



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAELA PINHEIRO BURGO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE *Cassia leptophylla* E DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Tynanthus micranthus***

Londrina
2010

RAFAELA PINHEIRO BURGO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO EXTRATO DE *Cassia leptophylla* E DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Tynanthus micranthus***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Terezinha de Jesus Faria

Londrina
2010

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

B957e Burgo, Rafaela Pinheiro.

Estudo químico e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Cassia leptophylla* e do óleo essencial de *Tynanthus micranthus* /

Rafaela Pinheiro

Burgo. – Londrina, 2010.

72 f. : il.

Orientador: Terezinha de Jesus Faria.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais, 2010

1. Química orgânica – Teses. 2. Produtos naturais – Teses. 3. Essências e óleos essenciais – Uso terapêutico – Teses. 4. *Cassia leptophylla* – Teses. 5. *Tynanthus micranthus* – Teses. I. Faria, Terezinha de Jesus. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais. III. Título.

CDU 547.9

RAFAELA PINHEIRO BURGO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
EXTRATO DE *Cassia leptophylla* E DO ÓLEO ESSENCIAL DE
*Tynanthus micranthus***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus
Faria
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Isabel Craveiro Moreira Andrei
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 10 de março de 2010.

**Esta dissertação é dedicada aos meus pais
Edson e Marisa, pelos ensinamentos, pelo
incentivo, dedicação, por acreditarem em
minha capacidade, que com imenso amor e
luta me ajudaram a conquistar mais este
degrau**

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pela oportunidade e pela capacidade para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo, dedicação e pelo grande amor. Agradeço também por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida e a lutar para conquistá-los.

Ao meu irmão, Edson, pelo carinho e apoio.

Em especial, à Prof^a Terezinha de Jesus Faria, pela constante orientação neste trabalho, por sua paciência, companheirismo e amizade.

Ao Didi, pela amizade, pelos ensinamentos e seus conselhos que fizeram a diferença para o término deste trabalho.

À Prof^a Rubia, pelos ensinamentos, pela disposição, e por sua dedicação.

Ao Jeferson, por sua grande ajuda e organização na primeira etapa deste trabalho.

À Taisa, por sua dedicação e companheirismo na realização deste trabalho.

À professora Dalva Trivisan Ferreira, por sua amizade, por sua confiança e por seus exemplos.

Ao meu Grande amigo Ismael Amador, pelos momentos de gargalhadas, por sua tranquilidade e sua paciência de ouvir e também ensinar.

Gostaria de agradecer também aos colegas e companheiros do LP MBA que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

BURGO, Rafaela Pinheiro. **Estudo químico e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Cassia leptophylla* e do óleo essencial de *Tynanthus micranthus***. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo do caule de *Cassia leptophylla* e do óleo essencial de *Tynanthus micranthus*. O gênero *Cassia* é bastante estudado e muitas de suas espécies possuem indicações populares de uso terapêutico, entretanto a espécie *C. leptophylla* ainda não havia sido estudada. Na primeira parte deste trabalho, portanto, foram realizados o estudo químico do extrato em acetato de etila de *C. leptophylla* e a avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade contra *Artemia salina* do mesmo. O fracionamento cromatográfico do extrato em coluna de sílica gel resultou no isolamento de uma mistura de hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos insaturados e álcoois de cadeias longas, identificados por CG-EM, além da 1,8-diidroxí-3-metilantraqüinona (crisofanol) e uma mistura constituída principalmente por β -sitosterol. Estes dois últimos constituintes foram indentificados através de técnicas espectrométricas usuais. A atividade antioxidante do extrato bruto em acetato de etila (EB) e das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAc) e etanólica (FE) do mesmo extrato foi avaliada pelo método do radical livre DPPH. FH não apresentou atividade antioxidante, enquanto que EB, FAc e FE foram altamente eficientes no sequestro de radicais livres DPPH, apresentando, praticamente, o mesmo valor de IC50 (~5 μ g/mL). O teor de polifenóis totais encontrado foi similar às quantidades encontradas em plantas fenólicas e em ervas medicinais registradas na literatura (172,642mg de polifenóis/g de extrato). O teor de flavonóides totais do EB foi de 3,3mg de flavonóides/g de extrato. Estes valores justificam a pronunciada atividade sequestradora de radicais livres DPPH apresentada pelo extrato. O EB não apresentou toxicidade contra *Artemia salina*. O segundo capítulo deste trabalho descreve a análise da composição química e a avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das folhas *Tynanthus micranthus*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e apresentou o eugenol como único constituinte (99,9%). A caracterização estrutural do eugenol foi feita através de análise por CG-EM, determinação do índice de Kovats e da das análises por espectrometrias no infravermelho, de RMN-¹H e de RMN-¹³C. O óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana pronunciada, atuando sobre o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O teste de bioautografia revelou o eugenol como a substância responsável pela atividade contra o *Cladoporium herbarum*. O óleo essencial apresentou, também, forte atividade sequestradora de radicais livres DPPH, evidenciada pelo resultado de IC50 de 5,2 μ g/mL. Os resultados obtidos confirmam o potencial do óleo essencial de *Tynanthus micranthus* para uso como agente antimicrobiano na agricultura e na preparação de produtos alimentícios e farmacêuticos.

Palavras-chave: *Cassia leptophylla*. Crisofanol. β -sitosterol. *Tynanthus micranthus*. Eugenol. Óleo essencial.

BURGO, Rafaela Pinheiro. Chemical study and evaluation of biological activities of the extract of *Cassia leptophylla* and essential oil of *Tynanthus micranthus*. 2010. 70 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The present work describes the study of the stem of *Cassia leptophylla* and of the essential oil of *Tynanthus micranthus*. Although *Cassia* genus is well studied and many of its species already have been indicated as home remedies; the specie *C. leptophylla* hasn't been studied until now. Therefore, the first part of this work presents the chemical study of the ethyl acetate extract of *C. leptophylla*, as well as the evaluations of its antioxidant activity and toxicity against *Artemia salina*. Chromatographic analysis of the extract on silica gel column has resulted in the following constituents: a mixture of saturated hydrocarbons, unsaturated hydrocarbons, and long-chain alcohols, identified by GC-MS; 1,8 dihydroxy-3-methylantraquinone (chrysophanol); and a mixture constituted mainly by β -sitosterol. The two last constituents were identified by conventional spectrometric techniques. Antioxidant activity of the crude extract in ethyl acetate (EB), hexanic fraction (FH), ethyl acetate fraction (FAC) and ethanolic fraction (FE) was evaluated using DPPH free radical method. FH did not show any antioxidant activity, while EB, (FAC), and (FE) showed very efficient DPPH radical scavenging activity, presenting nearly the same IC₅₀ value (~5 μ g/mL). Total polyphenol content was about the same as the one found in phenolic plants and medicinal herbs registered in the literature (172.642mg polyphenol/g of the extract). EB total flavonoid content was 3.3mg of flavonoid/g of the extract. These values may explain the strong DPPH radicals scavenging activity presented by the extract. EB did not show toxicity against *Artemia salina*. The second chapter of this work discuss chemical composition analysis, evaluation of antimicrobial activity and evaluation of antioxidant activity of the essential oil of *Tynanthus micranthus* leaves. The essential oil was obtained by hydrodistillation and had eugenol as its main component (99.9%). Eugenol structural characterization was obtained by GC-MS analysis, Kovats index determination, infrared spectrometry, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The essential oil showed high antimicrobial activity on the growth of bacteria, yeast, and filamentous fungi. Bioautography test has revealed that eugenol is the compound responsible for the activity against *Cladoporium herbarum*. The essential oil has also presented strong DPPH free radicals scavenging activity, evidenced by its IC₅₀ of 5.2 μ g/mL. The obtained results confirm the potential of *Tynanthus micranthus* essential oil as antimicrobial agent for applications in agriculture, food and pharmaceutical products.

Keywords: *Cassia leptophylla*. Crisofanol. β -sitosterol. *Tynanthus micranthus*. Eugenol. Essential oil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Exemplos de substâncias isoladas do gênero <i>Cassia</i>	22
Figura 2	- <i>Cassia leptophylla</i> : Flores, frutos, sementes, caule e madeira	24
Figura 3	- Cromatograma de CG/EM de CLA-1.....	34
Figura 4	- Espectro no infravermelho de CLA-1	34
Figura 5	- Curva de correlação entre tempo de retenção e o número de átomos de carbono de alcanos presentes em CLA-1.....	35
Figura 6	- Cromatograma de CG/EM de CLA-2.....	36
Figura 7	- a) Espectro de massas de CLA-2, b)Espectro de massas da biblioteca NIST da 1,8 diidroxí-3-metilantraquinona (crisofanol).....	36
Figura 8	- Mecanismo de fragmentação proposto para CLA-2 (crisofanol)	37
Figura 9	- Espectro de RMN de ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de CLA-2	38
Figura 10	- Área ampliada do espectro de RMN de ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de CLA-2.....	39
Figura 11	- Estrutura de 1,8-diidroxí-3-metilantraquinona (CLA-2).....	40
Figura 12	- Espectro no infravermelho de CLA-3 (KBr).....	42
Figura 13	- Espectro de RMN de ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de CLA-3	43
Figura 14	- Estrutura do β-sitosterol (CLA-3).....	44
Figura. 15-	Estruturas do DPPH.....	45
Figura 16	- Atividade doadora de átomos de hidrogênio (a) do extrato bruto (EB), frações (b) de acetato de etila (FAc) e (c) etanólica (FE) de <i>Cassia leptophylla</i>	47
Figura 17	- Curva de regressão linear para cálculo de DL ₅₀ do extrato em acetato de etila de <i>Cassia leptophylla</i> contra <i>Artemia salina</i>	48
Figura 18	- Estrutura química do eugenol	60
Figura 19	- a) Espectro de massas do constituinte principal do óleo essencial de <i>T. micranthus</i> b) Espectro de massas do eugenol (banco de dados NIST).	61
Figura 20	- Espectro no infravermelho do óleo essencial de <i>T. micranthus</i>	61

Figura 21 - Espectro de RMN de H^1 do constituinte principal do óleo essencial de <i>T. micranthus</i> (300MHz, $CDCl_3$)	62
Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C do constituinte do óleo essencial de <i>T. micranthus</i> (100MHz, $CDCl_3$)	62
Figura 23 - Espectro de DEPT- 135 do constituinte majoritário do óleo essencial de <i>T. micranthus</i> (100MHz, $CDCl_3$)	63
Figura 24 - Atividade doadora de átomos de hidrogênio do padrão de eugenol (a) e do óleo essencial de <i>T. micranthus</i> (b)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Indicações etnofarmacológicas e biológicas de extratos de <i>Cassia</i> utilizados em medicina popular	19
Tabela 2	- Propriedades farmacológicas de espécies do gênero <i>Cassia</i>	20
Tabela 3	- Série eluotrópica do fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila	27
Tabela 4	- Grupos de frações da coluna do extrato em acetato de etila e suas respectivas massas	27
Tabela 5	- Série eluotrópica da purificação do grupo 3.....	28
Tabela 6	- Série eluotrópica utilizada na purificação do grupo 5.....	29
Tabela 7	- Série eluotrópica utilizada na purificação do material das frações 27-43	29
Tabela 8	- Dados de RMN ¹ H comparados com dados da literatura do crisofanol.....	39
Tabela 9	- Dados de RMN ¹³ C de CLA-2 comparados com dados do crisofanol registrados na literatura	40
Tabela 10	- Deslocamentos químicos dos carbonos de CLA-3 (CDCl ₃ , 300MHz) comparados com dados do β-sitosterol registrados na literatura (CDCl ₃)	44
Tabela 11	- Dados de RMN ¹³ C (CDI ₃ , 100MHz) do constituinte majoritário do óleo essencial de <i>T. micrathus</i> comparados com dados do eugenol registrados na literatura (Son, <i>et al.</i> , 1998).	63
Tabela 12	- Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fungos filamentosos pelo óleo essencial de <i>T. micranthus</i>	64
Tabela 13	- Concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>T. micranthus</i>	65

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1 - ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE TOXICIDADE CONTRA <i>Artemia salina</i> DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Cassia leptophylla</i>.....	17
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO <i>CASSIA</i>	18
1.1.1 Atividades Biológicas do Gênero <i>Cassia</i>	18
1.1.2 Aspectos químicos do gênero <i>Cassia</i>	20
1.1.3 <i>Cassia Leptophylla</i>	23
1.2 PARTE EXPERIMENTAL	25
1.2.1 Materiais e Métodos	25
1.2.2 Estudo Químico do Extrato dos Caules de <i>Cassia Leptophylla</i>	26
1.2.2.1 Coleta e preparação da espécie vegetal	26
1.2.2.2 Preparação dos extratos	26
1.2.2.3 Isolamento e purificação dos constituintes do extrato em acetato de etila (1)	27
1.2.2.3.1 <i>Fracionamento do extrato em coluna cromatográfica de sílica gel</i>	27
1.2.2.3.1.2 Purificação dos grupos de frações	28
1.2.3 Obtenção de Frações do Extrato em Acetato de Etila (2) Para Realização de Testes Biológicos.....	30
1.2.4 Ensaio Biológico	30
1.2.4.1 Avaliação da atividade antioxidante do extrato e das frações de <i>Cassia leptophylla</i>	30
1.2.4.1.1 <i>Determinação do conteúdo de polifenóis totais</i>	31
1.2.4.1.2 <i>Determinação do conteúdo de flavonóides totais</i>	32
1.2.4.2 Teste de toxicidade contra <i>Artemia salina</i>	32
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.3.1 Identificação dos Constituintes Químicos.....	33
1.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato e das Frações de <i>C. leptophylla</i>	45
1.3.3 Teste de Toxicidade Contra <i>Artemia Salina</i>	48

1.4	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS CONSTITUINTES DE <i>CÁSSIA</i> <i>LEPTOPHYLLA</i>	48
-----	--	----

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Tynanthus*

	<i>micranthus</i>	51
2.1	PARTE EXPERIMENTAL	53
2.1.1	Coleta do Material Vegetal	53
2.1.2	Extração do Óleo Essencial das Folhas de <i>Tynanthus</i> <i>micranthus</i>	53
2.1.3	Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	54
2.1.4	Ensaio de atividade antimicrobiana	55
2.1.4.1	Microrganismos	55
2.1.4.2	Preparação dos inóculos Bactérias	55
2.1.4.3	Ensaio de Atividade Antimicrobiana	56
2.1.4.3.1	Atividade antifúngica contra <i>C. herbarum</i> : antibiografia em CCD	56
2.1.4.3.2	Ensaio de atividade contra fungos filamentosos: Diluição em Agar.....	57
2.1.4.3.3	Ensaio de atividade contra bactérias e leveduras: Microdiluição, determinação da concentração inibitória mínima	58
2.1.5	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH*	58
2.1.5.1	Resultados e Discussão	59
2.1.5.2	Composição química do óleo essencial	59
2.1.5.3	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>T. micranthus</i>	64
2.1.5.4	Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>T. micranthus</i>	65
	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

INTRODUÇÃO

Há tempos os produtos naturais são utilizados pela humanidade e, talvez, uma das primeiras formas de utilização destes, tenha sido na busca pela melhora e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006a). Existem muitos exemplos da utilização destes recursos na história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental. Algumas destas utilizações são, a técnica de conservação de múmias, desenvolvida no Egito; a descoberta de venenos, como Hemlock (*Conium maculatum*), utilizados na Idade Antiga para defesa, caça ou mesmo na execução de prisioneiros; a coniina, veneno usado na execução de Sócrates, durante o Império Romano; a pintura dos corpos e cabelos utilizadas por civilizações indígenas americanas como genipina ou bixina; assim como os bálsamos, as gomas e as essências que eram úteis como repelentes e aromatizantes de ambientes (PINTO,1995 apud VIEGAS JR.; BOLZANI, BARREIRO, 2006a).

O fato dos povos primitivos e indígenas terem um profundo conhecimento do arsenal químico da natureza é de fundamental importância para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas. Ainda na modernidade, tanto nas regiões mais carentes como nos grandes centros, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e também encontradas em quintais de residências (MACIEL; PINTO; VEIGA JR.,2002).

