------------------------------------------------------------------------


Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 18.9046511031897
--------------------------------------------------------------------------------


Tratamentos                             Médias      Resultados do teste
--------------------------------------------------------------------------------
804 act                              192.500000 a1
804 cl                               203.533333 a1 a2
739 cl                               228.433333 a1 a2
739 act                              221.466667 a1 a2
820 cl                               283.466667    a2
HE act                               288.933333    a2
820 act                              514.800000       a3
HE cl                                762.333333          a4
820 hex                             2624.966667             a5
804 hex                             3004.800000                a6
HE hex                              3021.566667                a6
739 hex                             3813.000000                   a7
--------------------------------------------------------------------------------



--------------------------------------------------------------------------------
```

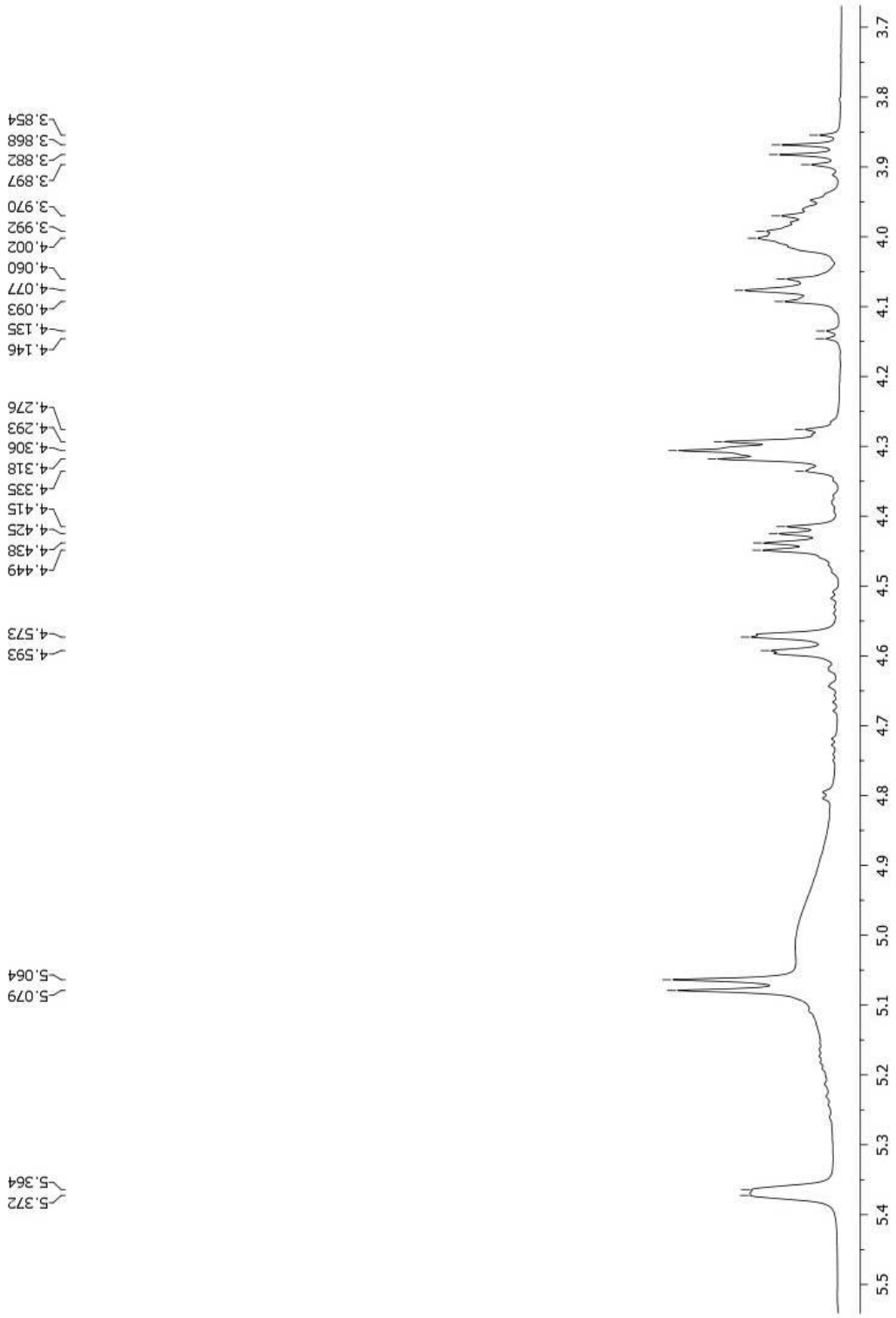
APÊNDICE

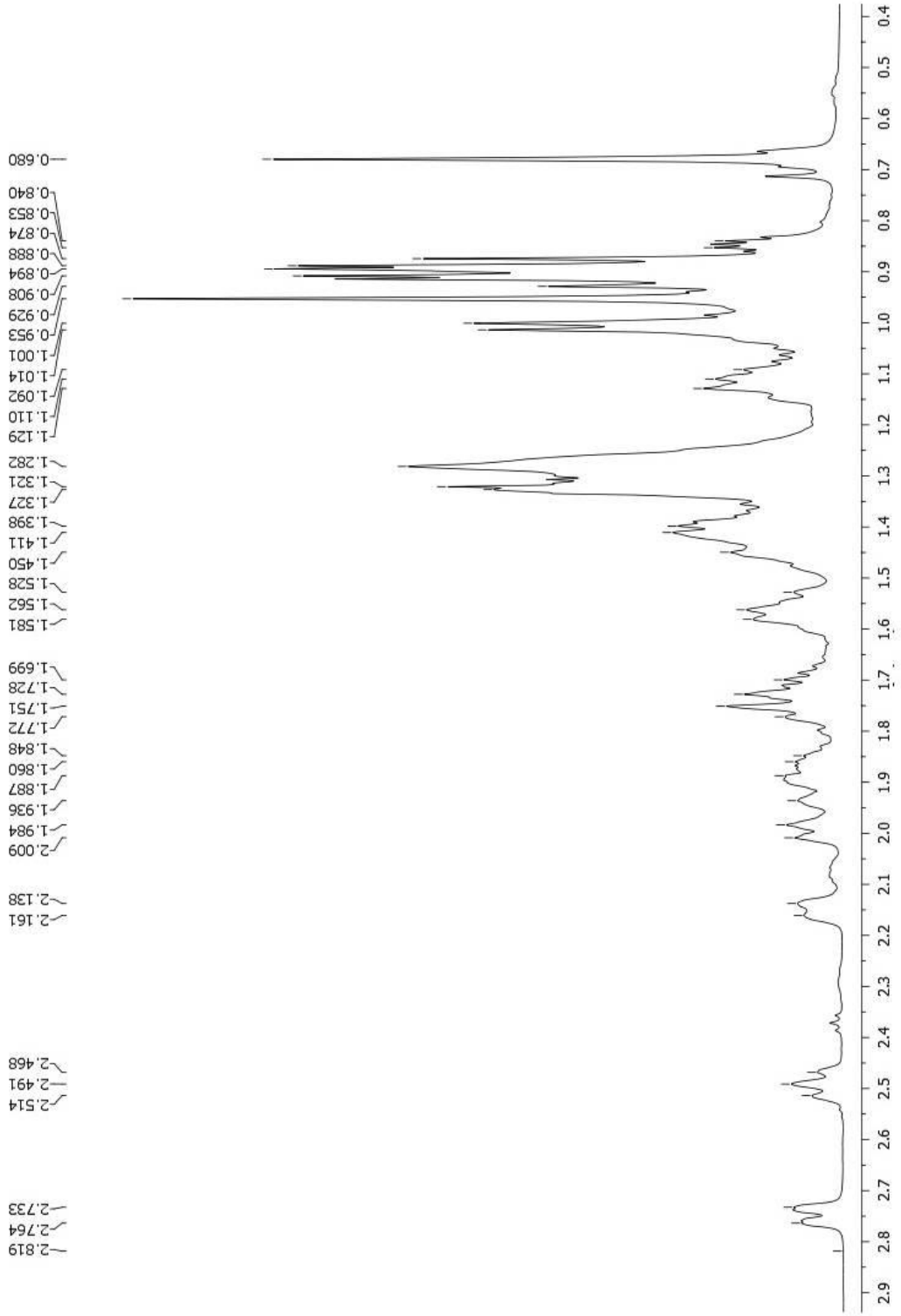
(D) Espectro de RMN ^{1}H do daucosterol, piridina $d_{5,}$ 500 MHz.



APÊNDICE

(E) Ampliação do espectro de RMN ^{1}H do daucosterol, piridina d_5, 500 MHz.




2.819
2.764
2.733
2.514
2.491
2.468
2.161
2.138
2.009
1.984
1.936
1.887
1.860
1.848
1.772
1.751
1.728
1.699
1.581
1.562
1.528
1.450
1.411
1.398
1.327
1.321
1.282
1.129
1.110
1.092
1.014
1.001
0.953
0.929
0.908
0.894
0.888
0.874
0.853
0.840
0.680
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
2.3
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4