

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL/MG

ANA FLÁVIA DA SILVA

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Alfenas/MG
2014

ANA FLÁVIA DA SILVA

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva

Alfenas/MG
2014

Silva, Ana Flávia da.

Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades biológicas de
Raphanus sativus var. *oleiferus* Metzg. / Ana Flávia da Silva. - 2014.
97 f.

Orientador: Geraldo Alves da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Brassicaceae. 2. Nabo. 3. Compostos Fitoquímicos.
4. Antimicrobianos. 5. Antioxidantes. I. Silva, Geraldo Alves da.
II. Título.

CDD: 615.321

ANA FLÁVIA DA SILVA

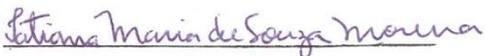
ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

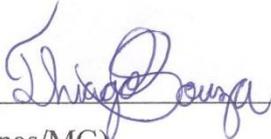
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva

Aprovado em: 28 de Julho de 2014.

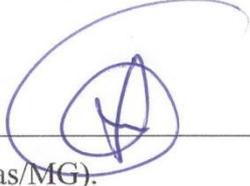
Profa. Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira. Assinatura: 
Instituição: Universidade Estadual Paulista (UNESP-Araraquara/SP).

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza.

Assinatura: 

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-Alfenas/MG).

Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva.

Assinatura: 

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-Alfenas/MG).

A todos que me apoiaram

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela graça de permitir a conclusão deste trabalho,

A Nossa Senhora, pela proteção, intercessão e graças,

A minha mãe, Romilda, pelo exemplo de dedicação, força, honestidade e principalmente pelo amor e carinho,

Ao meu pai Antônio pelo carinho, amor e apoio,

A minha querida irmã Ana Kelly pelo carinho e incentivo,

Ao Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva pela oportunidade, pela valiosa orientação, pela paciência e pelos ensinamentos. Agradeço pela confiança, atenção e dedicação,

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva pela orientação, pelos ensinamentos e por toda ajuda para conclusão deste trabalho,

Aos professores colaboradores, Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco e Prof. Dr. Marcos José Marques, pelo apoio e experimentos realizados,

Ao doutorando, Marcelo José Dias e ao Prof. Dr. Wagner Vilegas da UNESP-Araraquara, pela realização das análises em espectrômetro de massas,

Ao aluno de iniciação científica, Lucas Batista pela colaboração nos ensaios físico-químicos,

A aluna de graduação Karina Alves pela colaboração com os ensaios de citotoxicidade e leishmanicida,

Ao mestre Isael Aparecido Rosa e a Profa. Dra. Ingridy Ribeiro Cabral pela colaboração com os ensaios quantitativos,

Ao Prof. Dr. Thiago Correa de Souza pelos ensinamentos na elaboração da dissertação,

Ao mestrando Cláudio Daniel Cerdeira pela colaboração nas análises estatísticas,

As colegas de trabalho, Silvia Helena Martelli Dias, Marilda de Souza Borges e a Prof. Dra. Tati pela compreensão,

A querida mestre Marisa de Oliveira Lopes, pela companhia e ajuda na realização dos experimentos e principalmente pela amizade,

Ao Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, onde foi realizado grande parte dos testes,

A Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

RESUMO

As espécies da família Brassicaceae são amplamente utilizadas na medicina popular para diversos fins terapêuticos. Pesquisas têm demonstrado que o rabanete (*Raphanus sativus* L.) contém muitas classes de fitoquímicos biologicamente ativos com propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antimutagênica. Neste contexto, este estudo teve por objetivos: fornecer parâmetros de qualidade para a droga vegetal; realizar as análises químicas e avaliar as atividades antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. Inicialmente, realizou-se a triagem fitoquímica preliminar, por meio de testes qualitativos e Cromatografia em Camada Delgada no extrato seco, que permitiram a detecção de compostos como: flavonoides, taninos e terpenos. Posteriormente, o extrato seco e as frações foram analisados em espectrômetro de massas, o que possibilitou a identificação de alguns constituintes químicos, baseando-se na massa molecular e nos mecanismos de fragmentação das moléculas. As análises químicas quantitativas demonstraram que os teores de fenóis nas frações foram superiores à concentração obtida no extrato seco, sendo que os fenóis ficaram mais concentrados na fração butanólica (121,27 mg EAG/g). Os teores de flavonoides nas frações, exceto na fração aquosa, também foram superiores ao obtido no extrato seco, sendo que os flavonoides ficaram mais concentrados na fração acetato de etila (98,02 mg EQ/g). Nas avaliações da atividade antioxidante *in vitro*, observou-se que a atividade antirradicalar e o poder redutor das frações demonstraram resultados mais significativos em relação ao extrato seco, sendo que a fração acetato de etila apresentou os melhores resultados em ambos os experimentos, com porcentagem de sequestro de radicais DPPH de 83,45% e com porcentagem de redução de íons férrico de 11,34%. A análise da atividade antimicrobiana revelou que o extrato seco teve maior média de halos de inibição frente ao *Bacillus subtilis* (18,67 mm), sendo considerada uma média estatisticamente superior as produzidas pelas frações ($p < 0,05$). Entretanto, os menores valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram obtidos para *Micrococcus luteus*, sendo que a fração acetato de etila demonstrou menor concentração inibitória mínima (0,1 mg/mL) para esse micro-organismo, sendo considerada a fração mais ativa (80%). A bactéria *Micrococcus luteus* foi inibida por 50% das frações testadas com concentração inibitória mínima inferior ou igual a 1 mg/mL. O extrato seco e as frações não demonstraram atividade contra as bactérias Gram-negativas, as micobactérias e os fungos, e também não foram ativos contra os parasitos de *Leishmania amazonensis*. Os estudos demonstraram uma moderada correlação entre os mais baixos valores da CIM e as maiores quantidades de fenóis e de flavonoides, sugerindo que a atividade antimicrobiana não está relacionada somente com esses compostos, porém houve uma forte correlação entre os melhores valores da atividade antioxidante *in vitro* (pelo método do radical DPPH e pelo método do poder redutor) e as maiores quantidades de fenóis e de flavonoides no extrato e frações avaliados, sugerindo que os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro* da espécie vegetal em estudo.

Palavras-chave: Brassicaceae. Nabo. Compostos fitoquímicos. Antimicrobianos. Antioxidantes.

ABSTRACT

The species of the Brassicaceae family are widely used in folk medicine for various therapeutic purposes. Research has shown that the radish (*Raphanus sativus* L.) contains many classes of biologically active phytochemicals with anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties. In this context, this study aimed: to provide the quality parameters for plant drug; perform chemical analyzes and evaluate antimicrobial, antileishmanial and cytotoxic dry extract and fractions from the leaves of *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. Initially, there was the preliminary phytochemical screening using qualitative tests and Thin Layer Chromatography in dry extract, which allowed the detection of compounds such as flavonoids, tannins and terpenes. Subsequently, the dry extract and fractions were analyzed in a mass spectrometer, which allowed the identification of some chemical constituents, based on the molecular mass and fragmentation mechanisms of molecules. Quantitative chemical analysis showed that the levels of phenolics in the fractions obtained were higher than the concentration in dry extract, and phenols were more concentrated in the butanol fraction (121,27 mg GAE/g). The content of flavonoids in the fractions, except the aqueous fraction, were also higher than those reported in dry extract, and flavonoids were more concentrated in the ethyl acetate fraction (98,02 mg EQ/g). The evaluation of the antioxidant activity *in vitro*, it was observed that the antiradical activity and reducing power of the fractions showed most significant results on the dry extract, and the ethyl acetate fraction showed the best results in both experiments, with percentage of sequestration DPPH radical of 83,45% and a percentage reduction of ferric ions 11,34%. The analysis of antimicrobial activity revealed that the dry extract had higher mean inhibition zones against *Bacillus subtilis* (18,67 mm) and is considered a statistically higher mean those produced by the fractions ($p < 0,05$). The lowest values of minimum inhibitory concentration (MIC) were obtained for *Micrococcus luteus*, and the ethyl acetate fraction showed lowest minimum inhibitory concentration (0,1 mg/mL) for this micro-organism, is considered the most active fraction (80%). The bacterium *Micrococcus luteus* was inhibited by 50% of the tested fractions with lower or equal minimum 1 mg/mL inhibitory concentration. The dry extract and fractions do not show activity against Gram-negative bacteria, mycobacteria and fungi, and also were not active against the parasite *Leishmania amazonensis*. The studies showed a moderate correlation between the lowest MIC values and the highest amounts of phenolics and flavonoids, suggesting that the antimicrobial activity is not related only to these compounds, however there was a strong correlation between the best values antioxidant activity *in vitro* (by the method DPPH radical and by the method of reducing power) and higher amounts of phenolics and flavonoids in the extract and fractions evaluated, suggesting that phenolic compounds, especially flavonoids, are mainly responsible for the antioxidant activity *in vitro* plant species under study.

Keywords: Brassicaceae. Turnip. Phytochemical compounds. Antimicrobials. Antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA	Análise da variância
AT	Atividade total
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Butil-hidroxitolueno
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% de macrófagos
CE₅₀	Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	2,2-difenil-1- picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EF	Extrato seco das folhas
EQ	Equivalentes de Quercetina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FrAcOEt	Fração acetato de etila
FrAq	Fração aquosa
FrBuOH	Fração butanólica
FrHex	Fração hexânica
ISM	Índice de susceptibilidade microbiana
[M-H]⁻	Molécula desprotonada
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MSⁿ	Espectromeria de Massas Sequencial em Múltiplos Estágios
m/z	relação massa/carga
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Partes aéreas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	19
Figura 2 -	Glicosinolato e seus diferentes produtos de hidrólise.....	21
Figura 3 -	Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin - Ciocalteau.....	24
Figura 4 -	Núcleo básico dos flavonoides	25
Figura 5 -	Complexo formado entre a quercetina e o alumínio.....	28
Figura 6 -	Representação da reação de doação de hidrogênios da molécula antioxidante (RH) para a substância sequestradora de radicais, no caso o radical DPPH.....	28
Figura 7 -	Fluxograma representativo dos procedimentos empregados no estudo.....	34
Figura 8 -	Esquema de diluição seriada em microplaca de 96 orifícios, mostrando a distribuição das linhas e colunas, utilizada para a avaliação da CIM.....	48
Figura 9 -	Distribuição da porcentagem do pó das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. retido em cada tamis.....	51
Figura 10 -	Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	58
Figura 11 -	Espectro de massas, em modo full scan, obtido por injeção direta do extrato seco.....	59
Figura 12 -	Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 609 com a fragmentação da molécula proposta.....	60
Figura 13 -	Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 593 com a fragmentação da molécula proposta.....	61
Figura 14 -	Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 577 com a fragmentação da molécula proposta.....	61
Figura 15 -	Espectro MS ² do íon de <i>m/z</i> 563 com a fragmentação da molécula proposta.....	62
Figura 16 -	Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta da fração acetato de etila	63
Figura 17 -	Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta da fração hexânica.....	64
Figura 18 -	Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta da fração butanólica.....	65

Figura 19 -	Espectro de massas, em modo <i>full scan</i> , obtido por injeção direta da fração aquosa.....	66
Figura 20 -	Atividade antirradicalar qualitativa por CCD do extrato seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	68
Figura 21 -	Estrutura da quercetina mostrando as características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonoides.....	73
Figura 22 -	Índice de susceptibilidade microbiano (ISM, %) frente às frações do extrato seco das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. que apresentaram CIM igual ou inferiores a 1 mg/ml.....	81
Figura 23 -	Percentual de atividade das frações do extrato seco das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. com CIM igual ou inferiores a 1 mg/ml.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	52
Tabela 2 -	Caracterização físico-química da droga vegetal.....	53
Tabela 3 -	Rendimento das frações obtidas a partir de 5 g do extrato seco das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. em ordem crescente de polaridade.....	55
Tabela 4 -	Análise fitoquímica preliminar do extrato seco das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	56
Tabela 5 -	Proposta das estruturas de flavonoides encontrados no extrato seco e nas frações.....	59
Tabela 6 -	Teor de fenóis e de flavonoides totais no extrato seco e nas frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	67
Tabela 7 -	Atividade antirradicalar do extrato seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. pelo método do radical DPPH	70
Tabela 8 -	Avaliação do poder redutor do extrato seco e das frações de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg. na concentração de 100 µg/mL.....	71
Tabela 9 -	Valores das médias dos halos de inibição de crescimento microbiano (em milímetros) do extrato seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg., controles positivo (clorexidina 0,12%) e negativo (água destilada), avaliados pelo método de difusão em ágar..	75
Tabela 10 -	Determinações das CIM (mg/mL) do extrato seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	78
Tabela 11 -	Atividade antimicrobiana total do extratos seco e das frações das folhas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiferus</i> Metzg.....	80
Tabela 12 -	Análise estatística da correlação entre os parâmetros avaliados.....	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ASPECTOS BOTÂNICOS.....	19
2.2	ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	20
2.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS.....	22
2.4	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
2.4.1	Flavonoides	24
2.5	ANTIOXIDANTES E MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	26
2.6	ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	29
2.7	LEISHMANIOSES.....	30
2.8	CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS.....	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAIS.....	32
3.2	ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	33
4.1.1	Secagem e moagem	33
4.1.2	Determinação da granulometria	35
4.1.3	Caracterização físico-química da droga vegetal	35
4.1.3.1	Determinação do pH.....	36
4.1.3.2	Determinação da densidade aparente.....	36
4.1.3.3	Determinação da perda por secagem.....	36
4.1.3.4	Determinação da perda por dessecação.....	36
4.1.3.5	Determinação do teor de cinzas totais.....	37

4.1.3.6	Determinação de cinzas insolúveis em ácido.....	37
4.1.3.7	Determinação do teor de extrativos.....	38
4.2	PREPARO DO EXTRATO SECO E DAS FRAÇÕES.....	38
4.2.1	Extrato seco.....	38
4.2.2	Obtenção das frações.....	39
4.3	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR	40
4.3.1	Taninos.....	40
4.3.2	Alcaloides.....	40
4.3.3	Flavonoides.....	40
4.3.4	Antraquinonas.....	41
4.3.5	Saponinas.....	41
4.3.6	Polissacarídeos.....	41
4.3.7	Esteroides e triterpenos.....	42
4.4	ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	42
4.5	ANÁLISE QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	42
4.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS.....	43
4.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES.....	43
4.8	ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR.....	44
4.9	ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR.....	45
4.10	AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR	45
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	46
4.11.1	Método de difusão em ágar.....	46
4.11.2	Micro-organismos avaliados.....	47
4.11.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
4.11.4	Avaliação da atividade total, percentual de atividade e índice de susceptibilidade.....	48
4.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTA.....	49

4.13	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	49
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA	51
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL.....	52
5.3	RENDIMENTO DO EXTRATO SECO E DAS FRAÇÕES.....	55
5.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR	55
5.5	ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	57
5.6	ANÁLISE QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
5.7	TEOR DE FENÓIS E DE FLAVONOIDES	66
5.8	ATIVIDADE ANTIRRADICALAR QUALITATIVA	68
5.9	ATIVIDADE ANTIRRADICALAR QUANTITATIVA.....	69
5.10	AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR.....	71
5.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	74
5.11.1	Método de difusão em ágar.....	74
5.11.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	77
5.11.3	Atividade antimicrobiana total.....	79
5.11.4	Índice de Susceptibilidade Microbiana.....	81
5.11.5	Percentual de atividade.....	82
5.12	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CONSTITUINTES QUÍMICOS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	82
5.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTA.....	83
5.14	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	84
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com finalidade medicinal, para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JÚNIOR et al., 2005). É considerada medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, que exerce algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem a matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para a obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese. Sua aplicação é ampla e abrange desde o combate ao câncer até a micro-organismos patogênicos (CALIXTO, 2000).

As formas de uso e de preparo dos produtos a base de plantas são muito variados, assim como também as suas utilidades e as formas de aplicação. Em consequência do baixo custo (por serem naturais e de fácil acesso) quando comparados aos medicamentos industrializados, os produtos a base de plantas medicinais representam o único recurso terapêutico para a maioria das comunidades tradicionais (MACIEL et al., 2002).

A constituição química das plantas indica suas possíveis propriedades biológicas, podendo abranger tanto as propriedades terapêuticas como as tóxicas. A análise química pode ser baseada apenas na caracterização de grupos de metabólitos secundários que estejam presentes proporcionando o conhecimento do perfil químico da droga e indicando o grupo de compostos que seja relevante nesta ou a análise pode ser expandida até o isolamento e a elucidação estrutural de moléculas (FALKENBERG et al., 2004).

Grupos de compostos de estruturas complexas como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos, bem como seus derivados tem sido alvo de investigações a respeito de suas propriedades medicinais e aromáticas. As variações em termos de estruturas e de propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza, podem servir para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse comercial (ALVES, 2001).

Muitas plantas da família Brassicaceae têm sido relatadas como fonte de substâncias antimicrobianas e medicamentosas para organismos específicos. Existem evidências crescentes de que o consumo de brassicas, por exemplo, brócolis, repolho, couve, mostarda, couve de bruxelas e couve-flor reduz o risco de vários tipos de doenças, devido as potentes

propriedades antioxidantes dos fitoquímicos encontrados na família Brassicaceae (MANCHALI et al., 2012).

O rabanete comum (*Raphanus sativus* L.) é um vegetal de raiz comestível da família Brassicaceae que foi cultivado na Europa nos tempos pré-romanos, têm inúmeras variedades, diferem em tamanho, cor e duração do tempo necessário de cultivo. Há quatro variedades botânicas reconhecidas dentro da espécie: *radicula*, *niger*, *mougri* e *oleifera*, as duas primeiras são cultivadas por suas raízes tuberosas, enquanto a *oleifera* é cultivada principalmente devido ao teor de óleo em suas sementes. O gênero *Raphanus* é um nome grego que significa “rapidamente aparecendo” e refere-se a rápida germinação desta planta (ARUNA; YERRAGUNI; RAJU, 2012).

O nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.) é originário da Ásia Oriental e Europa (CULTURA, 2003), tradicionalmente é utilizado como adubo verde, ao fornecimento de massa (palha) para o plantio direto, como cobertura do solo e reciclagem de nutrientes. Com menor frequência, destina-se à alimentação animal e ao pasto apícola. Recentemente, o seu uso vem sendo ampliado, pois suas sementes estão sendo consideradas como excelente fonte de matéria-prima para a produção de biocombustível (BRASSI; DENUCCI; PORTAS, 2008).

Internacionalmente, o rabanete é conhecido como “radish”, suas diferentes partes (folhas, sementes e raízes) são citadas na medicina popular do sul da Ásia em uma variedade de desordens de origem gastrointestinal, biliar, hepática, urinária, respiratória e cardiovascular. Pesquisas têm demonstrado que o rabanete contém muitas classes de fitoquímicos biologicamente ativos com propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e antimutagênica (ALQASOUMI, et al., 2008)

O *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg é uma variedade de rabanete pouco estudada, sob o ponto de vista químico e biológico, a planta carece de estudos que comprovem suas atividades farmacológicas e que forneçam parâmetros de qualidade para o uso e obtenção racional de insumos fitofarmacêuticos. Porém, estudos relacionados à família e à espécie da planta indicam a presença de importantes metabólitos secundários relacionados a efeitos biológicos benéficos à saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão literária denotou aspectos botânicos, fitoquímicos, biológicos e farmacológicos das espécies pertencentes à família Brassicaceae, com enfoque especial à *Raphanus sativus* L.

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

O *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. é popularmente conhecido como nabo forrageiro e pertence à família Brassicaceae. Esta possui cerca de 350 gêneros e 4000 espécies, originárias do hemisfério norte e distribuídas nas zonas temperadas de todo o mundo. No Brasil, apresentam grande importância agrícola, ornamental, ruderais e/ou invasoras. As folhas são alternas, as basais rosuladas, inteiras a fortemente recortadas. As flores são tetrâmeras, brancas, amarelas ou róseo-violáceas. As pétalas estão dispostas em forma de cruz alternadamente com as sépalas, daí o nome alternativo da família (Cruciferae). O androceu é tetradínamo (às vezes reduzido a 2 ou 4 estames). Apresentam nectários polinização entomófila e pode ocorrer a autofecundação. O fruto é síliqua, às vezes lomento (*Raphanus*). As sementes não possuem endosperma e apresentam alto teor de óleo, outras têm glicosídeos que se hidrolizam por ações enzimáticas, dando um forte cheiro e sabor de compostos sulfurados (mostarda) (ZECCA, 2008).

São encontradas diversas variedades hortícolas, com destaque para *Brassica oleracea* var. *acephala* (couve-manteiga), *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho), *Brassica oleracea* var. *gemmifera* (couve-de-bruxelas), *Brassica oleracea* var. *borytis* (couve-flor) e *Brassica oleracea* var. *italica* (brócolis) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Outras espécies de destaque são as mostardas (*Brassica nigra* e *Sinapis* sp.), o rabanete (*Raphanus sativus* L. var. *radicula*), a raiz-forte (*A Armoracia rusticana*), o agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum*) e a rúcula (*Eruca sativa*). Algumas espécies são cultivadas como ornamentais, destacando-se o repolho-ornamental (*Brassica oleracea* var. *acephala*), o alisso (*Lobularia marítima*) e o mussambê (*Cleome hassleriana*). Muitas espécies da família Brassicaceae são invasoras de cultura, incluindo-se aqui as mostardas-do-campo (*Brassica rapa*, *Rapistrum rugosum* e *Sinapis arvensis*), a bolsa-depastor (*Capsella bursa-pastoris*), o agrião-bravo (*Cardamine bonariensis*), o mastruço (*Coronopus didymus*), o menstruz (*Lepidium* spp.) e a nabiça (*Raphanus raphanistrum*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

O nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), também denominado de nabiça, nabo, nabo silvestre, rabanete, ou ainda de rabanete silvestre, é uma planta cosmopolita presente em culturas anuais, pomares, áreas não agrícolas no Brasil e em várias partes do mundo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2008). Tem hábito de crescimento ereto, herbáceo, com intensa ramificação e altura variando entre 1,00 e 1,80 m (CULTURA, 2003). No Sul do País, esta planta é infestante comum em lavouras de trigo, canola e cevada, predominando, de modo geral, nos cultivos de inverno. A classificação científica dessa planta daninha é, atualmente, a seguinte:

- a) Reino: Plantae;
- b) Divisão: Magnoliophyta;
- c) Classe: Magnoliopsida;
- d) Ordem: Brassicales;
- e) Família: Brassicaceae;
- f) Gênero: *Raphanus*;
- g) Espécie: *Raphanus sativus*;
- h) Nome científico binomial: *Raphanus sativus* L.

