



ISSN 1808-9569 - ASSOCIADA À ABEC

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz: Paulo Ernani Gadelha Vieira

Diretor de Far-Manguinhos: Hayne Felipe da Silva

Coordenador do NGBS: Glauco de Kruse Villas-Bôas

Coordenação e Gestão do Projeto Fitos: Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu e Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira

Revisão Prévia: Tatiana Chaves Vasconcelos Pontes

Escritório e correspondência: www2.far.fiocruz.br/redesfito

e-mail: revistafitos@far.fiocruz.br

Impressão e Distribuição: Milmar Gráfica – Rio de Janeiro

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Complexo Tecnológico de Medicamentos – CTM – Farmanguinhos - Fiocruz

Av. Comandante Guarany N° 447

CEP: 22775-903

Jacarepaguá - Rio de Janeiro - RJ - Brasil

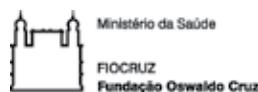
Tel.: (21) 3348-5050 (Far-Manguinhos)

Tels.: (21) 3348 5370 / 3348 5598 (NGBS)

Objetivos:

A Revista FITOS é um periódico multidisciplinar dedicado à publicação de trabalhos científicos originais, e artigos de divulgação, revisão e atualização sobre a biodiversidade vegetal brasileira, tais como química, farmacologia, legislação, gestão, inovação, monografia, etnofarmacologia, cultivo, farmacognosia, revisão, educação, política científica, políticas públicas, biotecnologia, botânica, etc. Por 'monografia' será entendida os trabalhos escritos segundo o padrão estabelecido pela OMS para a descrição das plantas medicinais. Trabalhos resultantes da conclusão de cursos de graduação, especialização, dissertações de mestrado e teses de doutorado, serão divididos de acordo com as categorias acima.

Análises, críticas, resenhas e revisões de livros recentes de qualquer das áreas mencionadas serão bem-vindas.



Editor: Lucio Ferreira Aves

Editor-Associado: Davyson de Lima Moreira

CORPO EDITORIAL

Adrian Martin Pohlit - Departamento de Produtos Naturais - INPA
Alaíde Braga de Oliveira – Faculdade de Farmácia - UFMG
Alphonse Kelecom - Instituto de Biologia - UFF
Ângelo da Cunha Pinto - Instituto de Química - UFRJ
Armando Cáceres - Departamento de Citohistologia – Universidad de San Carlos de Guatemala
Benjamin Gilbert - Far-Manguinhos - Fundação Oswaldo Cruz
Clélia Akiko Hiruma-Lima - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu
Edeltrudes de Oliveira Lima - Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPB
Elfriede Marianne Bacchi - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
Elsie Franklin Guimarães - Unidade de Botânica Sistemática - JBRJ
Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFPB
Glauce Socorro de Barros Viana - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFCE
Glyn Mara Figueira - CPQBA - UNICAMP
João Batista Calixto - Departamento de Farmacologia - UFSC
João Carlos Palazzo de Mello - Departamento de Farmácia e Farmacologia - UEM
João Ernesto de Carvalho - CPQBA - UNICAMP
José Maria Barbosa-Filho - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFPB
Humberto Bizzo - EMBRAPA - Rio de Janeiro
Lauro Xavier Filho - Instituto de Biologia - Universidade Tiradentes
Lígia Maria Marino Valente - Instituto de Química - UFRJ
Lin Chau Ming - Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP - Botucatu
Luis Carlos Marques - Faculdade de Farmácia - UNIBAN
Luis Vitor Sacramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara
Luiz Claudio Di Stasi - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu
Mahabir Gupta - Facultad de Farmácia - Universidad de Panamá
Maria Aparecida Medeiros Maciel - Departamento de Química - UFRN
Maria Auxiliadora Coelho Kaplan - NPPN - UFRJ
Maria Cristina Marcucci Ribeiro – Faculdade de Farmácia - UNIBAN
Mary Ann Foglio - CPQBA - UNICAMP
Nídia Franca Roque – Faculdade de Farmácia - UFBA
Paulo César Vieira - Departamento de Química - UFSCar
Pedro Melillo de Magalhães – CPQBA - UNICAMP
Pedro Ros Petrovick - Faculdade de Farmácia - UFRS
Rivaldo Niero - Curso de Farmácia - UNIVALI
Rosendo Augusto Yunes - Departamento de Química UFSC
Suzana Guimarães Leitão - Faculdade de Farmácia - UFRJ
Valdir Cechinel Filho - Universidade do Vale do Itajaí
Valdir Florêncio Veiga Junior - Departamento de Química - UFAM
Vanderlan da Silva Bolzani - Instituto de Química – UNESP - Araraquara
Wagner Vilegas - Instituto de Química - UNESP - Araraquara

