



ARTIGOS COMPLETOS/COMPLET ARTICLES

CONTROLE DE QUALIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO DE *Byrsonima intermedia* E DA AMENTOFLAVONA

QUALITY CONTROL AND EVALUATION OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *Byrsonima intermedia* EXTRACT AND AMENTOFLAVONE

Cássia Regina Primila Cardoso ⁽¹⁾

Doutora em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Docente da Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop – MT. cardosocrp@hotmail.com

Taís Maria Bauab ⁽²⁾

Doutora em Microbiologia. Docente na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp – SP. tmbauab@gmail.com

Eliana Aparecida Varanda ⁽³⁾

Doutora em Genética. Docente na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp – SP. eavaranda@gmail.com

RESUMO

Byrsonima intermedia é uma espécie vegetal do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como “murici amarelo”. Baseando-se em estudos etnofarmacológicos, é possível verificar que as folhas e o tronco dessa planta são utilizados popularmente para diarreias, disfunções gástricas e úlceras. Estudos fitoquímicos revelaram a presença, nas folhas, de derivados da quercetina, ácido gálico e galato de metila, além da amentoflavona – uma molécula que apresenta, quando isolada, várias atividades biológicas. Quanto às atividades biológicas do extrato, comprovadas cientificamente, se destacam os efeitos mutagênico e imunológico fracos, além do perfil gastroprotetor, sendo uma espécie promissora em estudos para a obtenção de novos fitoterápicos. Com base nos dados da literatura, o presente trabalho teve como objetivo, obter um extrato hidroalcoólico da planta, a partir da matéria prima vegetal previamente avaliada por técnicas de controle de qualidade microbiológico e físico-químico, além de avaliar os efeitos biológicos da amentoflavona, uma substância que, juntamente com outros flavonoides, está presente no gênero (antibacteriano, citotóxico e fitoestrogênico) presente no mesmo. Para tanto, utilizou-se métodos *in vitro*, com cultivo de células tumorais MCF-7 (citotoxicidade e estrogenicidade) e isolados de *E. coli* e *S. aureus* (antimicrobiano).

Palavras-Chave: amentoflavona; *Byrsonima intermedia*; controle de qualidade; atividade fitoestrogênica.

ABSTRACT

Byrsonima intermedia is a species of the Brazilian cerrado, popularly known as "yellow murici". Ethnopharmacological studies shows that leaves and stem of this plant are popularly used for diarrhea, stomach disorders and ulcers. Phytochemical studies have revealed the presence, in the leaves, of quercetin, gallic acid and methyl gallate derivatives, besides amentoflavone - a molecule that has several biological activities when isolated. The biological activities of the extract, scientifically proven, highlight its weak mutagenic and immune effects, besides the gastroprotective profile. Thus, it is a promising species in studies to obtain new herbal. Based on the literature, the present study aimed to obtain a hydroalcoholic plant extract from the vegetable raw material previously assessed by microbiological control techniques and physicochemical quality, and to evaluate the biological effects of amentoflavone, a substance which, with other flavonoids, is present in the genera (antibacterial, cytotoxic and phytoestrogenic). For this purpose, were carried out *in vitro* methods, with cultivation of MCF-7 tumor cells (estrogenicity and cytotoxicity) and isolates of *E. coli* and *S. aureus* (antimicrobial).

Key Words: amentoflavone; *Byrsonima intermedia*; quality control; phytoestrogenic activity.

INTRODUÇÃO

Apesar do uso popular de muitas plantas medicinais, estudos científicos multidisciplinares se tornam necessários, contribuindo para o controle de qualidade e a aceitação dos nossos fitoterápicos, uma vez que o Brasil constitui uma das maiores riquezas em biodiversidade de plantas medicinais promissoras (1).

B. intermedia, conhecida popularmente como “murici amarelo”, é um arbusto do cerrado brasileiro, considerado medicinal por sua propriedade antiúlcera e adstringente nas diarreias. Estudos com o extrato bruto de folhas demonstraram que *B. intermedia* produz lupeol e *b*-amirina, saponinas triterpênicas pentacíclicas (2). Além dessas substâncias, esta planta apresenta em suas folhas, um biflavonoide denominado amentoflavona, que já apresenta na literatura vários efeitos terapêuticos comprovados (3).