Nos últimos anos, tem aumentado o número de estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam a obtenção de novos compostos com atividades terapêuticas. Isto pode ser verificado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectrométricas, os químicos orgânicos têm conseguido descobrir novas moléculas de produtos naturais, até pouco tempo difíceis de serem identificadas. A cada instante são relatadas na literatura novas moléculas, algumas com importante ação farmacológica (CECHINEL FILHO;YUNES, 1998). Como exemplos podem ser citadas a forskolina, obtida de *Coleus barbatus* que apresenta efeitos promissores contra hipertensão, glaucoma e asma (DE SOUZA, apud CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) a artemisina, presente em *Artemisia annua* que exerce atividade antimalárica potente

(KAMCHONWONGPAISON, 1996 apud, CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Desta maneira, é importante ressaltar que as plantas, além de sua aplicação na medicina popular, têm contribuído para a obtenção de fármacos amplamente utilizados, (FARNSWORTH, 1980 apud, CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), (TESKE; TRENTINI, 1995 apud, CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), como os exemplos da morfina (potente analgésico) e a colchicina (antiinflamatório seletivo da artrite gotosa). Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a vimblastina e a vincristina, extraídas de *Catharantus roseus*, utilizadas como quimioterápicos contra o câncer. Outro exemplo recente de antineoplásico introduzido na terapêutica dos últimos 20 anos é o taxol, extraído de *Taxus brevifolia*. No entanto, estudos mostraram que a extração do Taxol a partir de *T. brevifolia* era inviável, pois para a extração de 1kg da substância, era necessário 10t de cascas da planta. A partir dos anos 1980, vários grupos de pesquisa tentaram viabilizar metodologias sintéticas para obtenção do taxol. A semi-síntese do taxol foi, então, otimizada e se tornou um método eficiente de sua obtenção em escala industrial, mostrando a importância da inter relação entre isolamento de substâncias, testes clínicos e a síntese (PINTO, 2004 apud VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006a).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas e o estudo químico de substâncias como flavonóides, taninos e sesquiterpenos, têm sido objetos de vários trabalhos, os quais já comprovaram ação farmacológica destes compostos em testes pré-clínicos com animais de várias espécies (HAVSTEEN, 1983 apud, CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), (CECHINEL FILHO, 1995 apud CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Assim, muitos modelos moleculares que deram base para estudos de relação-estrutura-atividade e impulsionaram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica, foram fornecidos pela natureza (PINTO, 2004 apud VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006a). Este desenvolvimento está ligado ao interesse de pesquisadores em áreas multidisciplinares, como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica que, juntas, aumentam o conhecimento sobre a flora mundial (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

No estudo de plantas visando o isolamento de princípios ativos, não é possível identificar todos os constituintes químicos por serem muito numerosos. Além disso, a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes podem apresentar efeitos sinérgicos para uma mesma atividade biológica. Portanto, a

seleção de um bioensaio para detecção de efeitos específicos é fundamental no estudo de novas moléculas bioativas. Estes testes devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis. Os alvos dos testes biológicos podem envolver os organismos inferiores, como microrganismos e microcrustáceos, entre outros; moléculas como enzimas e receptores; invertebrados, incluindo insetos, crustáceos e moluscos; culturas de células animais ou humanas; órgãos isolados e animais vivos. Entre os vários ensaios existentes para a obtenção de princípios ativos de plantas, destacamos os testes simples que podem ser realizados na rotina do laboratório de produtos naturais como os ensaios para avaliação de toxicidade contra *Artemia salina*, de atividade antioxidante e antimicrobiana (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

O ensaio de letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* Leach é um bioensaio preliminar, que permite a avaliação da toxicidade geral no estudo de extratos com atividade biológica. Muitos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomida e até mesmo na avaliação prévia como antitumorais (SIQUEIRA; BEMM; PEREIRA, 1998).

Tendo em vista os danos causados pelos processos oxidativos aos organismos, nos últimos anos verificou-se um grande interesse na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais. Esta propriedade é importante sob o aspecto farmacológico, pois acredita-se que as doenças degenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, arterosclerose, complicações da Diabetes mellitus, envelhecimento precoce e outras, estejam relacionadas com o estresse oxidativo (SORG, 2004). Com relação aos alimentos, o desenvolvimento de odores, ou sabores desagradáveis, são também devido à oxidação lipídica o que faz com que os alimentos se tornem impróprios para o consumo (KUBOW, 1993; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Considerando existirem poucos registros na literatura de estudos sobre *Cassia leptophylla* e de *Thynanthus micranthus*, o presente trabalho teve como objetivos o estudo da composição química e a verificação de algumas propriedades biológicas do extrato em acetato de etila de *C. leptophylla* e do óleo essencial de *T. micranthus*. O trabalho, portanto, será apresentado em dois capítulos: O capítulo 1 relata o estudo fitoquímico de *C. leptophylla* e os testes de avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade contra *Artemia salina*. O capítulo

2 apresenta o estudo da composição química e a avaliação das atividades antifúngica, antibacteriana e antioxidante do óleo essencial de *Tynanthus micranthus*.

OBJETIVOS

Gerais:

- Realizar o estudo químico do extrato dos caules de *Cassia leptophylla* e avaliar sua atividade antioxidante e a toxicidade sobre *Artemia salina*.
- Determinar a composição química e avaliar as atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Tynanthus micranthus*.

Específicos:

- Preparar o extrato dos caules de *Cassia leptophylla*;
- Realizar a caracterização das classes químicas do extrato dos caules de *C. leptophylla* através de testes fitoquímicos;
- Purificar e identificar os constituintes químicos de *Cassia leptophylla*;
- Realizar o monitoramento por ensaios de atividade antioxidante e de toxicidade sobre *Artemia salina*;
- Realizar a extração do óleo essencial das folhas de *Tynanthus micranthus*;
- Determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Tynanthus micranthus* através de análises por CG/FID (Cromatografia gasosa/Flame ionization detector) e CG-EM (Cromatografia gasosa/ espectrometria de massas)
- Avaliar as atividades antifúngica, antibacteriana e antioxidante do óleo essencial das folhas de *Tynanthus micranthus*.

CAPÍTULO 1

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE TOXICIDADE CONTRA *Artemia salina* DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cassia leptophylla*

1 ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DE TOXICIDADE CONTRA *Artemia salina* DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cassia leptophylla*

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO GÊNERO *CASSIA*

O gênero *Cassia* pertence à família Fabaceae, também denominada Leguminosae. Esta família é composta por três sub-famílias: Faboideae (Papilinoideae), Caesalpinoideae (Casalpiniaceae) e Mimosoideae (Mimosaceae). A família Fabaceae é composta por 2800 espécies e aproximadamente 154 gêneros, a maioria dos quais encontrados nos trópicos, na África, América e sudeste da Ásia (BIONDO et al, 2005). O gênero *Cassia* está inserido na sub-família Caesalpinoideae e está presente em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Na flora brasileira, ele ocorre especialmente na Mata Atlântica, onde, devido à beleza de suas flores, algumas espécies são utilizadas como plantas ornamentais (LORENZI, 1998). O gênero incluía, também, as espécies dos gêneros *Chamaecrista* e *Senna* até a revisão taxonômica de Irwin e Barneby em 1981, quando estes gêneros foram separados (RODRIGUES et al., 2005).

Apesar da diminuição do tamanho, o gênero *Cassia* contém mais de seiscentas espécies. As espécies de *Cassia*, juntamente com aquelas de sinonímia *Senna*, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VIEGAS JR. et al, 2006b).

1.1.1 Atividades Biológicas do Gênero *Cassia*

Existem muitas indicações populares para espécies de *Cassia*, muitas destas foram comprovadas por estudos fitoquímicos e farmacológicos. A Tabela 1 apresenta os diferentes usos populares das espécies do gênero *Cassia* e na Tabela 2 estão apresentadas as atividades farmacológicas comprovadas por

estudos científicos (AGARKAR apud VIEGAS JR., et al, 2006b).

Tabela 1 - Indicações etnofarmacológicas e biológicas de extratos de *Cassia* utilizados em medicina popular.

Espécies de Cassia	PROPRIEDADES ETNOFARMACOLÓGICAS E BIOLÓGICAS
<i>C. abbreviata</i>	Contra dores abdominais e dor de dente
<i>C. absus</i>	Antitumoral e anti-asmática
<i>C. acutifolia</i>	Purgativa
<i>C. alata</i>	Tóxica para o gado, anti-ulcerogênica, contra doenças de pele, eczemas, bronquite, anti-asmática, antibacteriana e anti-helmíntica
<i>C. angustifolia</i>	Purgativa, laxativa e contra doenças cutâneas
<i>C. auriculata</i>	Adstringente, anti-helmíntica, antidiabética, ativa em desordens urinárias, contra conjuntivites e antibacteriana
<i>C. biflora</i>	Contra tumores quelóides, picadas de insetos e anti-reumática
<i>C. corymbosa</i>	Mutagênica
<i>C. fistula</i>	Purgativa, repelente de insetos, anti-reumática, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antidermatite, anti-ofídica, antibacteriana, antiviral, antifúngica
<i>C. floribunda</i>	Nutricional
<i>C. frandis</i>	Antifúngica
<i>C. grandis</i>	Purgativa, anti-anêmica, adstringente, expectorante, sedativa
<i>C. holosericea</i>	Antimicrobiana
<i>C. itálica</i>	Purgativa, contra gota, inibidor biliar, anti-reumática e parasiticida
<i>C. jahni</i>	Purgativa
<i>C. kleinii</i>	Purgativa, hepatoprotetora
<i>C. laevigata</i>	Contra dores de ouvido, alopecia, doenças biliares, cólera, expectorante, purgativa, uso oftálmico
<i>C. multijuga</i>	Antibiótica, contra infecções dérmicas e uso oftálmico
<i>C. nigrigans</i>	Anti-ulcerogênica, antidiarrêica, vermífuga, anti-reumática, contraceptiva
<i>C. noname</i>	Diurética, tônica
<i>C. obtusa</i>	Antipirética, antidiabética, antidiarrêica, , uso oftálmico e contra doenças cutâneas
<i>C. obtusifolia</i>	Purgativa, diurética, aumenta acuidade visual, contra doenças oculares e hepatite, muito ativa contra larvas de mosquito
<i>C. occidentalis</i>	Purgativa, tônica hepática, bactericida, antipirética, antitumoral, expectorante, anti-inflamatória, diurética, antifúngica, neurotóxica para bovinos
<i>C. petersiana</i>	Anti-sífilis, bactericida, antiviral, antitussígena, antipirética, contra gonorréia, purgativa, contra dores estomacais, anti-helmíntica, contra infecções cutâneas, inseticida
<i>C. pumila</i>	Purgativa
<i>C. purpúrea</i>	Antimicrobiana
<i>C. putibunda</i>	Antimicrobiana
<i>C. noxburghii</i>	Antimicrobiana
<i>C. siamea</i>	Purgativa
<i>C. siebereiana</i>	Tóxica
<i>C. singueana</i>	Anticonvulsivante, anti-ofídica, contra dores estomacais, constipação, gonorréia
<i>C. tora</i>	Diurética, anti-astêmica, antibacteriana, contra doenças cutâneas e eczemas, correção da visão
<i>C. spectabilis</i>	Citotóxica, tóxica
<i>C. torosa</i>	Contra picadas de insetos, tônica e digestiva
<i>C. trachypus</i>	Antimicrobiana
<i>C. zeylanicum</i>	Anti-ulcerogênica e anti-alérgica

Fonte: (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

Tabela 2 - Propriedades farmacológicas de espécies do gênero *Cassia*.

Espécies de Cassia	Propiedades farmacológicas
<i>C. abbreviata</i>	Contra doenças venéreas, bactericida
<i>C. acutifolia</i>	Purgativa
<i>C. alata</i>	Antimicrobiana, antifúngica, efeitos tóxicos
<i>C. angustifolia</i>	Antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana
<i>C. aurantifolia</i>	Antibiótica, antimalárica, antitumoral, purgativa, ação cardiovascular, neuronal e bactericida
<i>C. auriculata</i>	Bactericida, fungicida e antidiabética
<i>C. eucalyptus</i>	Antibiótica, antimalárica, antitumoral, purgativa, ação cardiovascular, neuronal e bactericida
<i>C. fistula</i>	Bactericida, anti-inflamatória, hepatoprotetora, fungicida, antitumoral, laxativa, anti-reumática, antioxidante
<i>C. hirta</i>	Antibiótica, antimalárica, antitumoral, purgativa, ação cardiovascular, neuronal, bactericida
<i>C. holosericea</i>	Bactericida, fungicida
<i>C. itálica</i>	Antibacteriana, antitumoral, citotóxica, anti-inflamatória, antipirética, analgésica, liberadora de prostaglandinas, antiviral
<i>C. nigrigans</i>	Anti-úlceras, antidiarrêica
<i>C. noname</i>	Inibitória de lípases
<i>C. obtusifolia</i>	Antiagregante plaquetária, anti-histamínica
<i>C. occidentalis</i>	Bactericida, fungicida, antiviral, hepatoprotetora, antimalárica
<i>C. petersiana</i>	Inibidora de lípases
<i>C. purpúrea</i>	Bactericida, fungicida
<i>C. putibunda</i>	Citotóxica
<i>C. roxburghii</i>	Bactericida, fungicida
<i>C. siamea</i>	Bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante
<i>C. singueana</i>	Bactericida
<i>C. spectabilis</i>	Analgésica, anti-inflamatória, inibitória de superóxido, anestésica
<i>C. tora</i>	Hepatoprotetora, citoprotetora, fungicida, bactericida, antimutagênica, anti-inflamatória
<i>C. torosa</i>	Citotóxica, anti-inflamatória

Fonte: (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

1.1.2 Aspectos Químicos do Gênero *Cassia*

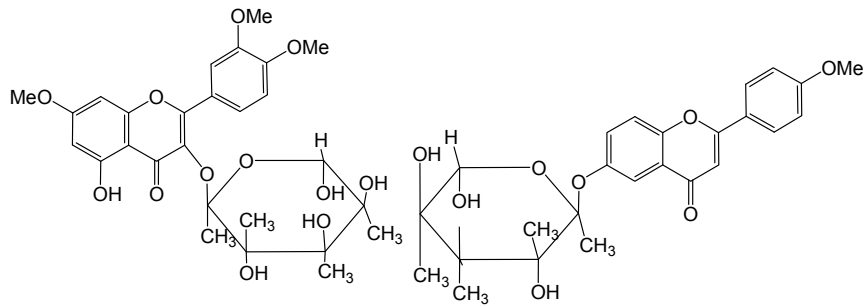
As espécies do gênero *Cassia* apresentam uma grande diversidade de substâncias bioativas. Estudos fitoquímicos resultaram no isolamento de mais de trezentos e cinquenta metabólitos secundários do gênero, que incluem derivados fenólicos, antracênicos, antraquinônicos e alcalóides piperidínicos, entre outros. A presença destes constituintes foi relacionada às atividades farmacológicas apresentadas pelas espécies. A 1,8-diidroxiantraquinona (Figura 1) isolada de *C. occidentalis*, por exemplo, foi considerada responsável pela atividade antimalárica apresentada pelo extrato da planta; a presença de taninos, saponinas e flavonóides no extrato das folhas de *C. nigrigans* foi associada às atividades antidiarrêica e anti-

ulcerogênica da espécie. De *C. torosa*, uma espécie de alto valor medicinal, foram isolados entre outros constituintes, antraquinonas, biantraquinonas glicosiladas e flavonas, as quais foram indentificadas como os constituintes responsáveis pelas atividades digestivas, tônica e contra picada de insetos, enquanto que outros derivados antraquinônicos apresentaram atividade anti-alergênica. Das flores da mesma espécie foi isolada, entre outros constituintes, a torosanina-9,10-quinona que foi identificada como responsável por pronunciada atividade citotóxica (VIEGAS JR. et al, 2006b).

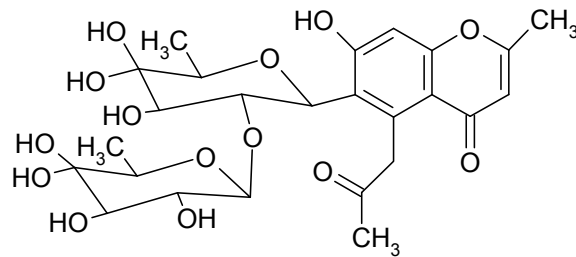
A maioria das espécies de *Cassia* que ocorrem no Brasil apresentam alcalóides piperidínicos como constituintes principais, além de outros poucos metabólitos como flavonas glicosiladas, ésteres alifáticos de cadeia longa, cromona glicosilada e polissacarídeos. Bolzani e colaboradores (1995) isolaram e identificaram sete alcalóides piperidínicos de *C. spectabilis* (Figura 1), espécie que apresenta maior diversidade destes compostos. Estes alcalóides despertam interesse pelas diferentes atividades farmacológicas que apresentam, as quais incluem as ações analgésica, citotóxica, anti-inflamatória e inibitória de superóxidos.

Figura 1 - Exemplos de substâncias isoladas do gênero *Cassia*

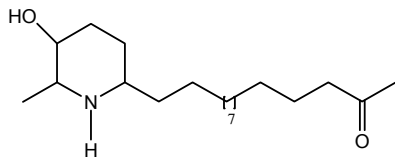
Flavonas glicosiladas (*C. spectabilis*)



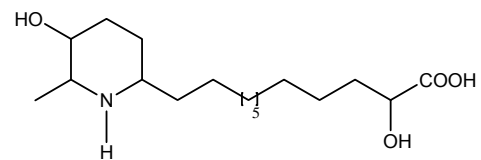
Cromona glicosilada (*C. spectabilis*)



Alcalóides piperídínicos (*C. spectabilis*)

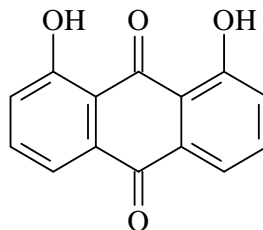


Espectralina A



Espectralina B

1,8 diidroxiantraquinona (*C. occidentalis*)



1.1.3 Cassia Leptophylla

Cassia leptophylla (Figura 2) é uma árvore comum nas florestas de araucárias dos Estados do Paraná e Santa Catarina, sobre a qual não existem estudos sobre suas atividades biológicas e seus constituintes químicos. Vale ressaltar que Bolzani *et al* (1995) relataram a presença de alcalóides piperidínicos em *Cassia leptophylla*; posteriormente, entretanto, foi verificado que a espécie estudada não se tratava de *C. leptophylla* e sim de *C. spectabilis*. Desta maneira, verifica-se que não há nenhum registro de estudos sobre *Cassia leptophylla*.

Nome popular: falso-barbatimão.

