

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE
EXTRATOS DE *Casearia sylvestris* Sw.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA RITA DE CASTRO GÜNTZEL

LAJEADO, RS - BRASIL

2008

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
Casearia sylvestris Sw.

por

Ana Rita de Castro Güntzel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, do
Centro Universitário UNIVATES (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO.

UNIVATES

Lajeado, RS – Brasil

2008

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

a comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação intitulada

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DE
Casearia sylvestris Sw.

elaborada por

Ana Rita de Castro Güntzel

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento

COMISSÃO EXAMINADORA:

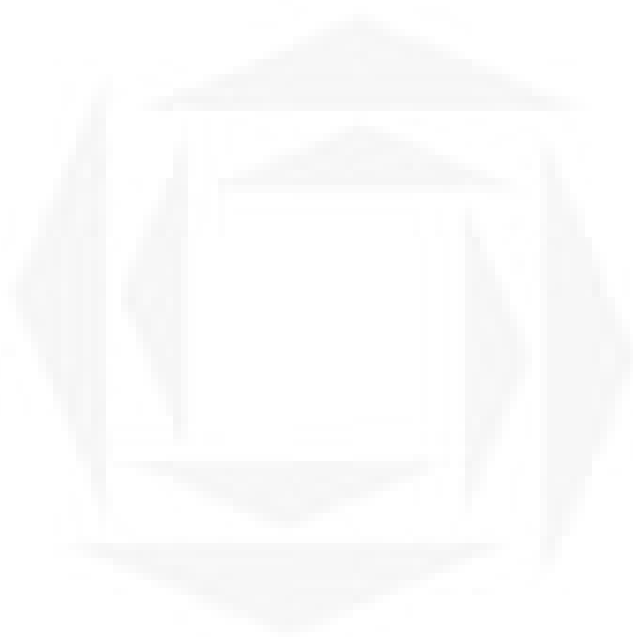
Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur – Orientador – UNIVATES

Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

Lajeado, 06 de junho de 2008



UNIVATES

*“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência;
e para chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer.”*

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar a minha caminhada da vida.

Aos meus pais, Brumilda e Norton Güntzel, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e honestidade. Pelo incentivo e reconhecimento do valor do estudo. Pelo apoio e estímulo em todos estes anos de estudo. Amo muito vocês!

Ao meu marido Alexandre por compreender a ausência, apoio emocional e técnico, além de sua torcida.

Ao Professor e amigo Eduardo Miranda Ethur pelas horas de atenção e paciência. Por ter me trazido de volta ao mundo da pesquisa científica.

À professora Iraci Lucena da Silva Torres, meu referencial farmacêutico, por me aceitar e ajudar nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório de Química Orgânica, Manuela Barth, Fabrícia Dietrich, Greici Raquel Wildner, Carolina Gehlen, e em especial a Ângela Gerhardt, que sempre estavam dispostas a ajudar. Obrigado por tudo pessoal.

A Andressa de Souza que vai continuar estudando esta espécie para enriquecer seu mestrado.

Ao professor André Jasper pela identificação da espécie vegetal.

Ao professor Euclésio Simionatto, da UFMS, pelas análises de CG-EM.

Ao Professor Marne Zanotelli por, gentilmente, ceder o material vegetal de sua propriedade.

À professora Elizete Maria de Freitas, por disponibilizar da sala de assepsia e autoclave, essenciais para os ensaios microbiológicos.

À professora Ionara Rodrigues Siqueira e seus alunos da UFRGS pela prestatividade com os ratos. Fica para a próxima.

À Adriana Ruschel Träsel, minha colega e chefe, obrigada pela compreensão e liberação das horas necessárias para cumprir esta empreitada.

Ao meu sogro Wanderley e minha sogra Vera, mesmo distante, obrigada pela torcida.

Às minhas colegas de setor da Farmácia Essência de Vida, por terem compreendido minha ausência no setor, adoro vocês meninas.

Enfim, a todos meus amigos e familiares que solicitaram minha presença e compreenderam quando eu tive de dizer não, agora poderei estar com vocês.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

Data e local de defesa: Lajeado, 06 de junho de 2008.

TÍTULO: “AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Casearia sylvestris* Sw.”

AUTOR: Ana Rita de Castro Güntzel

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

A espécie vegetal *Casearia sylvestris*, popularmente conhecida como guaçatonga ou erva-de-bugre, foi escolhida para estudo considerando seu uso relevante na medicina popular, escasso material bibliográfico. Foram avaliadas as atividades farmacológicas antioxidante, antimicrobiana e a toxicidade dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de folhas, além da descrição dos constituintes de seu óleo essencial e sua atividade antimicrobiana. Para avaliação da atividade antioxidante desta espécie, realizou-se ensaio espectrofotométrico baseado no princípio de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Para avaliação do potencial antimicrobiano, o ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), seguido da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). A CIM foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, enquanto que a CBM e CFM foram realizadas em placas de Petri. Ainda, verificou-se a atividade tóxica, através da utilização da *Artemia salina* (L.). Na investigação da atividade antioxidante, obtiveram-se inibições do radical livre DPPH nas concentrações de 0,1 mg. mL⁻¹ a 0,005 mg. mL⁻¹ para os extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) das folhas, onde através da análise estatística ANOVA, seguida de Student-Newman-Keuls, demonstrou a potencial atividade antioxidante dos extratos ser superior aos padrões testados. Na atividade antimicrobiana, obtiveram-se valores de CIM na faixa de 2,5 mg. mL⁻¹ a 1,25 mg. mL⁻¹ para o EE, enquanto que para EA não verificou-se atividade. No ensaio da letalidade da *A. Salina* o EA não foi verificada toxicidade, e o EE apresentou, devido ao seu baixo valor encontrado no cálculo da regressão

linear da DL₅₀, apresentou toxicidade moderada. Do óleo essencial, 97,3% dos seus constituintes foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, tendo como constituintes majoritários o β -elemeno (31,7%) e o α -humuleno (28,2%). A avaliação antimicrobiana, do óleo essencial, foi realizada por bioautografia, apresentando atividade bacterida para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, já para os fungos a atividade foi menor.

Palavras-chaves: *Casearia sylvestris* Sw., atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade tóxica.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

Data e local de defesa: Lajeado, 06 de junho de 2008.

TITLE: “EVALUATION OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *Casearia sylvestris* Sw.”

AUTHOR: Ana Rita de Castro Güntzel

ACADEMIC ADVISOR: Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur

ACADEMIC ADVISOR: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

The plant species *Casearia sylvestris*, popularly known as guaçatonga or grass-de-bugre, has been chosen to be studied considering its relevant use in popular medicine and little bibliographic material. We evaluated the antioxidant, antimicrobial and toxicity pharmacological activities of ethanol extracts (EE) and aqueous (EA) of leaves, in addition to the description of the constituents of its essential oil and antimicrobial activity. For the evaluation of the antioxidant activity of this species, a spectrophotometric assay was carried out based on the principle of free radical reduction of 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazila (DPPH). For the evaluation of the potential antimicrobial, the test of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was conducted, followed by Minimum Bactericide Concentration (MBC) and the Minimum Fungicide Concentration (MFC). The CIM was evaluated by the technique of broth microdilution, while CFM and CBM were conducted in Petri plates. Besides, toxic activity was verified, through the use of *Artemia salina* (L.). In the investigation of antioxidant activity, inhibitions of the DPPH free radical were obtained in concentrations of 0,1 mg.mL⁻¹ to 0,005 mg.mL⁻¹ for the ethanolic extract (EE) and aqueous (EA), where, through statistical analysis ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls, demonstrated that the potential antioxidant activity of the extracts to be greater than the standards tested. In antimicrobial activity, there were obtained MIC values from the range of 2,5 mg.mL⁻¹ to a 1,25 mg.mL⁻¹ for the EE, while for EA there was no activity. In the test of

the lethality of *A. Salina* the EA there was no toxicity, and the EE there was moderate activity, because of its low value found in the calculation of the linear regression of DL_{50} . From the essential oil, 97,3% of its constituents were identified by gas chromatography and mass spectrometry, with the major constituents being the β -elemene (31,7%) and α -humuleno (28,2%). In antimicrobial activity, of the essential oil, was carried out by a bioautography, which showed bactericide activity for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. For fungi, the activity was lower.

Keywords: *Casearia sylvestris* Sw. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Toxicity activity.



UNIVATES

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE GRAFICOS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
II REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS	8
2.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	8
2.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	11
2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	13
2.2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA	13
2.2.2 FUNGOS	14
2.2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA BIOAUTOGRAFIA	14
2.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO	15

2.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	16
2.3 ENSAIO DE LETALIDADE POR <i>Artemia salina</i>	17
2.4 <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO	17
2.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS ...	19
III MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 MATERIAL VEGETAL	21
3.2 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS.....	21
3.3 EQUIPAMENTOS	22
3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	22
3.5 EXTRATO AQUOSO (EA).....	23
3.6 EXTRATO ETANÓLICO (EE)	23
3.7 ENSAIOS	24
3.7.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
3.7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
3.7.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	25
3.7.3.1 MÉTODO DA BIOAUTOGRAFIA	26
3.7.3.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	26
3.7.4 ANÁLISE DA TOXICIDADE.....	27
3.7.5 <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO	28
3.7.5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	28
3.7.5.2 TANINOS.....	29
3.7.5.3 FLAVONÓIDES	29
3.7.5.4 CUMARINAS	30
3.7.5.5 QUINONAS	30
3.7.5.6 SAPONINAS.....	31
3.7.5.7 CARDIOTÔNICOS	31
3.7.5.8 ALCALÓIDES	32
3.7.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	32
IV APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	34
4.1 ÓLEO ESSENCIAL.....	34
4.2 EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO	34
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	34

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
4.4.1 BIOAUTOGRAFIA	36
4.4.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO	37
4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	38
4.6.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	40
4.6.2 FLAVONÓIDES	41
4.6.3 CUMARINAS	41
4.6.4 CARDIOTÔNICOS	41
4.6.5 TANINOS.....	41
4.6.6 ALCALÓIDES	42
4.6.7 SAPONINAS.....	42
4.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL	42
VI CONCLUSÃO	47
LISTA DE ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Folhas e flores <i>Casearia sylvestris</i>	5
FIGURA 2 - Árvore da <i>Casearia sylvestris</i>	5
FIGURA 3 - Estrutura geral dos flavonóides.	10
FIGURA 4 - Reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, originando a forma reduzida DPPH-H.	12
FIGURA 5 – Redução do TTC e conseqüente formação da formazana.	16
FIGURA 6 - Sistema de extração de óleos voláteis com extrator do tipo Clevenger modificado.	23
FIGURA 7 – Cromatograma do óleo essencial de <i>C. sylvestris</i>	43
FIGURA 8 - Sesquiterpenos hidrocarbonetos do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	45
FIGURA 9 - Sesquiterpenos oxigenados do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	45

LISTA DE GRAFICOS

GRÁFICO 1 - Atividade antioxidante. Dados expressos em Média+EPM do percentual de atividade antioxidante.....	35
GRÁFICO 2 - Citotoxicidade do EE.....	39
GRÁFICO 3 - Citotoxicidade do EA.	39

UNIVATES

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial da <i>C. sylvestis</i>	36
TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos EE e EA da <i>C. sylvestis</i>	37
TABELA 3 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos EE e EA da <i>C. sylvestis</i>	37
TABELA 4 - Composição química do óleo essencial de <i>C. sylvestris</i>	44

UNIVATES

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Coleção de Culturas Tipo Americano (do inglês: <i>American Type Culture Collection</i>)
BHT	Butilhidroxitolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila (do inglês: <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
EA	Extrato Aquoso das Folhas
EE	Extrato Etanólico das Folhas
NCCLS	Comitê Nacional de Padronização de Laboratórios Clínicos (do inglês: <i>National Committee for Clinical Laboratory Standard</i>)
nm	Nanômetros
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio (do inglês: <i>Triphenyl Tetrazolium Chloride</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
λ	Comprimento de onda

I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A utilização de plantas medicinais pela cultura popular, para tratamento de distúrbios do organismo humano vem aumentando a cada dia, como indica a crescente pesquisa de compostos químicos a partir de plantas no mundo industrializado. Embora a medicina esteja avançada, grande parte da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos na atenção primária à saúde.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, 80% da população de países desenvolvidos utilizam práticas tradicionais na atenção primária, a fim de complementar a prevenção e o tratamento de doenças. No Brasil, não é possível precisar o número de pessoas que utilizam as plantas medicinais para tratamento, mas essa tendência mundial também é seguida¹.