A pesquisa multidisciplinar para a descoberta de novas espécies brasileiras promissoras consiste em estudos que comprovem cientificamente alguns efeitos, sejam eles, terapêuticos, adversos ou tóxicos. Certamente, a padronização dessas preparações, associada ao controle de qualidade do processo e ensaios farmacológicos eficientes (*in vivo* e *in vitro*) permitirá a crescente confiabilidade, aceitação e sucesso dessa terapêutica.

Com base na utilização popular de *Byrsonima intermedia*, o presente trabalho desenvolveu técnicas para a otimização na obtenção do extrato hidroalcoólico, assim como técnicas de controle farmacognóstico e microbiológico da droga vegetal pulverizada, a fim de contribuir com a literatura com dados preliminares para a otimização da obtenção do extrato dessa espécie. Também foram realizados ensaios biológicos com a substância característica da espécie, a amentoflavona, para a atividade antibacteriana (*E. coli* e *S. aureus*), citotóxica e fitoestrogênica, na tentativa de direcionar os estudos para a padronização da atividade de possíveis princípios ativos para a planta, isoladamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da droga vegetal: A espécie vegetal foi coletada e identificada pelo Prof. Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia da

Universidade de Campinas, na cidade de Itirapina – SP. A autorização do IBAMA foi obtida sob o número 32066-1. A excisata foi depositada no Herbário HUEC, da Unicamp, sob o registro 1484. As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45°C, durante sete dias. Após a secagem, a droga vegetal foi pulverizada em moinho de facas e armazenada em embalagens plásticas devidamente rotuladas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – SP, Unesp.

Controle farmacognóstico da droga vegetal (4, 5):

- *Determinação de perda por dessecação em estufa a 110 °C*: Amostras pesando 4,0 g foram submetidas ao aquecimento (110 °C). Foram feitas pesagens sucessivas, a cada hora, até que o peso não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (% p/p), através da média de cinco determinações, em triplicata.

- *Determinação do teor de cinzas totais*: Foram utilizados 3,0g de droga vegetal em cadinhos de porcelana, os quais foram incinerados e calcinados em mufla (450 °C, por 2 horas). Após, os cadinhos permaneceram em dessecador para arrefecimento (15 minutos) e pesagem posterior. Os resultados foram expressos em porcentagem (peso de cinza - %, p/p) e representam a média de 5 determinações por lote, em triplicata.

- *Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido*: As cinzas totais obtidas foram submetidas ao aquecimento com ácido clorídrico 10%, filtradas em papel isento de cinzas e lavadas com água destilada quente. O papel foi submetido a 800 °C (mufla, por 4 horas). Os resultados foram expressos em porcentagem, com referência à massa inicial da droga vegetal.

- *Determinação do teor de extrativos*: 4,0 g de droga vegetal foram maceradas em 100 mL de solvente (etanol absoluto). Um volume de 25,00 mL foi transferido para cápsulas de porcelana e as mesmas foram levadas à estufa a 110 °C para obtenção dos extrativos. Após os cálculos, o teor de

resíduos secos foi obtido em porcentagem (em relação à massa de droga inicial).

Controle de qualidade microbiológico da droga vegetal (4, 5):

- Pré-tratamento: Foi obtida uma suspensão do material desejado (1:10, utilizando-se tampão de NaCl - peptona com pH 7,0). Essa suspensão foi utilizada nos passos subsequentes.

- Contagem de formas viáveis: Amostras nas proporções (1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000) foram semeadas em Agar tioglicolato para bactérias e Agar Sabouraud para leveduras, em placas de Petri, que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias (UFC/mL).

- Pesquisa de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*: Para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, foi utilizado caldo lactosado (amostra, 1:10), incubado a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, foi transferido para tubos contendo caldo tetracionato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetracionato para 1 tubo contendo Ágar verde brilhante e duas placas de Petri contendo Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e Ágar bismuto sulfito. Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. Colônias suspeitas foram semeadas, com alça reta, em tubo contendo Ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram. Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo Ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em Ágar eosina azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi realizada por meio de método de Gram.

- Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*: Foram transferidos, asépticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo soja

caseína e 1,0 g dos extratos para 9,0 mL, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, foi semeado em Ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e Ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a 35 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada por meio de método de coloração de Gram.