Além desta classificação padrão, aplicam-se, aos biótipos desse grupo, diversos identificadores taxonômicos adicionais, como convar.=convariedade; var.=variedade; spp=subespécie e f.=forma. Existem pelo menos 78 espécies declaradas em *Raphanus* e não há um consenso acerca da nomenclatura dos componentes deste gênero (EMBRAPA, 2008).

De acordo com estudos de Specht (2001), *Raphanus sativus* pode ser agrupada em três principais grupos taxonômicos, discriminados por convariedades: *Raphanus sativus* convar. *oleifera*, com sementes com alto teor de óleo e algumas variedades forrageiras; *Raphanus sativus* convar. *caudatus*; e *Raphanus sativus* convar. *sativus*, que inclui a maioria das variedades com raízes e folhas comestíveis. O nabo forrageiro pode ter, por exemplo, os seguintes nomes e/ou sinônimos:

- a) *Raphanus sativus* L.;
- b) *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Stokes;
- c) *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.;
- d) *Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.;
- e) *Raphanus sativus* L. convar. *oleifer* (Stokes) Alef.;

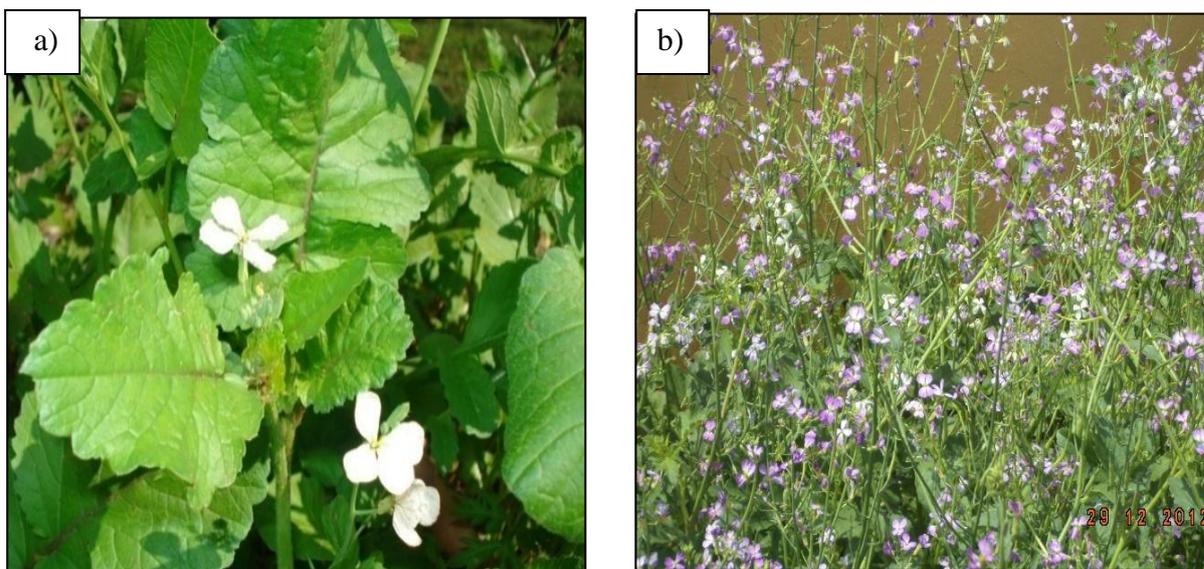
f) *Raphanus sativus* convar. *oleiferus*.

Estudos genéticos conduzidos com o *Raphanus* indicam que este gênero provavelmente seja um híbrido entre as linhagens de mostardas, notadamente dos grupos *Brassica nigra* e *Brassica rapa/oleracea*, originado em algum evento ocorrido a cerca de 5 milhões de anos (YANG; CHEN; LI, 2002). Estima-se também que o *Raphanus sativus* seja uma espécie derivada de *Raphanus raphanistrum* (YAMANE; LU; OHNISHI, 2005).

Atualmente as principais características usadas para diferir *Raphanus sativus* e *Raphanus raphanistrum* são a forma dos frutos e a coloração predominante das flores antes da fecundação. Enquanto em *Raphanus sativus* as siliquis são relativamente uniformes, com nenhum ou pouco estrangulamento entre as sementes e afiladas em direção ao ápice, as siliquis de *Raphanus raphanistrum* demonstram acentuada constrição entre os alojamentos das sementes e o afilamento do ápice não é uniforme (EMBRAPA, 2008).

As flores de *Raphanus sativus* (Figura 1) ocorrem na porção terminal das ramificações, possuem pedicelo com até 2 cm de comprimento; o cálice é formado por 4 sépalas verticais, de cor esverdeada. As pétalas são lilases, podendo, em outros casos, variar de branco ao violáceo, incluindo matizes intermediárias; após a fecundação, perdem sua pigmentação, tornando-se mais claras antes de senescerem. A forma de cruz desenhada pelas pétalas caracteriza todos os biótipos silvestres e cultivados de *Raphanus* e demais brássicas. É essa característica que origina o nome Cruciferae a esse grupo de plantas (EMBRAPA, 2008).

Figura 1 - Partes aéreas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.



Nota: a) Detalhes das folhas e das flores; b) Aspecto geral da planta.

Fonte: Do autor.

2.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

Os vegetais da família Brassicaceae são considerados alimentos básicos em muitas áreas do mundo, são reconhecidos como uma fonte rica em nutrientes, como as vitaminas (carotenoides, tocoferois, ácido ascórbico, ácido fólico), os minerais (Cu, Zn, P, Mg, entre outros), os carboidratos (sacarose e glicose), os aminoácidos (por exemplo, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, histidina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) e diferentes grupos de fitoquímicos, como as fitoalexinas indólicas (brassinina, espirobrassinina, brassilexina, camalexina, 1-metoxiespirobrassinina e éter metil 1-metoxiespirobrassinol) e os compostos fenólicos: as antocianinas, os flavonoides (quercetina e caempferol) e os ácidos hidroxibenzoico, neoclorogênico, clorogênico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico (JAHANGIR et al., 2009).

As espécies desta família também sintetizam grandes quantidades de glicosinolatos, compostos pertencentes ao grupo de glicosídeos que ficam armazenados nos vacúolos celulares dos vegetais. Os glicosinolatos são metabólitos secundários contendo enxofre e nitrogênio encontrados principalmente na família Brassicaceae. Quimicamente, eles se encontram como ânions, com a estrutura básica consistindo de um grupo β -D-tioglicosídeo, um grupo sulfonado e uma cadeia variável (R-), a qual inclui os grupos alquil, alquenil, hidroxialquil, hidroxialquenil, metiltioalquil, metilsulfinilalquil, metilsulfonilalquil, arilalquil e indol (BLAZEVIC et al., 2010). A presença do grupo sulfato na molécula confere propriedades fortemente ácidas aos glicosinolatos. Deste modo, os glicosinolatos não são voláteis e ocorrem como sais (HOLST; WILLIAMSON, 2004).

Quando as células da planta são rompidas, os glicosinolatos ali presentes são hidrolisados, pela enzima mirosinase, originando compostos como os isotiocianatos, os tiocianatos, as nitrilas e os indóis, os quais são conhecidos como potentes substâncias alelopáticas e como eficientes biocidas (NEVES, 2005). Os principais glicosinolatos encontrados na família são: a glicoiberina, a glicorafanina, a glicolissina, a gliconapina, a glicobrassinapina, a gliconastutina e a neoglicobrassicina (JAHANGIR et al., 2009). A figura 2 apresenta o glicosinolato e seus diferentes produtos de hidrólise.

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

Dados recentes revelam que os vegetais crucíferos são excelentes fontes de antioxidantes naturais. Eles contêm níveis elevados de carotenoides, de tocoferóis e de ácido ascórbico, há fortes evidências de que estes compostos ajudam a proteger o corpo humano contra os danos de espécies reativas de oxigênio (CARTEA et al., 2011). Porém, os polifenóis, sem dúvida, são os maiores antioxidantes desses vegetais. Sua inclusão na dieta pode contribuir muito para a redução da incidência de câncer na população humana (JAHANGIR et al., 2009), principalmente cânceres de pulmão, de cólon, de mama, de ovário e de próstata (TANG et al., 2008).

O efeito anticarcinogênico desses vegetais também tem sido atribuído aos produtos de decomposição dos glicosinolatos, dos indóis e dos isotiocianatos, das fitoalexinas e de outros antioxidantes (JAHANGIR et al., 2009).

As folhas e as raízes de *Raphanus sativus* L. também têm sido usadas em várias partes do mundo para o tratamento de câncer e como agente antimicrobiano e antiviral (ARUNA; YERRAGUNI; RAJU, 2012).

Na Rússia, os rabanetes têm sido usados para o tratamento de ambos os tipos de distúrbios da tireoide, pois a rafanina atua controlando a produção de tiroxina e de calcitonina. A goitrina, derivada da ciclização intramolecular do isotiocianato de 3-buten-2-ol, é inibidora da enzima tireoide peroxidase, atua inibindo a oxidação do iodeto a iodo interferindo na biossíntese das tiroxinas T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina). Os ânions tiocianato agem como inibidores competitivos de iodeto, impedindo a absorção pela tireoide (BONES; ROSSITER, 2006).

Os autores, Macharla, Goliand e Sattla (2012) testaram diferentes extratos das folhas de *Raphanus sativus* L. para a avaliação da atividade antidiabética. O trabalho concluiu que o extrato aquoso das folhas mostrou significativa atividade antidiabética quando comparado com o padrão de glibenclamida.

O nabo forrageiro, por apresentar elevados teores de óleo em suas sementes, com relativa facilidade de extração, torna-se importante matéria prima para produção de biodiesel. Essa planta é muito utilizada para a cobertura do solo, incorporação de matéria orgânica ao solo e também para a alimentação animal. O seu rápido crescimento contribui para diminuir a infestação de plantas invasoras, facilitando a implantação da cultura seguinte e minorando os

gastos com herbicidas ou com capinas mecânicas. Além disso, possui longo período de floração, mostrando-se muito útil à produção de mel de boa qualidade (EMBRAPA, 2008).

Recentemente, tem aumentado o interesse nas pesquisas com *Raphanus sativus* L. devido à presença de glicosinolatos e seus produtos de degradação, os isotiocianatos. No entanto, grande parte dos benefícios à saúde é também atribuída aos compostos fenólicos encontrados na espécie.

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

As substâncias fenólicas são caracterizadas por possuir um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais (MORAES-DE-SOUZA, 2007). A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, esses compostos são muito reativos quimicamente, possuem em geral características ácidas, podendo ser isolados por meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, a solução de carbonato de sódio), além disso, podem formar ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (SIMÕES et al., 2001).

Uma característica importante é a capacidade de complexação com os metais, pois muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, também apresentam intensa absorção na região do ultravioleta. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, de luz, de calor ou em meio alcalino, levando ao escurecimento de soluções ou compostos isolados (SIMÕES et al., 2001).

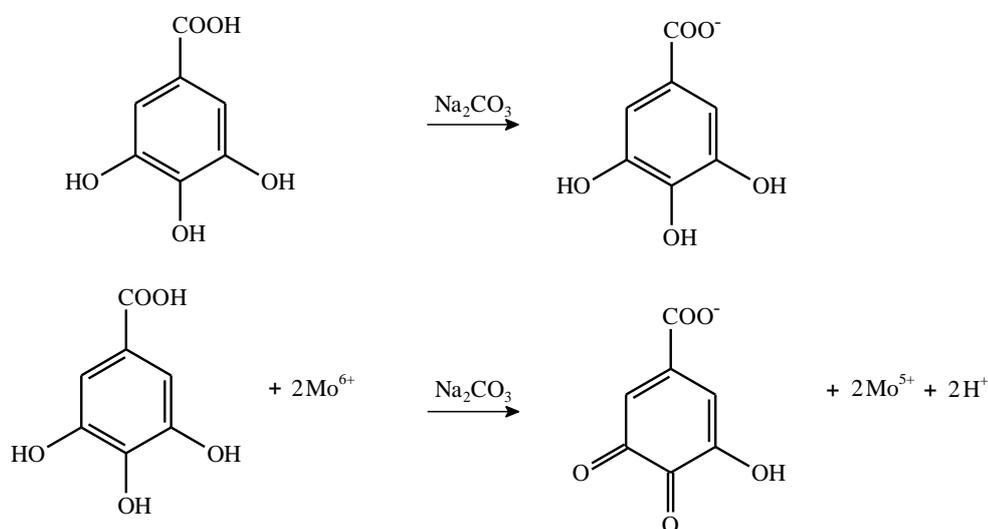
Eles dividem-se em diversas categorias, como os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmico), as cumarinas, os flavonoides, os estilbenos, os taninos condensados e hidrolisáveis, as lignanas e as ligninas. São responsáveis pela cor, pelo sabor amargo, pelo odor e pelas propriedades antioxidantes (KHANAM et al., 2012).

A quantificação espectrofotométrica de substâncias fenólicas é realizada por várias técnicas, entretanto, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é uma das mais utilizadas. O reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstênico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação seis, porém, em presença de compostos fenólicos (agentes redutores), formam-se os chamados molibdênio azul e

tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA et al., 2007).

A Figura 3 mostra a retirada de prótons das substâncias fenólicas (como exemplo, o padrão ácido gálico) em meio alcalinizado com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3), permitindo a formação de ânions fenolatos. A partir daí, ocorre a reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio sofre redução mudando a coloração do meio de amarelo para o azul (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 3 - Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin - Ciocalteu.

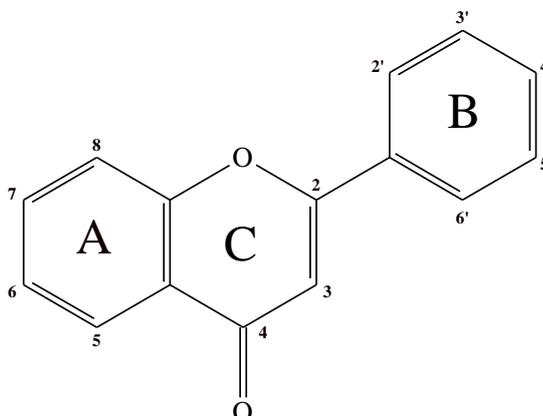


Fonte: OLIVEIRA et al., 2009.

2.4.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja a síntese não ocorre na espécie humana. São substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$, constituídos por dois anéis aromáticos C_6 (A e B) e um anel intermediário C_3 (anel C) que geralmente contém um átomo de oxigênio (Figura 4) (LOPES et al., 2000).

Figura 4 - Núcleo básico dos flavonoides.



Fonte: Dornas et al., 2007.

Frequentemente, os flavonoides apresentam-se oxigenados e conjugados com os açúcares. Eles são chamados de *O*-heterosídeos quando a ligação se dá através de uma hidroxila e *C*- heterosídeos quando a ligação é através de um átomo de carbono. A posição ocupada pela porção açúcar, o grau de insaturação e o grau e a natureza dos substituintes influem grandemente na solubilidade da molécula e na sua capacidade de precipitação em presença de metais (SIMÕES et al., 2010).

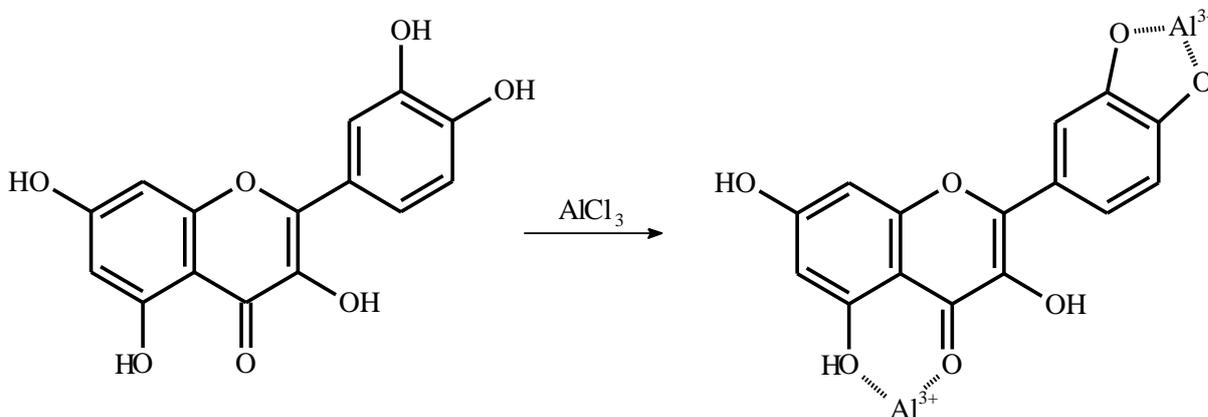
De acordo com as suas características químicas, os flavonoides são separados em diversas classes tais como: as flavonas, os flavonóis, os dihidroflavonoides (flavanonas e flavanonóis), as antocianidinas, os isoflavonoides, as auronas, os neoflavonoides, os biflavonoides, as catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002).

Eles são relatados por possuírem várias propriedades farmacológicas, dentre elas: as atividades antivirais, anti-inflamatória, estrogênica, antimicrobiana, vascular, antioxidante e antitumoral (SIMÕES et al., 2010).

O método para determinar o teor de flavonoides baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com os flavonoides (Figura 5) em metanol ou em etanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, o desvio da absorbância para comprimentos de onda maiores e a intensificação da absorção. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, onde os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de

cloreto de alumínio (AlCl_3), por isso não interferem no doseamento de flavonoides (KALIA, 2008).

Figura 5 - Complexo formado entre a quercetina e o alumínio.



Fonte: WOLLENWEBER et al., 1988.

2.5 ANTIOXIDANTES E MECANISMOS DE AÇÃO ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A produção de energia necessária para as atividades essenciais das células leva à produção de radicais livres em condições normais, dentre eles, o ânion superóxido, o radical hidroxila, o radical peroxila e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete, chamados de "espécies reativas de oxigênio" (EROs) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Quando a geração de espécies reativas de oxigênio em um sistema ultrapassa a capacidade deste sistema de neutralizá-los e de eliminá-los, ocorre o estresse oxidativo. O excesso de EROs pode levar a danos de lipídeos, de proteínas e de DNA celulares, prejudicando suas funções normais. Esses danos podem estar relacionados com a origem do envelhecimento precoce e com diversas doenças humanas, como as doenças cardiovasculares, a inflamação, as doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), a catarata, o declínio do sistema imune, as disfunções cerebrais e o câncer (LOTITO; FREI, 2004).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos sistemas enzimáticos e antioxidantes, os quais podem ter a origem endógena (exemplos, glutaciona

peroxidase, catalase superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e de outras fontes. Destas últimas destacam-se os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os polifenóis, o selênio e os carotenoides. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer as lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUSA et al., 2007).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou de desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com a atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

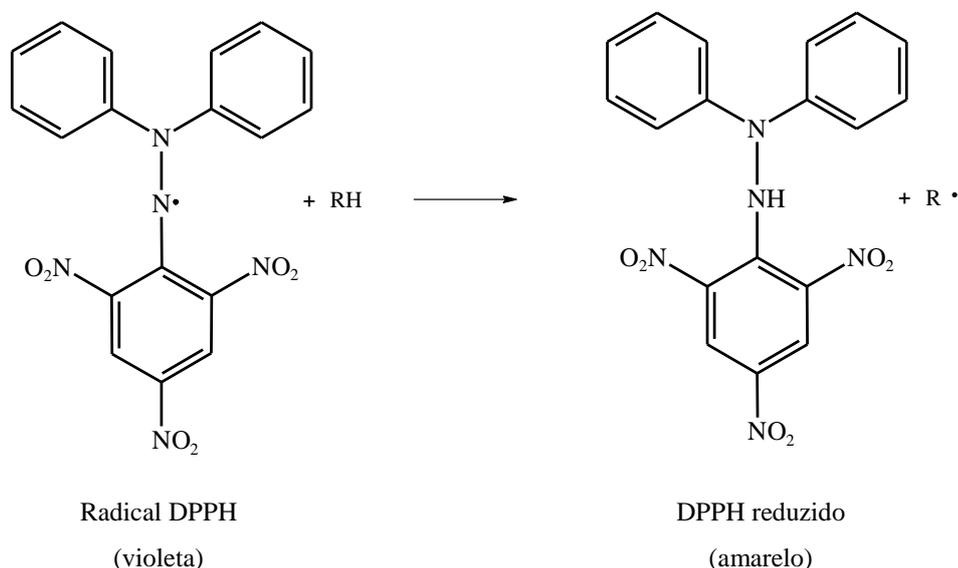
Segundo Reische, Lillard e Eitenmiller (2002), os antioxidantes podem ser classificados em primários e em secundários. Os antioxidantes primários são substâncias com o núcleo fenólico, com várias substituições no anel e atuam diretamente sobre os radicais livres. Por serem melhores doadores de hidrogênio que as moléculas lipídicas insaturadas, os antioxidantes primários doam os átomos de hidrogênio aos radicais livres ($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$ e $\text{R}\cdot$) assim, as espécies inativas são formadas. O radical proveniente do antioxidante é estabilizado por ressonância e, por isso, possui baixa reatividade. Exemplos dessa classe são os antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG), e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ).

Os antioxidantes secundários ou preventivos agem por meio de vários possíveis mecanismos. Tais antioxidantes diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não convertem os radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar os metais pró-oxidantes e desativá-los, repor o hidrogênio para os antioxidantes primários, decompor os hidroperóxidos a espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver a radiação ultravioleta ou agir como sequestrante de oxigênio. Os antioxidantes secundários são classificados como sinergistas, pelo fato de promoverem a atividade dos antioxidantes primários. Pode-se citar o ácido cítrico, o ácido ascórbico e o ácido tartárico como bons exemplos de sinergistas (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais, no entanto, o método do radical DPPH é um dos mais utilizados. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical estável de cor púrpura, que após ser reduzido pelo composto antioxidante, forma o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. É muito utilizado em testes para determinar a potência antioxidante de polifenóis (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela capacidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A propriedade de sequestrar radicais livres por substâncias presentes em vários extratos de plantas, sugere o possível papel protetor destes metabólitos, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, além de outras patologias associadas à formação de radicais livres, em humanos (BORGUINI, 2006). A reação que ocorre com o radical DPPH e o antioxidante, ou sequestrante, pode ser conferida na Figura 6.