Classificação científica:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

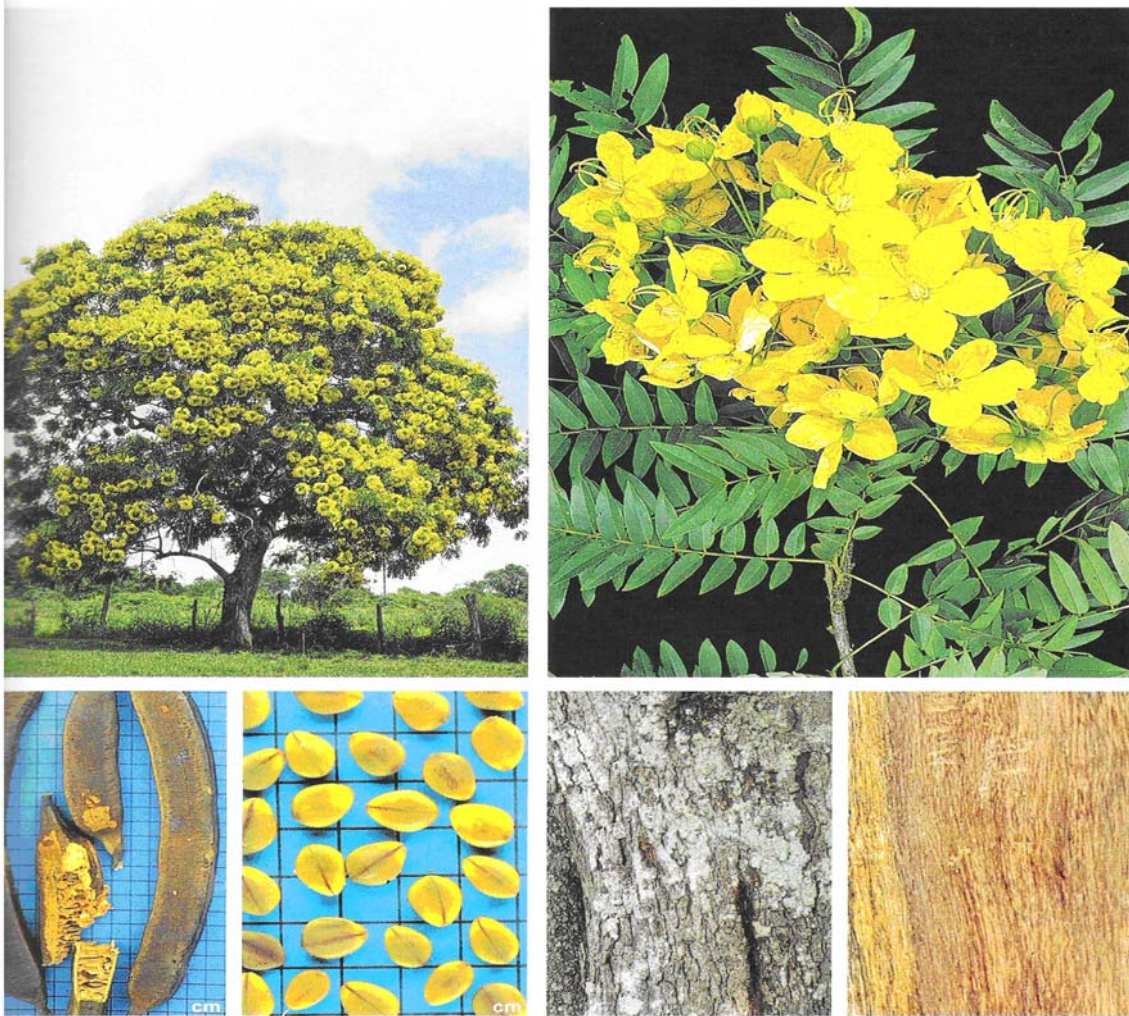
Subfamília: Caesalpinioideae

Gênero: Cassia

Espécie: *C. leptophylla*

Características morfológicas: Altura de 8 – 14m, com ramos lenticelados e tronco de 30 – 40cm de diâmetro, revestido por casca acinzentada com ritidoma escamoso. Folhas alternas espiraladas, estipuladas, compostas paripinadas, com 8 – 12 pares de folíolos opostos a subopostos, estreitamente ovalados a menos comumente ovalado-elípticos, de base subassimétrica a arredondada e ápice agudo, de 3 – 5cm de comprimento por 1,5 – 2cm de largura. Flores amarelas muito vistosas, actinomorfas, diclamídeas, dialipétalas, de corola pentâmera e ovário súpero, reunidas em racemos terminais. Fruto legume (vagem) lenhoso e achatado, anguloso, indeiscente, com muitas sementes ovaladas de cor bege.

Figura 2 - *Cassia leptophylla*: Flores, frutos, sementes, caule e madeira.



Fonte: (LONRENZI, 2008)

1.2 PARTE EXPERIMENTAL

1.2.1 Materiais e Métodos

A cromatografia gasosa foi realizada em equipamento Shimadzu modelo GC-17 A equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar DB5 (J&W Scientific) com 30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio com vazão de 1,2mL/min. As temperaturas estabelecidas para o injetor e detector foram 220°C e 300°C respectivamente. A inicial da coluna foi de 60°C por 1 min, sendo programada para ter acréscimo de 7°C por minuto até 320°C permanecendo em 320°C por 5min. Os dados foram coletados com Software CLASS-CR 10 Shimadzu. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em aparelho Shimadzu, modelo GC/MS-QP5000 e coluna capilar DB1 (100% polimetilsiloxano) 30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro x 0,25µm de espessura de filme. A análise foi efetuada com injeção de 1,0µL da amostra, em modo split (1:10). As temperaturas estabelecidas para o injetor e interface foram 300 e 250°C, respectivamente. A eluição foi realizada sob fluxo de 1,5mL/min, sendo utilizado o hélio como gás de arraste. A rampa de temperatura da coluna foi programada no intervalo de 60 a 320°C, sendo desenvolvida do seguinte modo: temperatura inicial de 60°C por 4min, acréscimo de 10°C/min até 250°C e acréscimo de 20°C/min até 320°C. o espectrômetro de massa foi configurado nas seguintes condições: temperatura do seperados e fonte iônica de 250/C e energia a 2,2kV. Os espectros dos constituintes presentes nas frações de *Cassia leptophylla* foram comparados a espectros catalogados na base de dados NIST 62, procedentes do “National Institute of Standars and Technology”, na qual estão registrados os espectros de aproximadamente 62000 compostos. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em espectrômetro VARIAN (Dept° de Química - UEM), operando a 300MHz para ¹H e 75,5MHz para ¹³C tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm e os solventes utilizados foram D₂O, CDCl₃ e CD₃OD.

1.2.2 Estudo Químico do Extrato dos Caules de *Cassia Leptophylla*

1.2.2.1 Coleta e preparação da espécie vegetal

Os caules de *Cassia leptophylla* foram coletados no Campus da Universidade Estadual de Londrina e identificados pelo biólogo Manoel R. Carvalho Paiva do Departamento de Biologia Geral da mesma Universidade. Uma excisata da *Cassia leptophylla* (n°46129) foi depositada no Herbário do departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina.

Os caules foram lixados, para retirada dos musgos que havia em sua casca e, após isso, eles foram moídos em moinho de facas e secados em estufa a 40°C.

1.2.2.2 Preparação dos extratos

Foram preparados três extratos da seguinte maneira:

Extrato acetato de etila 1: O material seco e moído (1,04Kg) foi extraído exaustivamente com acetato de etila à temperatura ambiente. A mistura resultante foi filtrada e concentrada através da destilação do solvente em evaporador rotativo. O restante do extrato (19,00g) foi utilizado no processo de purificação.

Extrato acetato de etila 2: Outra parte do material seco e moído (2,19Kg) também foi extraída exaustivamente de forma idêntica à anterior. O processo resultou na obtenção de 44,30g de extrato, dos quais foram separados 15g para realização de testes biológicos, restando, então, 29,30g para purificação.

Extrato Etanólico: A torta obtida na extração com acetato de etila para obtenção do extrato 2 foi extraída exaustivamente com etanol à temperatura ambiente. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotativo. O processo resultou na obtenção de 78,4g de extrato etanólico.

1.2.2.3 Isolamento, purificação e identificação dos constituintes do extrato em acetato de etila (1)

1.2.2.3.1 Fracionamento do extrato em coluna cromatográfica de sílica gel

O extrato em acetato de etila (19,07g) foi cromatografado em coluna de sílica (147,11g) (6x27, 5cm), utilizando-se para eluição hexano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridades crescentes (Tabela 3) . As 106 frações de 250mL recolhidas, foram comparadas em cromatoplasmas de sílica gel e as semelhantes foram reunidas em 15 grupos, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 3 - Série eluotrópica do fracionamento cromatográfico do extrato em acetato de etila

ELUENTE	FRAÇÕES
Hexano	1-7
Hexano/acetato de etila 10%	8-12
Hexano/acetato de etila 30%	13-22
Hexano/acetato de etila 40%	23-36
Hexano/acetato de etila 70%	37-54
Acetato de etila	55-65
Acetato de etila/etanol 10%	66-76
Acetato de etila/ etanol 20%	77-85
Acetato de etila/ etanol 50%	86-93
Acetato de etila/ etanol 70%	94-99
Etanol	100-106

Tabela 4 – Grupos de frações da coluna do extrato em acetato de etila e suas respectivas massas.

Grupo	Frações	Massa (g)
1	1-4	0,0517
2	5-9	0,0402
3	10-11	0,7067
4	12	0,1946
5	13-15	0,8985
6	16-19	0,2093
7	18-19	0,1296
8	20-27	0,400
9	28-29	0,1359
11	30-35	0,3728
12	36	0,0065
13	37-55	3,1611
14	56-75	6,1375
15	76-106	1,5678

1.2.2.3.1.2 Purificação dos grupos de frações

Dos 15 grupos obtidos, foram purificados somente os grupos 1 (frações 1-9), 3 (frações 10-11), 5 (frações 13-15).

Grupo 1 – Frações 1-4

O grupo 1 (0,0517g), caracterizado como material ceroso, denominado CLA-1, foi analisado em cromatoplaca, e também por CG-EM.

Grupo 3 – Frações 10-11

Este grupo de frações (0,7067g) consistiu de um material oleoso alaranjado, o qual foi purificado em coluna de sílica gel, eluída com hexano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridades crescentes (Tabela 5).

Tabela 5 - Série eluotrópica da purificação do grupo 3

Eluente	Frações
Hexano 100%	1-59
Hexano/Acetato de etila 5%	60-62
Hexano/Acetato de etila 15%	63-66
Hexano/Acetato de etila 30%	67
Hexano/Acetato de etila 50%	68
Hexano/Acetato de etila 80%	69
Acetato de etila 100%	70
Etanol 100%	71

As frações coletadas foram comparadas em cromatoplas de sílica gel e as semelhantes foram reunidas. As frações 29-40 foram purificadas em placas preparativas de sílica gel, eluídas duas vezes. A primeira eluição foi realizada com diclorometano e a segunda com mistura de Hexano/acetato de etila 5%. O processo resultou na obtenção de uma substância alaranjada (0,0212g) denominada CLA-2. As frações 42-59 também foram purificadas em placas preparativas de sílica gel, eluída duas vezes com mistura de hexano/acetato de etila 5%. A purificação resultou na obtenção de quantidade adicional de CLA-2 (0,0109g).

Grupo 5 – Frações 13-15

O material do grupo 5 (0,8985g) foi cromatografado em coluna de

sílica gel (38cmx2cm), eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridades crescentes (Tabela 6). Foram recolhidas 113 frações que foram comparadas em cromatoplasmas de sílica gel e as semelhantes foram reunidas.

Tabela 6 - Série eluotrópica da purificação do grupo 5.

Solvente	Frações
Hexano 100%	1-11
Hexano/Diclorometano 5%	12-17
Hexano/Diclorometano 15%	18-35
Hexano/Diclorometano 30%	36-58
Hexano/Diclorometano 40%	59-81
Hexano/Diclorometano 50%	82-93
Hexano/Diclorometano 70%	94-104
Diclorometano 100%	105-108
Acetato de etila 100%	109-110
Etanol 100%	111-113

As frações 27-43 (0,519g) foram purificadas, parte através de recristalização, e, outra parte, através de coluna cromatográfica. A recristalização foi feita com 0,318g do material, utilizando acetona como solvente. Foi obtido 0,258g de um material sólido branco, denominado CLA-3. A outra parte do material das frações 27-43 (0,119g) foi recromatografada em coluna de sílica gel (7,35g) (1cmX54cm) utilizando a série eluotrópica apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Série eluotrópica utilizada na purificação do material das frações 27-43

Solvente	Frações
Hexano 100%	1 a 11
Hexano/Diclorometano 10%	12 a 40
Hexano/Diclorometano 20%	41 a 58
Hexano/Diclorometano 50%	59 a 62
Diclorometano 100%	63 a 69
Etanol 100%	70

As frações coletadas foram reunidas em quinze grupos. O grupo constituído pelas frações 23-37 (0,1399g) foi purificado em placas preparativas de sílica gel, eluídas três vezes, na seguinte ordem: hexano, hexano e hexano/acetato de etila 20%. O processo resultou na obtenção de quantidade adicional do sólido branco (0,060g) denominado CLA-3.

1.2.3 Obtenção de Frações do Extrato em Acetato de Etila (2) Para Realização de Testes Biológicos

O extrato em acetato de etila 2 (29,30g) foi submetido à cromatografia em coluna filtrante de sílica gel (28,5cm de altura e 6cm de diâmetro), eluída exaustivamente com cada um dos seguintes solventes: Hexano (8,5L), Acetato de Etila (11,5L) e Etanol (3,5L). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, para obtenção das frações hexânica, acetato de etila e etanólica. Os materiais destas frações foram utilizados na realização de testes biológicos.

1.2.4 Ensaio Biológicos

1.2.4.1 Avaliação da atividade antioxidante do extrato e das frações de *Cassia leptophylla*

A atividade sequestradora do radical livre de 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) do extrato bruto em acetato de etila (EB) de *Cassia leptophylla* e das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAc) e etanólica (FE), obtidas deste extrato, foi avaliada de acordo com o método descrito na literatura (BLOIS, 1958; CASAGRANDE *et al.*, 2007). As soluções das amostras foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) nas seguintes concentrações: 12,5; 25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Alíquotas de 50µL de cada solução foram adicionadas à mistura contendo 1mL de solução tampão acetato 0,1M (pH 5.5), 1mL de etanol e 0,5mL de solução etanólica de DPPH* 250µM. O branco foi preparado utilizando 1mL de solução tampão acetato 0,1M (pH 5.5) e 1,5mL de etanol. Para o controle foram utilizados 1mL de solução tampão acetato, 1mL de etanol e 0,5mL de solução etanólica de DPPH* 250µM. As análises foram realizadas em triplicata. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, as absorvâncias das soluções resultantes foram medidas em espectrofotômetro em 517nm. A concentração inibitória (IC₅₀), ou seja, a concentração da solução de antioxidante necessária para

diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%, foi calculada a partir de uma curva hiperbólica, obtida plotando-se na abscissa as concentrações das amostras ($\mu\text{g/mL}$) e na ordenada a porcentagem de atividade antioxidante, calculada através da seguinte equação.

$$\%DPPH = 100 \left(\frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right)$$

1.2.4.1.1 *Determinação do conteúdo de Polifenóis totais*

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada apenas para o extrato bruto em acetato de etila (EB). A amostra foi analisada por meio de espectrofotometria na região do visível, utilizando o método de Folin-ciocalteau como reagente (KUMATZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; GEORGETTI *et al.*, 2007). O extrato bruto (EB) (0,1g) foi dissolvido em 5mL de solução aquosa de etanol 80%. Esta solução foi agitada por 15 minutos e, após isso, foi transferida para um balão volumétrico de 25mL e o volume foi completado com solução aquosa de etanol 80%. Uma alíquota de 50 μL desta última solução foi transferida para um balão volumétrico de 5mL e o volume completado novamente com solução aquosa de etanol 80%. Uma alíquota de 500 μL desta última solução foi misturada a 500 μL do reagente Folin-Ciocalteau e 500 μL de solução de Na_2CO_3 10%. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 760nm. O branco foi preparado utilizando o etanol e todos os reagentes, menos o extrato. Foi preparado também um controle utilizando a solução de extrato, reagente Folin- Ciocalteau e água. O teor de polifenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (4 a 24 $\mu\text{g/mL}$). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $A = 0,05652C + 0,005988$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorvância a 760nm. O coeficiente de correlação da curva foi $R^2 = 0,9984$. A análise foi realizada em triplicata.

1.2.4.1.2 Determinação do conteúdo de flavonóides totais

Os conteúdos de flavonóides totais presentes no extrato bruto em acetato de etila de *C. leptophylla* (EB), foram determinados pelo método descrito por Georgetti *et al.* (2007). O extrato (0,1g) foi dissolvido em 25mL de uma mistura contendo 50% de solução aquosa de etanol 80% e 50% de DMSO. Uma alíquota de 1,5mL desta solução foi misturada a 1,5mL de solução de AlCl_3 2% em solução aquosa de etanol 80%. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 420nm. Foi preparado um controle nas mesmas condições anteriores, sem a presença de solução de AlCl_3 2%. O branco foi preparado utilizando mistura contendo 50% de solução aquosa de etanol 80% e 50% de DMSO. O teor total de flavonóides foi calculado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de quercetina (6 a 30 $\mu\text{g/mL}$). A equação da curva de calibração de quercetina foi $A = 0,03185C - 0,05099$, onde C é a concentração de quercetina e A é a absorvância a 420nm e o coeficiente de correlação $R=0,9989$. A análise foi realizada em triplicata.

1.2.4.2 Teste de toxicidade contra *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* Leach foi realizado de acordo com o método de Meyer e colaboradores (1982). Os ovos do microcrustáceo foram colocados em água de mar artificial, constituída por 23g de NaCl, 11g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4g de Na_2SO_4 , 1,3g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,7g de KCl em 1000mL de água destilada. Em seguida, os ovos foram colocados em uma caixa contendo divisória com microperfurações, de maneira que apenas um dos lados da caixa ficasse iluminado para permitir a migração das larvas por fototropismo. Os ovos foram então incubados por 48 horas para que houvesse a eclosão dos mesmos.