Otimização de técnicas de extração: O objetivo da realização de ensaios de extração em pequena escala foi determinar, previamente, o melhor processo de extração disponível (melhor rendimento), sem consumo excessivo de tempo e de matéria prima e solvente (etanol 70 % v/v). A massa de droga, nos ensaios em pequena escala, foi de 1,0 g e o tempo de extração, de 24 horas. A concentração dos extratos foi realizada em rotaevaporador, sob pressão reduzida e temperatura de 25°C, com posterior liofilização por 24 horas. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes, utilizando o mesmo lote de droga vegetal. Os processos de extração realizados foram os seguintes: a) Maceração (1:30 m/v; 40 °C; agitação; 24h); b) Remaceração (1:90 m/v; em 3 x; TA; repouso de 24 h a cada processo); c) Percolação (1:100 m/v; TA; 24 h).

Análises químicas básicas (6,7): Os testes foram realizados para os principais grupos de metabólitos secundários vegetais e de acordo com a literatura sobre a espécie (taninos, saponinas e flavonoides).

Ensaio de atividade antimicrobiana (8,9): Ensaio de disco-difusão: colônias previamente isoladas foram transferidas para um tubo contendo 4mL de caldo Mueller-Hinton. O caldo foi incubado a 35 °C (24 h). A turbidez foi ajustada com tampão fosfato pH 7,2 de modo a comparar-se com a escala padrão de McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL). Para a inoculação em placa, empregou-se um swab estéril. Os discos de papel (Whatman n°1) foram impregnados com 20 µL das diluições das substâncias. Após a absorção, cada disco foi pressionado de encontro à placa. As placas foram invertidas e colocadas em geladeira (4 °C, 2 h) e, em seguida, incubadas em estufa a 35 °C. Como controle negativo, foi utilizado DMSO (5 %) diluído em caldo. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de ciprofloxacina 35

$\mu\text{g/mL}$ para as duas linhagens bacterianas. Após 24 h de incubação, as placas foram examinadas e os halos, aferidos.

Os ensaios de microdiluição foram realizados com uma suspensão de cada bactéria na concentração de 10^7 células/mL. As cavidades da placa foram preenchidas inicialmente com 80 μL de meio de cultura. Em seguida, 100 μL das diluições de amentoflavona e, ao final, 20 μL de suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e, após esse período, submetidas aos procedimentos de leitura. A CIM é determinada por meio da relação direta entre a absorbância do crescimento bacteriano e concentração da substância testada. A CBM foi determinada como a menor concentração da substância a partir da qual não foi verificado crescimento bacteriano após repique do microorganismo em meios isentos de substância teste.

Ensaio de atividade fitoestrogênica (10): Foram utilizadas células MCF7-BUS, incubadas em condições de incubação foram 37°C , sob tensão constante de CO_2 (5%) em meio DMEM sem indicador completo (com soro livre de hormônios). O controle positivo consistiu em células na presença de $17\beta\text{-E}_2$ (10^{-10} M) e meio. Após 6 dias de incubação, na presença dos extratos e da amentoflavona, a placa foi submetida à técnica colorimétrica de sulforodamina-B para a determinação da proliferação celular. Os resultados obtidos foram relacionados com a curva do $17\beta\text{-E}_2$ (com 15 concentrações, variando entre 0,01 pM - 10nM). Após incubação por 6 dias, os mesmos procedimentos de leitura foram realizados e os parâmetros de proliferação calculados.

Ensaio de citotoxicidade em células MCF-7 (11): Foram distribuídos 100 μL de suspensão celular/cavidade em microplacas de 96 cavidades, proporcionando uma concentração final de 5×10^5 células/cavidade. As microplacas foram incubadas a 37°C em condições padrão (24 h). Foram acrescentadas as diluições das substâncias às microplacas. Após 24, 48 e 72 h de incubação (condições padrão), as microplacas foram submetidas aos procedimentos adequados para a leitura e determinação da citotoxicidade, empregando a metodologia de sulforodamina-B. Além dos testes, foram realizados os controles:

negativo (células e a concentração máxima de solvente em meio) e positivo (solução de 20 $\mu\text{g/mL}$ de doxorrubicina). Todos os testes e controles foram feitos em seis replicatas, em três experimentos independentes. Foi elaborada uma curva dose-resposta (absorbância x concentrações), com base nos tratamentos e no controle negativo. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett, assumindo $p < 0,05$. A curva dose-resposta foi obtida na forma de gráfico e a IC50 calculada através da equação da reta entre os pontos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento no uso de fitoterápicos pela população mundial também tem se traduzido em preocupação com a qualidade de tais produtos, devido aos problemas comumente encontrados referentes à autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais que contribuem para um fitoterápico de má qualidade (12). Apesar desse enorme leque de potenciais efeitos terapêuticos, poucas são as informações referentes ao controle de qualidade farmacognóstico de *Byrsonima intermedia*, necessários à caracterização da espécie e à determinação dos parâmetros de sua qualidade.

O excesso de água em drogas vegetais, principalmente pulverizadas, é responsável pelo crescimento de bactérias e fungos, assim como a hidrólise de muitos constituintes químicos. As monografias farmacopeicas limitam o teor de água, especialmente, para aquelas drogas que possuem facilidade em absorvê-la. Com poucas exceções, o teor de umidade nas drogas vegetais deve variar entre 8 e 14%. A planta medicinal, processada nas condições do trabalho, apresentou-se em condições de estocagem e utilização. O valor obtido foi $11.41 \pm 1,4$, como média de triplicata em 3 experimentos independentes para o lote de droga vegetal.

A cinza resultante da incineração da droga vegetal pode ser fisiológica (pertencente ao próprio material vegetal) e não fisiológica (material estranho, em especial terra e areia). Cada droga vegetal

possui um limite aceitável de cinzas insolúveis em ácido, de acordo com a monografia correspondente. O teor de cinzas totais é composto pelo resíduo não volátil, isento de carbono, que resulta da combustão das substâncias orgânicas em condições apropriadas. As cinzas inorgânicas provêm, fundamentalmente, dos constituintes minerais e dos organometálicos integrantes das plantas, podendo também ser substâncias aderentes de origem terrosa (13). O conteúdo de cinzas insolúveis em ácido constitui dentro de certos limites, um índice de pureza. Há, portanto, a necessidade de se estabelecer um âmbito de variação dentro do qual se considere o teor aceitável, salientando-se que muitas plantas medicinais ainda não possuem dados referenciais confiáveis. Os valores obtidos, como média das triplicatas em 3 experimentos independentes, foram de $6,3 \pm 0,05$ e $3,7 \pm 0,03$ para cinzas totais e insolúveis em ácido, respectivamente (%).

O teor de extrativos avalia apenas a quantidade de substâncias que podem ser extraídas, aplicando-se o método de extração indicado e tendo como líquido extrator o álcool, ou outro solvente orgânico optado, sendo a técnica padronizada pela Farmacopeia (5), e não tem relação com a quantidade de princípios ativos contidos na planta ou no extrativo obtido. O valor obtido foi, como média das triplicatas em 3 experimentos independentes, de $22,3 \pm 1,82$ %.

Os valores de rendimento para os extratos obtidos, nos diferentes processos, foram relevantes, uma vez que proporcionaram um estudo piloto para o direcionamento da extração em maiores escalas. É fundamental considerar que, mesmo as diferenças menos significativas em pequena escala, podem representar vantagens em larga escala, considerando que essas espécies possam ser direcionadas à preparação de extratos padronizados e fitoterápicos. Os valores dos rendimentos obtidos para os processos extrativos foram: a) percolação: $32,7 \pm 0,8$ %; b) maceração: $32,6 \pm 1,1$ %; c) remaceração: $36,1 \pm 0,6$ % - que evidenciou que a remaceração é um bom processo de extração para ser empregado, inclusive, em larga escala. A tabela 1 contém os resultados obtidos para os parâmetros de qualidade

farmacognóstica, rendimento e controle microbiológico da droga vegetal.

Considerando os diversos aspectos que garantem a qualidade do material vegetal, que incluem não só os aspectos físico-químicos, mas também microbiológicos, e diante dos procedimentos de coleta e manuseio, torna-se comum a detecção de contaminantes microbiológicos. O controle microbiológico tem como objetivo determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além da identificação de microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes, assegurando assim o utilização de produtos de boa qualidade, seja ele de qualquer origem. Os dados obtidos foram: a) aeróbios totais: $8,7 \times 10^2 \pm 78$; b) fungos: $5,0 \times 10^2 \pm 33$; c) Patógenos (*E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *P. aeruginosa*): ausentes.