Figura 6 - Representação da reação de doação de hidrogênios da molécula antioxidante (RH) para a substância sequestradora de radicais, no caso o radical DPPH.



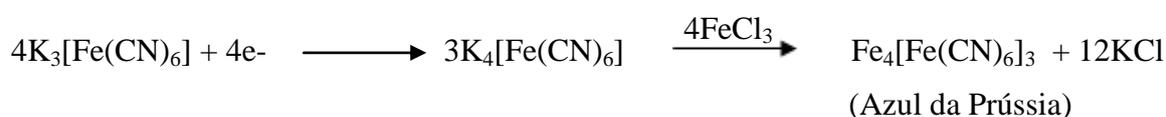
MÁXIMA ABSORBÂNCIA

DIMINUIÇÃO DA ABSORBÂNCIA

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2009.

Os resultados desse ensaio podem ser expressos de diversas maneiras, o radical DPPH reage rapidamente com alguns fenóis, porém existem as reações secundárias lentas que ocorrem concomitantemente, causando um progressivo decréscimo na absorvância, podendo demorar algumas horas para que a reação seja estabilizada. Sendo assim, a melhor interpretação dos resultados do método do DPPH é por meio do CE_{50} (concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução). Esse método foi introduzido por ser um método fácil e preciso para uso em frutas e em extratos vegetais (ATMANI et al., 2009). Quanto menor o valor da CE_{50} , maior a atividade antioxidante.

Outra avaliação da atividade antioxidante *in vitro* realizada neste trabalho foi pelo método do poder redutor das amostras em estudo. Esse método avalia a redução do íon férrico a íon ferroso pelas hidroxilas fenólicas, seguido pela formação do complexo de ferrocianeto ferroso, que apresenta o máximo de absorção a 700 nm. A habilidade dos compostos fenólicos de reduzir o íon férrico depende da hidroxilação e do grau de polimerização destes compostos (PRICE; BUTLER, 1977). A formação do Azul da Prússia é usada para monitorar a concentração de íons Fe^{2+} . Neste ensaio o aumento da absorbância, indica o maior poder redutor, devido à maior concentração do Azul da Prússia formado durante a reação, como demonstrado na reação abaixo:



2.6 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Nos últimos anos, a resistência dos micro-organismos patogênicos à múltiplas drogas aumentou muito devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas (SILVA et al., 2010). Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos micro-organismos resistentes está crescendo e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (AMOROSO, 2002).

Dessa forma, muitos esforços têm sido feitos para descobrir novos compostos antimicrobianos de vários tipos de fontes, tais como os micro-organismos, os animais e as plantas. Os extratos de diversas plantas são conhecidos por produzir as moléculas bioativas que reagem com outros organismos no ambiente e inibem o crescimento de bactérias e de fungos. A ampla variedade de metabólitos secundários, tais como os taninos, os terpenoides, as cumarinas, os alcaloides e os flavonoides possuem a atividade antimicrobiana *in vitro* (SHUKLA, 2011).

O uso de plantas e de preparações feitas a partir delas para o tratamento de infecções é uma prática antiga, utilizada por boa parte da população mundial, principalmente onde há dependência na medicina tradicional, como ocorre em países em desenvolvimento (AHMAD; MEHMOOD; MOHAMMAD, 1998).

Os vegetais são uma excelente fonte para a busca de novas drogas e por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos, eles têm se tornado objeto de estudo científico para o desenvolvimento de novos agentes com atividade farmacológica (NOVAIS, 2003).

Assim, estudos de triagem para a descoberta de novas substâncias com a ação antimicrobiana, podem contribuir significativamente para a saúde mundial, pois além de constituir um recurso terapêutico alternativo, há a possibilidade de isolamento de substâncias que apresentam a eficácia com o menor custo, a menor toxicidade, com os efeitos colaterais mais brandos e a maior disponibilidade de matéria prima (MENEZES et al., 2009).

2.7 LEISHMANIOSES

As leishmanioses humanas consistem em um complexo de enfermidades que acometem as vísceras e a pele, apresentando amplo espectro clínico e podem ser classificadas em visceral e em tegumentar. São causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e a maioria das infecções humanas estão relacionadas com os hábitos e as atividades de indivíduos que exploram ou que habitam matas ou florestas. Recentemente, tem ocorrido um aumento significativo dos casos de leishmaniose em áreas urbanas e periurbanas das grandes cidades do Brasil (SILVA-LÓPEZ, 2010).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e para outros hospedeiros mamíferos é através da picada de vetores. Os vetores são fêmeas conhecidas por flebótomos hematófagos, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. No Novo Mundo, a espécie mais comum é a *Lutzomyia longipalpis* conhecida popularmente como mosquito da terra, mosquito palha, birigui, entre outros (BASANO; CAMARGO, 2004).

Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representam um problema de saúde pública (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Uma das principais aplicações da química de produtos naturais está direcionada para a descoberta de novas substâncias com o potencial farmacológico, através do estudo de extratos de plantas ou por meio da síntese de moléculas análogas que possam ser, em ambos os casos, produzidos em escala industrial (MORAIS; BRAZ FILHO, 2007). Assim, o uso de plantas para a obtenção de novos fármacos tem aumentado devido à necessidade de se combater

micro-organismos resistentes aos fármacos sintéticos atuais e maximizar o controle de doenças endêmicas, como é o caso da leishmaniose (SHARIEF et al., 2006).

2.8 CITOTOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS

Geralmente, os fitoterápicos são muito utilizados por serem mais bem tolerados e por oferecerem menos efeitos colaterais. Além disso, eles são mais aceitos pela população devido ao seu menor custo quando comparados aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000).

Porém, muitas plantas medicinais têm sido utilizadas de forma indiscriminada, sem os estudos que demonstrem sua eficácia e sua segurança. Dessa forma, os novos produtos devem ser analisados por meio de estudos *in vitro* de cultivo celular, seguidos de experimentos em animais, para posterior aplicação clínica em seres humanos (FACURY NETTO et al., 2004).

O teste de citotoxicidade *in vitro* visa analisar o efeito tóxico que o material a ser analisado exerce quando em contato direto com a cultura de células. A avaliação quantitativa da viabilidade celular pode ser realizada por meio de ensaios colorimétricos, utilizando os corantes MTT, brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) e MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-tetrazólio (MOSMANN, 1983).

O MTT é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial resultando no sal de formazan de cor púrpura. Esta redução ocorre somente nas células vivas. Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura, já que é proporcional à quantidade de formazan formados (MOSMANN, 1983).

3 OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos, descritos a seguir, foram estabelecidos de modo a colaborar com a análise farmacognóstica e com a investigação das atividades biológicas da espécie vegetal em estudo.

3.1 GERAIS

Fornecer parâmetros de qualidade para a droga vegetal e realizar o estudo químico e biológico do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

3.2 ESPECÍFICOS

Realizar a análise físico-química da droga vegetal;

Determinar a granulometria da droga vegetal pulverizada;

Obter o extrato seco por liofilização e as suas frações;

Realizar a triagem fitoquímica preliminar do extrato seco por meio de ensaios qualitativos;

Realizar a análise química do extrato seco e das frações por Cromatografia em Camada Delgada;

Realizar a análise química do extrato seco e das frações por Espectrometria de Massas;

Determinar o teor de fenóis totais e de flavonoides no extrato seco e nas frações;

Avaliar a atividade antirradicalar pelo método do poder sequestrante de radicais DPPH do extrato seco e das frações;

Avaliar o poder redutor do extrato seco e das frações;

Avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e leishmanicida do extrato seco e das frações;

Avaliar a citotoxicidade do extrato seco e das frações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O preparo do material vegetal e as análises granulométrica e físico-químicas foram realizados no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Unifal/MG.

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. foram coletadas às 14 horas, em Junho de 2012, em um terreno situado à Avenida Afonso Pena, Bairro Jardim Boa Esperança, município de Alfenas, estado de Minas Gerais, nas coordenadas geográficas: 21°25'22,87"S e 45°57'29,42"O.

A identidade da planta foi confirmada pelo Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva. A exsicata do material botânico foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, Campus Alfenas-MG e registrada sob o número 2279.

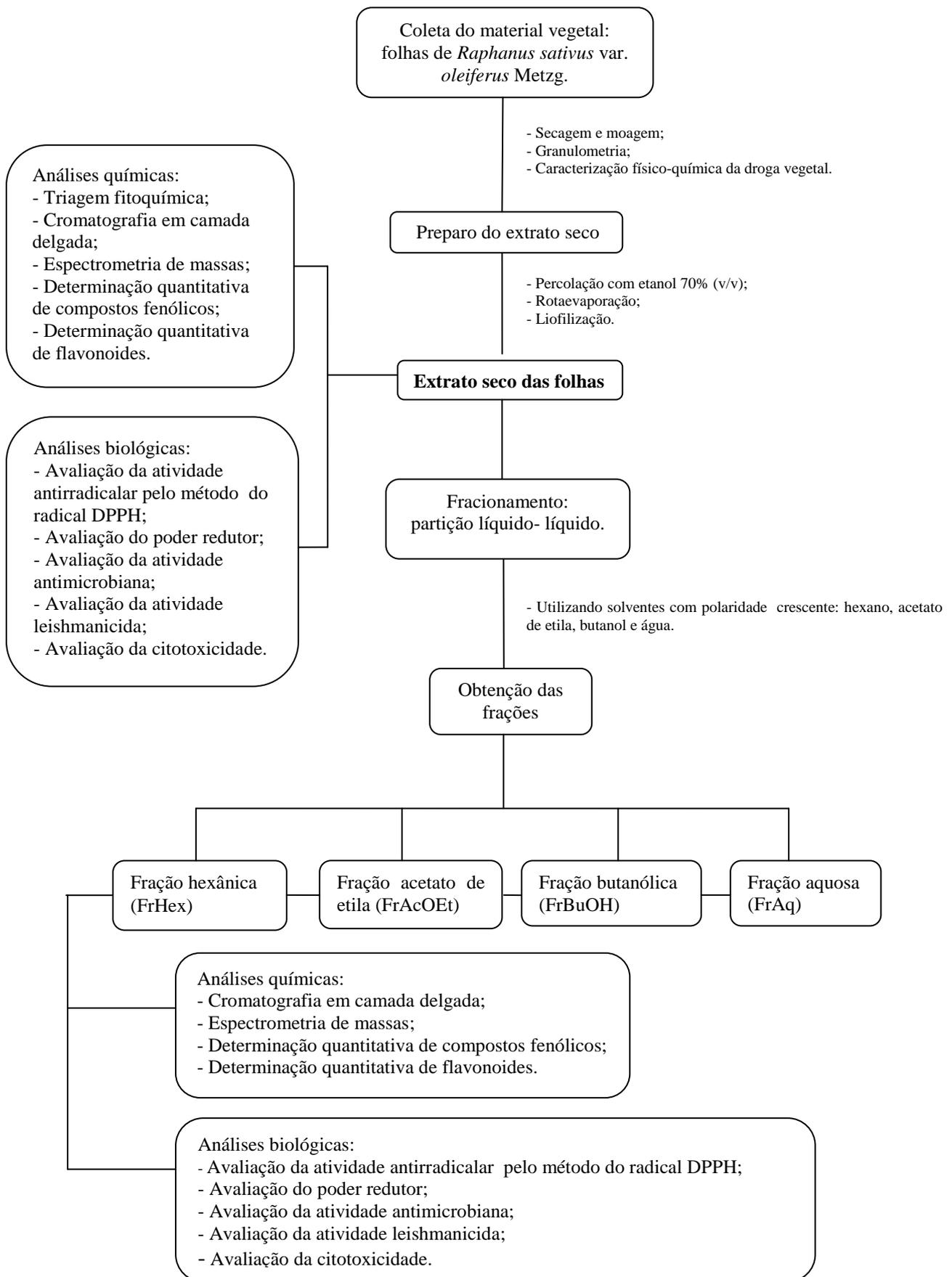
4.1.1 Secagem e moagem

As folhas coletadas foram dispostas em camadas finas, sendo submetidas à secagem em estufa de circulação e de renovação de ar (Solab[®] SL 102) a 45°C, durante 72 horas. O tempo necessário para a completa secagem foi determinado quando o peso de uma amostra permaneceu constante durante três pesagens consecutivas em balança analítica (Shimadzu[®] AY 220). A temperatura da estufa foi controlada por meio de termostato e de termômetro, os quais garantiram a homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem.

Após a secagem, o material vegetal passou por uma divisão grosseira seguida pela pulverização em moinho de facas (Cienlab[®] CE 430). O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

A figura 7 mostra o fluxograma resumindo os procedimentos empregados no estudo.

Figura 7 - Fluxograma representativo dos procedimentos empregados no estudo.



Fonte: Do autor.

4.1.2 Determinação da granulometria

O pó obtido após a moagem foi padronizado quanto ao seu tamanho médio de partícula. A análise granulométrica do material vegetal pulverizado da espécie foi executado segundo critérios descritos na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), utilizando o agitador de Tamises para a Análise Granulométrica – Eletromagnético (BerTel[®]), com os tamises superpostos de malhas 250, 355, 500, 710 e 850 µm, partindo-se do menor ao maior diâmetro.

Inicialmente, calibrou-se as intensidades das vibrações. Foram pesados 50 g da droga vegetal pulverizada e transferidos para o tamis de malha 250 µm (inferior) para serem submetidos a passagem forçada nas intensidades de vibração 3, 5, 7 e 9, com o tempo ajustado em 2 minutos. Verificou-se que a vibração mais adequadas para a análise granulométrica, ou seja, a vibração que apresentou o maior rendimento foi a 7 para o pó das folhas.

Com a vibração pré-estabelecida, 150 g da droga vegetal pulverizada foram transferidos para o tamis de malha 850 µm (superior) e submetidos a agitação por 20 minutos. Em seguida, as quantidades de pós retidos em cada tamis foram pesadas e os tamanhos médios das partículas foram mensurados. Após a tamisação, o percentual de partículas retidas em cada tamis foi representado na forma de histogramas, a distribuição das partículas foram expressas pela referência à abertura nominal da malha dos tamises utilizados.

Para o cálculo do tamanho médio das partículas (tm) foi utilizada a seguinte expressão, dada por Ansel, Popovich e Allen (2000):

$$tm = \frac{\sum (\% \text{ retida}) \cdot (\text{abertura média})}{100}$$

4.1.3 Caracterização físico-química da droga vegetal

As folhas pulverizadas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. foram submetidas a ensaios físico-químicos referentes ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal, de acordo com as metodologias propostas a seguir. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média ± desvio padrão (DP).

4.1.3.1 Determinação do pH

Uma solução a 1% (p/v) do pó da droga vegetal pulverizada em água foi aquecida até ebulição em chapa-elétrica por 5 minutos. Após este tempo, a solução foi filtrada em algodão. Após o resfriamento mediu-se o pH do filtrado e da água utilizando o potenciômetro previamente calibrado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

4.1.3.2 Determinação da densidade aparente

Para este teste, utilizou-se uma proveta de 250 mL previamente pesada. Preencheu-se a proveta com a da droga vegetal pulverizada até a marca de 250 mL. Em seguida, a proveta cheia foi novamente pesada. Do peso final, foi subtraído o peso da proveta vazia e em seguida foi calculada a densidade aparente não compactada do pó por meio da relação massa/volume do pó (MARTINS e SACRAMENTO, 2004).

4.1.3.3 Determinação da perda por secagem

Cerca de 100 g do material vegetal fresco foram colocados para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45°C. O material vegetal foi pesado diariamente até o peso constante e os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou de água percentual, pela média de três determinações (MELLO e PETROVICK, 2000).

4.1.3.4 Determinação da perda por dessecação

Cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada foi transferida para o pesa-filtro previamente dessecado durante 30 minutos. Após resfriamento em dessecador, o pesa-filtro com a amostra foi tampado e pesado. Agitou-se o pesa-filtro brandamente para distribuir a amostra da

maneira mais uniforme possível, a uma altura ideal de 5 mm. Em seguida o pesa-filtro foi colocado na estufa, retirou-se a tampa, deixando-a também na estufa. A amostra foi seca a 105°C pelo prazo determinado de 2 horas. Após esfriar até a temperatura ambiente em dessecador, o pesa-filtro foi pesado. A operação foi repetida até o peso constante (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

em que:

Pa = peso da amostra,

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

4.1.3.5 Determinação de cinzas totais

Pesou-se 3 g da droga vegetal pulverizada e transferiu-se para o cadinho previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada gradativamente, a temperatura no máximo de $600 \pm 25^\circ\text{C}$, até que todo o carvão fosse eliminado. O gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C) foi utilizado. Em seguida, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca ao ar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.1.3.6 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido, sobre o papel de filtro, isento de cinza, lavando-o

com a água quente até que o filtrado mostrou-se neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi recolhido para o cadinho original, seco sobre a chapa quente e incinerado a cerca de 500°C até o peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada em relação à droga seca ao ar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.1.3.7 Determinação do teor de extrativos

Pesou-se 4,0 g de droga vegetal pulverizada em erlenmeyer. Adicionou-se 100 mL do líquido extrator e pesou-se para obter o peso total, incluindo o frasco. Agitou-se e deixou descansar por 1 hora. Em seguida, o erlenmeyer foi acoplado ao condensador de refluxo, sendo submetido a aquecimento por 1 h, depois de esfriado, pesou-se. Após o refluxo, o peso original foi corrigido com o solvente especificado no ensaio para a droga vegetal. Misturou-se bem e filtrou-se. Transferiu-se 25 mL do filtrado para uma cápsula de porcelana tarada, deixando sob a evaporação até seca em banho de água a 105°C por 6 h, esfriou-se em dessecador por 30 min e, imediatamente, pesou-se. A porcentagem de materiais extraídos foi calculada em mg/g de material seco (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2 PREPARO DO EXTRATO SECO E DAS FRAÇÕES

Os preparos do extrato seco e das frações e as análises químicas qualitativas e quantitativas foram realizados no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Unifal/MG.

4.2.1 Extrato seco

As soluções extrativas foram obtidas por meio do método de extração exaustivo de percolação simples segundo Prista, Alves e Morgado (2008). O processo teve início com o intumescimento prévio do pó com etanol 70% (v/v) durante 1 hora fora do percolador. Após

esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70% v/v). O empacotamento foi feito de forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou de buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. O álcool 70% foi adicionado aos poucos, até cobrir a superfície do pó, a mistura foi deixada em maceração por 48 horas. Após este período procedeu-se a percolação na vazão de 1,0 a 2,0 mL/min.

Após a extração, os percolados foram concentrados em rotaevaporador (Fisatom® 801), a temperatura de 50°C. O extrato hidroetanólico concentrado foi transferido para vidros tarados e armazenados em geladeira até o momento da secagem em liofilizador (Liotop® L101).

Posteriormente, o extrato hidroetanólico foi congelado e submetido ao processo de liofilização nas condições ideais de pressão (380 µHg), de temperatura (-40°C) e de tempo de liofilização (72 horas). O rendimento do extrato seco foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal}) \times 100$. Após a obtenção do extrato seco, o produto foi acondicionado em frascos âmbar, hermeticamente fechados, e mantidos em dessecador provido de sílica, até o momento de uso.

4.2.2 Obtenção das frações

Uma alíquota de 5 g do extrato seco foi solubilizada em 250 mL de água. Esta solução foi transferida para um funil de separação e submetida ao processo de extração líquido-líquido (partição) com hexano:água (1:1, v/v) (quatro vezes), seguido por acetato de etila:água (1:1, v/v) (quatro vezes) e por butanol:água (1:1, v/v) (quatro vezes). Após a extração, as frações foram concentradas em rotaevaporador (Fisatom®) até a eliminação do solvente orgânico e posteriormente, concentradas até secura em capela, obtendo-se as frações hexânica (FrHex), acetato de etila (FrAcOEt), butanólica (FrBuOH) e aquosa (FrAq). Os rendimentos das frações foram calculados com base na massa de resíduo seco obtido em relação a alíquota inicial do extrato seco.

4.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A detecção dos principais grupos de substâncias presentes no extrato seco foi obtida por meio de reações químicas qualitativas, que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou de precipitado característico. Os testes foram realizados em triplicata, segundo as metodologias propostas a seguir.

4.3.1 Taninos

Uma alíquota de 1 g de extrato seco foi dissolvida em 10 mL de água destilada. Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro. Separou-se cinco porções de 2 mL em tubos de ensaios e adicionou-se separadamente 1 a 2 gotas dos seguintes reativos: solução alcoólica de cloreto férrico a 1% (m/v), acetato de cobre 3% (m/v), solução de gelatina 2,5% (m/v), cloridrato de quinino 5% (m/v), e solução alcoólica de vanilina 1% (m/v) (CARDOSO, 2009).

4.3.2 Alcaloides

Uma alíquota de 1 g do extrato seco foi dissolvida em 5 mL de solução de ácido clorídrico a 5% (v/v). Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro. Separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionou-se separadamente 3 gotas dos seguintes reativos: Mayer, Bouchardat, Dragendorff e Bertrand (CARDOSO, 2009).

4.3.3 Flavonoides

Uma alíquota de 1 g do extrato seco foi dissolvida em 5 mL de etanol. A mistura foi filtrada e testada com: solução alcoólica de cloreto de alumínio a 5% (m/v), solução alcoólica de cloreto férrico 1% (m/v) e pelo reagente de Shinoda (CARDOSO, 2009).

4.3.4 Antraquinonas

Uma alíquota de 1 g do extrato seco foi dissolvida em 5 mL de etanol. A mistura foi filtrada e em seguida foram realizadas as reações de Bortranger direta (pesquisa de antraquinonas livres) e de Bortranger indireta (para pesquisa de O-heterosídeos e C-heterosídeos) (CARDOSO, 2009).