Após a eclosão dos ovos, 9 a 12 larvas em 5mL de água do mar artificial foram colocadas em cinco tubos de ensaio, contendo o extrato em acetato de etila dos caules de *C. leptophylla* dissolvido em solução aquosa de DMSO 40%,

resultando nas seguintes concentrações, em $\mu\text{g/mL}$: 1071,4; 1228,1; 1379,3; 1525,4 e 1666,7. As análises foram realizadas em quadruplicata. As larvas mortas e vivas foram contadas após 24 horas e os valores de DL50 (Dose Letal-50%) calculados através de métodos estatísticos de regressão linear. Os resultados são considerados positivos para os valores de DL50 inferiores a $1000\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Identificação dos Constituintes Químicos

CLA-1

O constituinte denominado CLA-1 consistiu de um semi-sólido branco, o qual apresentou uma única mancha em cromatoplaça de sílica gel. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, entretanto, demonstrou que o material tratava-se de uma mistura de vários compostos, como pode ser observado no cromatograma da Figura 3. Os espectros de massas dos constituintes sugeriram a presença de hidrocarbonetos saturados (picos 1, 2, 11, 12, 13 e 16, Figura 3), de hidrocarbonetos insaturados (picos 15, Figura 3) e de álcoois (picos 3, 4, 7, 9, 17, 18, Figura 3) de cadeias longas.

O espectro no infravermelho (Figura 4) da mistura confirmou a presença de álcool pelas bandas de absorção em 3393 cm^{-1} (ν O-H) e 1266 cm^{-1} (ν C-O) e de insaturação pelas bandas de absorção em 3055 cm^{-1} (ν C-H, de carbono sp^2) e em 1630 cm^{-1} (ν C=C). As absorções em 2967, 2929, 2860, 1467 e 1379 e 745 cm^{-1} foram características de compostos contendo cadeias longas de carbonos saturados. Como a mistura era constituída de compostos de propriedades físicas muito semelhantes, não foi possível a separação dos mesmos. Entretanto, os hidrocarbonetos saturados de cadeias longas puderam ser identificados através da

comparação de seus dados cromatográficos com os dados de padrões de alcanos.

A amostra de CLA-1 e uma mistura de padrões de hidrocarbonetos saturados foram injetados nas mesmas condições no cromatógrafo a gás. Os tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos foram plotados contra os respectivos números de átomos de carbono, resultando numa curva representada na Figura 5. Por interpolação dos valores dos tempos de retenção dos hidrocarbonetos presentes em CLA-1 foi possível identificá-los como os alcanos C_{15} , C_{18} , C_{25} , C_{26} , C_{27} e C_{28} .

Figura 3 - Cromatograma de CG/EM CLA-1

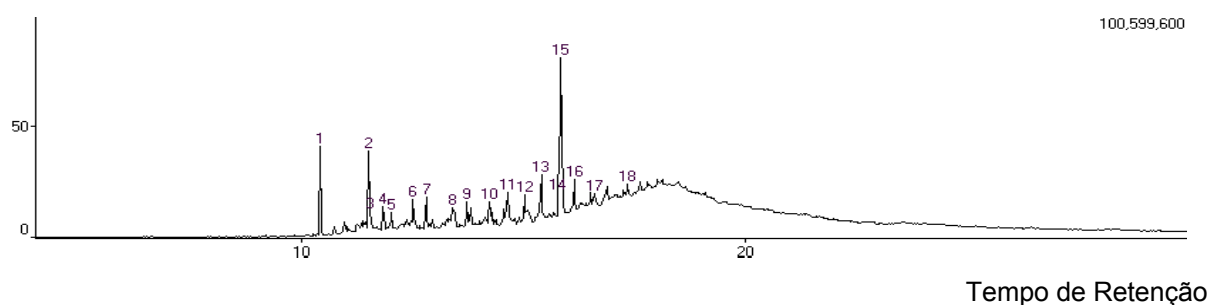


Figura 4 - Espectro no infravermelho de CLA-1

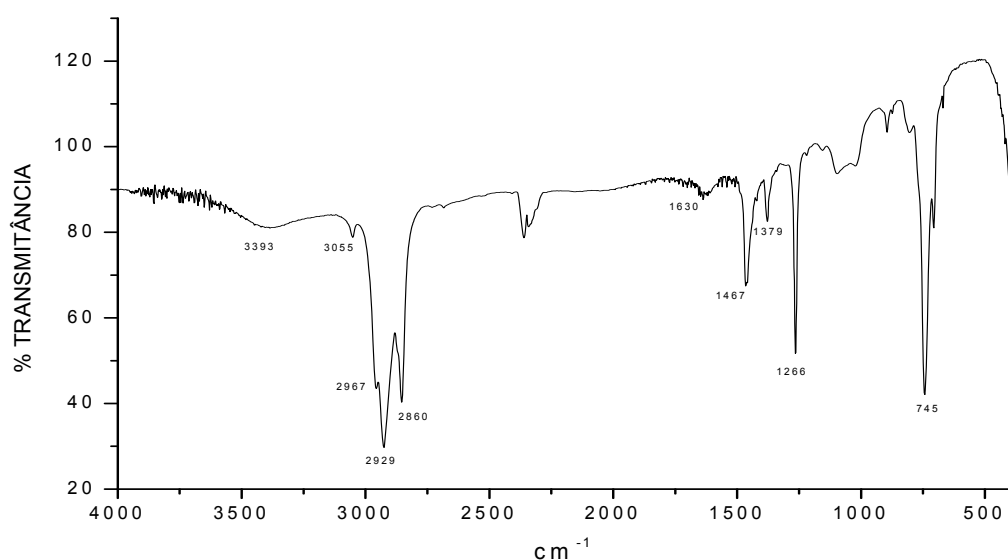
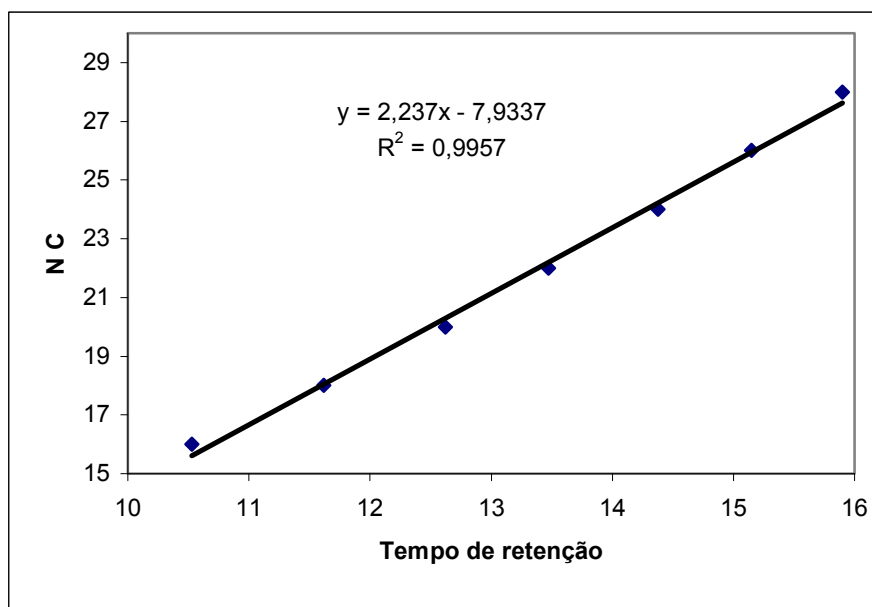
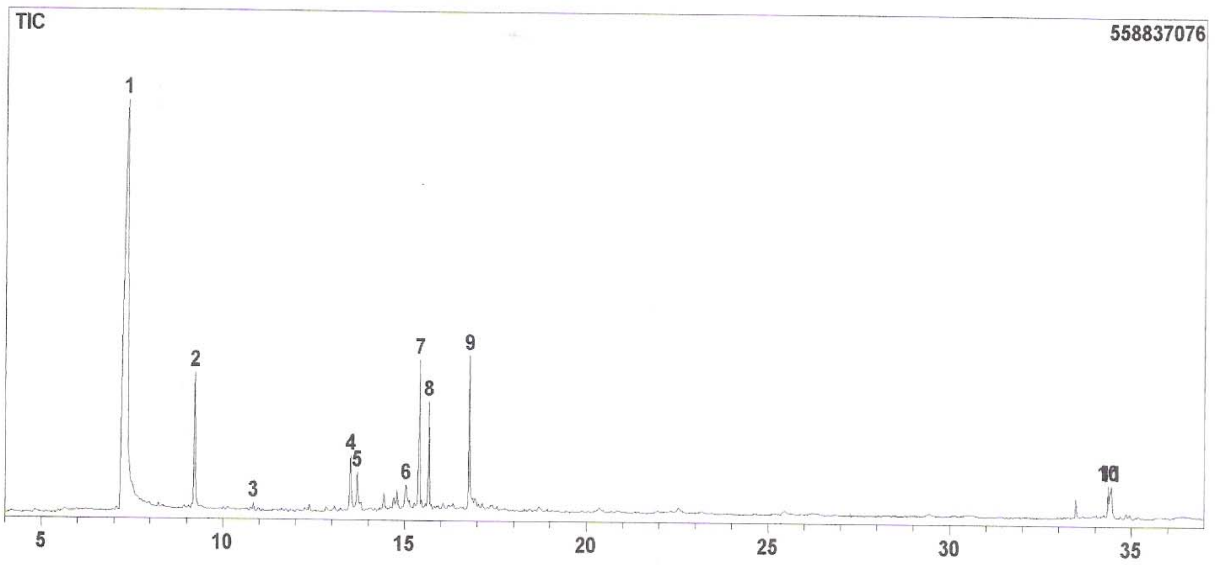


Figura 5 - Curva de correlação entre tempo de retenção e o número de átomos de carbono de alcanos presentes CLA-1.

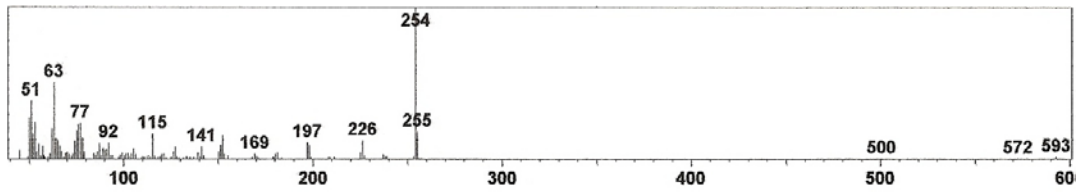


CLA – 2

A análise de CLA-2 por CG-EM revelou que o constituinte apresentava-se ainda impuro, conforme observado no cromatograma da Figura 6. Como o material, após várias tentativas de purificação, foi isolado em pequena quantidade, decidiu-se indentificar a substância presente em maior quantidade na mistura (Pico 1 do cromatograma da Figura 6). O espectro de massas de CLA-2 (Figura 7.a) mostrou ser idêntico ao da 1,8-diidroxi-3-metilantraquinona (crisofanol) obtido da biblioteca NIST12 (national institut of standards and tecnologia) (Figura 7.b) e em trabalho da literatura (SANTOS, 2007), apresentando pico do íon molecular e o pico base em m/z 254. O mecanismo de fragmentação proposto para a molécula está representado na Figura 8.

Figura 6 - Cromatograma de CG/EM de CLA-2**Figura 7** - a) Espectro de massas de CLA-2, b) Espectro de massas da biblioteca NIST da 1,8 diidroxí-3-metilantraquinona (crisofanol).

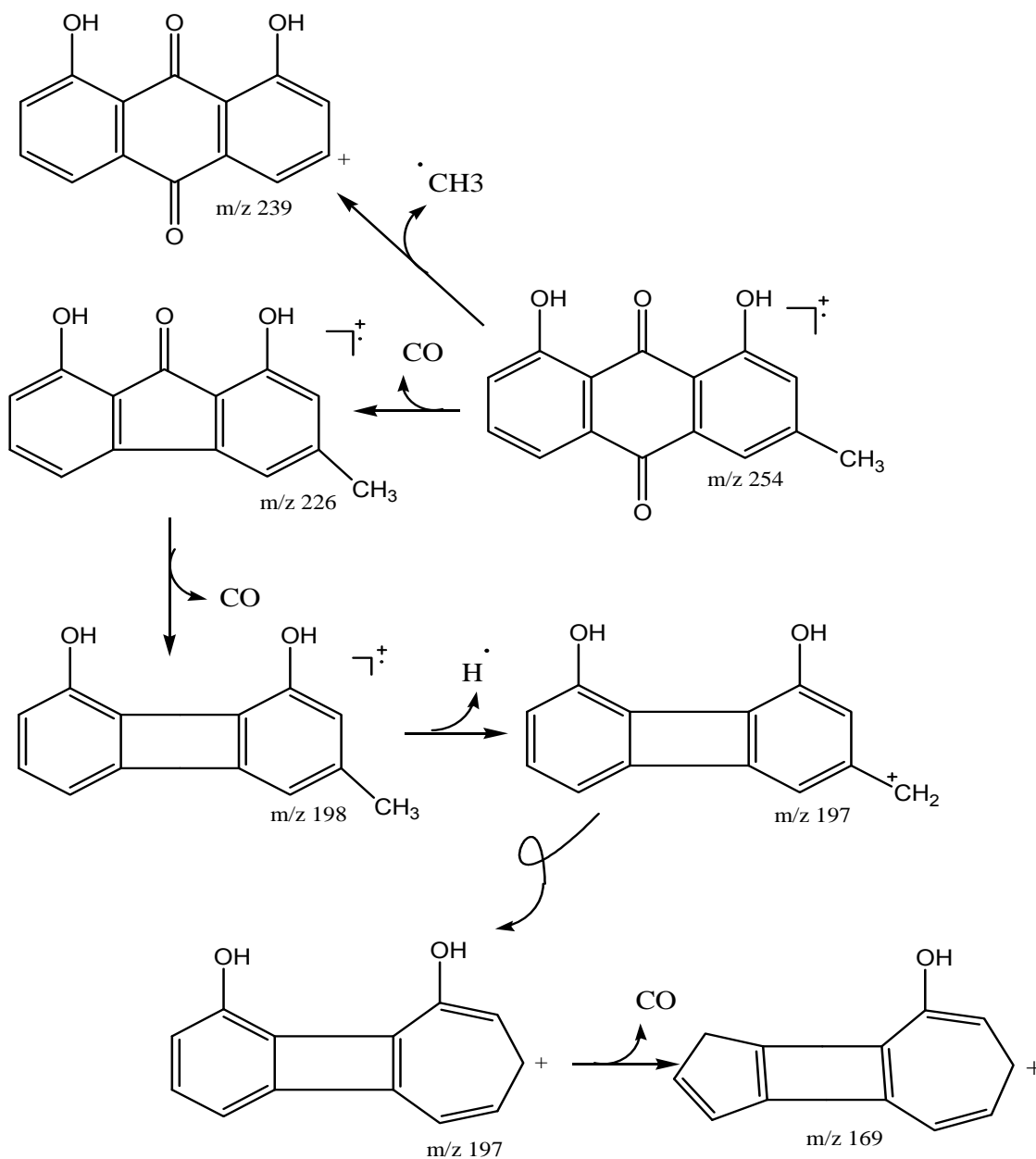
a)



b)



Figura 8 - Mecanismo de fragmentação proposto para CLA-2 (crisofanol).



A confirmação da estrutura proposta foi obtida pelo espectro de RMN de ^1H (Figura 9) que apresentou picos em δ 12,14 e 12,04 que indicaram a presença de duas hidroxilas fenólicas e de caráter quelatogênico. O singlete em δ 2,46, foi atribuído ao grupo metila em C-3, pois foi observado o alargamento dos sinais em δ 7,67 e 7,12 devido ao acoplamento a longa distância entre os hidrogênios metílicos e os dois hidrogênios aromáticos adjacentes H-2 e H-4, cujos

sinais deveriam se apresentar como dupletos característicos do acoplamento *meta* (Figuras 9 e 10, Tabela 8).

Os deslocamentos químicos dos demais hidrogênios também foram concordantes com os registrados na literatura para o crisofanol (SANTOS, 2007; FARIA, 1988; PINTO, 2004), (ver Tabela. 11), apresentando sinais em δ 7,84(1H, dd, J = 0,9 e 7,8 Hz) e em δ 7,30 (1H, dd, J = 0,9 e 8,4 Hz), característicos de hidrogênio aromáticos com acoplamento *orto* e *meta* (H-5 e H-7, respectivamente), em δ 7,68 (1H, t, J = 7,7Hz), característico de hidrogênio acoplado a dois hidrogênios adjacentes (H-6).

Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) de CLA-2.