Com a utilização crescente das plantas medicinais, o interesse científico aumenta, a fim de avaliar o seu valor terapêutico, risco e toxicidade.

Através de informações obtidas da população, organizam-se estratégias para investigação de plantas medicinais, uma vez que, aproximadamente 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo alegação de um dado efeito terapêutico em humanos².

¹ CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 3, p.178–189, 2000.

² YUNES, R. A.; CALIXTO, João Batista. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001

No Brasil, onde são encontrados altos índices de pessoas que não possuem acesso ao tratamento convencional, os medicamentos, a utilização de plantas medicinais pode ser o único tratamento disponível para essa população. Sabe-se que existem benefícios com esse tratamento alternativo, porém é importante conhecer os riscos que essa terapia pode ocasionar, pois uma utilização errada pode acarretar problemas à saúde da população. Com isso o interesse científico vem crescendo, a fim de saber sobre o valor terapêutico, risco e toxicidade dessas plantas.

A correta identificação da planta, a pureza da droga, bem como a avaliação do seu princípio ativo são tarefas imprescindíveis para a utilização de produtos com boa qualidade. No Brasil não havia nenhum cuidado até que em 1995 a Secretaria de Vigilância Sanitária instituiu a Portaria nº 06, de 31 de janeiro, onde reafirma que os fitoterápicos são medicamentos e necessitam a existência de estudos de segurança, de eficácia e de qualidade previamente a sua utilização³.

A planta escolhida para ser estudada neste trabalho é a *Casearia sylvestris*, conhecida pelos nomes populares de guaçatonga, erva de bugre, chá de bugre, cafezinho do mato, entre outros. Pertence a família *Salicaceae* e apresenta como características morfológicas, altura de 4 – 6 m, com tronco de 20 – 30 cm de diâmetro. Suas folhas são persistentes, brilhantes na parte superior, medindo 3 – 5 cm de largura por 6 – 12 cm de comprimento.

A escolha pela investigação das atividades farmacológicas antioxidante e antimicrobiana é justificada pela relação que possuem com as patologias que mais acometem o homem atualmente: inúmeras doenças associadas à formação de espécies reativas; resistência microbiana frente a vários fármacos disponíveis; problema de saúde crescente e com elevado índice de mortalidade em todo o mundo, respectivamente. Além da atividade citotóxica para avaliar a possibilidade da utilização, via oral, pela população.

Deste modo, optou-se pela aplicação de testes pouco ou ainda não estudados para a espécie, combinando abrangência, simplicidade e sensibilidade, considerando os recursos disponíveis.

³ LUZ, S.F.B.; SATO, M.E.O.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para o controle de qualidade de folhas de *Casearia Sylvestris* SW. - Guaçatonga. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7, p. 1-11, 1998.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar as potenciais propriedades antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade da espécie *Casearia sylvestris*, a qual foi eleita como objeto de estudo, com base nos seguintes critérios de seleção: amplo emprego nas práticas caseiras da medicina tradicional; escassa literatura científica justificando sua utilização segura e adequada; abundância da espécie no Vale do Taquari.

Sendo assim o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- ✓ Avaliar as potenciais propriedades farmacológicas dos extratos aquoso e etanólico de *Casearia sylvestris* Sw.: antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade;
- ✓ Extrair o óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw., determinar sua constituição química, por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM), e comparar com os dados encontrado na literatura;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw.

II REVISÃO DA LITERATURA

A espécie *Casearia sylvestris* Sw. pertencia à família Flacourtiaceae, porém baseado nos recentes trabalhos de filogenia, está incluída na família *Salicaceae* caracterizada por plantas angiospérmicas, como a *Casearia sylvestris* Sw.. A família *Salicaceae* compreende 50 gêneros com cerca de 1000 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem 19 gêneros e aproximadamente 80 espécies desta família, sendo a mais conhecida o gênero *Salix* do qual foi obtido o ácido salicílico⁴, que na sua forma acetilada originou o ácido acetilsalicílico. O gênero *Casearia* possui mais de 160 espécies descritas, sendo 70 espécies no continente americano e 37 no Brasil⁵. Além do cerrado, pode ser encontrada na Mata Atlântica brasileira, principalmente no Planalto Meridional e, no Rio Grande do Sul, nas regiões centro-oeste e litoral sul^{6,7,8}.

A *Casearia sylvestris* Sw. caracteriza-se por ser uma árvore de 4-6m de altura, sua copa é densa e arredondada, com troco de 20-30 cm de diâmetro. As folhas (FIGURA 1) são persistentes com base assimétrica de 6-12cm de comprimento, apresentam disposição alternada, sendo simples, pecioladas, lanceoladas, com bordos serrilhados e ápice acuminado. Contra a luz é possível visualizar suas glândulas de óleo essencial. Floresce nos meses de

⁴ LORENZI, H.; SOUZA, V.C. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 329 a 333, 2005.

⁵ TININIS, A. G.; ASSONUMA, M.M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C.C.; SILVA, M.R.S.R.M., FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química do óleo essencial da *Casearia sylvestris* Sw. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, 132-136, 2006.

⁶ LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

⁷ SILVA, F.A.; BAISCH, A.L.M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A.M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E.S.; ALAM, M.F.; APOLINÁRIO, J.C.G.; LAPA, A.J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Suplemento Acta Amazônica**, v. 18 (1-20), p. 219-229, 1988.

⁸ LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 4º ed., v. 1, p. 131, 2002.

junho a agosto, apresentando flores pequenas de cor esbranquiçada reunidas nos glomérulos axilares. Já os seus frutos amadurecem a partir de setembro, prolongando-se até meados de novembro, sendo estas cápsulas ovóides deiscentes^{6,8,9}.



Fonte: Adaptado pela autora de www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/JPEGS/A34guacatonga.jpg

FIGURA 1 - Folhas e flores *Casearia sylvestris*

Sua árvore (FIGURA 2) é considerada ideal para arborização de ruas estreitas, além de ser indicada para o reflorestamento ao longo de rios, pois seu desenvolvimento inicial é rápido, produzindo raízes profundas que evitam o deslocamento das mudas nas cheias. Recomendada como planta de sombra, arborização urbana e para o reflorestamento de subosques às margens dos reservatórios das hidrelétricas da Região Sul.



Fonte: Adaptado pela autora de www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/JPEGS/A34casearia_sylvestris2.jpg

FIGURA 2 - Árvore da *Casearia sylvestris*

Como a maioria das espécies nativas do Brasil, a *Casearia sylvestris* Sw. não é cultivada, e sua exploração extrativista ocorre em virtude do comércio em ampla escala no

⁹ LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, p. 115, 1992.

mercado brasileiro ou no exterior, pois é utilizada como espécie adulterante de *Cordia salicifolia*, popularmente conhecida como a porangaba, sendo comercializada com potencial ação emagrecedora, aumentando a ação antrópica sobre a espécie¹⁰.

Na medicina popular é conhecida como “guaçatonga”, denominação de origem tupi-guarani. Outros nomes populares são: erva ou chá de bugre, varre-forno, cafezeiro-do-mato, café-de-frade, cafezinho-do-mato, café-bravo, erva-de-lagarto, pau-de-lagarto, guaçatunga-preta, erva-de-pontada^{6,8,11}. Estudos demonstram o uso do extrato aquoso da *C. sylvestris* na medicina popular como anti-séptica, anestésica tópica¹², para o tratamento de lesões de pele, efeito citotóxico contra células tumorais^{13,14}, e como agente antiofídica frente ao veneno de cobras do gênero *Bothrops*, onde promove a neutralização da atividade hemorrágica^{15,16}. Outros estudos demonstraram a atividade antioxidante¹⁷, antiúlcera gástrica e antiinflamatória^{18,19} como algumas de suas propriedades farmacológicas. A atividade

¹⁰ FACANALI, R. Monografia: “Ecologia de populações de espécies prioritárias para conservação e uso: Um estudo de caso usando como modelo a *Casearia sylvestris* Sw”. Programa de pós-graduação em Ecologia. (UNICAMP). Campinas, São Paulo. 2004. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/profs/fsantos/nt238/2004/Monografias/Monografia-Roselaine.pdf>. Acesso em 26 fev. 2008.

¹¹ ESTEVES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; SCHNEEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T. Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191–196, 2005.

¹² MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S.; COLLE, T.D.; PIERI, D.V.; PETERS, R.R.; PIOVEZAN, A.P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 1-6, 2007.

¹³ OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.N.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.G.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 95–99, 2002.

¹⁴ MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro** 18, 337–342, 2003.

¹⁵ BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 127, p. 21–30, 2000.

¹⁶ BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863–1869, 2001.

¹⁷ MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398–400, 2004.

¹⁸ ESTEVES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; SCHNEEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T. Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191–196, 2005.

antiúlcera gástrica foi descrita a partir da utilização do extrato etanólico, e sua ação farmacológica está relacionada à presença de óleos voláteis, taninos e triterpenos em suas folhas^{20,21}.

Além das atividades já mencionadas, existe ainda um estudo que demonstrou que a *Casearia sylvestris* pode conter componentes que alteram Na^+ / K^+ -ATPase e atividades da acetilcolinesterase²², DNA e inibe a atividade da fosfolipase A_2 .

A espécie *Casearia sylvestris* Sw. caracteriza-se pela presença de substância de interesse como cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos, especialmente os clerodânicos^{5,23}. Foi possível encontrar vários autores que também descreveram na sua composição química diterpenos^{13,19,24,25,26,27}, triterpenos e os ácidos capróico e hexanóico²⁸. De acordo com Esteves *et al.*, na composição química do óleo essencial, analisado por cromatografia gasosa, foram encontrados os seguintes compostos, nos seguintes percentuais: cariofileno (13,8%), tujopseno (5,2%), α -humuleno (3,7%), β -acoradieno (20,8%),

¹⁹ SASSIOTO, M.C.P.; FILHO, N.C.; FACCO, G.G.; SODRE, S.T.; NEVES, N.; PURISCO, S.U.; FARIAS, A.G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19 (6), p. 637 – 641, 2004.

²⁰ BASILE, A.C.; SERTIE, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINO, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Prevention anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 185–197, 1990.

²¹ SERTIE, J.A.A.; CARVALHO, J.C.T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 112–119, 2000.

²² SILVA, A.C.; BALZ, D.; SOUZA, J.B.D.A.; MORSCH, V.M.; CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na^+/K^+ -ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 509 – 514, 2006.

²³ DE CARVALHO, P.R.F.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; KINGSTON, D.G.I.; BOLZANI, V.S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1659–1662, 1998.

²⁴ ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 3384–3388, 1990.

²⁵ MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 693–697, 1991.

²⁶ DE CARVALHO, P.R.F.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.N.; KINGSTON, D.G.I.; BOLZANI, V.S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1659–1662, 1998.

²⁷ ESPÍNDOLA, L.S.; VASCONCELOS, J.J.R.; DE MESQUITA, M.L.; MARQUIE, P.; DE PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica** v. 70, p. 1093–1095, 2004.

²⁸ ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. Corpus Libros, Rosario, Argentina, p. 577–579. 2004.

germacreno-D (1,9%), biciclogermacreno (40,9%), calamineno (1,5%), germacreno-B (3,9%), espatulenol (12,6%) e globulol (2,2%), sendo que o componente detectado em maior quantidade foi um sesquiterpeno (biciclogermacreno) que, de acordo com estudos demonstra atividade antiinflamatória e antibacteriana.

O estudo do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw também foi realizado por Schneider *et al.*²⁹, apresentando como componentes majoritários o α -cariofileno (27,5%) e o biciclogermacreno (24,2%), compostos sesquiterpenos, além de monoterpenos, sendo o principal o β -pinemo (2,0%). Neste estudo também foi descrita a característica antimicrobiana do óleo para as bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecali*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* e *Staphylococcus epidermidis*.

2.1 AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS

2.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As reações radicalares são aquelas onde ocorre a homólise das ligações covalentes, com a produção de componentes intermediários que possuem elétrons desemparelhados chamados de radicais livres. Os radicais-livres possuem vida curta, porém são altamente reativos e ao colidir com outra molécula a tendência é que ocorra o emparelhamento, extraíndo um átomo desta molécula^{30,31}.