4.3.5 Saponinas

Saponina espumídica: 0,5 g do extrato seco foi dissolvido em 5 mL de água destilada. Em seguida, dilui-se para 15 mL e agitou-se vigorosamente durante 2 min em tubo fechado. É considerado um resultado positivo quando a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora.

Saponina hemolítica: 0,5 g do extrato seco foi dissolvido em 2 mL de solução de etanol a 80%. Preparou-se 20 mL de suspensão de hemácias a 5% (v/v) em solução de cloreto de sódio 0,85% (m/v). Misturou-se 10 mL da suspensão a 1 mL do extrato em solução etanólica, homogeneizou-se cuidadosamente, deixando em repouso durante 5 min. Repetiu-se o mesmo procedimento para os 10 mL de suspensão restante, porém, substituindo o extrato em solução por solução de cloreto de sódio 0,85%. Centrifugou-se as duas preparações durante 5 min a 3500 rpm. A coloração vermelha ou rósea no líquido sobrenadante, é considerada evidência de hemólise, quando comparada ao teste em branco (BARBOSA et al., 2001).

4.3.6 Polissacarídeos

Uma alíquota de 1 g de extrato seco foi dissolvida em 10 mL de água destilada. Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro. Separou-se cinco porções de 2 mL em tubos de ensaios e adicionou-se separadamente 1 a 2 gotas dos seguintes reativos: Benedict (presença de açúcares redutores); Fehling e Tollens (presença de aldoses); Molish (açúcares no geral) e floroglucinol (presença de pentoses) (BARBOSA et al., 2001).

4.3.7 Esteroides e triterpenoides

Uma alíquota de 1 g do extrato seco foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio. Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro. O filtrado foi dividido em três porções de 2 mL em tubos de ensaio e realizou-se as reações de: Liebermann-Burchard; Baljet e Keller-Kiliani (CARDOSO, 2009).

4.4 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

O extrato seco e as frações foram dissolvidos em metanol a fim de se obter uma concentração de 1 mg/mL, em seguida 10 µl de cada amostra foram aplicados a 0,5 cm da base de placas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (5 x 5 cm).

Foram utilizadas como fase móvel dois sistemas de solventes: clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4, fase orgânica) e clorofórmio:metanol:água (43:37:20, fase orgânica), nos quais as placas foram eluídas. Os solventes percorreram 4 cm a partir do ponto de aplicação das amostras. Em seguida, as cromatoplasmas foram reveladas com o anisaldeído sulfúrico e aquecidas em estufa a 100 °C. As classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER; BLANDT; ZGAINSKY, 2009).

4.5 ANÁLISE QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Estadual de São Paulo (Unesp), Câmpus Experimental do Litoral Paulista.

Os espectros de massas foram obtidos no Espectrômetro de Massas LTQ XL da Thermo Scientific Linear 2D, equipado com o dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). O extrato e as frações foram analisados no modo de ionização por electrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e a análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os

demais experimentos em múltiplos estágios (MS^n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -41 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N_2) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LTQ XL.

4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais foi feita em espectrofotômetro Shimadzu TCC 240 A no comprimento de onda de 750 nm, de acordo com Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventos, (1999).

Alíquotas das amostras foram diluídas em etanol absoluto para se obter uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. A 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e em seguida, foram acrescentados aos tubos 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 4% (m/v). Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 750 nm (correspondente ao pico de absorção dos óxidos de molibdênio e de tungstênio), ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto, que substitui a solução da amostra.

Os mesmos procedimentos foram realizados com o ácido gálico em solução etanólica, nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$, a fim de se obter a curva analítica: $C = 75,25 \cdot A + 0,933$, onde C é a concentração de ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. A quantidade de fenóis foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração e os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

A determinação do teor de flavonoides foi realizada em Espectrofotômetro Shimadzu TCC 240 A no comprimento de onda de 425 nm, de acordo com Kalia et al. (2008).

As alíquotas das amostras foram diluídas em etanol absoluto para se obter as concentrações de 1000 µg/mL. A 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 1,5 mL de etanol absoluto, em seguida foi adicionado 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 10% (m/v) e posteriormente 0,1 mL de acetato de potássio (CH_3COOK) 1M (m/v). O volume da solução foi completado para 5 mL com 2,8 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos. Por último, foram feitas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm, correspondente ao pico de absorção do quelato quercetina-alumínio, ajustando o zero de absorbância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto, que substitui a solução da amostra.

Os mesmos procedimentos foram realizados com a quercetina em solução etanólica, nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica: $C = 138,9 \cdot A + 0,359$, onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 425 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. A quantidade de flavonoides foi determinada pela interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração e os valores foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata.

4.8 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

O extrato seco e as frações foram dissolvidos em metanol a fim de se obter uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida 10 µL de cada amostra foram aplicados a 0,5 cm da base de uma placa cromatográfica de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (5 x 5 cm). A placa foi eluída em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, fase orgânica) e após a secagem, foi nebulizada com solução de 0,4 mmol/L do radical DPPH em etanol (SOLER-RIVAS; ESPÍN; WICHERS, 2000) e foi observada até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antirradicalar.

4.9 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) do extrato seco e das frações foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen, Chang, Duh (2005), com modificações, monitorando-se o consumo do radical DPPH pelos componentes das amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações.

Foram preparadas as soluções das amostras em etanol nas concentrações de 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,56 µg/mL, utilizou-se como padrões de ácido ascórbico e de BHT nas mesmas concentrações das amostras. Adicionou-se 2,0 mL da solução das amostras a serem testadas a 0,5 mL de solução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob a proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram feitas as leituras das absorvâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, constituída de todos os reagentes e 2 mL de etanol absoluto, que substitui a solução das amostras. A propriedade de sequestro foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação:

$$\text{Sequestro de radical DPPH (\%)} = [(absorvância do branco - absorvância da amostra) / (absorvância branco)] \times 100.$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em % de sequestro do radical DPPH e pelo CE₅₀.

4.10 AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR

A avaliação do poder redutor do extrato seco e das frações foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yildirim, Oktay e Bilaloglu (2001) *apud* Yildirim, Mavi e Kara (2001) com modificações. Foram preparadas as soluções das amostras em etanol nas concentrações de 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Utilizou-se como padrões o ácido ascórbico e o BHT nas mesmas concentrações das amostras. Uma alíquota de 1,0 mL de amostra foi transferida para tubos de ensaio de 25 mL. A esta alíquota

foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 ml de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN_6)]$) (1%, m/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Uma porção de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%, m/v) foi adicionada à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Em seguida, 2,5 mL da mistura foram pipetados e transferidos para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico ($FeCl_3$) (0,1%, m/v). A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro UV/Vis.

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no laboratório de Microbiologia Básica da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG).

4.11.1 Método de difusão em ágar

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada a metodologia proposta no documento M7-A6 (CLSI, 2003) para as bactérias, M24-A2 (CLSI, 2011) para as micobactérias e M44-A2 (CLSI, 2009) para os fungos.

O extrato seco e as frações foram dissolvidos em água destilada a fim de se obter a concentração de 50 mg/mL. Adicionou-se gotas de DMSO às amostras que não se dissolveram completamente em água. Foram preparadas placas de ágar Muller-Hinton para as bactérias e ágar Muller-Hinton com 1% (v/v) de glicose para as leveduras e, posteriormente foram feitos os poços de 4 mm de diâmetro na superfície do ágar com auxílio de um tubo de metal.

As suspensões microbianas foram preparadas em soro fisiológico com a turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Estas suspensões foram inoculadas nas superfícies do ágar com o auxílio de swab. Após a secagem do inóculo, foram colocados 40 µl do extrato e das frações estéreis nos poços. Foram utilizados como controle positivo uma solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (v/v) e como controle negativo água destilada estéril. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, exceto as placas com os fungos, que

permaneceram incubadas por 48 horas. Após a incubação foi feita a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano em volta dos poços, utilizando uma régua milimetrada.

Para a atividade antimicobacteriana foi utilizada a técnica de difusão em meio Middlebrook 7H10 Agar adicionado de Middlebrook OADC Enrichment. As suspensões de micobactérias foram preparadas em soro fisiológico com a turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Estas suspensões foram inoculadas no Agar Middlebrook 7 H10, após a secagem do inóculo, os discos de papel de filtro secos, anteriormente embebidos com 10 µL do extrato e das frações (50 mg/mL) foram colocados na superfície do meio, utilizando como controle positivo a Rifamicina 30 µg e como controle negativo a água destilada. As culturas foram incubadas a 37° C por 28 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11.2 Micro-organismos avaliados

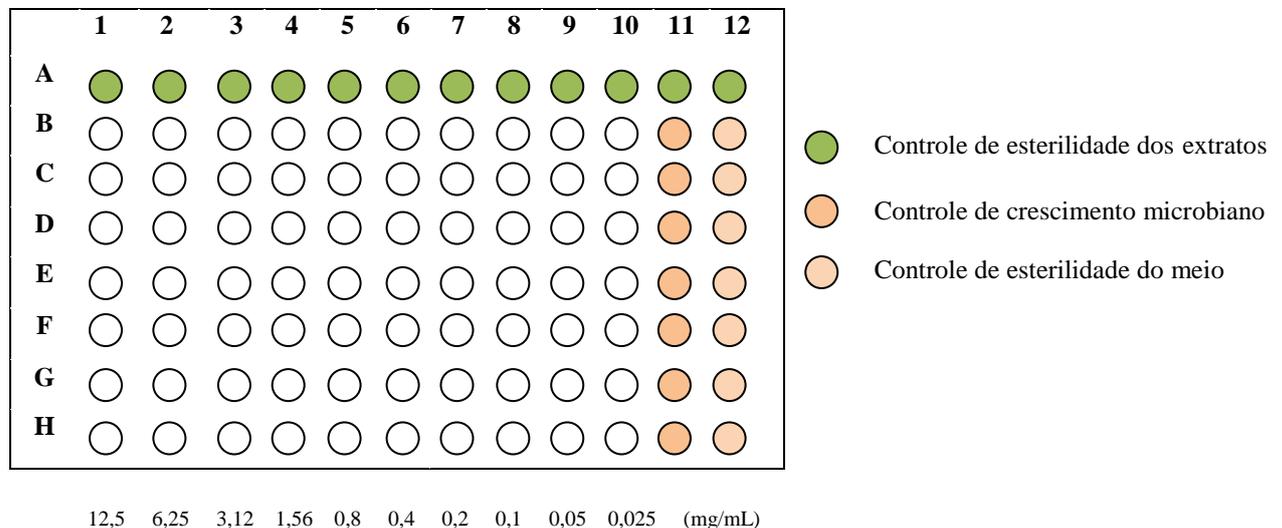
Os micro-organismos utilizados para a pesquisa foram as cepas-padrão (*American Type Culture Collection*) mantidas no laboratório de Microbiologia da Unifal-MG e recomendadas para testes de suscetibilidade a antimicrobianos (CLSI, 2009), constaram de bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25922), *Salmonella tify* (ATCC 14028), *Enterobacter cloacae* LMI-Unifal; bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e as micobactérias: *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177(H37Ra) e *Mycobacterium bovis* (amostra BCG).

4.11.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi determinada nas amostras que apresentaram a atividade inibitória de crescimento microbiano no teste de difusão em ágar, de acordo com o documento M27A3 (CLSI, 2008). O extrato seco e as frações foram dissolvidos em água estéril a fim de se obter a concentração inicial de 25 mg/mL. A partir desta, foram

realizadas as diluições até a concentração de 0,025 mg/mL. Foram adicionadas gotas de DMSO às amostras que não se dissolveram completamente em água. Os testes foram realizados em microplacas estéreis de 96 orifícios. As linhas de A a H, da coluna de 1 (Figura 8), foram preenchidos com 100 µL do caldo Mueller Hinton duas vezes concentrado estéril e 100 µL das amostras, os orifícios de B a H das colunas 2 a 10 foram preenchidos com 100 µL do caldo Mueller Hinton uma vez concentrado. Após isso, prosseguiram-se as diluições da coluna 1 a 10, de modo que obtivesse concentrações decrescentes do extrato e das frações. Sequencialmente, foram adicionados nos orifícios de B a H, das colunas 1 a 11, 10 µL da suspensão microbiana com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland. Foram reservados os orifícios para os controles, sendo: os orifícios da linha A, das colunas de 1 a 12 para o controle de estabilidade do extrato e das frações; os orifícios de B a H da coluna 12 para o controle de estabilidade do meio de cultura; os orifícios B a H da coluna 11 para o controle de crescimento microbiano. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi feita a partir do último tubo onde não houve a turvação.

Figura 8 - Esquema de diluição seriada em microplaca de 96 orifícios, mostrando a distribuição das linhas e colunas, utilizada para a avaliação da CIM.



Fonte: Do autor.

4.11.4 Avaliação da atividade total, do índice de susceptibilidade e do percentual de atividade.

A atividade antimicrobiana total (AT) foi calculada como a razão entre a quantidade (em mg) do material extraído, por 1 g de planta e a concentração inibitória mínima (ELOFF,

2004). O índice de susceptibilidade foi calculado como a razão entre o número de extratos efetivos contra cada micro-organismo e o total de extratos vegetais testados. O percentual de atividade foi calculado como a razão entre número de cepas susceptíveis aos extratos vegetais e o total de cepas microbianas testadas. Os resultados foram multiplicados por cem e expressos em porcentagem (BONJAR, 2004).

4.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTA

Os ensaios da atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Biologia molecular da Unifal-MG.

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), foram cultivadas em placa de 24 poços em meio Schneider's Drosophila suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado e 1% de penicilina (10000 µL/mL)/estreptomicina (10 mg/mL). Os parasitas foram coletados, ressuspensos em meio alcalino, contados em câmara de Neubauer e ajustados a concentração de 1×10^6 células/mL. O extrato seco e as frações foram dissolvidos em DMSO (0,6%, v/v) em concentrações variando de 0,1 a 40 µg/mL e foram adicionados às culturas de promastigotas a 1×10^6 células/mL, em seguida foram incubados a 25°C. Após 72 horas de incubação, os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com os controles, com apenas DMSO na concentração de 0,6% (v/v) (PEREIRA et al., 2010). Todos os testes foram realizados em triplicata e a anfotericina B foi utilizada como o medicamento de referência.

4.13 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade, foram utilizados os macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO₂, dispostos em placas de 24 poços na razão de 8×10^5 por poço, aos quais foram adicionados o extrato e as frações a serem avaliados em várias concentrações (0,1 a 160 µg/mL) e incubados por 72 horas. Após o período de incubação foram adicionados 50 µL de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) a cada poço, com nova incubação por 4 horas. As células foram lisadas com DMSO e avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm

comparando ao controle sem adição de drogas (PEREIRA et al., 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar Versão 5.3/DEX-UFLA (Copyrigh, 1999-2010), onde se realizou a Análise de Variância (ANAVA) seguida do teste de Scott e Knott (1974) em nível de significância de 5%.

As análises de correlação foram realizadas no software BioEstat, Versão 5.0 e os resultados foram obtidos pelo coeficiente de correlação de Spearman (r).

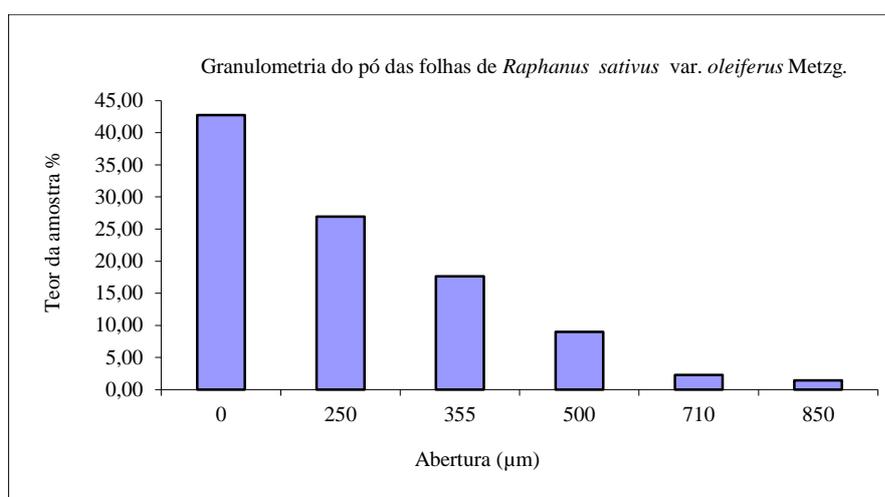
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão foram apresentados de acordo com as sequências apresentadas nas metodologias.

5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

A granulometria do pó obtido das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. permite afirmar que a maior parte das partículas encontra-se entre a faixa granulométrica de 250 μm a 500 μm , como apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Distribuição da porcentagem do pó das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. retido em cada tamis.



Fonte: Dados do autor.

De acordo com as especificações da FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), o pó das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. obtido em moinho de facas pode ser classificado como um pó moderadamente grosso, o qual se refere àquelas partículas que passam quase em sua totalidade pelo tamis com a abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm .

Os pós de tamanho maior, como os desta classificação, favorecem os processos extrativos, pois as partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e isso impede a penetração de solventes. O pó moderadamente grosso

também apresenta a vantagem de evitar a formação de aglomerados, já que as partículas muito pequenas quando em contato com o líquido extrator podem entupir os filtros de percoladores durante os processos de extração (MENDES et al., 2011).

Tendo em vista que o processo de moagem resulta em partículas irregulares, determinou-se também o tamanho médio das partículas através das determinações granulométricas apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Abertura da malha (μm)	Abertura média (mm)	Peso retido * (g)	Peso retido %	% retida x abertura média
0**	0,125	46,06	42,76	5,35
250	0,3025	27,749	26,92	8,14
355	0,4275	28,986	17,64	7,54
500	0,605	33,253	8,97	5,43
710	0,780	8,108	2,28	1,78
850	0,850	5,844	1,43	1,22
		150	100	29,45

*Média de três determinações.

**Fundo coletor.

Fonte: Dados do autor.

O valor do tamanho médio das partículas do pó apresentado foi de 0,2945 mm. A granulometria do material vegetal pulverizado interfere no rendimento final do extrato, quanto ao teor de extrativos. Quanto maior a superfície de contato da droga vegetal com o líquido extrator, maior o rendimento (MIGLIATO et al., 2007). Portanto, a avaliação granulométrica do material vegetal pulverizado é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido, visto que representa a influência direta sobre a eficiência do processo extrativo (SIMÕES, 2010).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA DROGA VEGETAL

Tendo em vista as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010) e a inexistência de estudos de controle da qualidade da droga vegetal *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg, descreveu-se o seu perfil físico-químico, de modo que pudesse colaborar

com os preceitos da qualidade para o uso da droga vegetal proposta como matéria-prima ou insumo fitoterápico. Os resultados foram apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização físico-química da droga vegetal.

Parâmetros	Resultados *
pH	5,46 ± 0,05
Densidade aparente (g/mL)	0,340 ± 0,002
Perda por secagem (%)	89,28 ± 0,94
Perda por dessecação (%)	6,5 ± 0,18
Cinzas totais (%)	18,04 ± 0,12
Cinzas insolúveis em ácido (%)	0,32 ± 0,09
Teor de extrativos em água (mg/g)	73,5 ± 12,1
Teor de extrativos em álcool 70% (mg/g)	309,0 ± 26,4

* Resultados expressos como a média de três determinações ± desvio padrão.

Fonte: Dados do autor.

O valor de pH da droga foi de 5,46 (Tabela 2), utilizando-se a água com pH de 6,56, o que sugere a presença de substâncias ácidas no insumo estudado (HUBINGER;SALGADO; MOREIRA, 2009). Os níveis de pH podem afetar a atividade de antimicrobianos (VOLPATO, 2005), sendo assim, o seu conhecimento tem correlação direta com a capacidade do fitoterápico interferir no desenvolvimento de micro-organismos. Segundo Carvalho (2008), o pH dos insumos fitoterápicos estão de acordo com a RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA (RDC) nº 14/2010 (BRASIL, 2010) quando se encontram entre os valores de 4 e 6.

O valor da densidade aparente foi de 0,340 g/mL (Tabela 2), esta determinação constitui-se uma exigência estabelecida pela RDC nº 14/2010 (BRASIL, 2010). As variações no resultado dessa análise podem estar relacionadas à redução do tamanho das partículas, portanto a granulometria do material vegetal representa a influência direta sobre a determinação da densidade aparente. Partículas com maior grau de divisão tendem a ocupar um menor volume, dessa forma necessita-se de uma maior massa de droga vegetal para ocupar um dado volume determinado, apresentando assim uma maior densidade aparente (SALVI JUNIOR, 2013).

Concomitantemente ao processo de secagem da espécie vegetal determinou-se a perda de água e/ou de substâncias voláteis. A estabilização de uma amostra de 100 g da droga

vegetal deu-se após 72 horas do início do processo de secagem, com a obtenção de uma massa constante de 10,72 g, após três pesagens consecutivas. O resultado obtido foi de 89,28% de perda de água e/ou de substâncias voláteis durante a secagem (Tabela 2). A determinação da perda por secagem tem o objetivo de impedir que a droga permaneça úmida após uma secagem ineficiente ou que ocorra a deterioração dos compostos metabólitos secundários de interesse por secagem excessiva.

A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal seca. O valor obtido na análise foi de 6,5% (Tabela 2), este resultado não ultrapassou o valor máximo de 14%, estabelecido pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010), portanto é possível inferir quanto a sua estabilidade microbiológica e química, uma vez que os teores de umidade acima do especificado possibilitam o desenvolvimento de fungos e de bactérias, a hidrólise e a atividade enzimática com conseqüente deterioração de constituintes químicos (HUBINGER; SALGADO; MOREIRA, 2009).