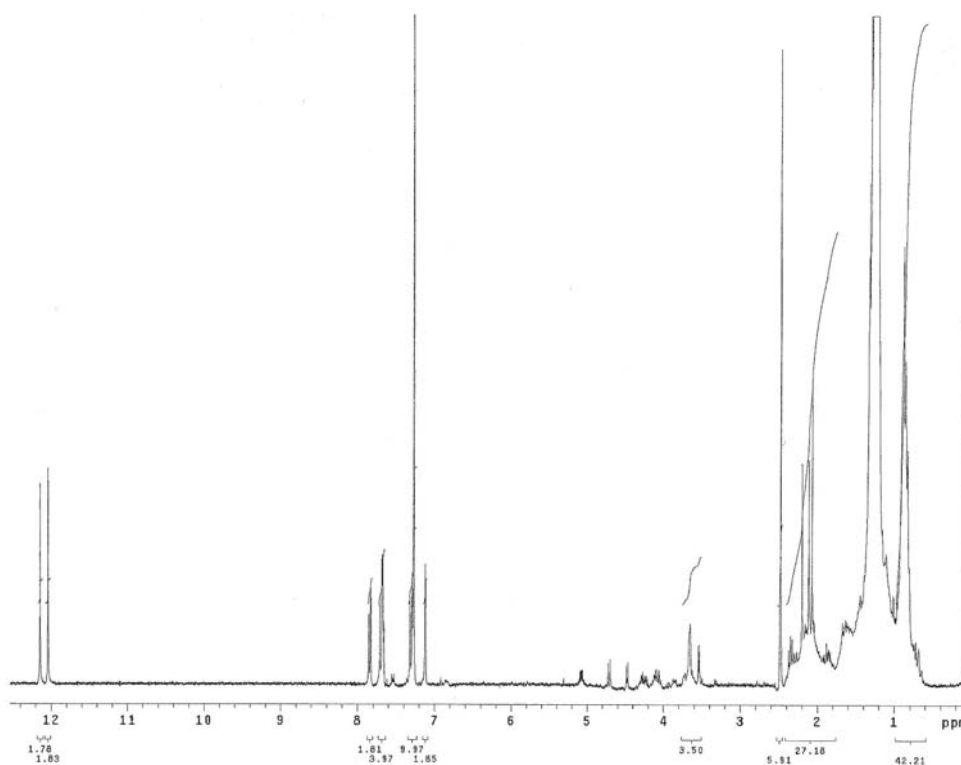


Figura 10 - Área ampliada do espectro de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) de CLA-2.

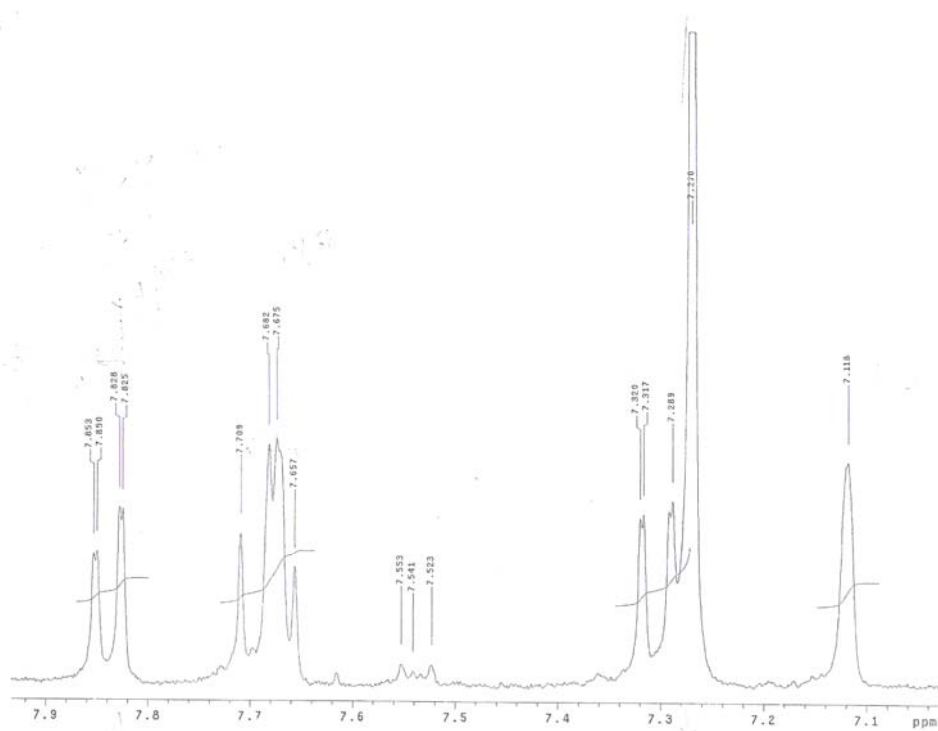


Tabela 8 - Dados de RMN ^1H comparados com dados da literatura do crisofanol

H	CLA-2 (300MHz)	Santos, 2007 (500MHz)	Pinto, 2004 (200MHz)	Faria, 1988 (80MHz)
2	7,12 (1H, sl)	7,11 (1H, m)	7,09(1H,dd)	7,10 (1H, sl)
4	7,66 (1H, sl)	7,66(1H, m)	7,64(1H,d, J=1,4Hz)	7,66 (1H,sl)
5	7,84(1H,dd, J=0,9 e 7,5Hz)	7,84 (1H, dd, J=10 e 1,9Hz)	7,81 (1H, dd, J = 7,6 e 1,1Hz)	7,84 (1H, dd, J=2,0 e 7,6 Hz)
6	7,68 (1H, t, J=7,7Hz)	7,67 (1H, t, J=10,0Hz)	7,68 (1H, dd, J=8,7 e 7,6)	7,66(1H, t, J =7,6Hz)
7	7,28 (1H, dd, J=7,3 e 0,9Hz)	7,31 (1H, dd, J = 10,0 e 1,9Hz)	7,28 (1H, dd, J=8,4 e 1,2Hz)	7,289(1H, dd, J=2,0 e 7,6Hz)
CH_3	2,48 (3H, s)	2,47 (3H, s)	2,46 (3H,s)	2,47 (3H, s)
OH-1	12,04 (1H, s)	12,02 (1H, s)	12,00 (1H, s)	12,11(1H, s)
OH-2	12,14 (1H, s)	12,12 (1H,s)	12,11 (1H, s)	12,00 (1H, s)

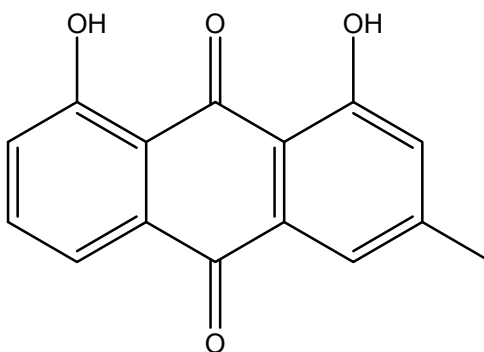
No espectro de RMN de ^{13}C de CLA-2 não foi possível observar os sinais dos carbonos 1, 4a, 8a, 9a, 10 e 10a, devido à pequena quantidade de amostra analisada. Entretanto os valores dos demais sinais dos carbonos presentes no espectro foram compatíveis com os apresentados na literatura para o crisofanol,

como pode ser observado na Tabela 9. Estes dados confirmaram, definitivamente, a estrutura de CLA-2 como 1,8-diidroxí-3-metilantraquinona (Figura 11).

Tabela 9 - Dados de RMN ^{13}C de CLA-2 comparados com dados do crisofanol registrados na literatura

C	CLA-2	Crisofanol Santos, 2007	Crisofanol Pinto, 2004
1	-	162,9	162,4
2	124,8	124,5	124,5
3	149,6	149,5	149,3
4	121,6	121,5	121,4
4 ^a	-	133,5	133,3
5	120,2	120,1	119,0
6	137,2	137,1	136,9
7	124,6	124,7	124,3
8	162,7	162,6	162,7
8a	-	116,1	115,8
9	-	192,7	192,5
9a	-	113,9	-
10	-	182,2	181,9
10a	-	133,8	-
Me	22,5	22,4	22,6

Figura 11 - Estrutura de 1,8-diidroxí-3-metilantraquinona (CLA-2).



As antraquinonas ocorrem principalmente nas famílias Polygonaceae, Liliaceae, Leguminosae e Ramnaceae (THOMSON, 1971). Na família Leguminosae, elas se concentram mais nos gêneros *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista*. Os representantes desta classe de compostos que possuem substituintes hidroxila nas posições 1 e 2 possuem propriedades corantes, enquanto as antraquinonas hidroxiladas nas posições 1 e 8 apresentam propriedade purgativa (ACCAME, 2000;

apud SANTOS, 2007). Entretanto, pesquisas com testes biológicos revelaram diversas outras propriedades biológicas das antraquinonas como atividades herbicida, anticarcinogênica, fungicida, helminticida, antipsoriática, moluscicida, bactericida e tuberculostática (SANTOS, 2007). O Crisofanol é uma antraquinona bastante comum no gênero *Cassia*, tendo sido isolado de quinze espécies de *Cassia*, de acordo com levantamento bibliográfico realizado por Santos (2007). As antraquinonas emodina, fisciona e crisofanol estão presentes em plantas conhecidas popularmente como ruibarbo, cáscara sagrada, senna e aloes, que são comercializadas há tempos como laxantes (DEWICK, 2002). Mais recentemente, Santos (2007) realizou testes farmacológicos para o crisofanol e constatou atividade antibacteriana significativa do composto contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*. Em testes *in vivo*, o autor constatou atividade anticonvulsivante satisfatória do crisofanol. As atividades antibacteriana e antifúngica do crisofanol já haviam sido reportadas anteriormente (GARCÍA-SOSA *et al.*, 2006; SURESH *et al.*, 2003).

CLA-3

CLA-3 consistiu de um sólido branco amorfo de ponto de fusão 135°C – 137°C, o qual apresentou reação positiva de Liebermann-Buchard para esteróis, indicada pelo desenvolvimento de coloração azul seguida de cor verde persistente (MATOS, 1988). O espectro no infravermelho do constituinte (Figura 12) apresentou bandas de absorção em 3400cm⁻¹ (√ O-H) e 1050 cm⁻¹ (√ C-O), indicativas da presença de hidroxila alcoólica; em 2940, 2920 e 2870 cm⁻¹ (√ C-H), 1465, e 1380 cm⁻¹ (δ C-H), atribuídas à ligação C-H de carbono saturado; em 1650 cm⁻¹ (√ C=C) e 840 e 800 cm⁻¹ (δ C-H) referentes à ligação dupla trissubstituída (NAKANISHI; SOLOMON, 1977).

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas revelou que o constituinte se tratava de uma mistura de três componentes. O espectro de massas do constituinte principal da mistura mostrou ser idêntico ao

espectro de massas do β -sitosterol obtido da biblioteca NIST, apresentando pico do íon molecular em m/z 414 e pico base em m/z 43. O espectro de RMN de ^1H (Figura 13) também foi compatível com a molécula do β -sitosterol (Figura 14), apresentando vários sinais na região de δ 0,8 a 1,3, referentes a hidrogênio ligados a carbono saturado, um multiplete em δ 3,53 correspondente a hidrogênio oximetínico, característico de H-3 em esteróide do tipo $3\beta\text{-OH}$ e um duplete largo em 5,36 atribuível a hidrogênio olefínico em C-6.

O espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença do β -sitosterol (1) na mistura, apresentando sinais em 72,02, característico de carbono carbinólico (C-3); em 140,96 e 121,94, atribuídos aos carbonos da ligação dupla, C-5 e C-6, respectivamente. Os demais sinais também foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos do β -sitosterol registrados na literatura, (Tabela 10).

Figura 12 - Espectro no infravermelho de CLA-3 (KBr).

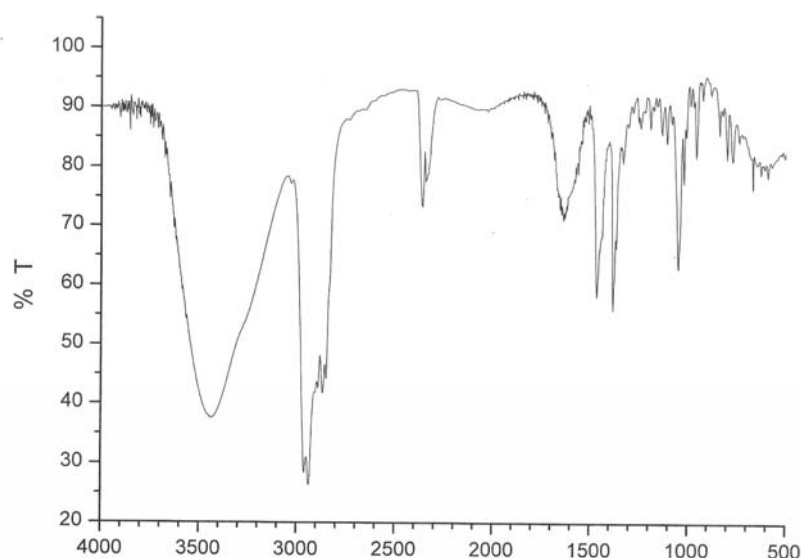


Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) de CLA-3.

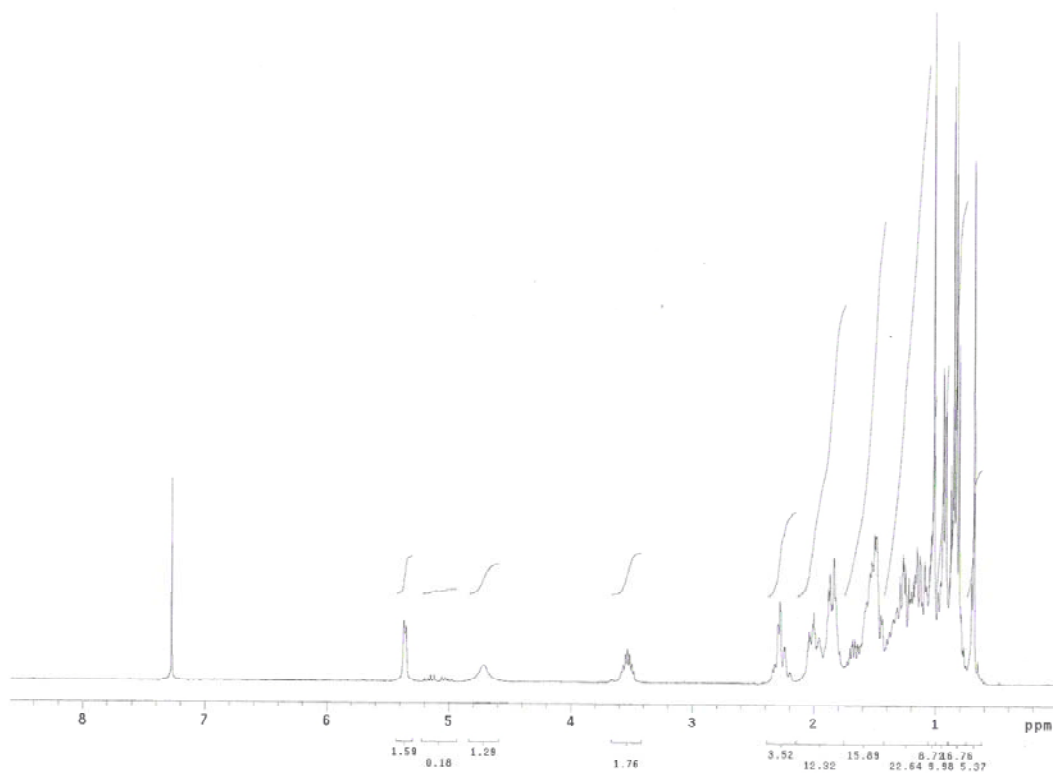
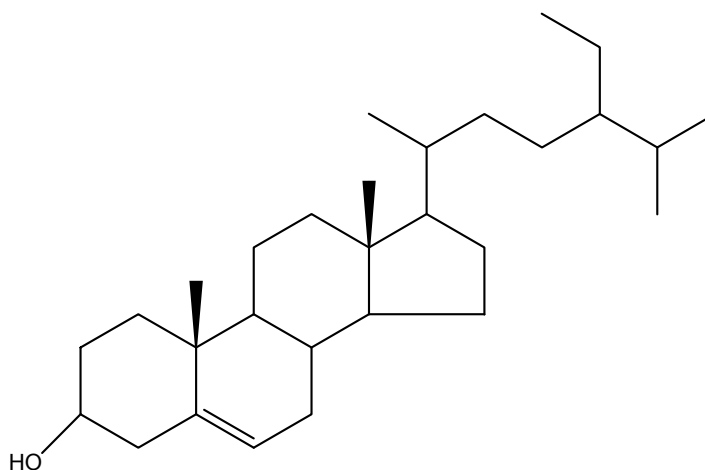


Tabela 10 - Deslocamentos químicos dos carbonos de CLA-3 (CDCl₃, 300MHz) comparados com dados do β-sitosterol registrados na literatura (CDCl₃)

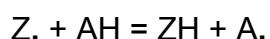
Carbono (n°)	CLA-3 (75MHz)	β-Sitosterol (Santos, 2007)	β-Sitosterol (Goulart et al, 1993)
1	37,4	37,5	37,25
2	31,8	29,1	31,64
3	72,0	71,8	71,81
4	42,5	42,5	42,29
5	141,0	141,0	140,73
6	121,9	121,9	121,72
7	32,1	31,9	31,89
8	32,1	32,1	31,89
9	50,3	50,4	50,12
10	36,7	36,7	36,40
11	21,3	21,4	21,08
12	40,0	40,0	39,78
13	42,5	42,4	42,29
14	57,0	56,2	56,75
15	24,5	24,5	24,30
16	28,4	28,4	28,24
17	56,2	57,0	56,05
18	12,1	12,0	11,87
19	19,6	19,3	19,38
20	36,3	36,3	36,16
21	19,2	19,2	19,03
22	34,1	34,2	33,94
23	26,2	26,3	39,12
24	46,0	46,1	45,83
25	29,3	29,4	26,03
26	19,0	19,0	18,76
27	20,0	19,6	19,81
28	23,3	21,3	23,06
29	12,2	12,3	11,00

Figura 14 - Estrutura do β-sitosterol (CLA-3)



1.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato e das Frações de *C. Leptophylla*

Nos últimos anos, observa-se um crescente interesse por agentes antioxidantes, principalmente por aqueles que previnem efeitos nocivos dos radicais livres no organismo humano ou que contribuem para a preservação de gorduras e de outros constituintes de alimentos. Um dos métodos mais usados para avaliar a atividade antioxidante é o do radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) (Figura 15), estável à temperatura ambiente. A estabilidade do radical se deve à deslocalização do elétron desemparelhado sobre toda a estrutura da espécie radicalar, o que impede a sua dimerização como ocorre para outros radicais. A deslocalização confere também uma coloração violeta ao radical em solução etanólica, caracterizada por uma banda de absorção em aproximadamente 517nm. Em presença de substância antioxidante, o composto assume a forma reduzida (Figura 15.b) e a solução se torna incolor. Considerando Z. como o radical livre DPPH e AH a molécula antioxidante, ou seja, doadora de átomos de hidrogênio, o processo pode ser representado pela equação abaixo:



Onde ZH representa a forma reduzida do DPPH e A. o radical formado (MOLYNEUX, 2004).