As reações com radicais possuem grande importância na biologia e na medicina. Estão presentes em todos os organismos vivos, já que esta reação acontece normalmente no metabolismo. Como exemplo, podemos citar o óxido nítrico (N=O), que desempenha inúmeras funções vitais nos seres vivos. Quando está na forma livre é um gás potencialmente

²⁹ SCHNEIDER, N.F.Z.; MOURA, N.F.; COLPO, T.; FLACH, A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Swart. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 8 (4), p. 112-114, 2006.

³⁰ YUNES, R.A., FILHO, V.C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí, SC. 1º ed, Univali, 2007.

³¹ SOLOMONS, G., FRYLE, C. **Química Orgânica**. V 1. 7º ed. Rio de Janeiro, 2001.

tóxico, porém também está envolvido na regularização da pressão sangüínea, coagulação do sangue, na neurotransmissão e na resposta imunológica contra células tumorais.

Pela sua alta reatividade, os radicais livres são capazes de causar danos ao organismo, como exemplo, o estresse oxidativo onde acontece um desequilíbrio no organismo, promovendo um dano potencial. Este dano pode estar relacionado com as patologias de inúmeras doenças crônicas, como exemplo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas³². Existem evidências de que as reações de radicais participam no desenvolvimento de tumores e da arteriosclerose, doença esta que bloqueia a circulação das veias e artérias, interrompendo o fluxo sangüíneo normal da corrente circulatória. Os radicais provenientes da fumaça do cigarro estão implicados na desativação de uma antiprotease nos pulmões, acarretando o desenvolvimento do enfisema^{30,31}.

Nos processos metabólicos normais, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo compensada pelo sistema antioxidante endógeno. No entanto, devido às desordens naturais do organismo pode acontecer uma produção excessiva de radicais livres ou moléculas geradoras de radicais livres, como: $O_2^{\cdot-}$, ânion superóxido radical peroxilo (ROO^{\cdot}), radical hidroxila ($^{\cdot}OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), resultando em um quadro de estresse oxidativo, resultante de um desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e oxidantes, induzindo danos celulares pelos radicais livres.

Quando ocorre esta situação de estresse oxidativo, acompanha a defesa antioxidante enzimática, porém quando este processo está em desequilíbrio tendendo a alta produção de radicais livres pode ocasionar danos e morte celular³³. Os danos oxidativos induzidos em células e tecidos tem sido relacionados à etiologia de várias doenças, incluindo as doenças degenerativas tais como cardiopatias, aterosclerose e doenças pulmonares.

Através do processo denominado autoxidação, onde pela presença de ligações duplas, o composto fica susceptível ao desemparelhamento das ligações, formando um radical que

³² ASOLINI, F.C.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian journal of food and technology**. v. 9, n. 3, p. 209 – 215, 2006.

³³ ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103 – 108, 1996.

pode reagir com íons livres. No caso da autoxidação do ácido linoléico, um ácido graxo poliinsaturado, as ligações duplas do éster linoléico sofrem a extração do radical que pode reagir com o oxigênio de uma reação em cadeia, resultando em hidroperóxido. Para que este processo não aconteça, é necessária a presença dos antioxidantes, que retiram os radicais peroxila, formando uma molécula estável.

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases de DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular, protegendo as células dos efeitos prejudiciais causados pelas espécies reativas. Os antioxidantes podem ser obtidos através da dieta, tais como as vitaminas A, C, E, carotenóides e flavonóides (FIGURA 3; TABELA 1). Estes flavonóides são antioxidantes vegetais de origem variada, como frutas, legumes, sementes, flores e folhas, possuem a propriedade de serem doadores de elétrons, explicando assim a capacidade de agirem como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos. São encontrados em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal, fazendo parte integral da dieta humana.

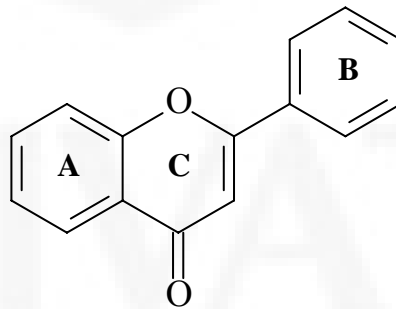


FIGURA 3 - Estrutura geral dos flavonóides.

TABELA 1 – Principais agentes de defesa com ação antioxidante³⁴

Não-enzimático	Enzimáticos
Vitamina E (α -tocoferol)	Superoxido dismutase
β -caroteno	Catalase
Vitamina C	NADPH-quinona oxireductase
Flavonóides	Glutaciona peroxidase
Proteínas do plasma	Enzimas de reparo
Selênio	
Glutaciona	
Clorofila	
L-cisteína	

A vitamina E (α -tocoferol) possui ação antioxidante, inibindo a reação de radicais livres que poderiam causar danos à célula. Pode ser encontrada em lipoproteínas e membranas atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, por meio do seqüestro do radical peroxila. A vitamina C também possui ação antioxidante, e é encontrada facilmente nos alimentos. Essa capacidade é atribuída às suas propriedades de oxi-redução, permitindo atuar como agentes redutores e doadores de hidrogênio³⁵.

Atualmente antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxitolueno (BHT), são adicionados aos alimentos, e outros produtos, a fim de prevenir a autoxidação, pois captura os radicais livres, atuando na prevenção e redução dos danos oxidativos.

2.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.

³⁴ BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v. 12 (2), p. 123-130, 1999.

³⁵ BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W. AND BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology**, v. 30, p. 609-615, 1997.

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre estabilizado pela ressonância do elétron desemparelhado (FIGURA 4), que evita sua dimerização e conseqüente inativação como radical livre³⁶. Freqüentemente é usado para avaliar a atividade antioxidante de vários compostos de origem vegetal³⁷, pois sua forma reduzida apresenta coloração diferente da forma oxidada, permitindo a detecção dos processos de oxi-redução de substâncias potencialmente antioxidantes.

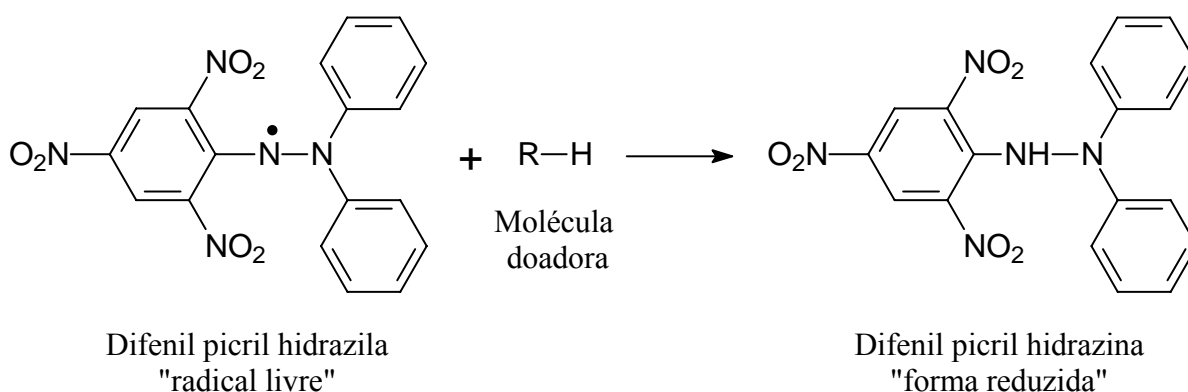


FIGURA 4 - Reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, originando a forma reduzida DPPH-H.

Os compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem com o DPPH permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre, reduzindo o DPPH. Quando ocorre a redução do DPPH, uma alteração colorimétrica é observada (forma oxidada: roxa; forma reduzida: amarela pálida)³⁸, com conseqüente redução nos valores de absorvância. O ensaio é determinado espectrofotometricamente, usando comprimento de onda de 517 nm (região do visível), que corresponde à absorção máxima do DPPH oxidado³⁹.

³⁶ MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

³⁷ NAIK, G.H.; PRIYADARSINI, K.I.; SATAV, J.G.; BANAVALLIKAR, M.M.; SOHONI, D.P.; BIYANI, M. K.; MOHAN, H. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. **Phytochemistry**, v. 63, p. 97-104, 2003.

³⁸ SILVA, C. P. *Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla*: estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria – RS, 2005.

³⁹ ELMASTAS, M.; GÜLCIN, I.; ISILDAK, O.; KÜFREVIÖGLU, O. I.; IBAOGLU, K.; ABOULD-ENEIN, H. Y. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 3, n. 3, p. 258-266, 2006.

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana vem sendo estudada nas últimas décadas devido aos microrganismos apresentarem resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica medicamentosa.

As formas de apresentação da atividade dos microrganismos podem ser através de: lesão da membrana plasmática, inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese protéica e dos ácidos nucléicos e inibição da síntese de metabólitos essenciais⁴⁰.

2.2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA.

A resistência bacteriana aos antibióticos, se refere à capacidade de multiplicação das cepas de microrganismos na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas habituais⁴¹.

A penicilina foi utilizada pela primeira vez em 1941, quando menos de 1% das cepas de *Staphylococcus aureus* eram resistentes a sua ação. Já em 1947, 90% do isolado deste mesmo microorganismo apresentava resistência⁴².

Neste contexto, os compostos de origem vegetal são interessantes porque, além de sua diversidade em estruturas químicas, que dificultam o desenvolvimento de resistência, também produzem substâncias frente à agressão de predadores, como fungos e insetos. Tendo, estas substâncias, a propriedade de inibir o crescimento de determinados organismos, pode haver uma potencialidade quanto a sua ação antimicrobiana.

⁴⁰ TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

⁴¹ WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e e resistência microbiana: guerra perdida? V. 1, n. 4, 2004. Disponível em : <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/HSE_URM_atb_0304.pdf>. Acesso em 07/04/2008.

⁴² HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical microbiology**. United Kingdom: Blackwell Science, 1998.

2.2.2 FUNGOS

Fungos são microrganismos compostos de: núcleo, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas, membrana celular e parede celular espessa com microfibrilas de actina e glicana. Na composição da parede celular são encontrados: β -glicanas, nanoproteínas e quitina, carboidratos, lipídios e proteínas. A parede celular é importante fator de virulência, pois é através dela que acontece a adesão ao hospedeiro, propiciando a colonização da célula fúngica. Também há apresentação dos componentes antigênicos e secreção de produtos (hidrolases e toxinas, entre outros)⁴³.

Os fungos são microrganismos com três a cinco μm de diâmetro, capazes de se reproduzir sexualmente, assexualmente e parassexualmente. Entretanto, suas variedades patogênicas não se reproduzem sexualmente. Quando estão na fase de célula simples, são chamadas de leveduras e se reproduzem por brotamento, enquanto que as bactérias se reproduzem por divisão. Dessa maneira, uma célula mãe dá origem a uma célula filha, inicialmente de menor tamanho⁴⁴. O crescimento dos fungos acontece em meio com sais, fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, com temperatura variando de 20 a 40 °C, pH variando de dois a oito.

2.2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA BIOAUTOGRAFIA

Os testes para avaliação da atividade antimicrobiana como *screening* de óleos essenciais são ensaios realizados *in vitro* através da difusão, diluição ou bioautografia, onde é possível relacionar os componentes bacteriostáticos ou bactericidas e fungistático ou fungicida da mistura. A bioautografia é um método qualitativo, onde a amostra a ser testada é depositada em sílicagel ou papel adequado para a cromatografia em camada delgada (CCD). O suporte que contém a amostra é embebido por uma fina camada de meio de cultura na placa de Petri, facilitando o crescimento do microrganismo. Após o período de incubação em estufa

⁴³ SAMARANAIKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. **Oral Candidosis**. London: Ed. Buter Worth Eco Ltd., 265p, 1990.

⁴⁴ SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANBERG, L.S.W. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 84, p. 68-73, 1997.

termostatzada, é feita a avaliação do resultado, podendo ser através da formação das zonas de inibição no crescimento do microrganismo cultivado. O teste segue o princípio da difusão do meio em ágar⁴⁵.

2.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO

O ensaio da microdiluição possibilita analisar várias amostras juntamente com várias espécies microbianas usando pequenas quantidades de amostra⁴⁶. É um método quantitativo que avalia a atividade microbiana de misturas, substâncias puras e óleos essenciais.

O método de microdiluição em caldo é realizado pela diluição seriada e homogênea das amostras em água, já que esta é o constituinte majoritário dos meios de cultura empregados⁴⁷.

A técnica descrita pela NCCLS⁴⁸, foi adaptada e os ensaios são realizados em placas estéreis, onde o comportamento dos microrganismos no meio de cultura é avaliado. A menor concentração capaz de inibir a multiplicação é denominada de concentração inibitória mínima (CIM)^{38,50}.