Os valores obtidos nas análises de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido foram 18,04% e 0,32%, respectivamente (Tabela 2). A literatura não relata valores limites de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido em espécies do gênero *Raphanus*, sendo assim, esses valores podem ser utilizados como parâmetros para as pesquisas posteriores. O principal objetivo da determinação de cinzas totais é a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. As cinzas insolúveis em ácido são indicativas da presença de terra, pois representa a porcentagem de silicatos devendo estes ser quantificados para uma melhor padronização da droga vegetal e evitar os efeitos adversos pelo seu uso, portanto o método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

As substâncias extrativas obtidas de drogas vegetais dependem de sua própria natureza e/ou da classe das substâncias de interesse e, do solvente utilizado no processo de extração dessas substâncias, os resultados do teor de extrativos demonstraram que a extração com etanol/água foi mais eficiente (309 mg/g) que a extração utilizando somente a água (73 mg/g) (Tabela 2).

A importância do estabelecimento de parâmetros referentes aos controle de qualidade do material vegetal garante a confiabilidade nos resultados obtidos nos ensaios químicos e biológicos, para que a droga seja futuramente utilizada com finalidade fitoterápica (SALVI JÚNIOR, 2013).

5.3 RENDIMENTO DO EXTRATO SECO E DAS FRAÇÕES

O rendimento do extrato seco foi de 29,198%, os rendimentos das frações obtidas por partição líquido-líquido a partir de 5 gramas do extrato seco estão apresentados na tabela 3, observa-se que a fração butanólica apresentou o maior rendimento (30,40%) e a fração acetato de etila apresentou o menor rendimento (5,88 %).

Tabela 3 - Rendimento das frações obtidas a partir de 5 g do extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. em ordem crescente de polaridade.

Material	Quantidade obtida de frações	Rendimento
FrHex	0,513 g	10,26%
FrAcOEt	0,294 g	5,88 %
FrBuOH	1,520 g	30,40%
FrAq	1,106 g	22,12%

Legenda: FrHex - fração hexânica; FrAcOEt - fração acetato de etila; FrBuOH - fração butanólica; FrAq- fração aquosa.

Fonte: Dados do autor.

De acordo com SIMÕES (2010), os lipídeos, as ceras e os pigmentos são as substâncias preferencialmente extraídas com o hexano, alguns flavonoides são extraídos com o acetato de etila e o *n*-butanol, e os heterosídeos em geral, tais como os taninos são os metabólitos majoritariamente encontrados em solventes mais polares, como o *n*-butanol e a água.

O processo de fracionamento possibilita a obtenção de compostos ativos mais concentrados, o que muitas vezes favorece a ação biológica. Porém, isso não ocorre sempre, em alguns casos ocorre a redução da atividade, denotando a perda de atividade durante o fracionamento ou então que a atividade estava relacionada com o efeito sinérgico de vários componentes.

5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Os resultados da análise fitoquímica preliminar do extrato seco foram referentes ao desenvolvimento de coloração e/ou de precipitado característico dos grupos de substâncias presentes na droga vegetal. Os resultados das análises estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Análise fitoquímica preliminar do extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Constituintes analisados	Reações químicas	Extrato seco das folhas
Taninos	Cloreto férrico	Positivo
	Acetato de cobre	Positivo
	Precipitação com proteínas	Positivo
	Precipitação com alcaloides	Positivo
	Vanilina	Positivo
Alcaloides	Mayer	Negativo
	Bouchardat	Negativo
	Dragendorff	Negativo
	Bertrand	Negativo
Flavonoides	Shinoda	Positivo
	Cloreto de alumínio	Positivo
	Cloreto férrico	Positivo
Antraquinonas	Bornträger direta	Negativo
	Bornträger indireta	Negativo
Saponinas	Persistência de espuma	Negativo
	Formação de hemólise	Negativo
Polissacarídeos	Tollens	Positivo
	Benedict	Positivo
	Fehling	Positivo
	Molish	Positivo
	Floroglucinol	Positivo
Esteroides /Triterpenos	Lieberman-Burchard	Positivo
	Salkowski	Positivo
	Baljet	Negativo
	Keller-Kiliani	Positivo

Fonte: Do autor

Dentre os grupos de metabólitos secundários pesquisados nos ensaios fitoquímicos (Tabela 4), foi possível detectar a presença de: **taninos**, a partir da *reação com os sais de ferro* (FeCl_3), pela coloração azul formada, *reação com o acetato de cobre*, pela formação de precipitado esbranquiçado, *reação com a gelatina* (proteína), pela formação de precipitado, *reação com os alcaloides*, pela turvação e formação de precipitado; *reação com a vanilina*, pela coloração avermelhada formada (indicando a presença de taninos condensados); **flavonoides**: a partir da *reação de Shinoda* (reação da cianidina), baseada no fato de que os derivados flavônicos de cor amarela perdem hidrogênio adquirindo a coloração avermelhada, *reação com o cloreto de alumínio*, pela manifestação de fluorescência verde amarelo intensa, característica, indicando a presença de compostos flavônicos, *reação com o cloreto férrico*,

pela coloração variável verde-castanha; **polissacarídeos**: a partir da *reação de Tollens*, baseada no fato de que as aldoses reduzem a Ag^+ que compõe o reativo, levando a formação de prata metálica que é depositada nas paredes do tubo de ensaio, *reação de Benedict* e *reação de Fehling* pela formação de precipitado vermelho tijolo, indicando presença de açúcares redutores, e *reação de Molish*, pela formação de anel violeta, indicando a presença de hexoses e de pentoses; **esteroides/terpenos**: a partir do desenvolvimento da *reação de Liebermann-Burchard* e *reação de Salkowski*, obtendo-se a coloração castanha avermelhada, caracterizando o núcleo fundamental de esteroides e triterpenoides, *reação de Keller-Kiliani*, pelo desenvolvimento de um anel de coloração castanho-avermelhada na interface dos líquidos e juntamente a coloração azul-esverdeada, adquirida gradualmente, particularidade esta, das desóxioses frequentes nos heterosídeos.

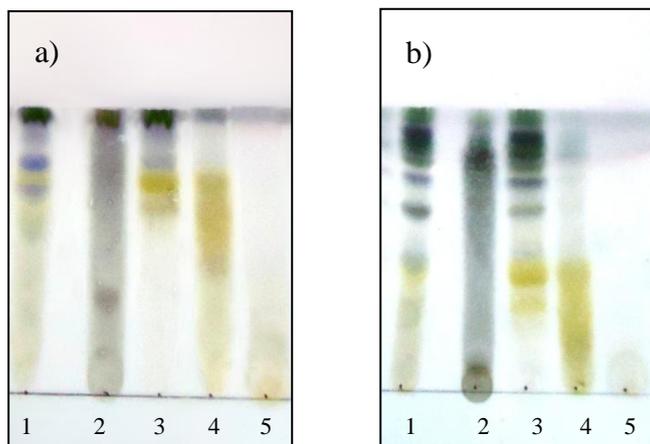
Não foram detectados: **compostos antraquinônicos** por meio das *reações de Bornträger*; **saponinas**, pelos ensaios de *formação de espuma persistente e de hemólise* e de **alcaloides**, pelas reações de *Mayer, Bouchardat, Dragendorff e Bertrand*.

Os metabólitos secundários encontrados no extrato em estudo estão em conformidade com os dados da literatura. Segundo Aruna, Yerraguni e Raju (2012), compostos como os polifenóis, os flavonoides, os taninos, os glicosídeos, os óleos voláteis e os glicosinolatos são comuns na espécie *Raphanus sativus* L.

5.5 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise buscou caracterizar a presença dos constituintes majoritários presentes no extrato seco e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. por dois sistemas eluentes de fase orgânica de diferentes polaridades. Os perfis cromatográficos estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.



Nota: 1 - Extrato seco das folhas, 2-Fração hexânica, 3-Fração acetato de etila, 4-Fração butanólica, 5-Fração aquosa.

3a) Sistema eluente (quaternário): CHCl_3 :MeOH:n.PrOH:H₂O (5:6:1:4, fase orgânica); 3b) Sistema eluente CHCl_3 :MeOH:H₂O (43:37:20, fase orgânica). Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄. Revelador: anisaldeído sulfúrico/aquecimento a 100 °C.

Fonte: Do autor .

A análise do perfil cromatográfico foi realizada pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas após serem reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009). Foi possível observar e inferir quanto as classes de metabólitos secundários presentes no extrato seco e nas frações, tais como taninos, caracterizados pela coloração caramelo (próximo ao ponto de aplicação); compostos fenólicos (flavonoides), caracterizados pela coloração amarela; terpenos, caracterizados pela coloração arroxeada.

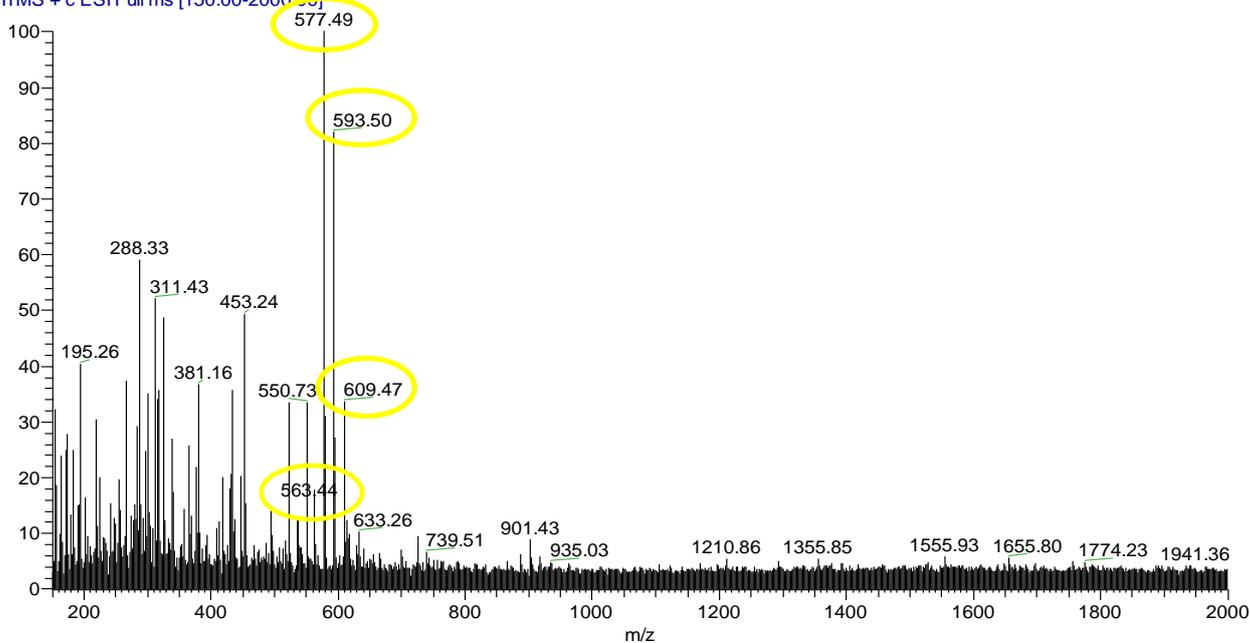
5.6 ANÁLISE QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após a análise dos espectros, verificou-se que alguns compostos são comuns ao extrato seco e às frações, porém em diferentes intensidades. Sugere-se que, os compostos de massas moleculares 564, 578, 594 e 610 g/mol detectados no extrato seco (Figura 11) e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. correspondam a flavonoides. Estes compostos (destacados em amarelo nos espectros) ao perderem um próton são registrados como seus respectivos íons ($[M-H]^-$). Para esses íons foram obtidas as MS^n (fragmentações

em múltiplos estágios), o que possibilitou a elucidação estrutural de algumas moléculas, baseando-se em mecanismos de fragmentação.

Figura 11 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta do extrato seco.

E1_130325175923 #31-1493 RT: 0.10-3.68 AV: 1091 NL: 6.22E4
T: ITMS + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



Fonte: Dados do autor.

Tendo por base a molécula de referência abaixo e considerando a possibilidade das variações dos R_s , foi possível propor as estruturas de alguns flavonoides (Tabela 5).

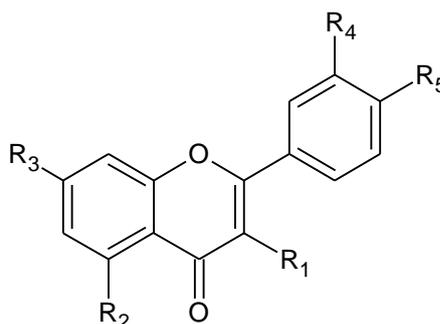


Tabela 5 - Proposta das estruturas de alguns flavonoides encontrados no extrato seco e nas frações.

Flavonoides	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	$[M-H]^-$	Principais fragmentos
1	O-hex	OH	O-6-dhex	OH	OH	609	463, 447, 301
2	OH	OH	O-6-dhex	H	O-6-dhex	593	447, 301
3	H	OH	O-6-dhex	OH	O-6-dhex	577	431, 285
4	OH	OH	O-6-dhex	H	pent	563	417, 430, 285

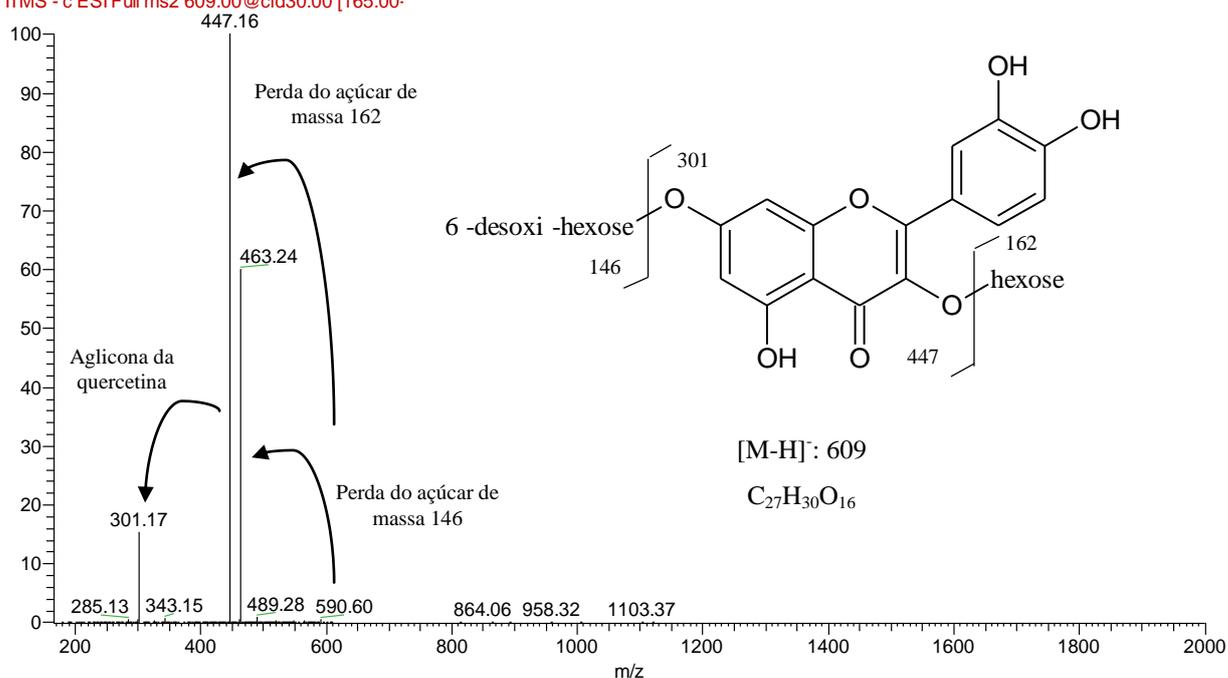
Legenda: hex (hexose); pent (pentose); 6-dhex (desoxi-hexose).

Fonte: Do autor.

O espectro MS² do íon de m/z 609 ($[M-H]^-$) (Figura 12) mostrou o pico-base de m/z 447, que pode ser devido à perda do açúcar de massa 162 (hexose). Evidenciou também outro pico com a intensidade mais fraca de m/z 463, sugerindo a perda de outro açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose), o pico de m/z 301 trata-se da aglicona da quercetina.

Figura 12 - Espectro MS² do íon de m/z 609 com a fragmentação da molécula proposta.

E1_130325175923 #1456 RT: 5.20 AV: 1 NL: 2.33E4
F: ITMS - c ESI Full ms2 609.00@cid30.00 [165.00-

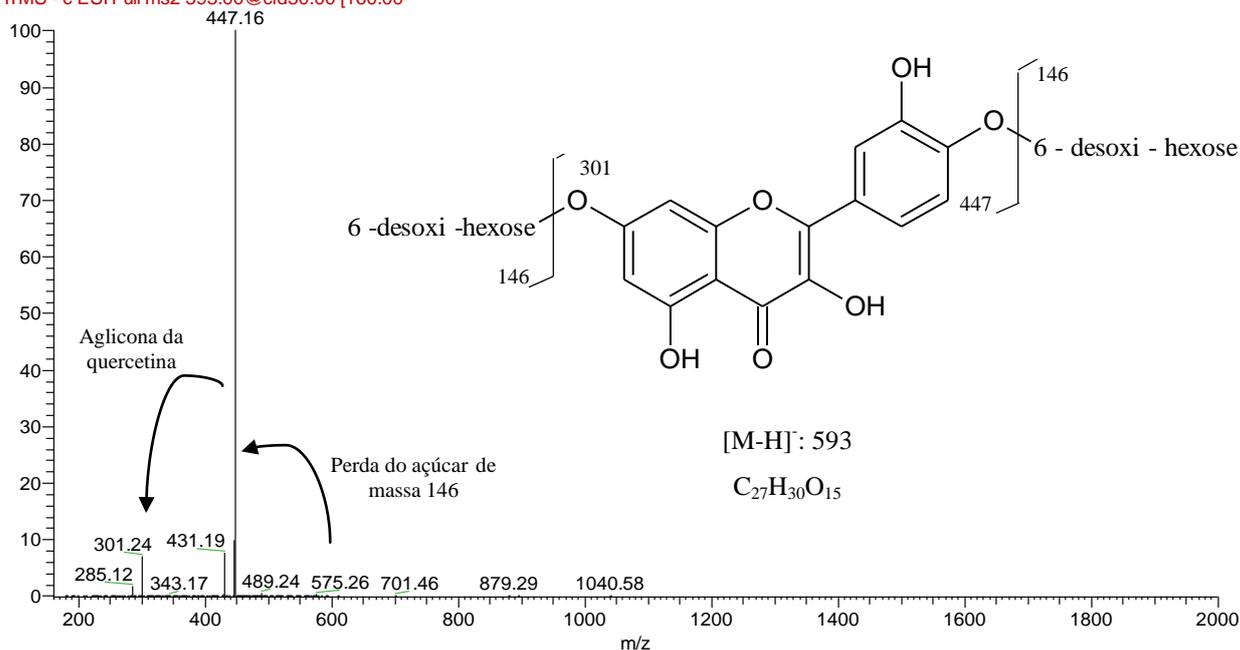


Fonte: Dados do autor.

O espectro MS² do íon de m/z 593 ($[M-H]^-$) (Figura 13) revelou o pico-base de m/z 447, que se propõe ser relativo à perda do açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose). O pico de m/z 301 trata-se da aglicona da quercetina, formada após a perda de outro açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose).

Figura 13 - Espectro MS² do íon de m/z 593 com a fragmentação da molécula proposta.

E1_130325175923 #1742 RT: 6.80 AV: 1 NL: 8.20E4
 F: ITMS - c ESI Full ms2 593.00@cid30.00 [160.00-

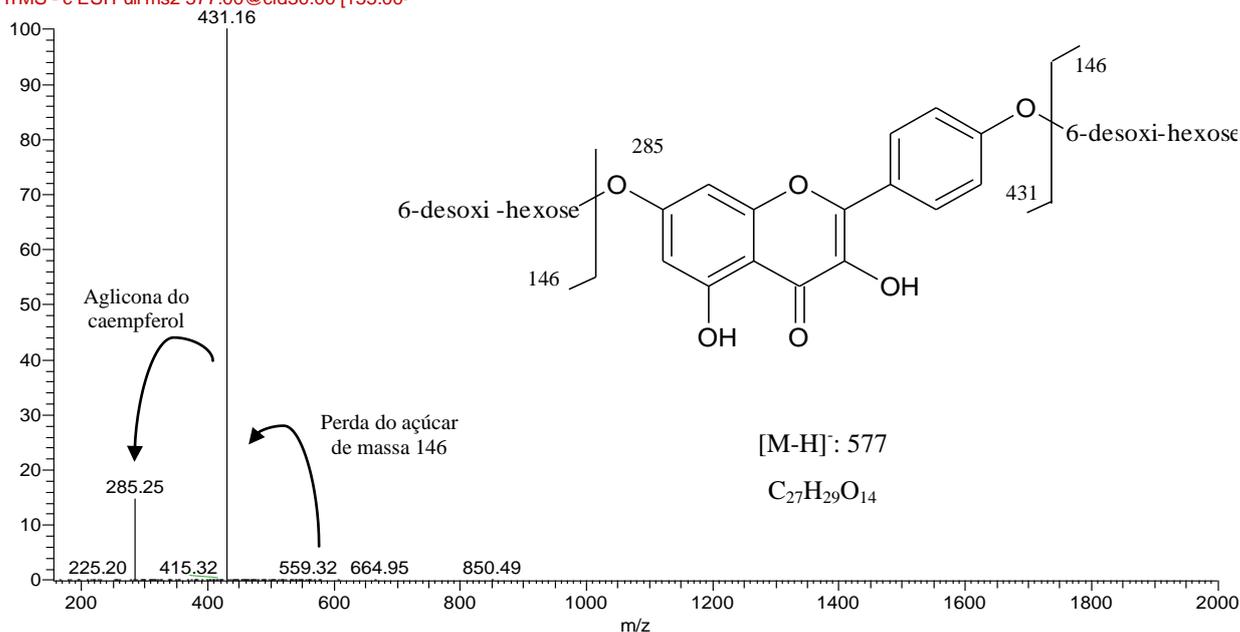


Fonte: Dados do autor.

O espectro MS² do íon de m/z 577 ([M-H]⁻) (Figura 14) revelou dois picos, o pico-base de m/z 431, que pode ser resultante da perda do açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose), e outro pico de m/z 285, que se propõe ser correspondente a aglicona do campferol, formada após a perda da outra molécula de açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose).