Figura. 15 - Estruturas do DPPH

Figura.15.a. Radicalar

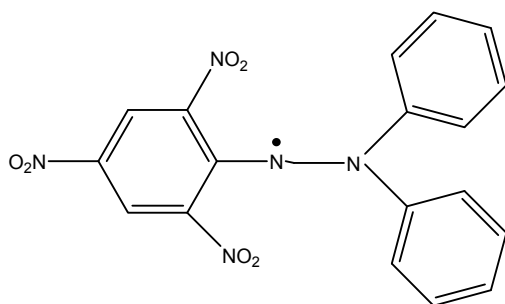
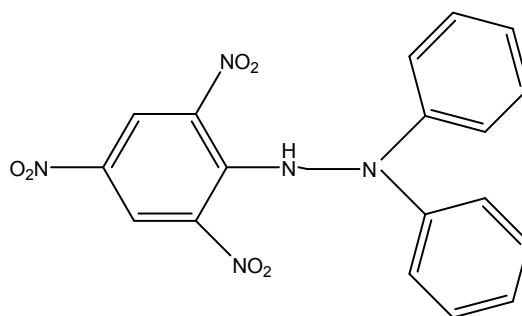


Figura.15.b.Reduzida



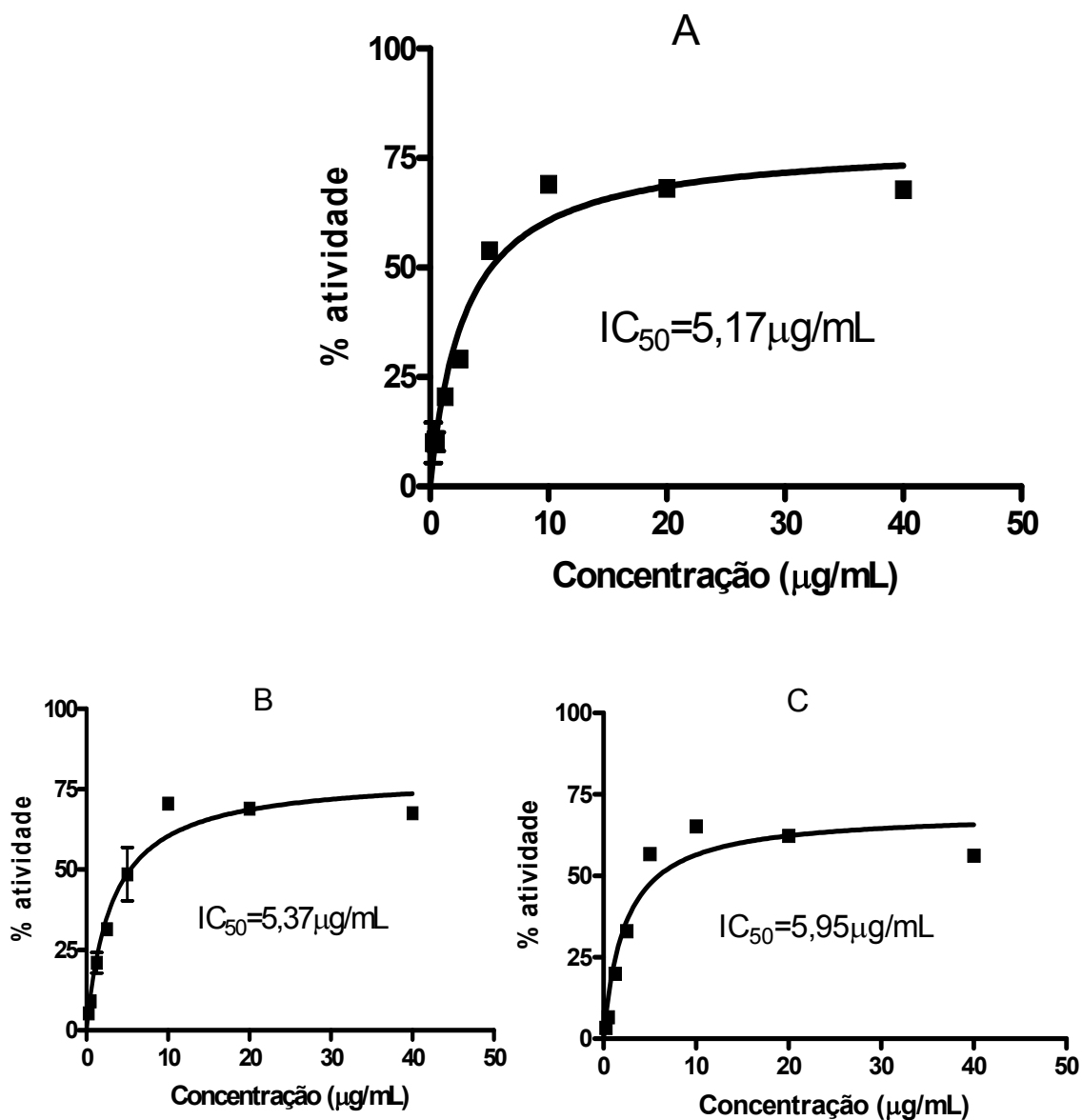
A atividade antioxidante do extrato bruto em acetato de etila (EB) e das frações deste extrato, fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAC) e fração etanólica (FE) foi avaliada pelo método do radical livre DPPH. Os resultados foram expressos em termos de concentração inibitória (IC_{50}), também denominada concentração eficiente (IE_{50}). As concentrações de extrato que inibem o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foram estimadas pelo software GraphPad Prism®, versão 4.00 de abril de 2003 utilizando uma curva hiperbólica. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$. A fração hexânica não apresentou atividade antioxidante, enquanto que o extrato bruto e as frações em acetato de etila e etanólica foram altamente eficientes no sequestro de radicais livres DPPH, apresentando, praticamente, o mesmo valor de IC_{50} ($\sim 5 \mu\text{g/mL}$) como apresentado nos gráficos da figura 16. Os resultados obtidos foram consideravelmente superiores ao do extrato Isoflavin Beta®, um extrato comercial padronizado, rico em isoflavonóides que apresentou $IC_{50} = 0,16 \text{mg/mL}$ (ou $160 \mu\text{g/mL}$) (GEORGETTI et al., 2007). Por outro lado, a atividade sequestradora de radicais livres DPPH das amostras de *C. leptophylla* foi comparável à atividade apresentada pela quercetina, um flavonóide de comprovada atividade antioxidante, cujo valor de IC_{50} foi de $1,7 \mu\text{g/mL}$ (CASAGRANDE et al., 2007).

Os resultados indicaram também que o método de DPPH• é eficiente para avaliação da atividade doadora de átomos de hidrogênio de EB, FAC e FE e que esta atividade foi concentração dependente para todas as amostras ativas.

Zhang e colaboradores (2007) atribuíram a moderada atividade antioxidante do óleo volátil de *Cassia tora* ($IC_{50} = 137 \mu\text{g/mL}$) à presença do crisofanol e do ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienóico. Portanto, o crisofanol identificado no extrato de *C. leptophylla* contribui, provavelmente, para a alta atividade sequestradora de radicais livres DPPH apresentada pela espécie vegetal. Entretanto, a alta atividade antioxidante apresentada por *C. leptophylla*, talvez se deva principalmente ao grande conteúdo de polifenóis encontrado no extrato bruto (EB) da planta ($172,642 \text{mg}$ de polifenóis/g de extrato). O teor de polifenóis totais encontrado foi similar às quantidades encontradas em plantas fenólicas e em ervas medicinais registradas na literatura (ZHENG; WANG, 2001; PROESTOS et al., 2005). Também foi quantificado o teor de flavonóides totais no extrato bruto,

encontrando-se 3,3mg de flavonóides/g de extrato. Este valor justificaria também a atividade sequestradora de radicais livres DPPH do extrato, uma vez que os flavonóides são substâncias comprovadamente antioxidantes (CASAGRANDE *et al.*, 2007).

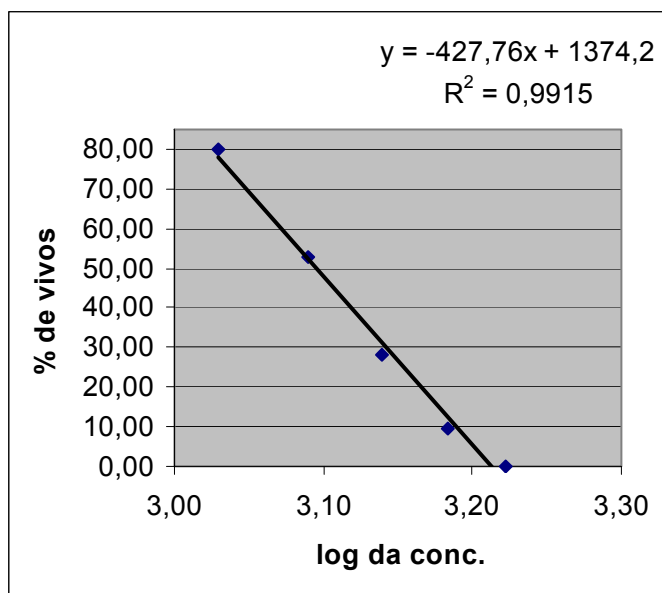
Figura 16 - Atividade doadora de átomos de hidrogênio (a) do extrato bruto (EB), frações (b) de acetato de etila (FAc) e (c) etanólica (FE) de *Cássia leptophylla*. Os resultados foram representados pela média \pm erro padrão médio.



1.3.3 Teste de Toxicidade Contra *Artemia Salina*

O teste de toxicidade contra *Artemia salina* apresentou uma DL₅₀ de 1247µg/mL, calculada através de método estatístico de regressão linear (Figura 18). Este resultado foi considerado negativo, pois os testes positivos apresentam DL₅₀ inferior a 1000µg/mL. Entretanto este é um fator positivo, pois indica que o extrato de *C. leptophylla* apresenta baixa toxicidade.

Figura 17 – Curva de regressão linear para cálculo de DL₅₀ do extrato em acetato de etila de *Cassia leptophylla* contra *Artemia salina*.



1.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS CONSTITUINTES DE *CÁSSIA LEPTOPHYLLA*

CLA-1: Mistura de alcanos ($C_{15}H_{32}$, $C_{18}H_{38}$, $C_{25}H_{52}$, $C_{26}H_{54}$, $C_{27}H_{56}$, $C_{28}H_{58}$).

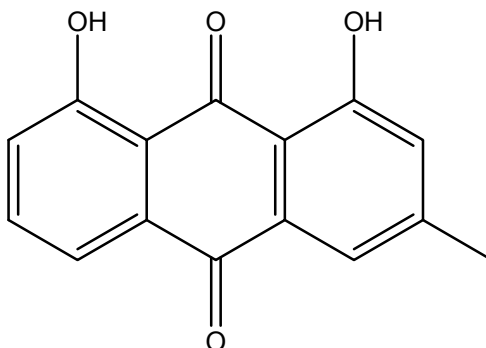
Semi-sólido branco.

IV – v max, KBr (cm^{-1}):

3393, 3055, 2967, 2929, 2860, 1467, 1379, 1266, 745.

CLA – 2: 1,8-diidroxi-3-metilantraquinona (crisofanol)

Material oleoso alaranjado

EM: M^+ 254, 226, 197, 169, 141, 115, 92, 77, 63, 51.RMN¹H – 300MHz, CDCl₃, δ:

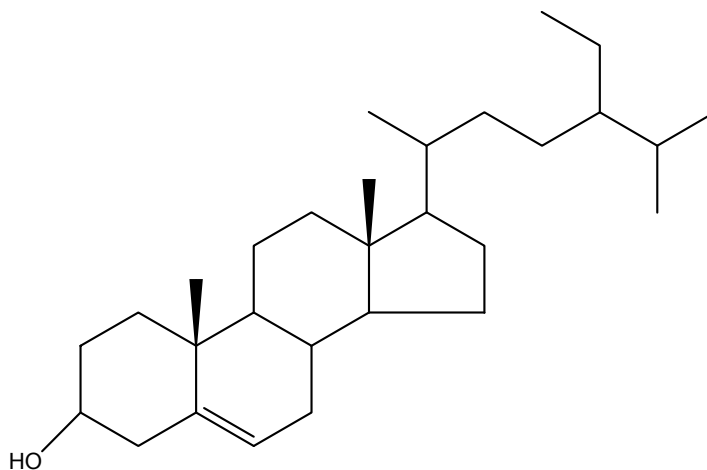
12,14 (1H, s, OH-2), 12,04 (1H, s, OH-1), 2,48 (3H, s, CH₃), 7,28 (1H, dd, J 7,3 e 0,9Hz, H-7), 7,68 (1H, t, J 7,7Hz, H-6), 7,84 (1H, dd, J 0,9 e 7,5Hz, H-5), 7,66 (1H, sl, H-4), 7,12 (1H, sl, H-2).

RMN¹³C – 75 MHz, CDCl₃, δ:

124,8 (C-2), 149,6 (C-3), 121,6 (C-4), 120,2 (C-5), 137,2 (C-6), 124,6 (C-7), 162,7 (C-8), 22,5 (C-CH₃).

CLA – 3: β-sitosterol

Sólido branco amorfo, ponto de fusão 135°C – 137°C



IV – v max, KBr (cm^{-1}):

3400, 2940, 2920, 2870, 1650, 1465, 1380, 1050, 840, 800.

RMN¹H – 300MHz, CDCl_3 , δ :

5,36 (1H, dl, H olefínico), 3,53 (1H, m, OH), 0,8-1,3 (demais H)

RMN¹³C – 75 MHz, CDCl_3 , δ :

37,4 (C-1), 31,8 (C-2), 72,0 (C-3), 42,5 (C-4), 141,0 (C-5), 121,9 (C-6), 32,1 (C-7), 32,1 (C-8), 50,3 (C-9), 36,7 (C-10), 21,3 (C-11), 40,0 (C-12), 42,5 (C-13), 57,0 (C-14), 24,5(C-15), 28,4(C-16), 56,2 (C-17), 12,1 (C-18), 19,6 (C-19), 36,3 (C-20), 19,2 (C-21), 34,1 (C-22), 26,2 (C-23), 46,0 (C-24), 29,3 (C-25), 19,0 (C-26), 20,0 (C-27), 23,3 (C-28), 12,2 (C-29).

CAPÍTULO 2
ESTUDO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Tynanthus micranthus*

2 ESTUDO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Tynanthus micranthus*

As espécies da família Bignoniaceae apresentam grande variedade de usos etnobotânicos e econômicos. Segundo a literatura, 36 gêneros da família são utilizados na medicina popular, dos quais vinte e sete são constituídos por lianas e nove por árvores. Grande parte das espécies de Bignoniaceae do noroeste da América do Sul é empregada para fins medicinais (LOPES *et al.*, 2008). O gênero *Tynanthus*, pertencente à família Bignoniaceae, é constituído por lianas, conhecidas por cipó-cravo em razão do forte odor de cravo que exalam durante o corte ou maceração de seus caules.

As espécies do gênero são usadas na medicina tradicional para diversos fins como estimulante, afrodisíaco, tônico, no tratamento do reumatismo, diarreia e diabete (VILEGAS *et al.*, 1995; PLAZA *et al.*, 2005, MUÑOZ *et al.*, 2000). O gênero é pouco estudado, tendo sido encontrados registros de apenas três espécies de *Tynanthus*: *T. panurensis*, *T. schumannianus* e *T. fasciculatus*. Em um estudo sobre as cascas de *T. panurensis* foi verificada a ocorrência de eugenol-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 5)-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopiranoside, verbascosídio, isoverbascosídio, leucosceptosídio e o flavonóide apigenina 8-C-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido, denominado *katchimoside* (PLAZA *et al.*, 2005), enquanto que do cortex da mesma espécie foi extraído um óleo essencial constituído de eugenol (LECLERCQ *et al.*, 2000). A investigação fitoquímica de *Tynanthus fasciculatus* resultou no isolamento de β -Sitosterol glicosilado (VILEGAS *et al.*, 1993), cumarina, estigmasterol e derivados do ácido melilótico (VILEGAS *et al.*, 1995). Outro estudo constatou a atividade antimalárica moderada do extrato dos frutos de *T. schumannianus* (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Tynanthus micranthus é usada na medicina popular, na forma de chá, para o tratamento de estados gripais e resfriados. Embora seja usada pela população, não existem estudos sobre a composição química de extratos e nem do óleo essencial e, tampouco, sobre as atividades biológicas da espécie. Este capítulo, portanto, aborda o estudo da composição química, a avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *T. micranthus*.

2.1 PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1 Coleta do Material Vegetal

As folhas de *Tynanthus micranthus* foram coletadas nas proximidades do departamento de agronomia da UEL em abril de 2008, com o auxílio do Sr. José Vicentine Neto (Sr Bié), oficial de agropecuária desta universidade, que também forneceu as informações sobre o uso popular da planta. A espécie foi identificada pela Professora Dra. Ana Odete Santos Vieira e uma excisada da planta encontra-se depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina sob o nº FUEL 45.005.