Quando as amostras possuem cores escuras, a visualização é dificultada, sendo então necessária a utilização de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Um corante químico indicativo de crescimento microbiano, devido à reação de redução dos componentes

⁴⁵ HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química, v. IV, EdUFSCar, São Carlos, 2003.

⁴⁶ ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

⁴⁷ RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 23, p. 127-149, 1988.

⁴⁸ NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico: NCCLS documento M7-A6, 6.ed., v. 23, n. 02 Pennsylvania, Estados Unidos: 2003.

da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de eucariotos, e da membrana citoplasmática de procariotos, formando espécies coloridas: as formazanas (FIGURA 5)⁴⁹.

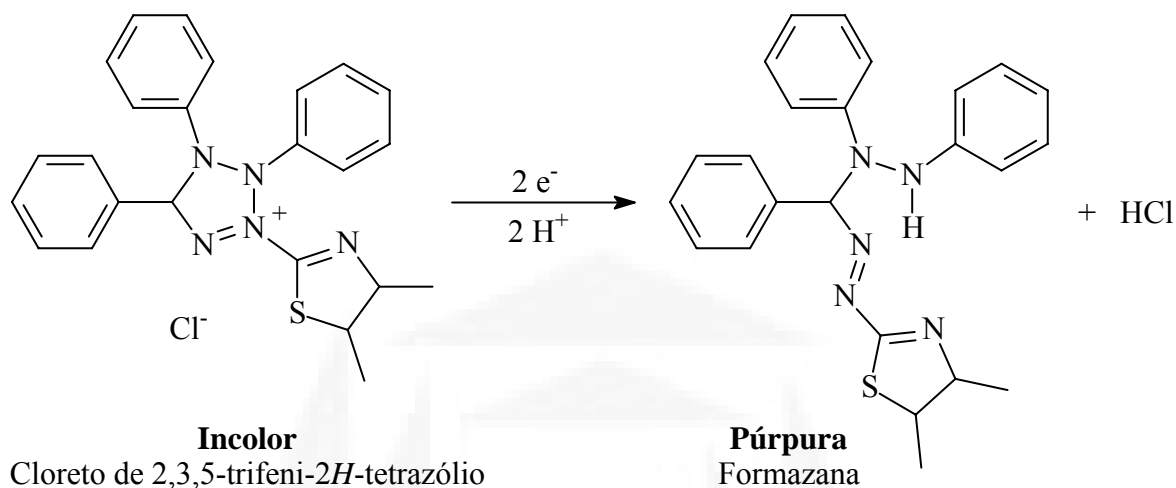


FIGURA 5 – Redução do TTC e conseqüente formação da formazana.

2.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Através deste ensaio torna-se possível avaliar a efetividade da substância testada. Sendo considerada uma análise quantitativa, a qual avalia o comportamento dos microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos antimicrobianos em meio de cultura líquido. A menor concentração que inibe a multiplicação dos microrganismos é denominada CIM⁵⁰. Após uma série de diluições as placas são incubadas. Quando ocorre crescimento bacteriano é observado visualmente, sendo que as culturas onde não observa-se crescimento microbiano, são transferidas em alíquotas e inoculadas em placas com meio sólido, para assim determinar a concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM). Sendo segundo Hammer *et al.* a menor concentração de substância alcançando redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

⁴⁹ STÜKER, C. Z. **Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrium triplinervium*, *Baccharis pentodonta*, *Pluchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium***. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria – RS, 2007.

⁵⁰ HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1990.

2.3 ENSAIO DE LETALIDADE POR *Artemia salina*

A *Artemia salina* é uma espécie de pequeno crustáceo marinho, utilizado como um bioindicador. O termo bioindicador é usado para qualquer membro da fauna e flora de um determinado habitat, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo a que apresente uma resposta nítida face às pequenas variações na qualidade do ambiente⁵¹. Desenvolve-se em habitat marinho, sendo assim, pode ser cultivado em laboratório, pois pode ficar na forma latente por alguns meses.

O ensaio de letalidade por *Artemia salina* foi proposto inicialmente por Michael *et al.* (1956)⁵², complementado por Van Haecke *et al.* (1981)⁵³ e Meyer *et al.* (1982)⁵⁴. O teste baseia-se na habilidade da substância testada em matar os microcrustáceos de *Artemia salina*.

Este ensaio de toxicidade celular *in vivo* é uma ferramenta útil, relativamente rápida e de baixo custo para a preliminar avaliação da toxicidade, onde o parâmetro envolvido é a letalidade do organismo. O ensaio permite realizar um *screening* da planta a ser testada, avaliando a toxicidade geral, portanto é considerado como bioensaio preliminar dos compostos com potencial toxicidade⁵⁵.

2.4 SCREENING FITOQUÍMICO

Os metabólitos secundários compreendem um grupo numerosíssimo de substâncias como: alcalóides, taninos, mucilagens, saponinas, cumarinas, flavonóides, antraderivados, óleos essenciais, resinas, gomas, glicosídeos, etc.

⁵¹ ABEL, P.D. **Water pollution Biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers. Chichester. p. 231, 1989.

⁵² MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a teste organism for bioassay. **Science**, v.123, p.464, 1956.

⁵³ VAN HAECKE, P.; PERSUUNE, G. Report on an intercalibration exercise on a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii* (ARC test). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 5, p. 352 – 387, 1981.

⁵⁴ MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* **Planta Medica** 45, 31-34. 1982.

⁵⁵ CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5 triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20 – 22, 1999.

Os flavonóides são encontrados na forma de glicosídeos responsáveis pela pigmentação amarela, laranja, azul e vermelho das flores. Constituem uma classe de compostos polifenólicos presentes no reino vegetal e, conseqüentemente, na dieta humana. Apresentam atividades biológicas que possuem função protetora perante enfermidades cardiovasculares e cânceres. São compostos que apresentam baixa toxicidade, porém em alguns casos possuem propriedades mutagênicas, como é o caso da quercetina.

Os flavonóides são compostos com baixo peso molecular provenientes de fenilbenzopironas, formados pela junção de três anéis, dois deles aromáticos. Suas estruturas podem ser variáveis originando compostos com diferente grau de oxidação e substituição. O destaque para pesquisar suas atividades biológicas ocorreu nos últimos anos com a reintrodução da Medicina Tradicional, a fim de compreender qual a interação destes compostos com as células e tecidos nos mamíferos. Dentre as atividades reconhecidas pela natureza fenólica é possível citar as três principais, atuando como potentes quelantes e captadores de radicais livres, atividade antioxidante, antiproliferativa e antiinflamatória.

Uma definição empregada atualmente para taninos foi dada por Haslam⁵⁶, segundo qual o termo designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, os taninos vegetais, sendo classificados em dois grupos: as proantocianidinas, denominados taninos condensados, responsáveis pelas características como: adstringência, precipitação de proteínas etc. Além dos taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glucose.

Os alcalóides são compostos de caráter básico e apresentam na sua fórmula nitrogênio. Estão classificados de acordo com sua atividade biológica, estrutura química e a origem biossintética. São farmacologicamente ativos encontrados nas angiospermas, assim como a quinina, substância utilizada para tratamento de arritmias cardíacas e da malária⁵⁷.

⁵⁶ HASLAM, E. **Plant polyphenols**. Cambridge: Cambridge University Press, 230. 1989.

⁵⁷ KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNANDEZ-TERRONES, M.; LOTINA-HENNSSEN, B. Metabólitos secundarios de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas. In: Bernal-Lugo, I.; Loza-Tavera, H. **Avances en bioquímica y biología molecular de plantas**. México D. F.: UNAM, 198p, 2001.

Já as cumarinas são lactonas do ácido o-hidróxi-cinamo. São amplamente distribuídas nos vegetais, podendo ser encontradas em fungos e bactérias. Suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição.

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou ainda, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Quanto à aglicona, denominam-se saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas. No grupo das saponinas esteroidais são considerados também os glicosídeos nitrogenados esteroidais. O caráter ácido pode ser devido a presença de um grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares (exemplo: ácidos glicurônicos e/ou galacturônicos). O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária, como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais⁵⁸.

2.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massas (CG-EM), constitui uma ferramenta extremamente eficaz na análise de óleos essenciais. Através de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, torna a velocidade de varredura grande o suficiente, permitindo a obtenção de vários espectros de massas pelo pico eluído no cromatógrafo⁵⁹. A conexão direta de colunas de capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas, permite a varredura de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, testando a sua homogeneidade. Assim é possível avaliar picos cromatográficos parcialmente superpostos. Com isso a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individualmente separados⁶⁰.

⁵⁸ SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

⁵⁹ BLOOR, S.; PORTER, L.J. Mass Spectrometry. In: **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. [edited by] Colegate, S.M. & Molyneux, R.J., CRC Press, Flórida, EUA, p. 105-120, 1993.

⁶⁰ ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois, 451p., 1995

Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. A maioria dos íons desintegra-se em 10^{-10} a 10^{-3} s, fornecendo um certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores⁶¹. Através de um gráfico de barras gerado por um computador, a abundância relativa dos picos é apresentada como porcentagem, fornecendo o espectro de massas por impacto de elétrons.

⁶¹ SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.G.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 5 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., 387 p., 1994.

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material para análise foi coletado em Lajeado, Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2007. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. André Jasper (departamento de Biologia da Univates) e o material *voucher*, sob número 2267, depositado no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Centro Universitário UNIVATES.

3.2 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS

Os solventes e reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de procedência Nuclear®. Para o preparo das soluções, água obtida de osmose reversa e água Milique® foram utilizadas.

Os meios de cultura para o ensaio antimicrobiano foram oriundos da Difco®, com exceção do caldo Sabourand, proveniente da Oxoid®. Os fármacos cloranfenicol (solução oftálmica 4,0 mg.mL⁻¹ - Allergan®) e cetoconazol (Pharma Nostra®) foram utilizados como padrões antimicrobianos.

No ensaio antioxidante foram utilizados como padrões o BHT (Alpha-Química®) e a quercetina (QUE) (Henrifarma®).

Os meios de cultura, depois de preparados, foram esterilizados por calor úmido (autoclavação 121 °C a 1 atm por quinze minutos) ou por filtração (membrana 0,22 µm) e,

posteriormente, armazenados à temperatura apropriada para a sua conservação, ao abrigo da luz, conforme indicação.

3.3 EQUIPAMENTOS

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Perkin Elmer®, modelo λ 25, da Central Analítica do Centro Universitário UNIVATES. Para o ensaio antioxidante e para o ensaio antimicrobiano utilizou-se comprimento de onda 517 nm e 625 nm, respectivamente.

Para avaliar o óleo essencial foi utilizado um sistema CG-EM-EM Varian compreendido por um cromatografo a gás CP-3900 (Walnut Creek, CA, USA) com um injetor 1077, um auto-amostrador CP-8410 e um espectrômetro de massas íon-trap (Varian Saturn 2100). As separações foram realizadas utilizando uma coluna capilar de sílica fundida ZB-5 (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano; 30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μ m de espessura do filme) fornecida pela empresa Phenomenex (Torrance, CA, USA). A temperatura programada do forno foi de 50° até 250 °C a 3 °C /min. A temperatura da interface foi de 240 °C. Helio (99.999%) foi usado como gás de arraste na pressão constante de 1.0 mL min⁻¹. O volume injetado foi 1 μ L, com razão de split de 1:20. A energia de ionização foi de 70 eV, a faixa de massa foi de 41-380 m z⁻¹.

3.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial das folhas frescas de *C. sylvestris* foi realizada por hidrodestilação, em temperatura ambiente, utilizando o equipamento Clevenger modificado (FIGURA 6). As folhas foram cuidadosamente separadas e inspecionadas quanto à presença de materiais estranhos e lesões ocasionadas por parasitas. Então, foram colocadas em moinho de facas para aumentar a superfície de contato do vegetal, depois de pesadas 350 g das folhas, transferiu-se para o extrator. Após 3 horas coletou-se o óleo essencial extraído.



FIGURA 6 - Sistema de extração de óleos voláteis com extrator do tipo Clevenger modificado.

3.5 EXTRATO AQUOSO (EA)

O extrato aquoso foi produzido através do processo de infusão. Inicialmente o material vegetal fresco foi separado e inspecionado. Após, pesou-se 50,0 g de folhas, previamente picotadas e foi adicionado 750 mL de água destilada fervente. As folhas foram mantidas em contato com a água fervente por um tempo de 30 minutos. O material foi filtrado e o líquido foi liofilizado e armazenado em geladeira.