Figura 14 - Espectro MS² do íon de m/z 577 com a fragmentação da molécula proposta.

E1_130325175923 #1989 RT: 8.08 AV: 1 NL: 1.12E5
 F: ITMS - c ESI Full ms2 577.00@cid30.00 [155.00-

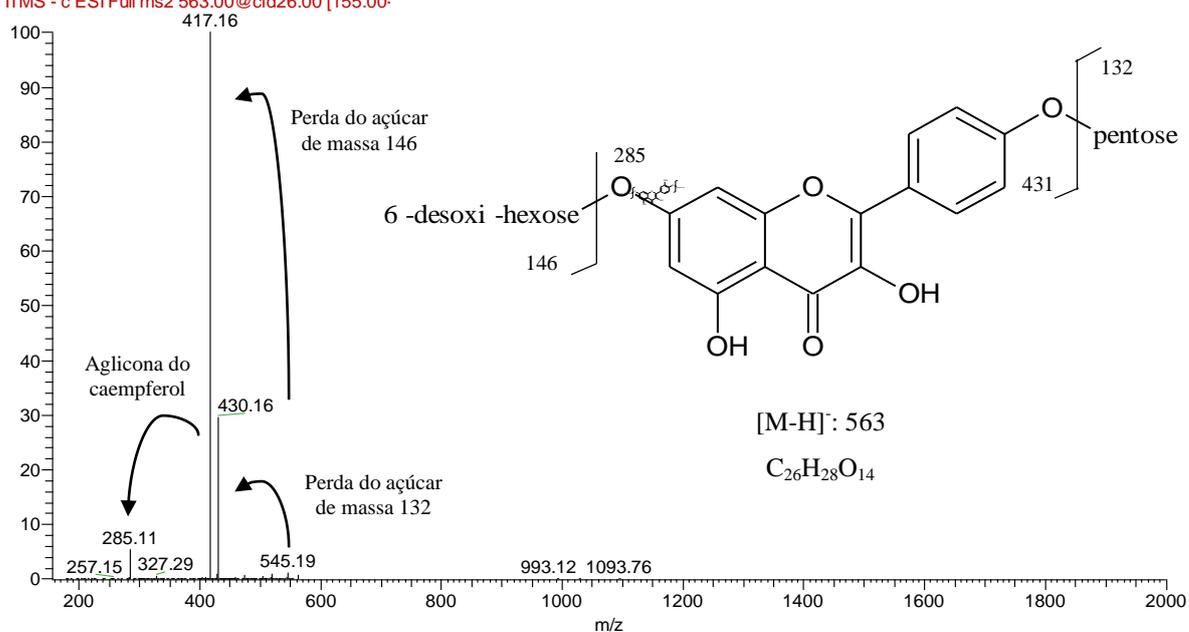


Fonte: Dados do autor.

No espectro MS² do íon de m/z 563 ($[M-H]^-$) (Figura 15) pode-se observar o pico-base de m/z 417 e outro pico de m/z 430, os quais podem ser resultante da perda do açúcar de massa 146 (6-desoxi-hexose) e do açúcar de massa 132 (pentose), respectivamente. O pico de m/z 285 trata-se da aglicona do caempferol.

Figura 15 - Espectro MS² do íon de m/z 563 com a fragmentação da molécula proposta.

E1_130325175923 #2299 RT: 9.76 AV: 1 NL: 1.27E4
F: ITMS - c ESI Full ms2 563.00@cid26.00 [155.00-

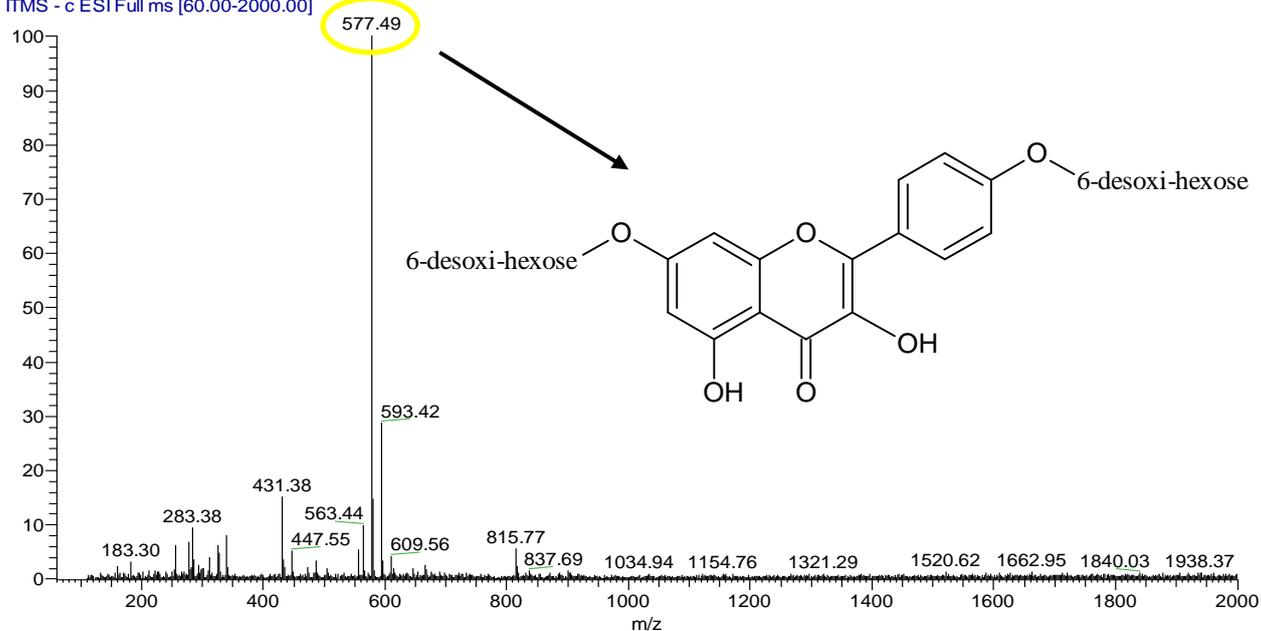


Fonte: Dados do autor.

O espectro de massas da fração acetato de etila (Figura 16) mostra como pico base a molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 577. Por meio de fragmentação de segunda ordem foi possível inferir que a molécula corresponde a um flavonoide derivado do caempferol.

Figura 16 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta da fração acetato de etila.

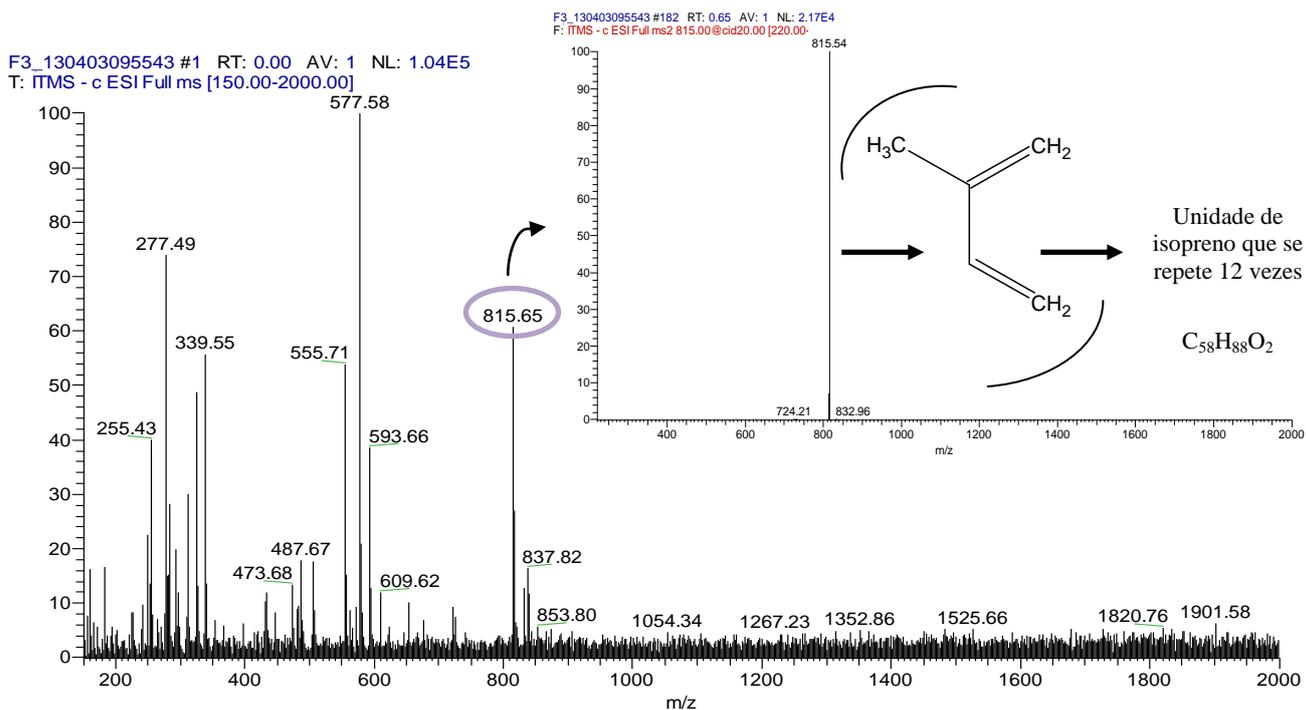
F4_130403093809 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.54E5
T: TMS - c ESI Full ms [60.00-2000.00]



Fonte: Dados do autor.

O espectro de massas da fração hexânica (Figura 17) revelou o íon de m/z 815 (destacado em lilás) que possivelmente trata-se de um polímero com 12 unidades de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno). Nota-se que, com a obtenção do MS^2 não foi observada a fragmentação da molécula, pois trata-se de um composto muito estável, portanto de difícil quebra.

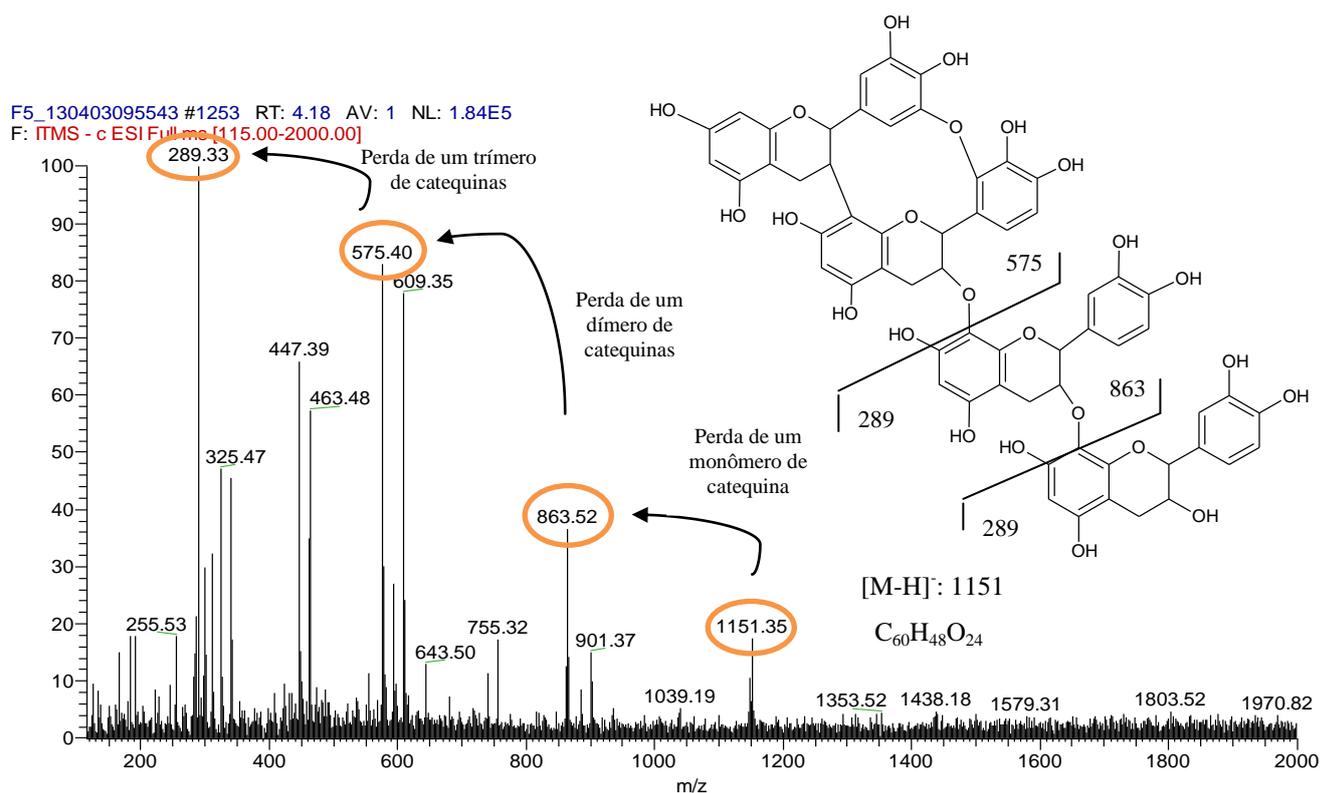
Figura 17 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta da fração hexânica.



Fonte: Dados do autor.

O espectro de massas da fração butanólica (Figura 18) revelou o íon de m/z 1151 que possivelmente corresponde a um tanino condensado. O pico de m/z 863 pode ser proveniente da perda de um monômero de catequina, o pico de m/z 575 possivelmente é proveniente da perda de um dímero de catequinas e o pico de m/z 289 devido a perda de um trímero de catequinas.

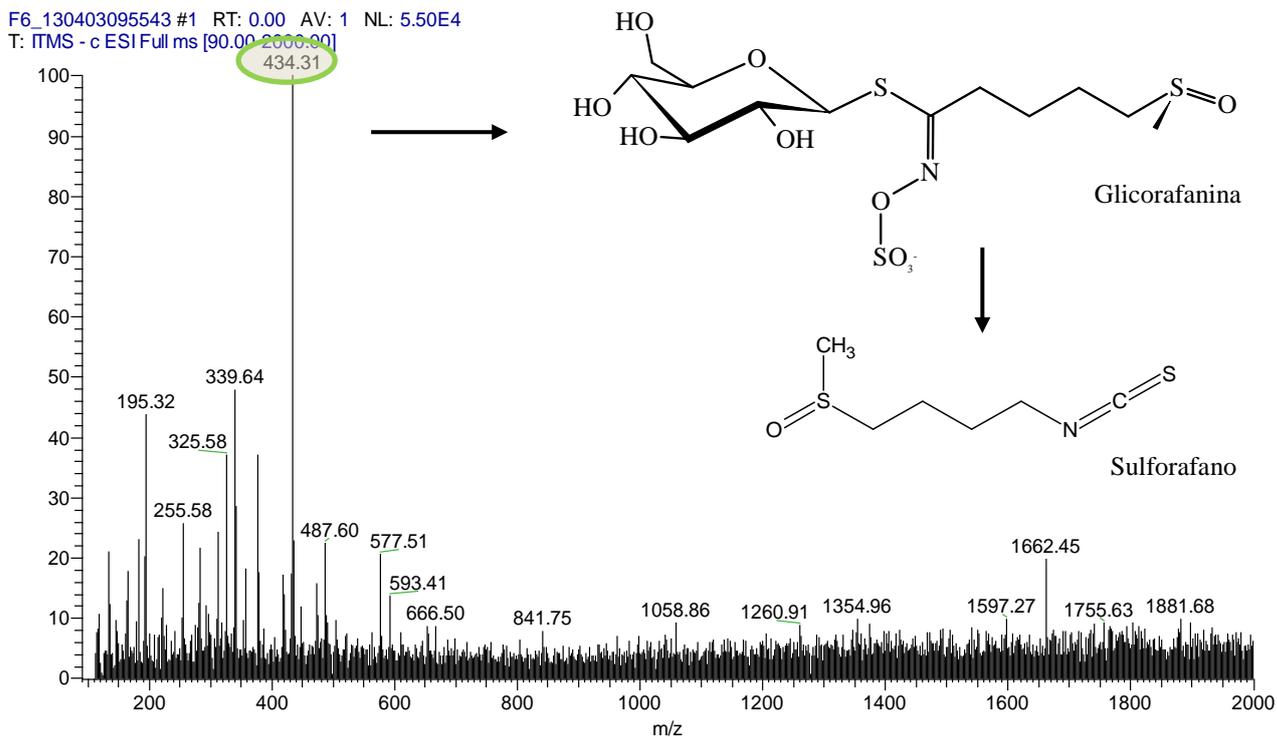
Figura 18 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta da fração butanólica.



Fonte: Dados do autor.

No espectro da fração aquosa (Figura 19) o pico de maior intensidade possui m/z 434, este composto possivelmente trata-se de um glicosinolato (glicorafanina), o mais comumente encontrado no gênero *Raphanus*, porém mais estudos precisam ser realizados para confirmar a identidade da molécula. Esse composto já foi identificado em outras espécies da família Brassicaceae, Rochfort et al. (2008) identificaram a glicorafanina no brócolis (*Brassica oleracea*). No trabalho de Ediage et al. (2011), eles também identificaram alguns glicosinolatos nas raízes do rabanete preto (*Raphanus sativus* L. *niger*), entre eles a glicorafanina (m/z 434) e a glicorafasatina (m/z 418). Há vários estudos relacionados com o sulforafano, um isotiocianato derivado da glicorafanina, trata-se de uma importante molécula anticarcinogênica.

Figura 19 - Espectro de massas, em modo *full scan*, obtido por injeção direta da fração aquosa.



Fonte: Dados do autor.

5.7 TEOR DE FENÓIS E DE FLAVONOIDES

Os resultados mostraram que as concentrações de fenóis e de flavonoides nas frações foram maiores que no extrato seco ($47,02 \pm 0,6$ mg EAG/g), com exceção do teor de flavonoides da fração aquosa (Tabela 6). Segundo Sousa (2007), essa discrepância deve-se à complexidade do extrato seco que resulta em uma grande variedade de interações químicas, além da inerente presença de interferentes potenciais como pigmentos coloridos.

O fracionamento do extrato seco proporcionou maior concentração de fenóis totais na fração butanólica ($121,27 \pm 1,1$ mg EAG/g), enquanto que os flavonoides ficaram mais concentrados na fração acetato de etila ($98,02 \pm 0,2$ mg EQ/g). Os menores teores de fenóis e de flavonoides entre as frações foram encontrados na fração aquosa, com valores de $52,48 \pm 0,3$ mg EAG/g e $3,28 \pm 0,4$ mg EQ/g, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Teor de fenóis e de flavonoides totais no extrato seco e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Amostras	Teor de fenólicos totais	Teor de flavonoides
	(mg EAG/g de amostra analisada)	(mg EQ/g de amostra analisada)
EF	47,02 ± 0,6 ^a	20,36 ± 0,6 ^b
FrHex	96,09 ± 3,1 ^c	70,93 ± 0,4 ^c
FrAcOEt	99,95 ± 1,4 ^c	98,02 ± 0,2 ^e
FrBuOH	121,27 ± 1,1 ^d	89,87 ± 0,6 ^d
FrAq	52,48 ± 0,3 ^b	3,28 ± 0,4 ^a

Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Os resultados de cada teste foram analisados separadamente. Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes (Scott e Knott, $p < 0,05$).

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina.

Fonte: Dados do autor.

Heimler et al. (2006) determinaram a composição fenólica de várias espécies da família Brassicaceae, dentre elas, do extrato hidroetanólico (70%) do brócolis (*Brassica oleracea* L. conv. *botrytis*) e encontraram um valor de 12,85 mg EAG/mL para essa espécie vegetal.

O chá verde e o chá preto, espécies ricas em polifenóis, apresentam cerca de 30 a 40% e 3 a 10%, respectivamente, desses compostos em sua constituição química (SHARAGI, 2009), valores bastante relevantes quando comparado ao obtido no extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. (4,702%).

No trabalho de Beegamashi (2010) foram avaliados o conteúdo de polifenóis de vários resíduos vegetais, dentre eles os resíduos de folhas/talos do rabanete comum, o resultado para o extrato aquoso foi de 17,75 mg EAG/mL e para o extrato hidroetanólico (80%) foi obtido um valor de 8,68 mg EAG/mL, resultados esses inferiores aos encontrados neste estudo.

Beevi et al. (2010) encontraram nos extratos metanólicos e acetônico das folhas de *Raphanus sativus* L. a concentração de polifenóis total de 86,16 e 78,77 mg(equivalentes de catequinas)/g de extrato seco, respectivamente. Embora tenham utilizado um padrão diferente do utilizado neste trabalho, os autores compararam os resultados obtidos às ricas fontes tradicionais, como o chá verde e o chá preto.

Hanlon e Barnes (2011) determinaram o teor de fenóis totais nos extratos aquosos dos brotos e das raízes maduras de oito variedades de rabanetes (*Raphanus sativus* L.), utilizando ácido gálico como padrão, eles obtiveram resultados inferiores aos obtidos neste estudo, variando de 18,1 ± 3,5 a 24,2 ± 2,2 mg EAG/ mL.

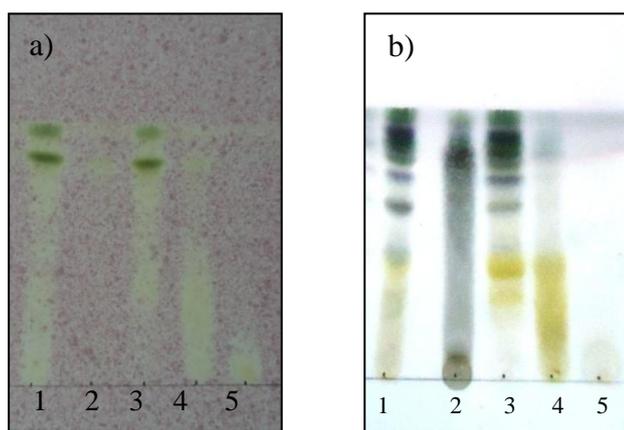
Samec et al. (2011), avaliaram o teor de fenóis totais e de flavonoides no repolho branco (*Bassica oleracea* var. *capitata*) e na couve chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) em vários estágios de maturação. O suco da maturação completa da couve-chinesa mostrou um teor de fenóis totais de 1,88 mg EAG/mL e o suco do repolho branco (maduro) mostrou um teor de fenóis de 1,03 mg EAG/mL.