2.1.2 Extração do Óleo Essencial das Folhas de *Tynanthus Micranthus*

As folhas recém coletadas de *T. micranthus* (55,0g) foram submetidas ao processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação por 2 horas, utilizando-se aparelho de Clevenger. Em seguida, o óleo foi separado da fase aquosa através de extração com diclorometano (4X100mL) em funil de separação. A fase orgânica, após secagem com sulfato de sódio, filtração e concentração em evaporador rotativo, resultou na obtenção de 0,625g de óleo essencial. O processo de extração foi repetido para obtenção de quantidade adicional do óleo. A título de comparação de rendimentos foi feita a extração do óleo das folhas de *T. micranthus* secas em estufa a 40°C. As folhas desidratadas (30,13g) foram submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, como descrito no processo de hidrodestilação das folhas frescas. O processo resultou na obtenção de 0,0113g de óleo essencial.

2.1.3 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa e por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

As análises do óleo essencial foram realizadas em aparelho Shimadzu GC-17A, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm), com fase estacionária DB-5 (0,25µm de espessura de filme), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 1,2mL/min. A temperatura foi programada começando em 60°C e, em seguida, aumentada de 7 °C/min até atingir 320 °C, mantendo esta temperatura constante por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 300°C, respectivamente. 2,0µL de amostra diluída (1:10 em diclorometano, v/v) foram injetados na taxa de partição do volume injetado de 1:20. A área do pico foi usada para determinação quantitativa. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em aparelho Shimadzu acoplado a equipamento Shimadzu GC/MS-QP5000 usando coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm), com fase estacionária DB-1 (0,25µm de espessura de filme) e utilizando hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2mL/min. A temperatura foi programada começando em 60 °C e, em seguida, aumentada de 7°C/min até atingir 320°C, mantendo esta temperatura por 5 minutos. As demais condições cromatográficas foram as mesmas descritas acima para a análise no aparelho com detector de chama (FID). As condições da espectrometria de massas foram: detetor de captura iônica operando por impacto eletrônico, energia de impacto de 70 eV, temperatura do separador e fonte iônica de 250°C e fragmentos detectados de 40 a 400 Dalton.

O componente majoritário do óleo essencial foi identificado através da comparação de seu espectro de massas com o espectro da literatura (ADAMS, 2007) e do banco de dados do equipamento; pela comparação do índice de retenção (índice de Kovats, IK) com aquele da literatura e por comparação dos mesmos dados com os dados de amostra autêntica. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra. A concentração do constituinte principal do óleo foi calculada através da área integral de seu respectivo pico, relacionada à área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (FID).

2.1.4 Ensaios de Atividade Antimicrobiana

2.1.4.1 Microrganismos

Foram utilizados os seguintes microrganismos: (I) três isolados clínicos de levedura cedidos pelo Hospital Universitário da UEL: *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*; (II) quatro cepas padronizadas: duas bactérias Gram-positivo, *Bacillus subtilis* (8272) e *Staphylococcus aureus* (25923), duas Gram-negativo, *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e *Escherichia coli* (25922) e (III) cinco fungos filamentosos: *Botryosphaeria rhodina*, *Botryosphaeria ribis*, *Claudosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides* e *Lasiodiplodia theobrome*. Todas as cepas de bactérias cresceram em meio Mueller-Hinton Agar (MHA); as leveduras cresceram em meios Saboureaud Dextrose Agar (DAS) e os fungos cresceram em meio de batata dextrose Agar (BDA).

2.1.4.2 Preparação dos inóculos

Bactérias:

As cepas foram preservadas em meio MHA (solução Mueller-Hinton Agar) a 4°C, e incubadas a 37±1°C durante 18-24h. Em seguida, foram diluídas a concentração de 10⁴ UFC/ mL.

Leveduras:

As cepas foram preservadas em SDA (solução de Saboureaud) a 4°C e incubadas a 30±1°C durante 24-48h. Em seguida, foram diluídas a concentração de 10⁴ UFC/ mL.

Fungos:

- Filamentosos: Estes fungos foram preservados em BDA a 4°C e incubados a 27±1°C durante 7-10 dias. Discos de BDA com o fungo crescido, de 3mm de diâmetro de crescimento médio foram usados como inóculos.

- *Cladosporium herbarum*: O fungo foi repicado em meio inclinado de batata-dextrose-ágar (BDA), contido em tubos de ensaio. Em seguida o material foi incubado por oito dias em estufa a 28°C. Após esse tempo, os tubos foram armazenados em câmara fria a 4°C para manutenção do microrganismo.

2.1.4.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Para a verificação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Bioautografia em cromatografia em camada delgada (CCD) para verificação da atividade contra *Cladosporium herbarum*, realizado no Laboratório de Pesquisa em Moléculas Bioativas deste Departamento (HOMANS; FUNCHS, 1970).
- Método de difusão em Agar (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001), para avaliação da atividade contra fungos filamentosos, realizado no Departamento de Bioquímica da UEL.
- Teste de microdiluição (NCCLS document M7-A6) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003), para determinação da concentração inibitória mínima contra bactérias e leveduras realizado no Departamento de microbiologia, CCB, UEL.

2.1.4.3.1 Atividade antifúngica contra *C. herbarum*: bioautografia em CCD

O teste de bioautografia foi realizado de acordo com o método de Homans e Funchs (1970). O óleo essencial foi aplicado (0,25mg) em duas placas cromatográficas de sílica gel (Merck), eluídas com mistura de hexano/diclorometano 1:1. Uma das placas foi usada como cromatograma de referência e a outra para a bioautografia. Nesta última foi aplicada, através de borrifador, uma solução nutritiva

(2 mL de solução de glicose 30% e 10 mL de solução salina) contendo esporos de *Claudosporium herbarum* em suspensão. A placa cromatográfica foi colocada em câmara úmida e em seguida foi incubada em estufa a 28° C, por três dias. A área de inibição do crescimento do microrganismo foi observada e correlacionada com o cromatograma de referência, visualizado com luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm.

Preparação de solução de glicose 30%:

15g de glicose grau P.A. foram dissolvidos em 50mL de água destilada e a solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio que foram, em seguida, esterilizados em autoclave.

Preparação de solução salina:

7g de KH_2PO_4 ; 3g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 4g de KNO_3 ; 1g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de NaCl foram dissolvidos em 1L de água destilada e a solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio que foram, em seguida, esterilizados em autoclave.

2.1.4.3.2 Ensaio de atividade contra fungos filamentosos: Diluição em Agar:

A atividade biológica do óleo essencial contra fungos filamentosos foi avaliada com base na taxa de crescimento radial das hifas, de acordo com a metodologia de Quiroga, Sampietro e Vattuone (2001) . Volumes diferentes do óleo foram dissolvidos em acetato de etila e adicionados a erlenmeyers contendo 16mL de meio BDA esterilizado e aquecido. Após agitação manual, as misturas foram vertidas em placas de Petri (60mm X 15mm). Um disco de 3mm de diâmetro do meio contendo o fungo crescido foi colocado no centro das placas de Petri, as quais foram incubadas até o crescimento do microrganismo nas placas controle. Paralelamente, foram preparados controle positivo de inibição com captan, um antifúngico comercial, e controle positivo de crescimento contendo somente o meio BDA e o solvente acetato de etila.

2.1.4.3.3 Ensaio de atividade contra bactérias e leveduras: Microdiluição, determinação da concentração inibitória mínima

Os ensaios de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima do crescimento de bactérias e leveduras foram realizados em uma microplaca de 96 orifícios, nos quais foram adicionados, previamente, 100µL de meio Mueller-Hinton para o teste com bactérias e 100µL de meio Saboureaud para o teste com leveduras. Em seguida, foram adicionados aos orifícios, volumes adequados de óleo para se conseguir concentrações que variaram de 0,5 a 67 µL/mL do óleo essencial e 100µL dos inóculos preparados como descrito na seção 2.1.4.2. As placas dos ensaios com bactérias foram incubadas a 30°C durante 24 horas e as placas dos ensaios com leveduras a 25°C por 48 horas. Após este tempo, foram adicionados a cada orifício 50µL de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazolium (TCC) 0,5% e as placas foram incubadas por 3 horas nas temperaturas mencionadas anteriormente. As concentrações inibitórias mínimas foram definidas como a menor concentração do óleo que inibiu o crescimento dos microrganismos.

As ações bacteriostática e bactericida do óleo essencial foram verificadas através da aplicação, em placas de petri contendo meio de cultivo, das amostras utilizadas no teste de microdiluição. Após a incubação das placas, foi observado o crescimento ou não de bactérias. A ação foi considerada bacteriostática nos cultivos onde houve crescimento do microrganismo e bactericida, naqueles que não houve o crescimento.

2.1.5 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre DPPH*

A redução do radical DPPH* foi determinada pela mudança na absorvância medida em 517nm (BLOIS, 1958; CASAGRANDE et al.,2007).

O óleo essencial de *T. micranthus* foi pesado (0,1g), diluído em DMSO e transferido para um balão volumétrico de 10mL e o volume foi completado com DMSO. Uma alíquota de 0,5mL desta solução foi transferida para outro balão volumétrico de 5mL e o volume final foi completado com DMSO. Desta solução

foram feitas diluições nas seguintes proporções: 1:2; 1:5; 1:10 1:20 e 1:40 no meio de reação, obtendo-se as concentrações do extrato de 25 - 1000 μ g/mL. Alíquotas de 50 μ L de cada amostra, das soluções preparadas com o óleo, foram adicionadas à mistura reacional contendo 1mL de solução tampão acetato 0,1M (pH 5.5), 1mL de etanol e 0,5mL de solução etanólica de DPPH^{*} 250 μ M. Após 15min de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 517nm. O branco foi preparado utilizando 1mL de solução tampão acetato 0,1M (pH 5.5) e 1,5mL de etanol. O controle positivo foi preparado sem a amostra. A análise foi realizada em triplicata.

O mesmo teste foi realizado com o padrão de eugenol, nas mesmas condições e concentrações.

2.1.5.1 Resultados e discussão

2.1.5.2 Composição química do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido com um rendimento de 1,2% a partir das folhas frescas e de apenas 0,04% a partir das folhas desidratadas. Este resultado demonstra a grande perda dos constituintes voláteis durante o processo de secagem do material vegetal.

A composição química do óleo essencial foi determinada pela análise em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (FID). O cromatograma revelou a presença de praticamente um único constituinte (99,9%). A substância presente no óleo essencial foi identificada como eugenol (1) através do seu índice de Kovats (1456), o qual foi idêntico ao índice de Kovats do eugenol registrado na literatura e ao da amostra autêntica da substância. O espectro de massas da substância (Figura 20a) foi idêntico ao do eugenol obtido da biblioteca NIST (Figura 20b) e da literatura (ADAMS, 2007).

Como o óleo apresentou praticamente um único constituinte químico, pôde ser submetido às análises por espectrometria no infravermelho e de RMN de ¹H e de ¹³C sem purificação prévia. O espectro no infravermelho do óleo (Figura 21) também foi compatível com a estrutura do eugenol, apresentando bandas de absorção em 3065, 1612 e 1508 cm^{-1} , características de anel aromático, em 3480 cm^{-1} (ν O-H) e 1262 cm^{-1} (ν C-O), atribuídas à hidroxila fenólica, e em 1646 cm^{-1} ,

referente à ligação dupla mono-substituída da cadeia alílica. O espectro de RMN de ^1H (Figura22) também foi característico da molécula do eugenol, apresentando singlete em δ 4,0 (3H), atribuído a grupo metoxila e sinais na região de prótons aromáticos com integração para três hidrogênios: um duplete em δ 6,92 ($J = 8,4$, 1H) referente ao hidrogênio H-6 e um multiplete em δ 6,73-6,76 referente aos hidrogênios H-3 e H-5. A cadeia alílica da molécula foi caracterizada pelo multiplete em δ 5,95-6,09, correspondente ao hidrogênio metínico da ligação dupla, pelo multiplete em δ 5,1-5,18 (2H), atribuído aos hidrogênios vinílicos, e pelo duplete em δ 3,38 ($J = 6,9$, 2H), correspondente aos hidrogênios do grupo metilênico ligados ao anel aromático. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 10 sinais (Figura 23). Os sinais em δ 146,50, 143,97 e 137,69 foram atribuídos aos carbonos quaternários, uma vez que estes sinais não aparecem no espectro de DEPT-135 (Figura24). O espectro DEPT 135 apresentou, por outro lado, cinco sinais em fase oposta aos dois sinais de CH_2 , atribuídos a carbonos CH e CH_3 . Os deslocamentos químicos dos dez carbonos e suas respectivas atribuições, bem como os dados obtidos na literatura para os carbonos do eugenol, são apresentados na Tabela11.

Figura 18 - Estrutura química do eugenol

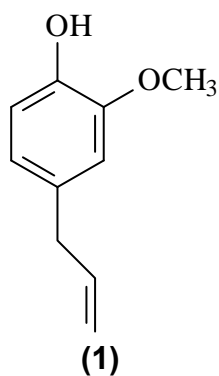


Figura 19 a) Espectro de massas do constituinte principal do óleo essencial de *T. micranthus* b) Espectro de massas do eugenol (banco de dados NIST).

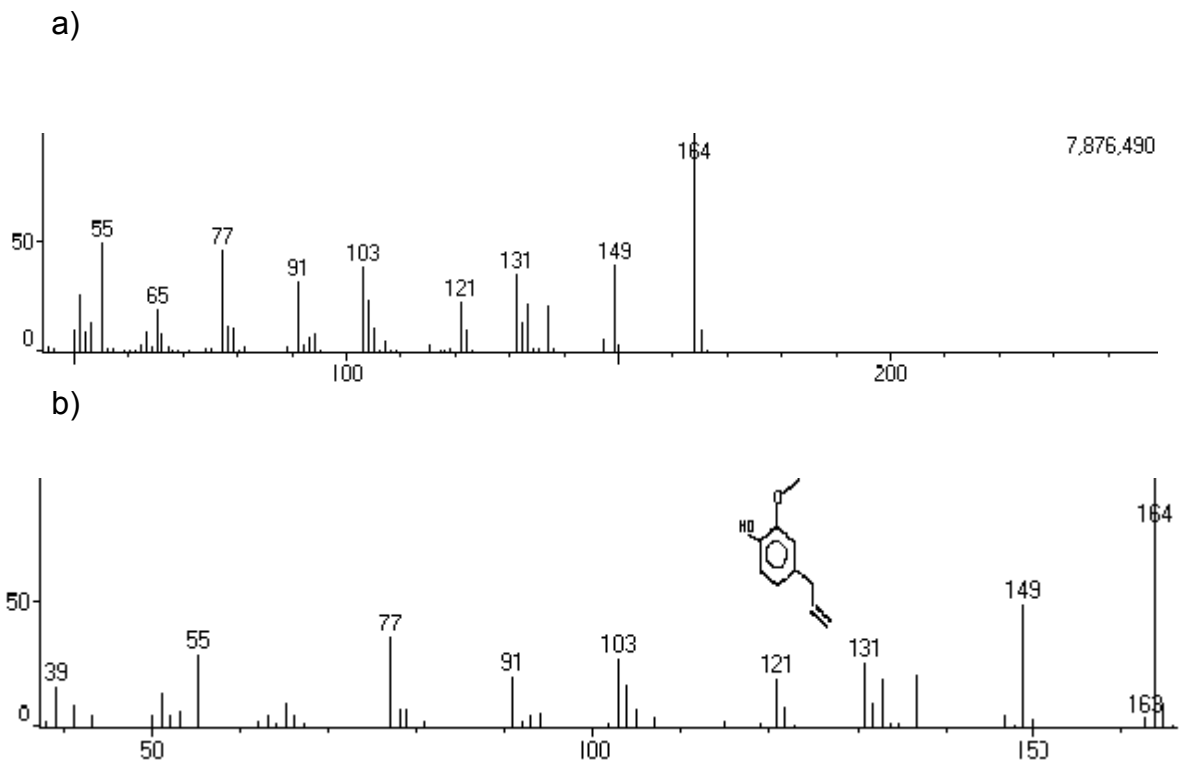


Figura 20 - Espectro no infravermelho do óleo essencial de *T. micranthus*

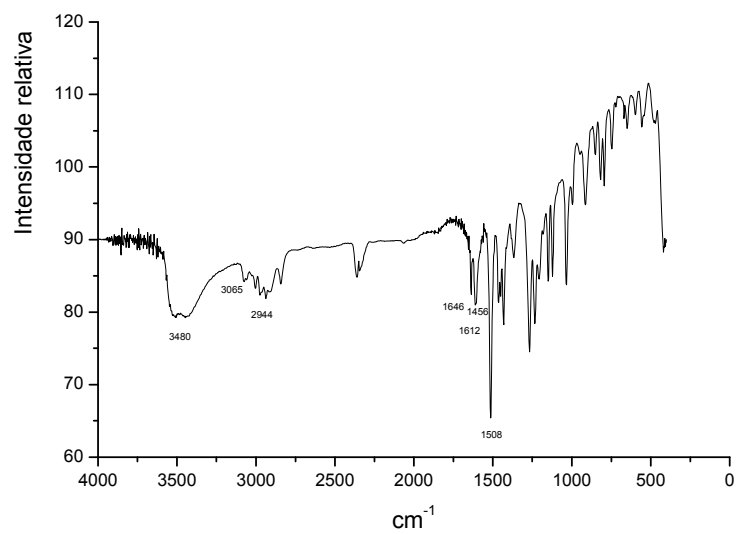


Figura 21 - Espectro de RMN de H^1 do constituinte principal do óleo essencial de *T. micranthus* (300MHz, $CDCl_3$).