3.6 EXTRATO ETANÓLICO (EE)

Para preparação do extrato etanólico das folhas, inicialmente separou-se o material vegetal fresco, sendo separado e inspecionado quanto à presença de materiais estranhos e lesões ocasionadas por parasitas. Após, pesou-se 150,0 g de folhas, previamente picotadas.

O processo extrativo de escolha foi maceração estática, o qual fornece rendimento suficiente para realização dos testes biológicos e não submete a espécie em estudo ao aquecimento. Considerando-se que sua composição química é pouco conhecida, torna-se adequado optar por métodos extrativos a frio, a fim de evitar a perda ou degradação de possíveis compostos termolábeis.

Foi utilizada uma solução etanólica 90%, a fim de facilitar o processo extrativo do EE. A relação da planta para o solvente foi 1:10, mantida por um período de sete dias em repouso em frascos âmbar. Decorrido este tempo, as soluções extrativas foram filtradas e o solvente foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e em banho termostatizado com temperatura de 40 °C. Os extratos foram armazenados em frascos de tamanho adequado, protegidos da luz e sob congelamento a aproximadamente -9 °C.

3.7 ENSAIOS

3.7.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O potencial de redução do radical DPPH dos extratos de *C. sylvestris* foi avaliado espectrofotometricamente, conforme descrito por Elmastas *et al.*. Preparou-se uma solução metanólica a 0,051 mg.mL⁻¹ de DPPH, onde 1,0 mL desta solução foi adicionado a 3,0 mL das soluções metanólicas dos extratos de concentrações 0,005 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,02 mg.mL⁻¹, 0,04 mg.mL⁻¹, 0,06 mg.mL⁻¹, 0,10 mg.mL⁻¹. As misturas foram agitadas e mantidas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 30 minutos. As absorvâncias das amostras e do controle foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda de 517 nm (região do visível) correspondente à absorção máxima do radical livre em estudo. O experimento foi realizado em três amostras, repetidos três vezes, tendo como controle o BHT (padrão antioxidante sintético) e a quercetina (padrão antioxidante natural).

A habilidade dos extratos em reduzir o radical livre DPPH foi calculada conforme a equação a seguir:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

Onde A0 corresponde à absorvância da reação controle e A1 às absorvâncias das amostras.

3.7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a atividade antioxidante a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS for Windows, versão 8.0, Para tanto, utilizou-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), quando necessário. Os dados foram expressos por Média \pm Erro Padrão da Média (M \pm EPM). Os valores foram considerados significativos quando o erro de tipo I ($P\alpha$) foi menor ou igual a 0,05.

3.7.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos da *C. sylvestris* foi realizada através do método da microdiluição, enquanto que o óleo essencial foi avaliado por bioautografia. Utilizando cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) dos seguintes microrganismos:

Bactérias Gram Positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633);

Bactérias Gram Negativas: *Salmonella setubal* (ATCC 19796); *Escherichia coli* (ATCC 25792); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853);

Fungos (Leveduras): *Candida albicans* (ATCC 10231); *Sacharomyces cerevisiae* (ATCC 2601); *Cryptococcus neoformans* (ATCC 28952), *Candida glabrata* (ATCC 10231).

O padrão utilizado para as bactérias foi o cloranfenicol na concentração de 0,2 mg.mL⁻¹, enquanto que para os fungos foi utilizado o cetoconazol na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

3.7.3.1 MÉTODO DA BIOAUTOGRAFIA

Através deste método a amostra é aplicada em meio sólido utilizando cromatofolhas de alumínio em gel de sílica 60 F₂₅₄ de procedência da Merck® (Cód. 5554), a qual foi submetida a um meio de cultura sólido previamente inoculado.

Inicialmente foram preparadas as diluições do óleo essencial de *C.sylvestris* em hexano, as quais foram aplicadas em cromatofolhas com auxílio de uma microseringa, resultando nas quantidades de substância ativa (QSA) de 100,0 µg, 50,0 µg, 25,0 µg, 12,5 µg, 6,25 µg e 3,12 µg de óleo essencial. Para cada cromatoplaça, aplicou-se um padrão, cloranfenicol na concentração de 0,2 mg.mL⁻¹ para as bactérias, e cetoconazol na concentração de 1 mg.mL⁻¹ para os fungos.

Em seguida as cromatofolhas contendo as amostras foram depositadas nas placas de Petri (10 x 100 mm), onde foram adicionados, para cada placa, 10,0 mL do meio de cultura ágar nutriente, para bactérias, e ágar Sabouraud, para leveduras, já contendo a suspensão do microrganismo a ser analisado. Após a solidificação as placas foram incubadas na posição invertida a 35 °C por 24 horas, para bactérias, e a 25 °C por 48 horas para as leveduras. Decorrido o período de incubação, as placas foram reveladas com uma solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹. A solução foi borrifada sobre as placas, resultando em uma coloração vermelha com os halos de inibição visíveis.

3.7.3.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Empregou-se a técnica descrita pelo NCCLS *et al.*, com algumas modificações. Utilizando-se placas estéreis de 96 micropoços (Costar, código 3596). A partir de soluções dos extratos da *C. sylvestris* na concentração de 20,0 mg.mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO), aplicaram-se alíquotas de 100,0 microlitros nas placas, em triplicata. A seguir realizou-se uma série de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja para bactérias, e Sabourand para fungos, previamente inoculados, resultando nas seguintes concentrações teste: 10 mg.mL⁻¹; 5 mg.mL⁻¹; 2,5 mg.mL⁻¹; 1,25 mg.mL⁻¹; 0,625 mg.mL⁻¹ e 0,3125 mg.mL⁻¹.

O padrão antibiótico foi aplicado também em diluições seriadas, a partir de uma solução de cloranfenicol $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que o padrão antifúngico utilizado foi o cetoconazol em solução de 1 mg.mL^{-1} . Durante o teste ainda foi realizado o controle do meio de cultura, do inóculo e do dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram então incubadas em estufa, por 24 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ para bactérias e 48 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, por meio da presença de turvação nos poços. O poço contendo a menor concentração, onde não mais se observou crescimento microbiano, possibilitou a verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Como o extrato possui coloração para facilitar a visualização do crescimento microbiano, foi aplicado $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 5 mg.mL^{-1} , resultando em uma coloração vermelha nos poços onde houve crescimento.

As culturas que não apresentaram crescimento nos poços foram transferidas para placa de meio sólido (Agar nutriente e Agar Sabourand), a fim de determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), como sendo a menor concentração da substância onde não ocorreu crescimento microbiano. As amostras foram realizadas em triplicata.

3.7.4 ANÁLISE DA TOXICIDADE

O processo para análise da toxicidade utiliza o microcrustáceo *Artemia salina*, cuja metodologia foi adaptada de Meyer *et al.* (1982). As amostras foram diluídas, a fim de obter concentrações de $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, $1000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e juntamente, foi aplicado o controle positivo nos tubos de ensaio, em triplicata, deixando em repouso por 24 horas para secagem do solvente. Passado esta etapa, foram aplicadas 10 espécimes de *A. salina* em cada tubo, acrescido de $0,05 \text{ mL}$ de levedura. O tubo foi fechado e deixado em repouso por 24 horas, para posterior avaliação da DL_{50} .

Previamente ao início do teste é realizada a eclosão dos ovos de *Artemia salina* em solução salina, após a eclosão as larvas são submetidas a diluições seriadas da amostra por um

período de 24h. Passado o prazo os resultados são avaliados estatisticamente pelo método da regressão linear, fornecendo o valor da dose letal capaz de matar 50% (DL₅₀) dos indivíduos daquela população. As amostras são consideradas ativas quando o valor da DL₅₀ < 1000 µg.mL⁻¹, segundo Probits⁶²

3.7.5 SCREENING FITOQUÍMICO

Consistiu em um conjunto de análises qualitativas realizadas com a espécie vegetal de escolha, a planta fresca, a fim de caracterizar a constituição química.

A detecção dos grupos químicos é feita através de reações químicas que apresentam desenvolvimento de cor ou de precipitado, e também pelo perfil cromatográfico. Esta análise é de extrema importância para uma caracterização química inicial da espécie, a qual tem íntima relação com o perfil de atividade farmacológica que a planta apresentará.

Os reagentes de coloração empregados nestes ensaios estão descritos no ANEXO A. A metodologia empregada neste *screening* foi adaptada a partir de Harborne⁶³, Simões *et al.* e Farmacopéia Brasileira⁶⁴.

3.7.5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Extraiu-se cerca de 0,5 g de ambas as amostras vegetais com cerca de 20,0 mL de água em banho-maria fervente. Esfriou-se, filtrou-se e dividiu-se em 3 tubos de ensaio.

No tubo A adicionaram-se gotas de uma solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração verde ou azul é indicativo da presença de compostos fenólicos.

⁶² FINNEY, D.J. **Probit Analysis**: a statistical treatment of the sigmoid response curve. University Press, Cambridge, p. 55-80, 1974.

⁶³ HARBORNE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3. ed. London: Chapman and Hall, 1998.

⁶⁴ Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

No tubo B adicionaram-se gotas de uma solução aquosa de hidróxido de potássio 3%. O aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja é indicativo da presença destes compostos.

O tubo C consistiu no controle para verificação da coloração inicial do extrato.

3.7.5.2 TANINOS

Em um copo de béquer, extraiu-se por aquecimento 1 g do vegetal com 20 mL de água, por 30 minutos. Após resfriamento, filtrou-se com algodão e dividiu-se em 4 tubos de ensaio (A, B, C e D).

No tubo A adicionaram-se 3 gotas de solução de gelatina 1%. Como os taninos possuem a propriedade de precipitar proteínas, a formação de um precipitado branco indica a presença destes.

No tubo B adicionaram-se gotas de FeCl_3 1% (solução aquosa). A complexação de hidroxilas presentes nos taninos com Fe^{+2} leva ao desenvolvimento de substâncias de coloração azulada ou esverdeada. O desenvolvimento de cor azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e cor verde indica taninos condensados.

No tubo C adicionaram-se 3 gotas de ácido clorídrico diluído a fim de verificar possível precipitação, a qual indica a presença de taninos condensados, pois os mesmos sofrem oxidação com ácidos.

O tubo D consistiu no controle para verificação da coloração inicial do extrato.

3.7.5.3 FLAVONÓIDES

Extraiu-se cerca de 2,0 g de cada amostra da planta em aproximadamente 50,0 mL de água em banho maria fervente. Esfriou-se, filtrou-se, e extraiu-se em funil de separação com 2

vezes de 10,0 mL de *n*-butanol. Evaporou-se a fração butanólica à secura em cápsula de porcelana, e retomou-se o extrato em metanol (cerca de 10,0 mL). Transferiu-se para 2 tubos de ensaio.

No tubo A adicionou-se, cuidadosamente, 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado, e após 0,1 g de magnésio metálico. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas, coloração violácea indica flavononas e cor vermelha a presença de flavonóis.

O tubo B consistiu no controle para verificação da coloração inicial do extrato.

3.7.5.4 CUMARINAS

Empregou-se a técnica de sublimação. Em um tubo de ensaio, aqueceu-se cerca de 0,5 g das amostras em banho-maria fervente. O tubo foi tampado com papel filtro seco previamente impregnado com uma solução metanólica de hidróxido de potássio 5%. Após 10 minutos, expuseram-se os papéis à radiação UV de $\lambda = 365$ nm. Quando há a presença de cumarinas voláteis, observa-se coloração amarela e azul, conforme a estrutura da cumarina detectada.

3.7.5.5 QUINONAS

Em um béquer extraiu-se em banho-maria fervente durante 10 minutos, 0,2 g do vegetal com 5,0 mL de hidróxido de potássio 3% (m/v). Após resfriado, filtrou-se o extrato e acidificou-se em ácido acético e após extraiu-se com 5,0 mL de tolueno. Separou-se em um béquer a fase orgânica e adicionaram-se 2,0 mL de solução de hidróxido de potássio 3% (m/v). O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas, a coloração violácea indica a presença de naftoquinóides e o surgimento de coloração azul indica a presença de benzoquinóides. Este ensaio detecta a presença de quinonas livres (agliconas).