Melo e Faria (2014) quantificaram o teor de fenóis totais nos extratos hidroetanólicos (95%) do brócolis e do rabanete e obtiveram valores de 11,08 e 7,64 mg EAG/g de extrato seco, valores inferiores aos obtidos no extrato e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

5.8 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR QUALITATIVA

A avaliação qualitativa do extrato seco e das frações por CCD, após borrrificação com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugere a existência de substâncias com atividade antirradicalar, evidenciadas na placa pela presença de manchas de cor amarela sobre fundo púrpura (Figura 20). As substâncias reagem com o radical DPPH, se oxidando e evitando que o radical cause algum dano ao organismo em que ele está presente.

Figura 20 - Atividade antirradicalar qualitativa por CCD do extrato e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.



Nota: 1 - Extrato seco das folhas, 2- Fração hexânica, 3- Fração acetato de etila, 4- Fração butanólica, 5- Fração aquosa;

Sistema eluente: CHCl_3 :MeOH:H₂O (43:37:20, fase orgânica). Fase estacionária: sílica gel 60 F₂₅₄.

a) Revelador: solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH;

b) Revelador: anisaldeído sulfúrico/aquecimento a 100 °C.

Fonte: Do autor.

De acordo com o cromatograma (Figura 20a) obtido, os compostos com o maior potencial antirradicalar ficaram mais concentrados nas frações acetato de etila (3) e butanólica (4). Fazendo uma comparação com a Figura 20b, esses compostos possivelmente tratam-se de flavonoides e taninos.

Ao analisar os resultados quantitativos, observa-se que nas frações acetato de etila e butanólica também foram detectadas as maiores concentrações de flavonoides, sugerindo que tais compostos sejam os principais responsáveis pela atividade antirradicalar.

5.9 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR QUANTITATIVA

Na tabela 7, observa-se que a porcentagem de sequestro de radical DPPH pelo extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. foi de 26,48%, com CE_{50} de 387,61. Entre as frações avaliadas, a fração acetato de etila foi a que apresentou melhores resultados em relação à capacidade sequestradora do radical livre DPPH (83,45%), apresentando CE_{50} de 29,37 $\mu\text{g/mL}$, seguida pela fração butanólica (57,20%), apresentando CE_{50} 77,48 $\mu\text{g/mL}$, fração hexânica (47,70%), apresentando CE_{50} 100,48 $\mu\text{g/mL}$ e fração aquosa (40,16%), apresentando CE_{50} 112,17 $\mu\text{g/mL}$.

Um aspecto importante que deve ser considerado na avaliação da atividade antirradicalar é a possibilidade de interação (sinergismo ou antagonismo) entre compostos presentes no extrato vegetal (CABELLO-HURTADO et al., 2012). Com os resultados obtidos pode-se observar que as frações apresentaram a maior porcentagem de sequestro de radical DPPH em relação ao extrato seco das folhas (Tabela 7), demonstrando que não houve interações sinérgicas entre os compostos presentes no extrato seco. O fracionamento neste caso possibilitou a maior concentração desses compostos, permitindo a obtenção de resultados mais significativos.

Tabela 7 - Atividade antirradicalar do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. pelo método do radical DPPH.

Amostras	% Sequestro de radical DPPH (a 100 µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)
EF	26,48 ± 0,4 ^a	387,61
FrHex	47,70 ± 0,1 ^c	100,48
FrAcOEt	83,45 ± 0,5 ^g	29,37
FrBuOH	57,20 ± 0,3 ^d	77,48
FrAq	40,16 ± 0,3 ^b	112,17
Quercetina	81,44 ± 0,2 ^f	4,57
Ácido Áscórbico	90,43 ± 0,3 ^h	6,49
BHT	63,7 ± 0,10 ^e	70,11

Nota: Resultados expressos como a média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott $p < 0,05$).

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; BHT: butil-hidroxitolueno.

Fonte: Dados do autor.

Levando-se em consideração a análise estatística dos dados da atividade antirradicalar na concentração de 100 µg/mL, verificou-se que as amostras e os padrões apresentaram diferenças no potencial como fonte de substâncias sequestradoras de radicais livres. Porém, a porcentagem de sequestro de radical DPPH na fração acetato de etila apresentou um valor aproximado aos obtidos com os padrões de quercetina e de ácido ascórbico.

Arbos et al. (2010), comparou a atividade antirradicalar de alguns vegetais convencionais e orgânicos, dentre eles a rúcula (*Eruca sativa*) também pertencente à família Brassicaceae. Os extratos de rúcula na concentração de 0,1 mg/mL apresentaram a redução de 14,1% do radical DPPH na amostra convencional e uma redução do radical DPPH de 23% na amostra orgânica, ambos os resultados inferiores aos obtidos no extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. na mesma concentração.

Beevi et al. (2010) determinaram a atividade antirradicalar pelo método do radical DPPH dos extratos metanólicos e acetônico das folhas e do caule de *Raphanus sativus* L. e encontraram resultados de CE₅₀ entre 31 e 42 µg/mL respectivamente, valores aproximados aos obtidos na fração acetato de etila deste estudo.

No estudo da atividade antirradicalar pelo método do radical DPPH com os frutos de *Raphanus sativus* L., Edziri et al. (2012) encontraram valores de CE₅₀ de 640,2 µg/mL para o extrato metanólico. Para o extrato aquoso os autores encontraram um valor de CE₅₀ de 10,3

$\mu\text{g/mL}$, sendo considerado um resultado mais significativo que os obtidos no extrato seco e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Melo e Faria (2014) analisaram a atividade antioxidante *in vitro* pelo método do radical DPPH nos extratos hidroetanólicos (95%) do brócolis e do rabanete comum e obtiveram porcentagens de sequestro do radical DPPH de 51,05% e 29,06%, respectivamente.

5.10 AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR

Os resultados deste ensaio estão apresentados na tabela 8 e foram expressos em porcentagem de redução, em comparação ao ácido ascórbico e ao BHT. Observa-se que, a fração acetato de etila demonstrou maior atividade redutora de íons Fe^{3+} (a 100 $\mu\text{g/mL}$) (11,34%), resultado inferior ao padrão de ácido ascórbico e superior ao BHT. A fração aquosa mostrou menor atividade (8,33%) e as frações butanólica e hexânica foram consideradas estatisticamente iguais quanto ao potencial redutor.

Tabela 8 – Avaliação do poder redutor do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Amostras	% Atividade redutora de íons Fe^{3+} (a 100 $\mu\text{g/mL}$)
EF	$6,49 \pm 0,28^a$
FrHex	$10,54 \pm 0,29^d$
FrAcOEt	$11,34 \pm 0,29^e$
FrBuOH	$10,71 \pm 0,29^d$
FrAq	$8,33 \pm 0,36^b$
Ácido Áscórbico	$20,53 \pm 0,51^f$
BHT	$9,13 \pm 0,28^c$

Nota: Resultados expressos como a média \pm desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott e Knott $p < 0,05$).

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; BHT: butil-hidroxitolueno.

Fonte: Dados do autor.

A maior porcentagem de sequestro do radical livre DPPH e a maior porcentagem redutora de íons Fe^{3+} (a 100 $\mu\text{g/mL}$) da fração acetato de etila sugerem que exista algum constituinte na fração acetato de etila que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação. Além disso, a maior atividade antioxidante *in vitro* pode estar relacionada também

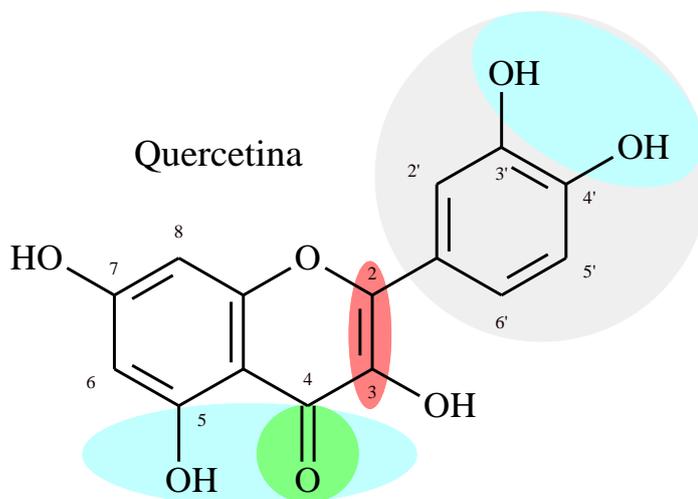
com a quantidade de flavonoides, pois a fração acetato de etila foi a que apresentou maior concentração desses compostos ($98,02 \pm 0,2$ mg EQ/g) (Tabela 6).

Os compostos fenólicos junto com a vitamina C são os maiores antioxidantes encontrados nos vegetais da família Brassicaceae (PODSEDEK, 2007). Muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. A posição de substituição da hidroxila no anel fenólico, considerada em relação a uma posição fixa, influencia diretamente a atividade antioxidante. Como os flavonoides são os compostos de maior interesse científico entre os fenólicos. Compostos com dois (mais comum) ou três substituintes grupos hidroxilas no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante do que os monohidroxilados (SCOTTI et al., 2007).

Os flavonoides e outros derivados fenólicos podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres, eles atuam na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido, agindo por sinergismo com outros antioxidantes, como as vitaminas C e E. A capacidade dos flavonoides em quelar metais, impede que estes atuem como catalisadores na formação de radicais livres (SIMÕES et al., 2010).

A Figura 21 evidencia características importantes da quercetina, representando o potencial antioxidante clássico dos flavonoides. O grupo catecol ou dihidroxil no anel B (marcado em cinza) possui as melhores propriedades de doação de elétrons e a oxidação do flavonoide ocorre no anel B quando esse grupo está presente. A presença da insaturação no anel C (marcado em vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (marcado em verde), uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo é responsável pelo deslocamento do elétron do anel B. O grupo catecol e outras funções podem também explicar a habilidade dos flavonoides em quelar metais de transição como cobre e ferro (marcado em azul) (PIETTA, 2000). Lembrando que, a quercetina na forma glicosilada foi um dos flavonoides identificados por espectrometria de massas no extrato seco e nas frações, as diferenças entre as amostras nas avaliações da atividade antirradicalar e do poder redutor possivelmente devem-se as diferentes concentrações desses compostos nas amostras testadas.

Figura 21 - Estrutura da quercetina mostrando características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonoides.



Fonte: OLDONI, 2007.

Além dos compostos fenólicos, os isotiocinatos, produtos de degradação dos glicosinolatos encontrados nas crucíferas, também desempenham importante função antioxidante *in vivo*, porém de forma indireta, ou seja eles não participam dos processos fisiológicos, bioquímicos ou celulares de inativação ou impedimento de formação de radicais livres (FAHEY; TALALAY, 1999; VIG et al., 2009).

Os isotiocinatos atuam como potentes indutores de enzimas de fase II, aumentando a atividade antioxidante das células, visto que as enzimas de fase II desempenham um papel importante na proteção da célula contra danos ao DNA, causados por agentes carcinogênicos e espécies reativas de oxigênio (FAHEY; TALALAY, 1999; VIG et al., 2009).

Farag e Motaal (2010) testaram a atividade antioxidante do sulforafano e o resultado sugeriu que o isotiocianato não contribui para atividade antioxidante *in vitro*, pois não apresentou atividade sequestrante de radicais livres DPPH.

Porém, alguns trabalhos relatam atividade antioxidante direta dos produtos de degradação dos glicosinolatos. Haina et al. (2010) determinaram a atividade antioxidante (*in vitro*) pelo método do radical DPPH de isotiocinatos isolados dos brócolis, os resultados mostraram que alguns deles possuem alta capacidade sequestradora de radicais livres comparáveis à da vitamina C.

5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios antimicrobianos (método de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima) foram complementados com cálculos matemáticos da atividade total, do índice de susceptibilidade e do percentual de atividade, a fim de se obter uma visão geral da eficiência da atividade antimicrobiana das amostras testadas.

5.11.1 Método de difusão em ágar

Dentre as amostras testadas (Tabela 9), o extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. apresentou a maior média de halos de inibição de crescimento microbiano, frente ao *Bacillus subtilis* (18,67 mm), sendo que esta média é estatisticamente superior às produzidas pelas frações ($p < 0,05$).

O extrato seco e as frações de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. apresentaram médias de halos inibitórios menores que os controles para cada micro-organismo, ou seja, nenhum micro-organismo foi mais sensível ao extrato e às frações quando comparados com a clorexidina 0,12% ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores das médias dos halos de inibição de crescimento microbiano (em milímetros) do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg., controles positivo (Clorexidina 0,12%) e negativo (Água destilada), avaliados pelo método de difusão em ágar.

Micro-organismos	Média de halos de inibição (mm)						
	EF	FrHex	FrAcOEt	FrBuOH	FrAq	Cl	Ag
Gram-positivos							
<i>Bacillus subtilis</i>	18,67 ^d	9,00 ^b	9,34 ^b	6,00 ^b	5,30 ^b	28,00 ^e	0,00 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	18,00 ^c	0,00 ^a	9,34 ^b	5,60 ^b	0,00 ^a	27,34 ^e	0,00 ^a
<i>Micrococcus luteus</i>	10,67 ^b	0,00 ^a	9,67 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	34,67 ^f	0,00 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	9,34 ^b	0,00 ^a	7,34 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	19,67 ^d	0,00 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,00 ^c	8,00 ^b	9,34 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	27,34 ^e	0,00 ^a
Gram-negativos							
<i>Escherichia coli</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	21,34 ^d	0,00 ^a
<i>Serratia marcescens</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	21,67 ^d	0,00 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	21,34 ^d	0,00 ^a
<i>Proteus mirabilis</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	17,00 ^c	0,00 ^a
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	21,34 ^d	0,00 ^a
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	11,67 ^b	0,00 ^a
Fungos							
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	15,34 ^c	0,00 ^a
<i>Candida albicans</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	15,67 ^c	0,00 ^a
Micobactérias							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	20,00 ^b	0,00 ^a
<i>Mycobacterium bovis</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	20,00 ^b	0,00 ^a

Nota: Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes (Scott e Knott, $p < 0,05$).

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt : fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; Cl: Clorexidina 0,12%; Ag: Água destilada.

Fonte: Dados do autor.

A atividade antibacteriana está relacionada aos compostos bioativos presentes no extrato seco e nas frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg., porém não se pode afirmar quais compostos químicos, isolados ou em associação, exercem a ação. Embora, observa-se a possibilidade da existência de uma ação sinérgica dos compostos, para *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, pois o extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. apresentou halos de inibição superiores às suas frações.

O extrato seco e as frações das folhas de *R. sativus* var. *oleiferus* Metzg. mostraram-se ativos somente contra as bactérias gram-positivas. Para as bactérias gram-negativas, as micobactérias e os fungos não foram formados halos de inibição. A ausência de atividade

antimicrobiana muitas vezes deve-se a atuação de compostos ativos dos extratos na parede dos micro-organismos, visto que as diferenças nas constituições das paredes celulares das bactérias gram-negativas, gram-positivas, micobactérias e fungos interferem na resistência do micro-organismo.

A parede celular dos micro-organismos gram-negativos é mais complexa, possui uma membrana adicional externa, correspondente a uma segunda bicamada lipídica, que adere fortemente à camada de peptidoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana é rica em polissacarídeos, o que a torna mais antigênica (TORTORA; FUNKE, 2011). Dessa forma, a dificuldade de penetrar na camada externa das bactérias gram-negativas é a razão pela qual algumas substâncias serem menos ativos ou não exibirem atividade antibiótica.

A alta concentração de lipídios de elevado peso molecular presente na parede das micobactérias funciona como uma barreira para os compostos polares (ARANTES, 2005). A membrana citoplasmática dos fungos possui em sua composição química, esteroides, além dos lipídeos e proteínas (KONEMAN et al., 2001). Isso pode justificar a resistência dos fungos e das micobactérias aos extratos hidroetanólicos. Uma atividade antimicobacteriana e antifúngica promissora poderia ser encontrada para extratos apolares, já que os componentes ativos lipofílicos atravessam mais facilmente a barreira lipídica presente na parede dos fungos e das micobactérias.

Em um estudo com extratos hexânicos e acetônicos obtidos a partir da raiz, caule e folhas de nabo forrageiro, Beevi et al. (2009) concluíram que ambos os extratos exibiram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli*, porém a atividade antibacteriana foi mais forte na fração acetônica de raiz, com maior zona de inibição e concentração inibitória mínima mais baixa. Entre as diferentes partes de *Raphanus sativus* L. estudados, o extrato da raiz foi mais ativo que os extratos do caule e da folha em inibir o crescimento bacteriano.

Vários estudos relatam os mecanismos de ação antimicrobiana dos principais metabólitos secundários encontrados em *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. A atividade antimicrobiana dos flavonoides pode ser atribuída a sua atuação nas membranas celulares, isto é, causam modificações nas propriedades físico-química da membrana, como por exemplo, diminuição da fluidez (TSUCHIYA, 2010). De acordo com Tim Cushnie e Lamb (2011), além da diminuição da fluidez e/ou perfuração das membranas, a atividade antibacteriana dos

flavonoides pode ser atribuída a outros mecanismos, como inibição da síntese dos ácidos nucleicos, inibição do metabolismo energético e inibição da síntese de parede celular.

Os taninos, também detectados na espécie *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg., possui ação antimicrobiana conhecida, há três hipóteses que podem explicar seu mecanismo de ação contra os microrganismos: 1) inibição das enzimas bacterianas através da complexação dos taninos com proteínas; 2) modificação do metabolismo microbiano em função da ação dos taninos sobre a membrana e organelas celulares e 3) complexação com ferro, vanádio, magnésio, alumínio e cálcio, levando a diminuição da disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (MONTEIRO et al., 2005).

A atividade antimicrobiana dos terpenos provavelmente está ligada às suas propriedades lipofílicas e às suas interações com as bicamadas fosfolípídicas das bactérias (DORMAN; DEANS, 2008).

Com relação aos glicosinolatos, há uma grande quantidade de trabalhos disponíveis sobre a sua atividade antimicrobiana, porém as informações sobre os mecanismos de ação são escassas, sugere-se que os produtos derivados dos glicosinolatos agem por inativação de várias enzimas intracelulares responsáveis pela produção de energia celular (VIG et al., 2009).

5.11.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Tabela 10 apresenta os resultados das CIM do extrato seco e das frações, observa-se que os menores valores de CIM foram obtidos para *Micrococcus luteus*, sendo que a fração acetato de etila demonstrou menor CIM (0,1 mg/mL) para esse micro-organismo, seguido da fração aquosa (0,2 mg/mL) e butanólica (0,4 mg/mL). Na fração hexânica não foi detectada ausência de crescimento na máxima concentração testada (12 mg/mL). A fração acetato de etila mostrou-se mais eficaz, apresentando CIM entre 0,1 e 12,5 mg/mL, o que não ocorreu quando se utilizou a técnica de difusão em ágar, onde a atividade inibitória ocorreu em concentração mais elevada.

Tabela 10 - Determinações das CIM (mg/mL) do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Bactérias	Microdiluição da amostra vegetal (mg/mL)				
	EF	FrHex	FrAcOEt	FrBuOH	FrAq
1. <i>Bacillus subtilis</i>	3,12	6,25	0,4	3,12	3,12
2. <i>Bacillus cereus</i>	12,5	3,12	0,8	1,56	3,12
3. <i>Micrococcus luteus</i>	12,5	nd	0,1	0,4	0,2
4. <i>Enterococcus faecalis</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	6,25	nd	0,1	3,12	3,12

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; nd: não detectado à máxima concentração utilizada (12,5 mg/mL).

Fonte: Dados do autor.

De acordo com Holets et al. (2002), os extratos que apresentarem CIM menores que 100 µg/mL, podem ser considerados com boa atividade antimicrobiana, CIM entre 100-500 µg/mL são moderadamente ativos, CIM entre 500-1000 µg/mL são pouco ativos e CIM maior que 1000 µg/mL são considerados inativos. Dessa forma, ao analisar a tabela 10, observa-se que frações acetato de etila, seguida da fração aquosa e butanólica apresentaram melhor atividade antimicrobiana, pois demonstraram CIM variando de 100 a 800 µg/mL.

O teste de difusão em ágar tem eficiência apenas para substâncias que são solúveis em água, possibilitando a difusão destas através do meio de cultura. Além disso, vários fatores como a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a difusão da substância no meio, a densidade do inóculo, o período de incubação, a temperatura, a estabilidade da substância em uso e a massa molecular, podem dificultar a difusão no meio de cultura (SILVEIRA et al. 2009), o que pode dificultar o contato dos extratos com os micro-organismos, levando a resultados falso-negativos.

O teste da micro-diluição em placa para a determinação da CIM tem a vantagem de permitir o contato direto do extrato com os micro-organismos, evitando possíveis interferentes do método de difusão em ágar.

Edziri et al. (2012) determinaram a CIM através da técnica de microdiluição em placa de extratos aquosos dos frutos de *Raphanus sativus* L. e encontraram o valor de CIM de 5 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e para *Staphylococcus aureus*, valor esse superior aos obtidos nas frações butanólicas (3,12 mg/mL) e aquosa (3,12 mg/mL) das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg., frente a *Staphylococcus aureus*.

5.11.3 Atividade antimicrobiana total

A atividade antimicrobiana total (AT) permite comparar a bioatividade de diferentes extratos de uma planta, ou entre diferentes plantas, em uma base mais racional e padronizada. Ela indica, teoricamente, quantas vezes os compostos bioativos encontrados em 1 g de planta podem ser diluídos e ainda inibir o crescimento de micro-organismos (ELOFF, 2004).

De acordo com a Tabela 11, podemos observar que o extrato seco das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. mostrou a melhor AT, visto que os prováveis componentes com ação antimicrobiana presentes neste extrato, por grama da planta, podem ser diluídos até aproximadamente 94 vezes e ainda inibir o crescimento do *B. subtilis*. Para as frações, a melhor AT verificada foi para a fração aquosa contra *M. luteus* (3,2 mL/g) e para a fração butanólica também contra *M. luteus* (2,25 mL/g).