As técnicas de caracterização química da espécie foram compatíveis com os dados da literatura, evidenciando a presença de flavonoides (3). A triagem fitoquímica de um lote de droga vegetal é uma etapa importante na cadeia produtiva de um extrato padronizado, principalmente quando se objetiva caracterizar a presença de uma ou mais classes de metabólitos secundários que podem ser responsáveis pelas ações farmacológicas. Para a caracterização de classes químicas nas drogas vegetais, foram realizados ensaios cromáticos, que se mostraram eficazes como um estágio preliminar de análise. Embora todos os metabólitos tenham sido avaliados semi quantitativamente, foi possível observar que as classes mais frequentes, em todas as espécies, são as de flavonoides. Os dados obtidos com o extrato hidroalcolico foram comparados com a literatura para a comprovação do perfil cromatográfico e a presença de flavonoides (qualitativamente). A espécie apresenta, em cada 10,0 g de extrato metanólico, além de outros compostos, os mais significativos: quercetin-3-O-galactopyranosídeo (7,0 mg); mistura de catequina e epicatequina (11,0 mg); ácido gálico (6,0 mg); galato de metila (7,2 mg); quercetin-3-O-l-arabinopiranosídeo (7,0 mg); amentoflavona (9,0 mg) (3). Segundo a mesma referência, a amentoflavona, além de

ser o biflavonoide majoritário, possui potencial farmacológico, além de ser mutagênico (de acordo com a concentração). Obviamente, dados obtidos por CCD não fornecem um perfil quantitativo, porém, os dados qualitativos quanto à presença de flavonoides e fenólicos foi um direcionamento para a triagem farmacológica proposta neste

trabalho, sendo base para futuros estudos de padronização químico-biológica da espécie vegetal. A tabela 2 apresenta os dados da triagem fitoquímica da droga vegetal.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal (Farmacopeia brasileira, 1988/2010) e rendimento do extrato hidroalcoólico 70 %.

Parâmetro	Resultado	Resultado esperado	Avaliação da qualidade
Teor de umidade (%)	11,4 ± 1,4	< 14 %	Aceitável
Densidade (%)	0,225 ± 0,04	-	Aceitável
Cinzas totais (%)	6,3 ± 0,05	-	Aceitável
Cinzas insolúveis (%)	3,7 ± 0,03	-	Aceitável
Teor de extrativos (%)	22,3 ± 1,82	-	Aceitável
Formas viáveis (UFC/g)	8,7 x 10 ² ± 78	≤ 10 ⁵	Aceitável
Fungos (UFC/g)	5,0 x 10 ² ± 33	≤ 10 ³	Aceitável
Patógenos (UFC/g)	Ausentes	Ausentes	Aceitável

Dados obtidos a partir de triplicatas, em três experimentos independentes.

Tabela 2. Triagem química do extrato hidroalcoólico 70 % de *Byrsonima intermedia*.

Grupo de metabolitos	Resultado	Método	Possível marcador
Flavonoides	++	Shinoda	SIM
Flavonoides	+	Taubock	SIM
Flavonoides	++	Pew	SIM
Flavonoides	+	Cloreto de Al	SIM
Taninos	+++	Gelatina (2 %)	SIM
Taninos	+++	Cloreto férrico (5 %)	SIM
Saponinas	++	Formação de espuma em H ₂ O	SIM

Dados obtidos a partir de triplicatas, em três experimentos independentes.

Os fitoestrogênios são fenóis que apresentam ação estrogênica por meio da ligação aos receptores estrogênicos. A amentoflavona foi testada por *e-screen* nas concentrações que variaram entre 10^{-9} e 10^{-5} M e os resultados foram negativos (efeito proliferativo de $1,03 \pm 0,10$, em 10 mM). O efeito proliferativo é a taxa máxima de proliferação para uma substância na concentração ótima ($M \pm DE$). Esse biflavonoide é composto por duas moléculas de apigenina, molécula cuja atividade estrogênica já foi comprovada (14). Esses pesquisadores evidenciaram o potencial estrogênico da apigenina sobre receptores estrogênicos ER β . Embora as células MCF7 clone BUS possuam predominância de receptores ER α , é possível sugerir que a amentoflavona, por sua estrutura, não possa interagir da mesma forma que o seu monômero nos receptores estrogênicos, apresentando resultados negativos para essas atividades. Estudos sobre a metabolização da amentoflavona ou a hidrólise enzimática poderiam elucidar possíveis mecanismos estrogênicos detectáveis *in vitro* ou *in vivo*.