A presença de quinonas na forma heterosídica é verificada submetendo-se o material vegetal à hidrólise ácida. Ferveu-se 1,0 g de cada parte da planta fresca (folhas e inflorescências) com 10,0 mL de ácido clorídrico a 10%, por 15 minutos. Esfriou-se, filtrou-se, e adicionou-se 5,0 mL de tolueno ao extrato. Separaram-se as fases, e a orgânica (tolueno) foi submetida à identificação. A adição de 2,0 mL do reagente de Bornträger (KOH 0,5 mol.L⁻¹) resulta em aparecimento de coloração vermelha na fase aquosa (KOH), quando da presença de quinonas glicosídicas. As técnicas se baseiam no fato de que as agliconas (formas livres) são solúveis em solventes orgânicos, e os respectivos fenolatos alcalinos são solúveis em água.

3.7.5.6 SAPONINAS

Em um béquer extraiu-se em banho-maria fervente durante 15 minutos, 1,0 g do vegetal com 20,0 mL de água. Após resfriado, filtrou-se e colocou-se em tubo de ensaio. O tubo foi submetido a agitações durante 10 segundos e mediu-se então a altura da espuma formada. O desenvolvimento de espuma com altura superior a 10 mm e persistência de espuma após repouso, e após adição de ácido clorídrico 10% indica positividade para compostos desta classe.

3.7.5.7 CARDIOTÔNICOS

Em um béquer extraiu-se em banho-maria durante 30 minutos, cerca de 3,0 g da planta com cerca de 20,0 mL de água e 10,0 mL de acetato de chumbo. Filtrou-se o extrato com auxílio de algodão. Extraiu-se o filtrado em clorofórmio, e a partir deste realizou-se a identificação de porções da molécula dos cardiotônicos: anel lactônico, pelo emprego dos reativos de Baljet e de Kedde; núcleo esteroidal, pelo reativo de Liebermann-Burchard e reativo de Salkowsky; e desoxi-açúcares, pelo reativo de Keller-Kiliani.

3.7.5.8 ALCALÓIDES

Em um béquer, extraiu-se em banho-maria (40 °C) 2,0 g do vegetal picado com 10,0 mL de ácido clorídrico 1% durante 30 minutos. Filtrou-se o extrato em algodão. Parte deste filtrado foi transferido para o vidro relógio, onde foram adicionados os seguintes reagentes de detecção, gota a gota: reagente de Mayer, reagente de Dragendorff, reagente de Wagner e reagente de Bertrand. O aparecimento de precipitado indica provável presença de alcalóides.

3.7.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os constituintes do óleo essencial foram identificados através da eluição em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) juntamente com a determinação do índice de retenção de Kovats (IK).

Para cálculo do índice de retenção de Kovats, uma mistura de padrões de alcanos (C9 a C21) foi utilizada. Esta amostra foi diluída em n-hexano e analisada. Após, esta solução foi adicionada a amostra em estudo e analisada novamente. Os índices de retenção dos compostos foram obtidos de acordo com a equação:

$$Ir = 100n + \Delta n \frac{tr_i - tr_n}{tr_m - tr_n}$$

onde:

Ir_i = índice de retenção **i**

n = número de carbonos do alcano que elui antes de **i**

m = número de carbonos do alcano que elui depois de **i**

Δn = número de carbonos do alcano que elui depois de **i** menos número de carbonos do alcano que elui antes de **i**

tr_i = tempo de retenção de **i**

tr_n = tempo de retenção do alcano que elui antes de **i**

tr_m = tempo de retenção do alcano que elui depois de **i**.

A identificação dos componentes foi baseada na comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do sistema (NIST 2.0 e biblioteca Saturn) e pela comparação dos índices de retenção de Kovats obtidos experimentalmente, com os padrões de igual índice de retenção de acordo com literatura.



IV APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

As folhas de *Casearia sylvestris* foram coletadas no município de Lajeado – RS, sendo submetidas ao processo de hidrodestilação no sistema de Clevenger modificado. Seu rendimento obtido para as folhas de *Casearia sylvestris* foi de aproximadamente 1%, cerca de 3,5 mL de óleo para 350 g de material vegetal. O óleo apresentou coloração amarela clara e seu odor foi característico.

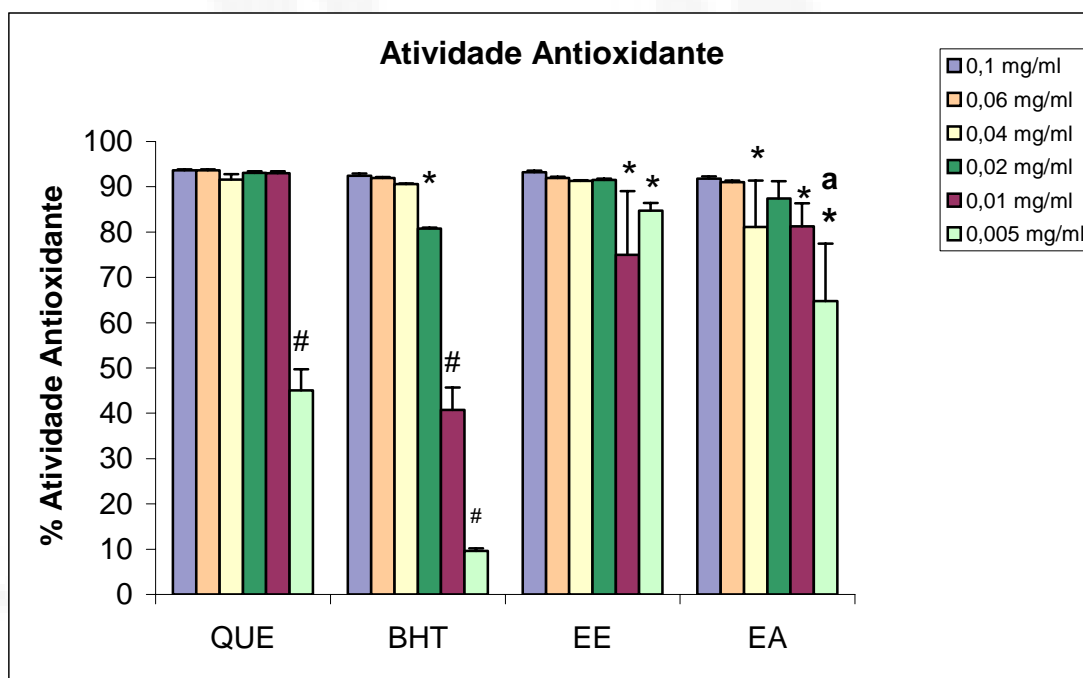
4.2 EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO

Após a remoção do solvente em evaporador rotatório, obteve-se extrato de coloração marrom escuro, com rendimento de aproximadamente 3,7% para o EE, enquanto que para o EA o rendimento foi de 6,7%, também de coloração marrom escura.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

Ao avaliar a atividade antioxidante (GRÁFICO 1) observamos diferença significativa entre os grupos testados (ANOVA de uma via $p < 0,001$). Quando aplicamos o teste de *post-hoc* (SNK) observamos que o EE na menor dose utilizada apresentou a mesma atividade antioxidante das demais substâncias testadas, independente das doses em que foram utilizadas

(SNK $p > 0,05$). É importante salientar que o EA na menor dose ($0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$) apresentou atividade antioxidante igual ao EE $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, BHT $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, EA $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, EA $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, EE $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ (SNK $p > 0,05$), no entanto esta mesma concentração apresentou menos atividade antioxidante quando comparada a concentrações maiores (EE: $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; BHT: $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; EA: $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; QUE: $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ SNK $p < 0,05$). Além disso, observamos que o BHT nas concentrações $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, assim como a QUE $0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentaram menor atividade antioxidante que os extratos (EE e EA) em qualquer das concentrações utilizadas (SNK $p < 0,05$).



* grupos com atividades iguais (Student-Newman-Keuls - $p > 0,05$).

diferença significativa em relação aos demais grupos (Student-Newman-Keuls - $p < 0,05$).

^a diferença significativa dos demais grupos que não estão assinalados como iguais a ele (Student-Newman-Keuls - $p < 0,05$).

GRÁFICO 1 - Atividade antioxidante. Dados expressos em Média±EPM do percentual de atividade antioxidante.

Podemos sugerir que a importante atividade antioxidante observada tanto no EE quanto no EA seja resultante da composição química dos extratos (EE e EA). Sabe-se que

através da referência que cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos, especialmente os clerodânicos^{5,23,21} fazem parte da sua composição. Os resultados encontrados no *screening* fitoquímico confirmam a presença de compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos condensados e cumarinas. Merecendo destaque para compostos fenólicos e flavonóides que determinam a potencial atividade antioxidante do extrato da *C. sylvestris*, atuando como sequestradores de radicais livres presentes.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 BIOAUTOGRAFIA

A TABELA 2 apresenta os valores encontrados para atividade antimicrobiana do óleo essencial da *C. sylvestris* mostrando uma atividade moderada frente a maioria dos microrganismos testados. A atividade mais expressiva foi encontrada para os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Para estes microrganismos todas as concentrações testadas apresentaram inibição, sendo um resultado semelhante ao encontrado no estudo de Schneider *et al.*. Enquanto que para os fungos testados as atividades não foram tão importantes.

TABELA 2 - Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial da *C. sylvestris*.

MICROORGANISMO	CIM (mg.mL ⁻¹)	PADRÃO (mg.mL ⁻¹)*
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,12	0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,12	0,2
<i>Escherichia coli</i>	3,12	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,12	0,2
<i>Salmonella setubal</i>	12,5	0,2
<i>Candida albicans</i>	12,5	1,0
<i>Candida glabrata</i>	25	1,0
<i>Candida dubliniensis</i>	12,5	1,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	1,0
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	12,5	1,0

*Cloranfenicol para bactérias e cetoconazol para fungos;

NA: Não ativo;

4.4.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Os resultados encontrados para a atividade antimicrobiana das bactérias e fungos do EE e do EA estão descritos conforme as TABELAS 3 e 4.

TABELA 3 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos EE e EA da *C. sylvestis*.

Microrganismos	EA* (mg.mL ⁻¹)		EE*(mg.mL ⁻¹)		Padrão ^{&} (mg.mL ⁻¹)
	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>Bacillus subtilis</i>	NA	NA	2,50	5,00	3,12 x 10 ⁻³
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	NA	1,25	1,25	3,12 x 10 ⁻³
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NA	NA	2,50	5,00	3,12 x 10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	1,25	2,50	3,12 x 10 ⁻³
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NA	NA	5,00	5,00	3,12 x 10 ⁻³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	NA	5,00	5,00	3,12 x 10 ⁻³
<i>Salmonella Setubal</i>	NA	NA	1,25	2,50	3,12 x 10 ⁻³

* Concentração inicial de 20,0 mg.mL⁻¹.

& Padrão antibiótico cloranfenicol 0,2 mg.mL⁻¹.

NA: Não ativo.

Ao observar os valores na TABELA 4, é possível verificar-se que o EE apresentou atividade antimicrobiana superior ao EA, o qual não apresentou qualquer atividade frente às bactérias. Por outro lado, o EE apresentou uma atividade mais efetiva frente ao *Staphylococcus aureus* (CIM = CBM = 1,25 mg.mL⁻¹), *Escherichia coli* (CIM = 1,25 mg.mL⁻¹; CFM = 2,50 mg.mL⁻¹) e a *Salmonella setubal* (CIM = 1,25 mg.mL⁻¹; CBM = 2,50 mg.mL⁻¹), possuindo atividade bactericida frente a estas bactérias.

TABELA 4 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos EE e EA da *C. sylvestis*.

Microrganismos	EA* (mg.mL ⁻¹)		EE* (mg.mL ⁻¹)		Padrão ^{&} (mg.mL ⁻¹)
	CIM	CFM	CIM	CFM	
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	5,0	-	1,25x10 ⁻¹
<i>Candida glabrata</i>	NA	NA	5,0	-	1,25x10 ⁻¹
<i>Candida dubliniensis</i>	NA	NA	5,0	-	1,25x10 ⁻¹
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA	NA	5,0	5,0	1,25x10 ⁻¹
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	NA	NA	5,0	5,0	1,25x10 ⁻¹

* Concentração inicial de 20,0 mg.mL⁻¹.

& Padrão antibiótico cetoconazol de 1,0 mg.mL⁻¹.