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana total do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.

Amostras	Rendimento (p/p)*	Micro-organismos	CIM (mg/mL)	Atividade total (mL/g)
EF	0,29	<i>B. subtilis</i>	3,12	93,58
EF	0,29	<i>B. cereus</i>	12,5	23,36
EF	0,29	<i>M. luteus</i>	12,5	23,36
EF	0,29	<i>E. faecalis</i>	12,5	23,36
EF	0,29	<i>S. aureus</i>	6,25	46,72
FrHex	0,03	<i>B. subtilis</i>	6,25	0,048
FrHex	0,03	<i>B. cereus</i>	3,12	0,096
FrHex	0,03	<i>M. luteus</i>	-----	-----
FrHex	0,03	<i>E. faecalis</i>	12,5	0,024
FrHex	0,03	<i>S. aureus</i>	-----	-----
FrAcOEt	0,017	<i>B. subtilis</i>	0,4	0,425
FrAcOEt	0,017	<i>B. cereus</i>	0,8	0,212
FrAcOEt	0,017	<i>M. luteus</i>	0,1	1,7
FrAcOEt	0,017	<i>E. faecalis</i>	12,5	0,014
FrAcOEt	0,017	<i>S. aureus</i>	0,1	1,7
FrBuOH	0,09	<i>B. subtilis</i>	3,12	0,3
FrBuOH	0,09	<i>B. cereus</i>	1,56	0,58
FrBuOH	0,09	<i>M. luteus</i>	0,4	2,25
FrBuOH	0,09	<i>E. faecalis</i>	12,5	0,072
FrBuOH	0,09	<i>S. aureus</i>	3,12	0,3
FrAq	0,064	<i>B. subtilis</i>	3,12	0,21
FrAq	0,064	<i>B. cereus</i>	3,12	0,21
FrAq	0,064	<i>M. luteus</i>	0,2	3,2
FrAq	0,064	<i>E. faecalis</i>	12,5	0,055
FrAq	0,064	<i>S. aureus</i>	3,12	0,21

Legenda: EF: extrato seco das folhas; FrHex: fração hexânica; FrAcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica; FrAq: fração aquosa; nd: não detectado à máxima concentração utilizada (12,5 mg/mL).

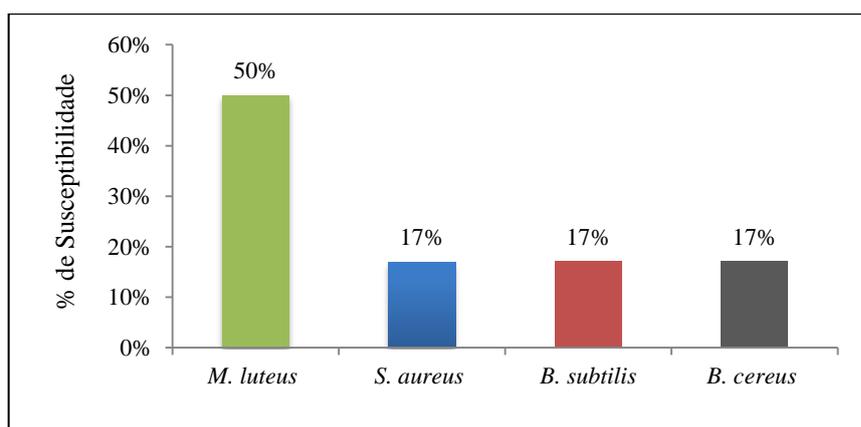
*Com relação ao material vegetal bruto da folha; ----- = não aplicável.

Fonte: Dados do autor.

5.11.4 Índice de susceptibilidade microbiano (ISM, %)

De acordo com Dall'Angol et al., (2003); Fabry et al., (1998) e Tanaka et al., (2005) os extratos de plantas são considerados com potencial inibitório promissor se demonstram atividade antimicrobiana em concentrações de até 0,1 mg/mL, atividade inibitória moderada de 0,1-0,5 mg/mL, atividade fraca de 0,5 a 1 mg/mL, e inativos acima de 1 mg/ml. Portanto, segundo tal premissa, apenas para o extrato e frações de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. que apresentaram CIM menor ou igual a 1 mg/ml, foram obtidos o percentual de atividade (%) (Figura 22) e o índice de susceptibilidade microbiana - ISM (%) (Figura 23).

Figura 22 - Índice de susceptibilidade microbiano (ISM, %) frente às frações provenientes da folha de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. que apresentaram CIM igual ou inferiores a 1 mg/ml.



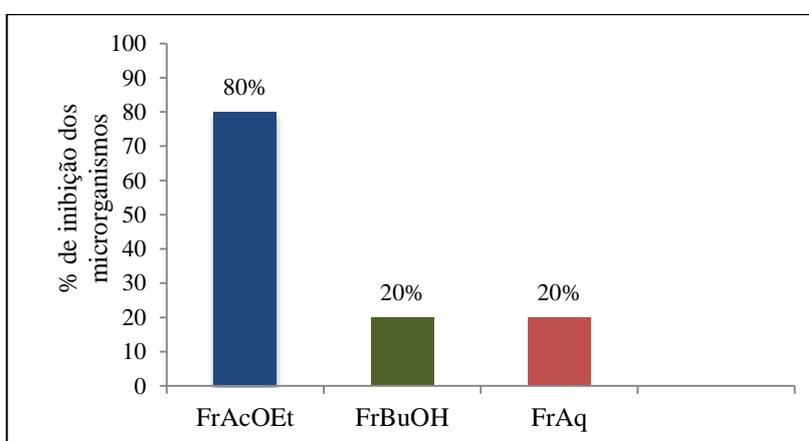
Fonte: Do autor.

O índice de susceptibilidade microbiano (ISM) varia de '0' (resistente a todos os extratos) até '100' (susceptíveis a todos os extratos) e avalia a susceptibilidade relativa entre os micro-organismos testados, em que houve valores de CIM iguais ou menores que 1 mg/ml contra as frações testadas (critério arbitrário, levado em conta os extratos com significativa atividade segundo alguns autores). Para as frações de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. avaliadas, o micro-organismo *M. luteus*, foi inibido por 50% das frações testadas com concentração inibitória mínima (CIM) inferior ou igual a 1 mg/ml, seguido por *S. aureus* (17%), *B. subtilis* (17%) e *B. cereus* (17%).

5.11.5 Percentual de atividade

O percentual de atividade representa a quantidade de cepas susceptíveis a um determinado extrato. Dentre as frações provenientes do extrato da folha que demonstraram CIM igual ou inferior a 1 mg/mL, observa-se que a fração acetato de etila foi a mais ativa (80%), seguido da butanólica (20%) e Aquosa (20%) (Figura 23).

Figura 23 - Percentual de atividade das frações provenientes da folha de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. com CIM igual ou inferiores a 1 mg/ml.



Legenda: Fr AcOEt: fração acetato de etila; FrBuOH: fração butanólica;
FrAq: fração aquosa.

Fonte: Dados do autor.

O percentual de atividade avaliou o potencial antimicrobiano das frações de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. testadas e representa a quantidade de micro-organismos que foram inibidos por elas.

5.12 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE CONSTITUÍNTES QUÍMICOS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As correlações entre os mais baixos valores da concentração inibitória mínima obtidos para o extrato seco e as frações e a maior quantidade de fenóis e flavonoides presentes no extrato e nas frações, apresentaram valores de r positivos, 0,40 e 0,33, respectivamente (Tabela 12) sendo considerada uma moderada correlação entre a presença de tais metabólitos e os melhores valores de atividade antimicrobiana.

As análises da correlação entre os maiores valores na atividade antirradicalar pelo método do radical DPPH e pelo método do poder redutor e a maior quantidade de fenóis totais e de flavonoides no extrato seco e nas frações avaliados, também demonstraram valores de r positivos (Tabela 12), sendo considerada uma forte correlação entre a presença de tais metabólitos e os melhores valores das atividades antioxidantes *in vitro*.

Tabela 12 - Análise estatística da correlação entre os parâmetros avaliados.

Correlação	r
<i>Atividade antimicrobiana</i>	
CIM x Compostos fenólicos	0,40
CIM x Flavonoides	0,33
<i>Atividade antioxidante “in vitro”</i>	
Método do DPPH [*] x Compostos fenólicos	0,80
Método do DPPH [*] x Flavonoides	0,77
Método do poder redutor x Compostos fenólicos	0,70
Método do poder redutor x Flavonoides	0,64

Nota: Segundo a classificação de Callegari-Jaques (2003): $0,00 < r < 0,30$, demonstra fraca correlação; $0,30 < r < 0,60$, demonstra moderada correlação; $0,60 < r < 0,90$, demonstra forte correlação e $0,90 < r < 1,00$ demonstra muito forte correlação entre os parâmetros avaliados.

Legenda: r = coeficiente de correlação; CIM = Concentração Inibitória Mínima; DPPH^{*} = radical DPPH.

Fonte: Dados do autor.

Os resultados indicaram que os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, têm importante papel na atividade antimicrobiana do extrato seco e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg., porém é provável que a atividade não esteja relacionada somente com essa classe de metabólitos secundários. Com relação a atividade antioxidante *in vitro*, os estudos de correlação demonstraram que os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, são os principais responsáveis por essa atividade.

5.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTA

O extrato e as frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. foram testados contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* nas concentrações de 0,05 a

40 µg/mL, porém nenhuma das amostras mostrou-se citotóxica contra o parasita até a maior concentração analisada (40 µg/mL).

Pelo fato dos resultados contra as formas promastigotas não terem sido promissores, não se prosseguiram os testes contra as formas amastigotas, visto que, nos ensaios com as formas promastigotas, o extrato e as frações entram em contato direto com o parasita e com as formas amastigotas é necessário que as moléculas presentes na amostra rompam as membranas dos macrófagos para atingir o parasita.

5.14 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

O extrato e as frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. não se mostraram citotóxicos frente aos macrófagos peritoneais murinos na maior concentração avaliada (160 µg/mL), sugerindo que há possibilidade de se encontrar um valor citotóxico em concentrações superiores a 160 µg/mL.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* têm se tornado uma etapa cada vez mais frequente em trabalhos para a determinação de toxicidade de produtos naturais, em especial os de origem vegetal. A busca por substâncias com atividade citotóxica é uma das prioridades da química medicinal e um grande número de abordagens diferentes vem sendo utilizado nessa busca (PISCO et al., 2006).

Um aspecto positivo sobre a atividade citotóxica surge para estudo de substâncias potencialmente anticancerígenas. Pocasap, Weerapreeyakul e Barusrux (2013) avaliaram o efeito preventivo de câncer do extrato de *Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef. contra uma linhagem celular de cancro do cólon HCT116, pelo ensaio do MTT. Os resultados mostraram alta citotoxicidade do extrato contra essas células, com CC_{50} de $9,42 \pm 0,46$ µg/ml. À vista disso, sugere-se a necessidade de ensaios complementares com a espécie *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. contra células cancerígenas.

6 CONCLUSÕES

A análise granulométrica e físico-química da droga vegetal obtida das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. permitiram estabelecer especificações iniciais de qualidade, servindo de referência para assegurar a reprodutibilidade de estudos posteriores com essa droga vegetal.

Os estudos químicos do extrato e das frações das folhas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. revelaram a presença de compostos predominantemente encontrados na família Brassicaceae, dentre eles os flavonoides (derivados da quercetina e campferol), que são compostos com amplo espectro de atividade biológica, entre as quais, antimicrobianas e antioxidantes.

A partir dos experimentos quantitativos, pode-se dizer que, tanto a concentração de flavonoides como as avaliações da atividade antioxidante *in vitro*, possuem valores decrescentes na ordem: fração acetato de etila, fração butanólica, fração hexânica e fração aquosa, sendo que a fração acetato de etila apresentou os resultados mais significativos em ambos os experimentos.

No estudo antimicrobiano, o extrato seco e as frações das folhas demonstraram atividade somente contra as bactérias Gram – positivas.

O extrato seco e as frações das folhas não demonstraram atividade leishmanicida na maior concentração testada.

O extrato seco e as frações não demonstraram citotoxicidade frente aos macrófagos peritoneais murinos na maior concentração avaliada.

Os estudos mostraram moderada correlação entre a atividade antimicrobiana e os teores de fenóis e de flavonoides. Isso sugere que a atividade antimicrobiana também está relacionada com os outros compostos bioativos encontrados na planta. A atividade antioxidante *in vitro* mostrou forte correlação com o teor de fenóis e flavonoides, o que demonstra que esses compostos são os principais responsáveis por essa atividade.

Em função dos resultados encontrados, pode-se concluir que a espécie *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg. apresenta metabólitos secundários com potenciais ações biológicas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening os some Indian medicinal plants for their antimicrobials properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 183-193, 1998.

ALQASOUMI, S. et al. Gastroprotective effect of radish (*Raphanus Sativus* L.) on experimental gastric ulcer models in rats. **Farmácia**, v. 2 , p. 204-214, 2008.

ALVES, H. M. A diversidade das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 3, p. 01-06. 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/divers.pdf>>. Acessado em: 29 de jul de 2012.

AMOROSO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Levenger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 16, p. 189-203, 2002.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000, 177 p.

ARANTES, V. P. **Estudo da atividade antimicobacteriana de extratos vegetais do cerrado brasileiro**, 2005, 75 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

ARBOS, K. A. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, 2010.

ARUNA, G.; YERRAGUNI, V. G.; RAJU, A. B. Phytochemistry and Pharmacology of *Raphanus sativus*. **International Journal of Drug Formulation and Research**, v. 3, n. 1, p. 43-52, 2012.

ATMANI, D. et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food chemistry**, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.

BARBOSA, W. L. R. et al. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais**. Edição revisada, Belém, 2001. Disponível em: <http://www2.ufpa.br/rcientifica/didaticos_cientificos/pdf_textos/abord_fitoquimica.pdf>. Acessado em: 26 de ago de 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.

BEEGAMASHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**, 2010, 96 f. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEEVI, S. S. et al. Polyphenolics Profile, Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Leaves and Stem of *Raphanus sativus* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 8-17, 2010.

BEEVI, S. S. et al. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L. **Food borne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 1, p. 129-136, 2009.

BLAZEVIC, I. et al. Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1020-1028, 2010.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of Glucosinolates. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1053-1067, 2006.

BONJAR, G. H. S. New approaches in screening for antibacterials in plants. **Asian Journal of Plant Science**, v. 3, p. 55-60, 2004.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**, 2006, 178 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Universidade de São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 de abril de 2010.

BRASSI, L. A. C. S.; DENUCCI, S.; PORTAS, A. A. **Nabo - adubo verde, forragem e bioenergia**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/nabo/index.htm>. Acessado em: 20 de jul de 2012.

CABELLO-HURTADO, F. et al. Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1003–1009, 2012.

CALIXTO, J. B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003, 255 p.

CARDOSO, C. M. Z. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 148 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/52664007/manual-de-controle-de-qualidade-de-materias-primas-vegetais-para-farmacia-magistral>>. Acessado em: 27 de out de 2013.

CARTEA, M. E. et al. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251-280, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard – Sixth edition. M7-A6**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved Guideline-Second Edition. M44-A2**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard – Third Edition. M27-A3**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardie, and Pther Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – M24-A2. 2. ed.** Wayne, PA, USA: CLSI, 2011.

CULTURA DO NABO FORRAGEIRO. **Circular técnico** Cati; n.1, 2003. Disponível em: <www.cati.sp.gov.br>. Acessado em: 10 de ago de 2012.

DALL' AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2008.

DORNAS W. C. et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, 2007.

EDIAGE, E. N. et al. Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. *niger*) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4395-4405, 2011.

EDZIRI, H. et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of some Tunisian vegetables. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 252–256, 2012.

ELOFF, J. N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, v. 11, p. 370-371, 2004

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Aspectos botânicos e relato da resistência de nabo silvestre aos herbicidas inibidores de ALS**. Pelotas – RS. ISSN 1806-9193. Dez, 2008.

FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of east African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84, 2008.

FACURY NETTO, M. A. et al. Systematic use of *Solidago microglossa* DC in cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 207-210, 2004.

FAHEY J. W.; TALALAY P. . Antioxidant Functions of Sulforaphane: a Potent Inducer of Phase II Detoxication Enzymes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 973 -979, 1999.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: ed Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, p. 229-245, 2004.

FARAG M. A.; MOTAAL A. A. Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 65-70, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/publicacoes/4_edicao/parte1/4_edicao_part1.pdf>. Acessado em: 8 de Jan de 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, v. 1, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acessado em: 8 de Jan de 2013.

GUTIERREZ, R. M.; PEREZ, R. L. *Raphanus sativus* (radish): their chemistry and biology. **The Scientific World Journal**, v. 4, p. 811–837, 2004.

HAINA, Y. et al. Antioxidant Activity of Isothiocyanate Extracts from Broccoli. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 2, p. 312-321, 2010.

HANLON, P. R.; BARNES, D. M. Phytochemical Composition and Biological Activity of 8 Varieties of Radish (*Raphanus sativus* L.) Sprouts and Mature Taproots. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 96, p. 67– 202, 2002.

HEIMLER, D. et al. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. **Food Chemistry**, v. 99, p. 464–469, 2006.

HOLETS, F. B. et al. Screening of some slants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds, **Natural Product Reports**, v. 21, p. 425-447, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 690-696, 2009.

IPPOUSHI, K. et al. Antioxidative effects of daikon sprout (*Raphanus sativus* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in rats. **Food Chemistry**, v. 102, p. 237-242, 2007.

IVANOVICS G.; HORVARTH S. Raphanin, an antibacterial principle of radish (*Raphanus sativus*). **Nature**, v. 160, p. 297-298, 1947.

JAHANGIR M. et al. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 31-43, 2009. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1541-4337](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1541-4337)>. Acesso em: 21 de set de 2012.

KALIA, K. et al.. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosan- guinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.10129–10134, 2008.

KHANAM, U. K. S., et al.. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p.979 –987, 2012.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora, 2001.

LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, n. 1, p. 18-22, 2000.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidant in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 36, p. 201-211, 2004.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHARLA S. P.; GOLIAND V.; SATTLA S. R.. Antidiabetic activity of *Raphanus Sativus* L, leaves extracts on alloxan induced diabetic rats. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 3, p.1519-1522, 2012.

MANCHALI, S. et al. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4 , p. 94-106, 2012.

MARTINS, A. B.; SACRAMENTO, L. V. S. **Congresso de Iniciação Científica**, n. 16, 2004, UNESP/SP. Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada.

MELO, C. M. T.; FARIA, J. V. Composição centesimal, compostos fenólicos e atividade antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 93-100, 2014.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC.(Asteraceae) hidroalcoholic extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MENDES, A. S. L. et al. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas de região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES-DE-SOUZA, R. A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil**, 2007, 60 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORAIS, S.; BRAZ FILHO, R. **Produtos naturais**: estudos químicos e biológicos. Fortaleza, Editora: UECE, p. 105-122, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEVES, R. **Potencial alelopático da cultura de canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) na supressão de picão-preto (*Bidens* sp.) e soja**, 2005, 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 05-08, 2003.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***, 2007, 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PISCO, L. et al. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 401-407, 2006.

POCASAP, P.; WEERAPREEYAKUL, N.; BARUSRUX, S. Cancer preventive effect of Thai rat-tailed radish (*Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef.). **Journal of functional foods**, v. 5, p. 1372-1381, 2013.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1270, 1977.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2008.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 3. ed., Nova York: CRC Press, p. 409-434, 2008.

ROCHFORT, S. J. et al. Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSⁿ fragmentation. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1671-1679, 2008.

SALVI JÚNIOR, A. **Schinus terebinthifolius raddi: Estudo farmacognóstico e investigação da atividade biológica de extratos e frações**, 2013, 123 f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, 2013.

SAMEC et al. Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 78–83, 2011.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHARANGI, A. B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. **Food Research International**, v. 42, p. 529–535, 2009.

SHARIEF, A. H. et al. *Leishmania donovani*: An *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 247-252, 2006.

SHUKLA, S. et al. Antimicrobial efficacy of *Raphanus sativus* root juice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, p. 89-92, 2011.

SILVA, V. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia sidoides* Cham. Sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: Novo salvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre. ed. da UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemistry Analysis**, v. 11, n. 1, 2000.

SOUSA, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática-Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., Nova Odessa, SP, p. 403-404, 2005.

SPECHT, C. E.; RAPHANUS. IN: HANELT, P. **Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops**, Heidelberg: Springer-Verlag, v. 3, p. 1476-1481, 2001.

TANG, L. et al. Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention**, v. 17, p. 938-944, 2008.

TIM CUSHNIEA, T. P.; LAMBB A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99–107, 2011.

TORTORA, G. J., FUNKE B. R. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 827 p.

TSUCHIYA, H. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. **Food Chemistry**, v. 120, p.1089–1096, 2010.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VIG A. P. et al. Bio-protective effects of glucosinolates – A review. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1561–1572, 2009.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**, 2005, 137 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Curitiba, PR, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant Drug Analysis**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009.

WOLLENWEBER, E. J. M. **Flavones and Flavonols**. In: HARBORNE, J.B. The Flavonoids: advances in research since 1980. 1ed, London: Chapman and Hall, p. 233-302, 1988.

YAMANE, K.; LÜ, N; OHNISHI, O. Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 627-634, 2005.

YANG, Y.; TAI, P.; CHEN, Y; LI, W. A study of the phylogeny of *Brassica rapa*, *B.nigra*, *Raphanus sativus*, and their related genera using noncoding regions of chloroplast DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 268-275, 2002.

YEN, W.J.; CHANG, L.W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science Technology**, v. 38, n. 1, p. 193-200, 2005.

YILDRIM, A.; OKTAY, M.; BILALOGLU, V. The antioxidant activities of the leaves of *Cydonia vulgaris*. **Turkish Journal Medicine Science**, v. 31, p. 23-27, 2001.

YILDRIM A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.

ZECCA, A. G. D. . Botânica Sistemática de Plantas de interesse agrícola 2008 (Revisão Bibliografica). Disponível em:
<www.cesnors.ufsm.br/professores/zecca/botanica/Apostila_COMPLETA.doc>. Acessado em: 23 de set de 2012.