A amentoflavona também não se apresentou toxicidade, de acordo com a técnica utilizada para as células MCF-7 clone ATCC. Os valores de IC50 para 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, $476,56 \pm 5,09$ $\mu\text{g/mL}$; $456,47 \pm 6,45$ $\mu\text{g/mL}$; $328,60 \pm 3,95$ $\mu\text{g/mL}$ – contrariando dados da literatura, que evidenciaram toxicidade para outras linhagens, como SK-BR-3 e HT-1080 de fibrossarcoma (15), com IC50 9,2 $\mu\text{g/mL}$ e Lu1 (pulmão), com IC50% 18,2 $\mu\text{g/mL}$ (16).

Os resultados da atividade antimicrobiana da amentoflavona foram negativos pelas técnicas utilizadas. Outros

estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de biflavonoides com várias linhagens bacterianas pelo método de disco difusão, também não detectaram essa atividade da amentoflavona contra *E. coli* e *S. aureus* (17). Os halos, em mm, para o controle positivo, foram de $5,93 \pm 0,21$ para *S. aureus* e $4,84 \pm 0,12$ para *E. coli*. Não foram detectados halos na presença de todas as concentrações de amentoflavona testadas. Os valores de CIM e CBM, em $\mu\text{g/mL}$, foram superiores a 1000 para ambas as bactérias.

CONCLUSÃO

Embora os resultados tenham sido negativos para os ensaios realizados neste estudo, acreditamos que a sua contribuição foi relevante, uma vez que a literatura carece de informações sobre muitas espécies vegetais, utilizadas pela população brasileira. Vale lembrar que esta espécie possui indicações etnofarmacológicas para diarreias, cicatrização de feridas, entre outras. Portanto, dados adicionais sobre a espécie poderão auxiliar estudos futuros de grupos de pesquisa que estejam direcionando esta espécie, ou outras do gênero, na cadeia produtiva de novos fitoterápicos brasileiros.

AGREDECIMENTOS

À CAPES e à FAPESP, pelas bolsas concedidas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp, pela disponibilidade de ambiente físico, humano e material permanente para a realização de experimentos e técnicas.

REFERÊNCIAS

(1) FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. Atheneu, Ribeirão Preto, SP, 2006.

(2) FELICIO J. D. et al. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. Arquivos do Instituto de Biologia, v. 62, p. 91-92, 1995.

(3) SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A.Juss. leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, p. 319 - 326, 2007.

(4) FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

(5) FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

(6) COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

(7) MATOS, F. J. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed EUFC, Fortaleza, 1997.

(8) NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

(9) NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6)**. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

(10) VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; BROTONS, J.A.; OLEA-SERRANO, M.F.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.F.; PEDRAZA, V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cells stocks. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 844 - 850, 1995.

(11) SKEHAN, P. STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; et al. New Colorimetric Cytotoxic Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, nº 13, p. 1107 - 1112, 1990.

(12) CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A., PERFEITO, J.P.S. Situação do

registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 18, p. 314-319, 2008.

(13) VIGO, C. L. S.; NATIRA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

(14) WUTTKE, W.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; GORKOW, C. The *Cimicifuga* preparation BNO. 1055 vs. Conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. **Manuritas**, v. 44, supl. 1:S67 - S77, 2003.

(15) LEE, J.S. et al. Fatty acid synthase inhibition by amentoflavone induces apoptosis and antiproliferation in human breast cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1427 - 1432, 2009.

(16) SILVA, G.; HEEBYUNG, C.; GUPTA, M.P.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; BEECHER, C.W.W.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 129 - 134, 1994.

(17) MBAVENG, A.T.; NGAMENI, B.; KUETE, V.; SIMO, I.K.; AMBASSA, P.; ROY, R.; BEZABIH, M.; et al. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 483 - 489, 2008.

Enviado: 16/10/2014

Revisado: 10/11/2014

Aceito: 10/08/2015