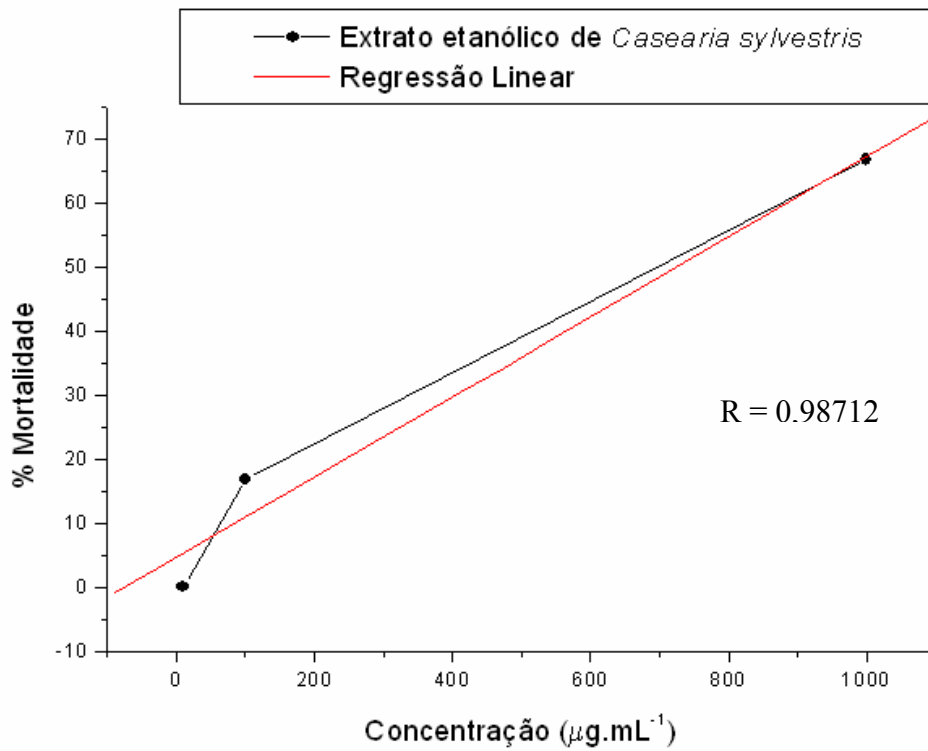
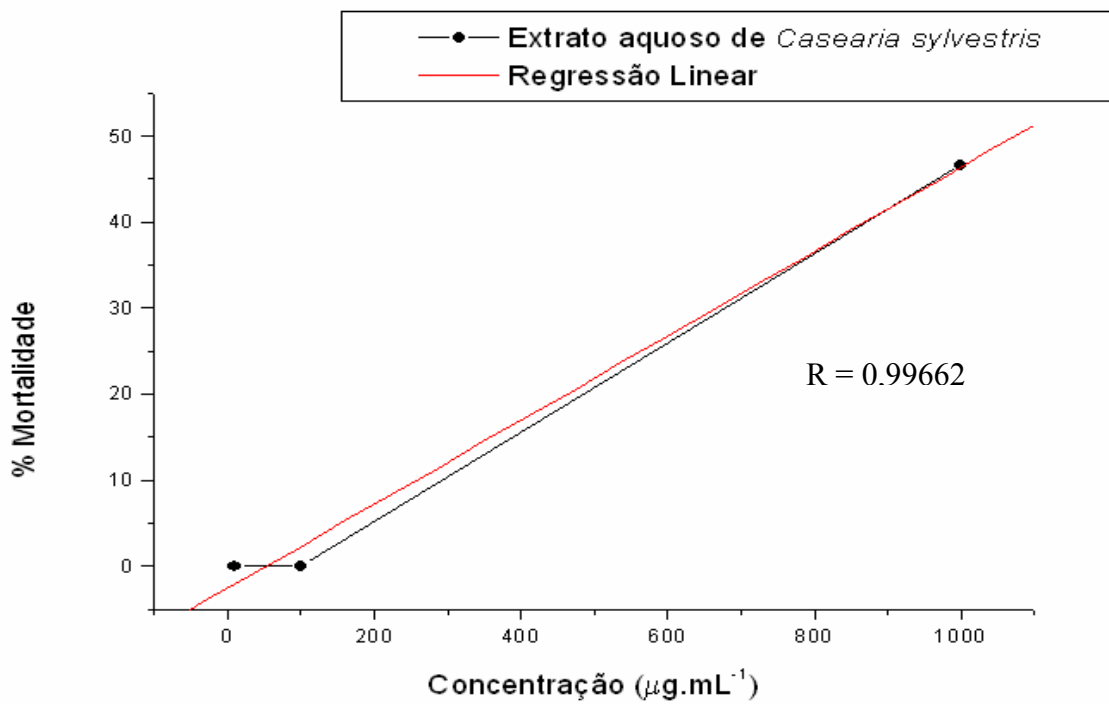
NA: Não ativo.

Quanto à avaliação antifúngica (Tabela 4), é possível observar que o EA não apresentou atividade antimicrobiana, enquanto que o EE apresentou moderada ação fungicida, sendo letal para os microrganismos *Sacharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*, já que o valor encontrado no CIM coincide com o do CFM e, apresentou característica fungistática, inibindo o crescimento dos microrganismos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*.

4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Neste teste foi possível avaliar a toxicidade dos extratos quando em contato com a *Artemia salina* e calcular o valor da dose letal em 50% (DL₅₀) para os microcrustáceos, fornecido pelas Figuras 6 e 7. O comportamento dos extratos foi distinto em cada teste realizado. De acordo com Meyer *et al.*, as amostras são consideradas tóxicas quando o valor da DL₅₀ < 1000 µg.mL⁻¹ ⁶². Assim sendo quanto menor for a valor encontrado no cálculo, maior será a sua potencial atividade tóxica. No cálculo da regressão linear foi encontrado o valor da DL₅₀ para o EA de 1073,68 µg.mL⁻¹, enquanto que para o EE, o valor foi de 724,76 µg.mL⁻¹ para sua DL₅₀.

Comparando os valores encontrados para a DL₅₀ com os dados da literatura^{54,62} as amostras evidenciam uma potencial atividade tóxica para o EE, demonstrando que o bioensaio utilizando a letalidade da *A. salina* como parâmetro apresentou-se eficiente.

GRÁFICO 2 - Citotoxicidade do EE de *C. sylvestris*.GRÁFICO 3 - Citotoxicidade do EA de *C. sylvestris*.

4.6 SCREENING FITOQUÍMICO

Verificou-se a presença alguns compostos secundários nas folhas de *C. sylvestris*, tais como: compostos fenólicos, taninos, cumarinas, alcalóides, saponinas e flavonóides.

4.6.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

O teste para detecção de compostos fenólicos na planta fresca resultou no desenvolvimento de coloração verde, conforme previsto quando da presença de compostos fenólicos em geral, que possuem em comum um anel aromático contendo um ou mais substituintes hidroxila. O teste no tubo B também resultou em coloração indicativa da presença destes compostos, por meio do desenvolvimento de coloração alaranjada.

Conforme Simões *et al.* e Bruneton⁶⁵, tais metabólitos vegetais, por serem fenólicos, são muito reativos quimicamente, e por isso facilmente oxidáveis pela ação de diversos fatores, como a luz, calor e o meio alcalino, ocasionando o escurecimento ou intensificação da cor de suas soluções. Isto explica o surgimento de coloração alaranjada escura das soluções quando da adição de solução alcalina de hidróxido de potássio 3%.

Outra característica importante é a propriedade de complexação dos fenóis com metais. A importância destes quelatos metálicos nos sistemas biológicos já foi exemplificada anteriormente, na seção “Compostos vegetais com atividade antioxidante”. Além disso, essa propriedade é útil para sua identificação. A complexação de fenóis com ferro ou manganês resulta no desenvolvimento de coloração escura de suas soluções, conforme observado quando da adição de solução de cloreto férrico 1%.

⁶⁵ BRUNETON, J. Farmacognosia: fitoquímica das plantas medicinales. 2. ed. Zaragoza: Acribia. 2001

4.6.2 FLAVONÓIDES

Na reação da cianidina para detecção de flavonóides, obteve-se o desenvolvimento de coloração avermelhada, indicando a presença de flavonóides do tipo flavonóis.

A reação da cianidina, também conhecida como reação de Shinoda, baseia-se no fato de que flavonóides de coloração amarela, em presença do magnésio metálico, são reduzidos à cor vermelha, e antociânicos, à cor azul .

4.6.3 CUMARINAS

Manchas de coloração azul foram observadas no papel filtro, quando da exposição à radiação UV em $\lambda = 365$ nm, indicando a presença de cumarinas, as quais, conforme Bruneton possuem um espectro ultravioleta característico, apresentando cores intensas como azul, amarelo e roxo.

4.6.4 CARDIOTÔNICOS

A detecção da presença de núcleo esteróide no material vegetal fresco foi realizada quando da investigação por compostos cardiotônicos, para detecção de seu núcleo esteroidal, onde se empregaram os reagentes de Lieberman-Burchard e de Salkowsky.

De fato, o núcleo esteroidal é comum a outros metabólitos vegetais, que não fitoesteróis, como saponinas e alcalóides esteroidais e cardiotônicos. No entanto, não foi detectada a presença de cardiotônicos na espécie vegetal em análise.

4.6.5 TANINOS

Observou-se presença de taninos condensados, devido ao surgimento da cor verde. Vegetais ricos em taninos são utilizados popularmente para o tratamento de diversas

patologias, tais como, diarreia, disfunções gastrointestinais (gastrite, úlcera gástrica, entre outros), problemas do sistema urinário, processos inflamatórios em geral .

Algumas atividades biológicas também são citadas, destacando-se a ação bactericida e fungicida (Scalbert, 1991). Podendo sugerir uma possível relação entre esse composto secundário e as atividades observadas nas análises com os extratos.

4.6.6 ALCALÓIDES

Observou-se presença de alcalóides nas folhas de *C. sylvestris*, pois houve o aparecimento de precipitado quando em contato com todos os reagentes testados.

4.6.7 SAPONINAS

Constatou-se que no teste para detecção de saponinas ocorreu o surgimento de 1,5 cm de espuma, sugerindo a presença deste composto secundário em folhas de *C. sylvestris*.

4.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Casearia sylvestris* foi submetido a análise cromatográfica, possibilitando a identificação de 97,3% dos seus constituintes. A FIGURA 7 apresenta o cromatograma do óleo essencial após o teste realizado. Enquanto que, na TABELA 5 estão listados os constituintes químicos do óleo estudado.

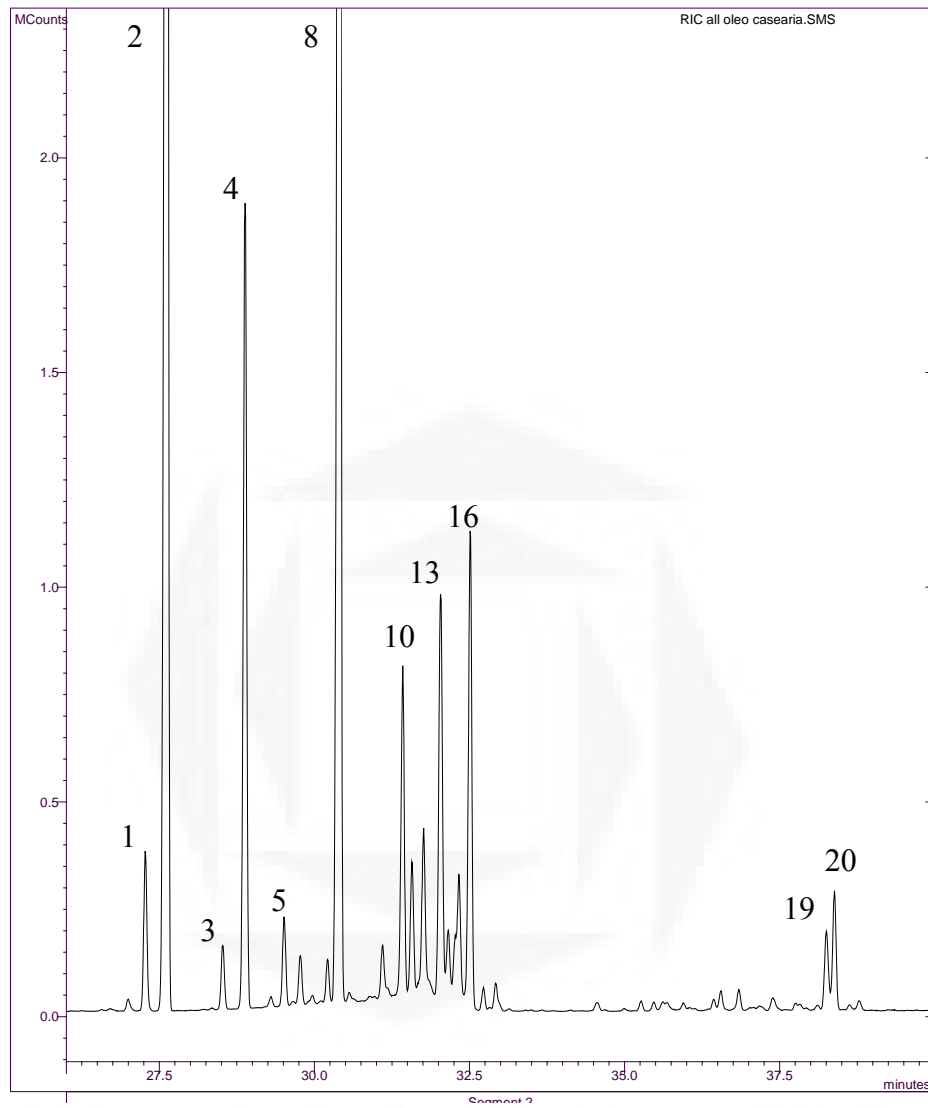


FIGURA 7 – Cromatograma do óleo essencial de *C. sylvestris*.