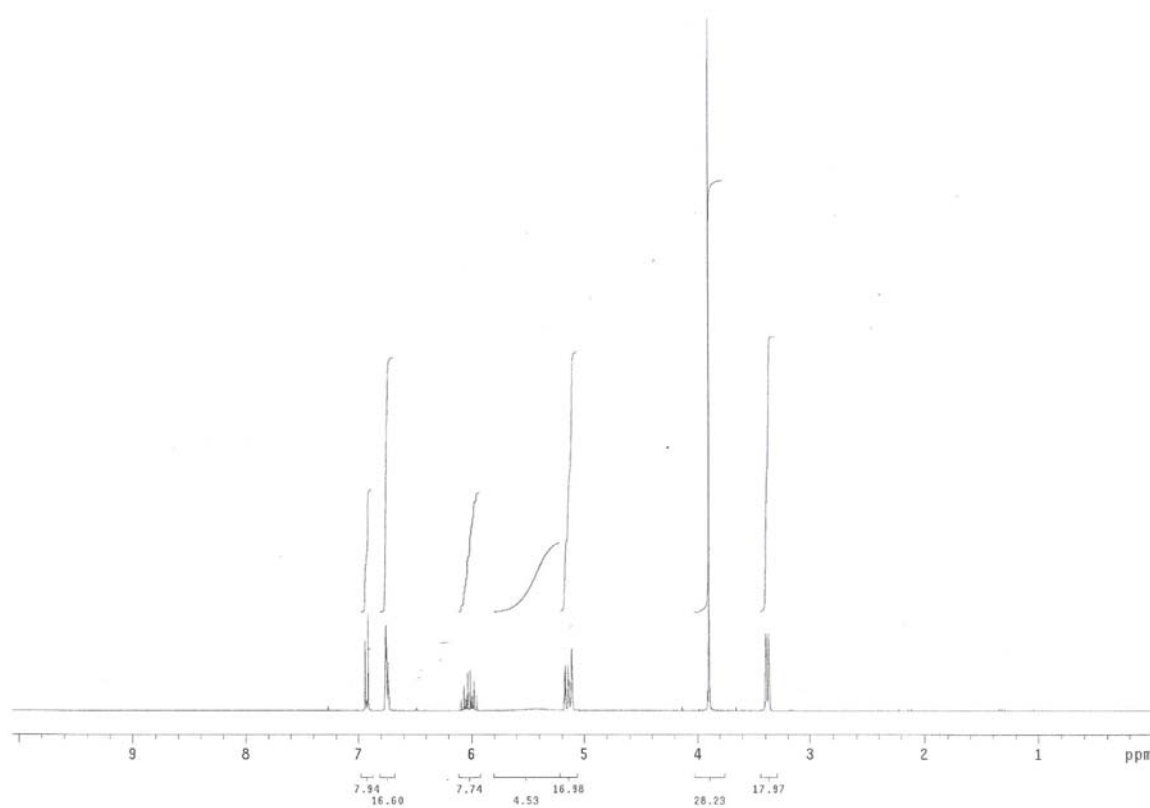


Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C do constituinte principal do óleo essencial de *T. micranthus* (100MHz, $CDCl_3$).

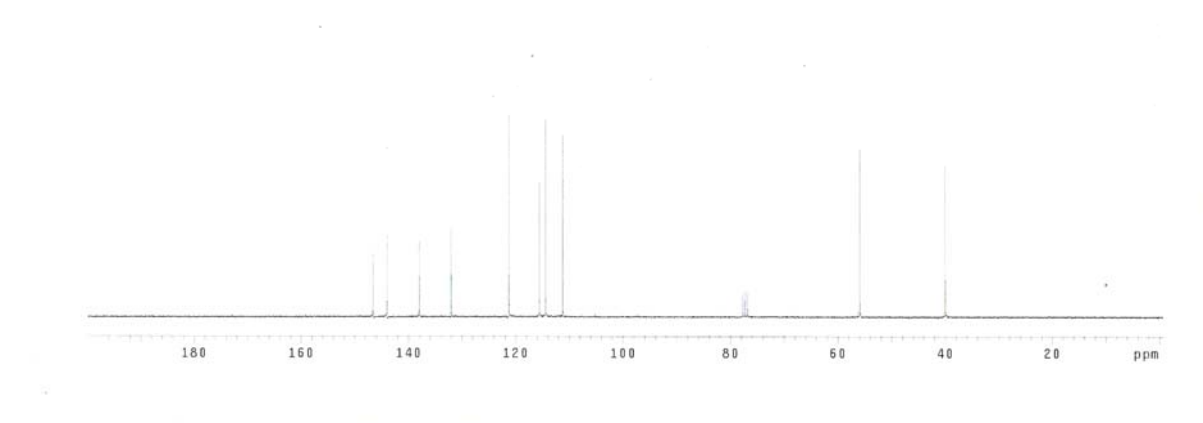


Figura 23 - Espectro de DEPT-135 do constituinte majoritário do óleo essencial de *T. micranthus*.

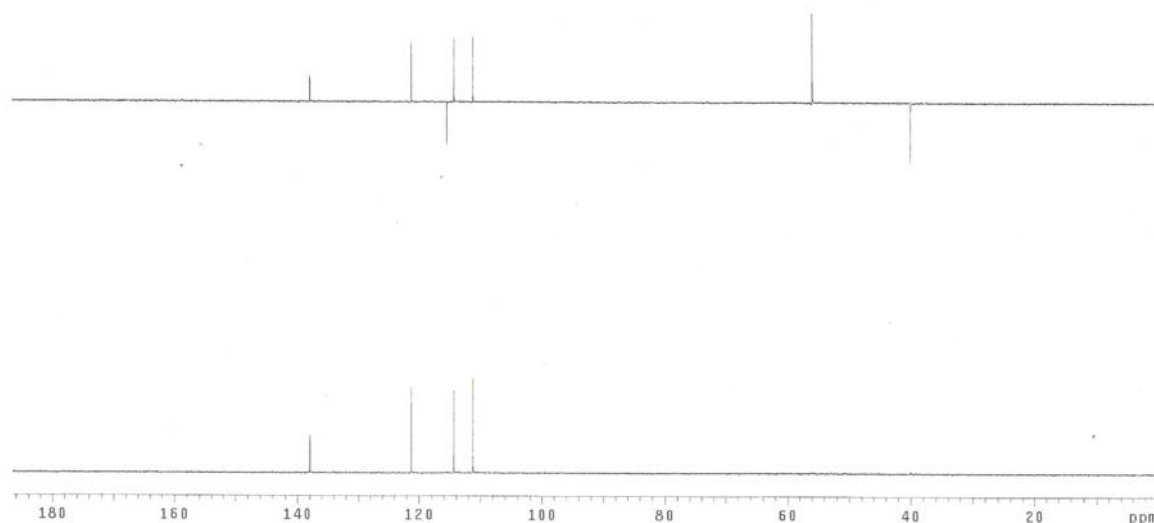


Tabela 11 - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) do constituinte majoritário do óleo essencial de *T. micranthus* comparados com dados do eugenol registrados na literatura (Son, *et al.*, 1998).

C	Eugenol do óleo de <i>T. micranthus</i>	Eugenol Son <i>et al.</i> , 1998
C-1	146,5	146,8
C-2	143,97	144,3
C-3	114,44	114,7
C-4	131,99	132,3
C-5	111,25	111,5
C-6	121,25	121,6
C- α	39,97	40,3
C- β	137,96	138,2
C- γ	115,59	115,9
OCH ₃	55,9	56,3

Os resultados obtidos neste primeiro estudo sobre o óleo essencial de *T. micranthus* foi análogo ao obtido por Leclercq e colaboradores (2000) com o óleo essencial das cascas de *T. panurensis*, que também apresentou o eugenol como único constituinte (99,9%).

2.1.5.3 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. micranthus*

No teste de bioautografia em placas de camada delgada de sílica gel foi verificada a atividade do óleo essencial de *T. micranthus* contra o fungo *C. herbarum*. A substância responsável por esta atividade foi identificada como eugenol através da comparação com amostra autêntica de eugenol em placa cromatográfica de sílica gel.

O óleo essencial de *T. micranthus* inibiu mais de 80% do crescimento micelial de *Botryosphaeria ribis* e 40 a 80% do crescimento micelial dos demais fungos filamentosos testados pelo método de difusão em agar. Na concentração maior, o óleo apresentou bom grau de inibição do crescimento micelial de todos os fungos testados, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fungos filamentosos pelo óleo essencial de *T. micranthus*.

Fungos filamentosos	Concentração (mg/placa)					
	4,0	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	++	+	±	-	-	-
<i>Botryosphaeria ribis</i>	+++	+	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	++	+	+	+	-	-
LASIODIPLODIA THEOBROMEAE	++	±	±	-	-	-

* A inibição foi registrada como (-) <10% de inibição do crescimento, (±) entre 10 e 20%, (+) entre 20 e 40%, (++) entre 40 e 80% e (+++) >80%.

No teste de microdiluição, observou-se uma concentração inibitória mínima de 17µL. mL⁻¹ para todos os microrganismos testados, com exceção de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta última a mais resistente, tendo seu crescimento inibido somente pela maior concentração do óleo testada (Tabela 13).

Tabela 13 - Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *T. micranthus*.

Microrganismo	Conc. Inibitória mínima ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)
<i>Bacillus subtilis</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Candida albicans</i>	17
<i>Cândida krusei</i>	17
<i>Cândida tropicalis</i>	17

O óleo essencial apresentou ação bacteriostática contra *P. aeruginosa* e *E. coli* e ação bactericida contra *B. subtilis*. Observou-se também que o óleo essencial de *T. micranthus* mostrou boa atividade contra todas as leveduras testadas.

2.1.5.4 Atividade antioxidante do óleo essencial de *T. micranthus*

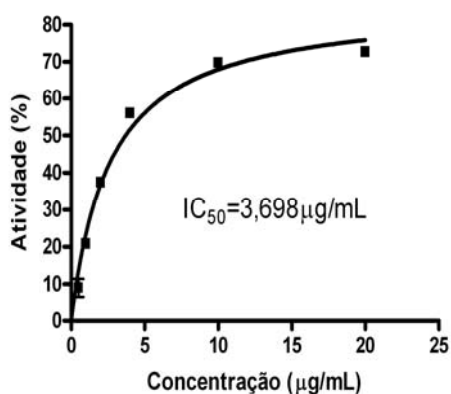
Vários estudos têm demonstrado a relação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, os quais se distribuem amplamente na natureza e possuem a capacidade de sequestro de radicais livres (Hirano et al, 2001Apud SCHERER; GODOY, 2009). Como o óleo de *T. micranthus* é praticamente constituído somente por eugenol, era de se esperar que apresentasse pronunciada atividade antioxidante. A partir desta hipótese, a atividade antioxidante do óleo essencial de *T. micranthus* e do padrão de eugenol foram avaliados segundo o método de sequestro de radicais livres DPPH. Confirmando relatos da literatura (SCHERER; GODOY, 2009), o eugenol apresentou forte atividade antioxidante, fornecendo IC₅₀ de 3,7 $\mu\text{g/mL}$ (Figura25a), enquanto o óleo essencial de *T. micranthus* apresentou IC₅₀ de 5,2 $\mu\text{g/mL}$ (Figura25b), evidenciando também pronunciada atividade sequestradora de radicais livres DPPH. Estes resultados foram concordantes com os obtidos por Scherer e Godoy (2009), que avaliaram a capacidade sequestradora de radicais livres DPPH de vários compostos fenólicos,

incluindo o eugenol e o óleo de cravo. Os autores verificaram que, na concentração final de DPPH de 30,75 $\mu\text{g/mL}$, o eugenol apresentou IC_{50} de 3,02 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o óleo de cravo apresentou IC_{50} de 3,28 $\mu\text{g/mL}$.

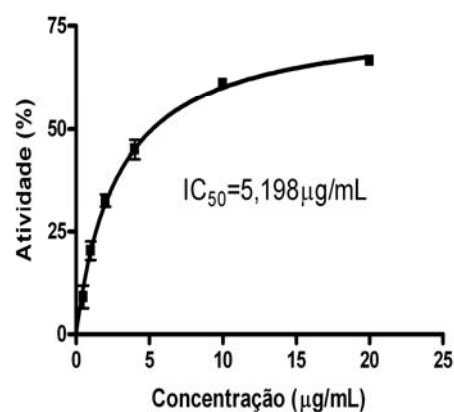
Nos últimos anos, tem-se verificado um grande interesse pela descoberta de moléculas com capacidade antioxidante, oriundas de fontes naturais para uso nas indústrias de alimentos, de bebidas e de cosméticos. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram o potencial do óleo de *T. micranthus* para uso como uma alternativa de antioxidante natural.

Figura 24 - Atividade doadora de átomos de hidrogênio do (a) padrão de eugenol e do (b) óleo essencial de *T. micranthus*. Os resultados foram representados pela média \pm erro padrão médio.

a)



b)



CONCLUSÃO

A purificação do extrato em acetato de etila de *C. leptophylla* resultou no isolamento de cinco constituintes, dos quais três foram identificados como uma mistura de compostos alifáticos de cadeia longa, 1,8-diidroxi-3-metilantraquinona e sitosterol.

C. leptophylla possui potencial para uso como agente antioxidante, uma vez que seu extrato em acetato de etila e as duas frações deste extrato apresentaram atividade antioxidante significativa, demonstrada pelos valores de IC₅₀ próximos a 5µg/mL.

O teste de toxicidade contra *Artemia salina* apresentou resultado negativo, sugerindo uma baixa toxicidade do extrato, o que o tornaria apto a ser usado em cosmetologia devido à sua ação antioxidante.

O óleo essencial de *T. micranthus* é constituído quase que exclusivamente por eugenol (99,9%).

O óleo essencial de *T. micranthus* apresenta relevante atividade antimicrobiana, atuando sobre o crescimento de *C. hebarum*, de fungos filamentosos, de bactérias e de leveduras. Foi constatado que o constituinte do óleo de *T. micranthus* responsável pela atividade contra o fungo *C. hebarum* é o eugenol.

O óleo essencial de *T. micranthus* apresentou pronunciada atividade sequestradora de radicais livres DPPH.

As propriedades químicas e biológicas do óleo de *T. micranthus*, constatadas no presente trabalho, evidenciam o óleo como uma alternativa natural de produto antioxidante e antimicrobiano para uso em indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- BIONDO, E. et al. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécie de subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes da região sul do Brasil, **Revista Brasil**, v. 28, n. 64, p. 797-808, out./dez., 2005.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p. 1199-1200, 1958
- BOLZANI, V. S.; et al. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, Araraquara, v. 51, n. 21. P. 5929 – 5934, 1995.
- CASAGRANDE, R. et al. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, p. 183-190, 2007.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES; R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, jan./feb. 1998.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne: NCCLS, 2003.
- DEWICK. P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., 2002.
- FARIA, T. J. **Estudo químico de *Vismia martiana***. 1988. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GARCÍA-SOSA, K. *et al.* Crysophanol, an antimicrobial anthraquinone from the root extract of *Colubrina greggii*. **Journal of Mexican Chemical Society**, Pueblas, v. 50, n. 2, p.76-78, 2006.
- GEORGETTI, S. R. *et al.* Assesment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different *in vitro* methods. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, p. 252-257, 2007.
- HOMANS, A. L.; FUNCHS, A. Direct bioautography on thin – layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Cromatography**, Amsterdam, v. 51, p. 327- 329, 1970.
- KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, New York, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993
- KUMATZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 329-339, 2004.

- LECLERCQ, P. A.; *et al.* Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon: Part 2. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Renealmia* sp., *Hyptis recurvata* Point. and *Tynanthus panurensis* (Bur.). **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 12, p. 14-18, 2000.
- LOPES, M. M. M. *et al.* Crescimento de mudas de cipó-cravo (*Tynanthus fasciculatus* Meiers). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, p. 211-216, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Plantarum: Nova Odessa, 1998. v. 1.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, may, 2002.
- MATOS, F. H. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.
- MEYER, B. *et al.* Brine shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MOLYNEUX, P. The use the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal Science Technology**, Thailand, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004
- MUÑOZ, V. *et al.* The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 69, p. 139-155, 2000.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P. H. **Infrared absorption spectroscopy**. 2.ed. São Francisco: Holden Day, 1977.
- PLAZA, A. *et al.* Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus panurensis*: characterization and LC-MS quantitative analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 2853-2858, 2005.
- PROESTOS, C. *et al.* RP-HPLC analyses of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1190-1195, 2005.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, p. 89-96, 2001.
- RODRIGUES, R. S. *et al.* O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil, **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 19, p. 1-16, 2005.
- SANTOS, R. N. **Estudo químico e farmacológico de *Senna reticulata* Willd.** 2007. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, London, v. 112, p. 654-658, 2009

- SILVA, F. A. M., BORGES, M. F. M; FERREIRA, M. A. Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p. 94-103, 1999
- SIQUEIRA, J. M.; BEMM, M. D.; PEREIRA, F. G. Estudo Fitoquímico de unonopsis lindmanii- Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de Toxicidade sobre a Artemia salina leach . **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p.557-559, 1998.
- SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **C R Biology**, v. 327: p. 649-662, 2004.
- SURESH, B. K. *et al.* Antimicrobail constituents from the rhizomes of Rheum emodi. **Phytochemistry**, v. 62, p. 303-207, 2003.
- THOMSON, R. H. **Naturally Occuring Quinone**. 2. ed. Great Britain: William Glowes & Sons, 1971.
- VIEGAS JR., C. *et al.* Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do Gênero *Cassia*, **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1279 – 1286, 2006b.
- VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006a.
- VILEGAS, J. H. Y. *et al.* Constituents of Brazilian medicinal plants: constituents of *Tynanthus fasciculatus*. **Fitoterapia**, Milano, v. 64, p. 476, 1993.
- VILEGAS, W.; *et al.* The chemistry of “cipó-cravo” *Tynanthus fasciculatus*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, p. 47-49, 1995.
- ZHANG, Y. *et al.* Chemical components and antioxidant activity of the volatile oil from *Cassia tora* L. seed prepared bsupercritical fluid extraction. **Journal of Food Lipids**, Maledn, v. 14, p. 411–423, 2007.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 5165-5170, 2001.