TABELA 5 - Composição química do óleo essencial de *C. sylvestris*.

Compostos ^a	%	RI ^{b c}
01 ni	1,5	1384
02 β-elemeno	31,7	1392
03 α-gurjuneno	0,6	1412
04 <i>E</i> -cariofileno	8,8	1422
05 α-guaieno	1,0	1437
06 ni	0,7	1443
07 <i>E</i> -β-farneseno	0,6	1454
08 α-humuleno	28,2	1458
09 β-chamigreno	0,6	1475
10 germacreno-D	3,8	1482
11 ni	1,7	1486
12 valenceno	2,6	1491
13 biciclogermacreno	5,0	1497
14 ni	1,0	1501
15 α-bisaboleno	1,6	1505
16 germacreno-A	5,2	1509
17 γ-cadineno	0,2	1515
18 δ-cadineno	0,3	1520
19 β-eudesmol	0,9	1658
20 epi-α-eudesmol	1,3	1661
TOTAL	97,3	

^aCompostos listados em ordem de eluição na coluna ZB-5; ^bIdentificação: RI, índice de retenção, GC-MS, cromatografia gasosa-espectrometria de massas; ^cTemperatura programada, índice de retenção determinado na coluna apolar ZB-5 (50-250 °C; 3 °C min⁻¹). Ni = não identificado.

O óleo essencial de *C. sylvestris* apresentou como estruturas predominantes os sesquiterpenos hidrocarbonetos (C₁₅H₂₄), tendo como compostos majoritários o β-elemeno (31,7%) e α-humuleno (28,2%). Além de dois sesquiterpenos oxigenados, o epi-α-eudesmol (1,3%) e o β-eudesmol (0,9%). Através da avaliação da composição química encontrada, foi

possível observar que o óleo avaliado apresenta uma constituição diferente da encontrada na literatura^{11,29}.

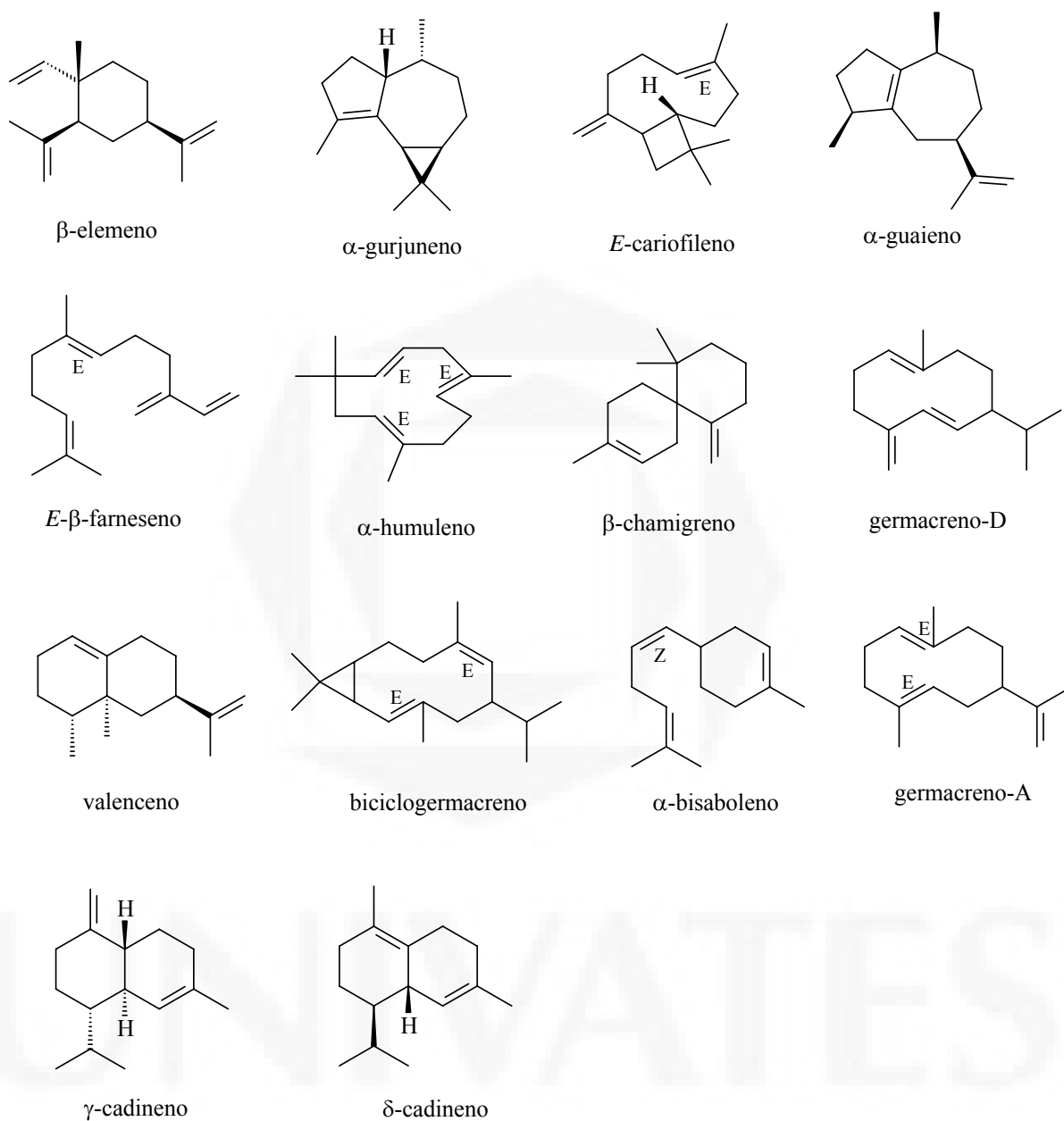


FIGURA 8 - Sesquiterpenos hidrocarbonetos do óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

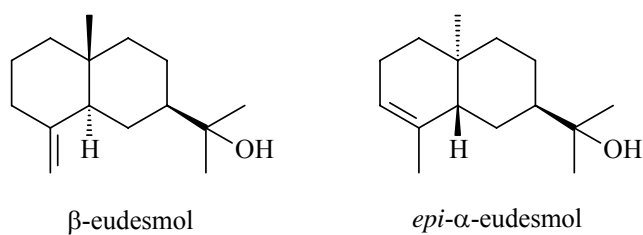


FIGURA 9 - Sesquiterpenos oxigenados do óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

Devido ao caráter lipofílico do óleo essencial de *C. sylvestris*, o teste para avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado pela metodologia da bioautografia, que facilitou a sua dissolução no solvente utilizado. As outras atividades farmacológicas não foram realizadas devido a essa característica particular do óleo.



VI CONCLUSÃO

Considerando os objetivos para a realização deste trabalho juntamente com os métodos de análise utilizados e os resultados encontrados foi possível concluir que:

As técnicas adaptadas para este trabalho demonstraram eficiência para a preparação dos extratos e óleo essencial, além de permitir as análises *in vivo* e *in vitro*.

O solvente escolhido para a produção dos extratos foi eficiente. Isto é extremamente importante porque demonstrou que tais metabólitos vegetais, aos quais são atribuídas várias propriedades farmacológicas, não foram excluídos pelo processo extrativo empregado.

Através dos ensaios da atividade antioxidante foi possível verificar que os extratos (EA e EE) apresentam atividade antioxidante, verificados pela pelo teste do DPPH. Sendo que pela análise estatística ANOVA, seguida de Student-Newman-Keuls, os extratos apresentaram uma atividade antioxidante superior aos padrões BHT e quercetina nas menores concentrações testadas (SNK $p < 0,05$). Inclusive o EE na menor concentração apresentou igual atividade antioxidante para as demais concentrações, salientando que a atividade não é dependente da concentração utilizada. Sendo assim, os extratos apresentaram atividade sequestradora do radical livre DPPH.

Os testes da atividade antimicrobiana revelaram que o EA não apresentou atividade para nenhum dos microrganismos testados, enquanto que o EE apresentou melhor atividade frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*, demonstrando apresentar característica bactericida frente a estas bactérias. Para os fungos testados foi encontrada atividade fungicida, sendo letal para os microrganismos

Sacharomyces cerevisiae e *Cryptococcus neoformans*, já que o valor encontrado no CIM coincide com o do CFM. E, apresentou característica fungistática, inibindo o crescimento dos microrganismos, para *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*.

Para o óleo essencial da *C. sylvestris* foi possível observar uma atividade mais expressiva para os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo todas as concentrações testadas. Estas bactérias são responsáveis por gastroenterites e bacterimias, tipos de pneumonia. Enquanto que para os fungos testados as atividades não foram tão importantes. Com isso é possível concluir que o óleo apresenta um melhor potencial antimicrobiano para bactérias do que para os fungos.

A avaliação do óleo através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas possibilitou, com sucesso, identificar os componentes do óleo de *Casearia sylvestris* encontrada no Vale do Taquari, possuindo os sesquiterpenos, o β -elemeno (31,7%) e α -humuleno (28,2%), como componentes majoritários, diferente dos estudos realizados.

Quanto ao teste da letalidade da *Artemia salina* foi possível revelar que o EA não apresentou toxicidade neste teste, comparado com o EE testado que, pelo valor de DL_{50} encontrado, demonstrou uma toxicidade moderada. Dados importantes de serem considerados, pois a planta é utilizada na medicina popular, através da ingestão oral de preparados aquosos.

O *screening* fitoquímico empregado consistiu em diversos testes qualitativos que apontaram para a presença de grupos de compostos em *C. sylvestris*, como forma preliminar. As atividades apresentadas pelos extratos podem estar relacionadas com a presença dos grupos detectados, como, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, alcalóides e saponinas.

Com a conclusão deste trabalho foi possível observar que existe a necessidade de continuidade e aprofundamento nas pesquisas da espécie vegetal *Casearia sylvestris* pelas propriedades encontradas na planta. Para melhores conclusões quanto à composição química do óleo essencial de *Casearia sylvestris* são necessários testes contínuos, a fim de avaliar os

possíveis interferentes na sua composição, como o solo da região, estação do ano e horário que será feita a coleta.



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Reativos de Coloração.....	51
--------------------------------------	----



UNIVATES

ANEXO 1 - Reativos de Coloração

Os reagentes a seguir foram preparados conforme descrito em: **Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel**, E. Merck, Darmstadt: Alemanha, 1972.

Reagente de Mayer: Misturaram-se 1,36 g HgCl₂/60 mL de água e 5 g de KI/10mL de água. Completou-se o volume para 100 mL com água.

Reagente de Wagner: Dissolveram-se 1,27 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 5 mL de água e completou-se o volume para 100 mL com água.

Reagente de Dragendorff segundo Munier: Solução A: dissolveu-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água. Solução B: dissolveu-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água. Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

Reagente de Baljet: Solução A: 1 g de ácido pícrico/100 mL de etanol. Solução B: 10 g de NaOH/100 mL de água. Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

Reagente de Kedde: Solução A: Ácido 3,5-dinitrobenzóico a 3% em metanol. Solução B: KOH a 5,7% em água. Reagente: misturaram-se partes iguais de A e B.

Reagente de Liebermann-Burchard: Misturou-se 5 mL de anidrido acético em 50 mL de etanol absoluto e após foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico concentrado à mistura, sob resfriamento em banho de gelo.

Reagente de Salkowski: Ácido sulfúrico concentrado.

Reagente de Bornträger: Preparou-se uma solução de KOH 0,5 M em água.