ERRATA

No índice do número 3, volume 7, (página 185), onde se lê
Medicamentos no Brasil: Entre Naturais e Sintéticos (1920-2000)
Medicines in Brazil: Among Natural and Synthetic (1920-2000)
Benjamin Gilbert e Rita Favoreto

leia:

Erythrina sp. Fabaceae (Leguminosae, Faboidea)
Benjamin Gilbert e Rita Favoreto

O artigo Medicamentos no Brasil: Entre Naturais e Sintéticos (1920-2000) de autoria da professora Tânia Fernandes foi publicado na Revista Fitos, volume 7, número 2, 119-124 (2012).

Lucio Ferreira Alves
Editor da Revista Fitos

- 207 FARMACOLOGIA / PHARMACOLOGY**
Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae
Biological Activity of Naphthoquinones from Bignoniaceae Species
Ana Maria Pereira da Silva; Selma Ribeiro de Paiva; Maria Raquel Figueiredo e Maria Auxiliadora Coelho Kaplan
- 216 FARMACOLOGIA / PHARMACOLOGY**
Avaliação Farmacognóstica da Droga Vegetal Flores de Jasmim
Pharmacognostic Study of Jasmine Flowers Vegetable Drug
Ana R. Alpiovezza; Marcelo S. Pinto; Ivair D. Gonçalves; Aguinaldo P. Barbosa; Francisco R. C. de Araújo; Sérgio de Mendonça; Maria C. Marcucci; Luis C. Marques
- 225 FARMACOLOGIA / PHARMACOLOGY**
Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)
Pharmacognostic Study of the Flowers of *Tagetes patula* L. (Asteraceae)
Vanessa M. Munhoz; Renata Longhini; Tayara A. P. Silva; Audrey A. S. G. Lonni; José Roberto P. Souza; Gisely C. Lopes; João Carlos P. Mello
- 231 BOTÂNICA / BOTANY**
Anatomia Foliar de *Ocimum basilicum* L. 'Genovese' (Lamiaceae)
Leaf Anatomy of *Ocimum basilicum* L. 'Genovese' (Lamiaceae)
Marcos Roberto Furlan; Elisa M. Aoyama; Alexandre Indriunas; Cláudia Mauro
- 236 MONOGRAFIA / MONOGRAPHY**
***Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae)**
Maria Dutra Behrens; Carla J. Moragas Tellis; Maria do Socorro Chagas
- 245 FARMACOLOGIA / PHARMACOLOGY**
Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus*(Kunth.) Micheli (Alismataceae)
Antinociceptive activity of essential oil from *Echinodorus macrophyllus*(Kunth.) Micheli (Alismataceae)
Daniele C. Fernandes; Leosvaldo S. M. Velozo; Rafael A. Alves; Helena A. A. Siqueira; Gislaine P. Silva; Shirley V. M. Santos; Carlos R. M. Gayer; Marsen G. P. Coelho
- 252 FITOQUÍMICA / PHYTOCHEMISTRY**
Evaluation of *in vitro* antileishmanial and antimycobacterial activities of *Stiffitia chrysantha* J.C. Mikan extracts
Rachel R. P. Machado; André M. Marques; Wilson Valente Júnior; Elaine S. Coimbra; Rafael S. Duarte; Geraldo Luiz G. Soares; Maria Auxiliadora C. Kaplan
- 259 FARMACOLOGIA / PHARMACOLOGY**
Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase
Essential oils as acetylcholinesterase inhibitors
Stefânia P. de Souza; Simone S. Valverde; Raphael L.N.R. da Silva; Keila S.C. Lima; Antônio L.S. Lima

Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae

Biological Activity of Naphthoquinones from Bignoniaceae Species

^{1,2*}Ana Maria Pereira da Silva; ³Selma Ribeiro de Paiva; ⁴Maria Raquel Figueiredo e ¹Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

¹ Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Bloco H, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-902

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Nilópolis, R. Lúcio Tavares 1045, Centro, Nilópolis, Rio de Janeiro, RJ, CEP 26530-060

³ Setor de Botânica, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, UFF, Campus do Valonguinho, Outeiro de São João Batista s/no, Centro Niterói, Rio de Janeiro, RJ, CEP 24210-130

⁴ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Far-Manguinhos, FIOCRUZ, R. Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21041-250

*Correspondência: *e-mail: ana.pereiradasilva@gmail.com

Palavras chave:

Naftoquinonas; Bignoniaceae; Angiospermae; atividade biológica.

Keywords:

Naphthoquinones; Bignoniaceae; Angiospermae; biological activities.

Resumo

Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos, plantas e animais, caracterizadas por apresentarem múltiplas atividades biológicas. Em Angiospermae as naftoquinonas são encontradas em diversas famílias com destaque para Bignoniaceae, Ebenaceae, Plumbaginaceae, Verbenaceae, dentre outras. O perfil químico da família Bignoniaceae distingue-se pela ocorrência predominante de terpenóides e quinonas, além de alcalóides, flavonóides e derivados não nitrogenados de cadeia longa, entre outros. Esse trabalho visa apresentar as atividades biológicas descritas na literatura para as naftoquinonas isoladas de espécies da família Bignoniaceae, em particular dos gêneros *Handroanthus*, *Paratecoma*, *Tabebuia* e *Tecoma*.

Abstract

Naphthoquinones are secondary metabolites produced by algae, fungi, plants and animals and these substances show many biological activities. In the Angiospermae the naphthoquinones are found in several families with emphasis on Bignoniaceae, Ebenaceae, Plumbaginaceae, Verbenaceae, among others. The chemical profile of Bignoniaceae is characterized by the predominant occurrence of terpenoids and quinones, besides alkaloids, flavonoids, long chain non-nitrogenous derivatives and others. This paper presents the biological activities, described in the literature, for the naphthoquinones isolated from Bignoniaceae species, chiefly from the Bignoniaceae genera *Handroanthus*, *Paratecoma*, *Tabebuia* and *Tecoma*.

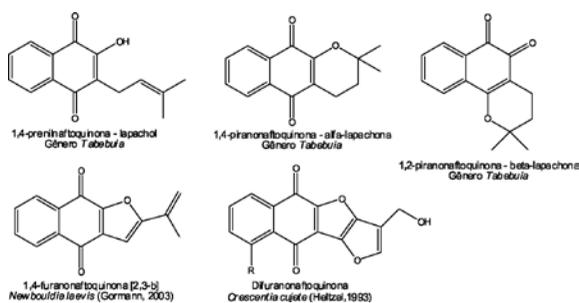


Introdução

Plantas contendo naftoquinonas são utilizadas pelas populações de diferentes localidades para tratamento de diversos males, incluindo doenças parasitárias e vários tipos de câncer. Países onde há ocorrência de espécies vegetais produtoras de naftoquinonas, como o Brasil, China e Japão, vêm contribuindo intensamente com os estudos químicos e farmacológicos dessas espécies (Oliveira et al., 1990; Wu et al., 1998; Ferreira, Silva e Souza, 2003; Fonseca, Braga e Santana, 2003; Karalai et al., 2010).

Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos, plantas e animais (Thomson, 1991). Em Angiospermae essas substâncias são encontradas em diversas famílias com destaque para Bignoniaceae, Ebenaceae, Plumbaginaceae, Verbenaceae, dentre outras. As naftoquinonas dividem-se em 1,2- e 1,4-naftoquinonas e, em função da presença de anel heterocíclico oxigenado, ainda podem ser classificadas em preninaftoquinonas, furanonaftoquinonas, difuronaftoquinonas e piranonaftoquinonas (Figura 1), demonstrando uma grande variação estrutural para o grupo.

Figura 1 – Padrões estruturais de algumas naftoquinonas de Bignoniaceae.



A família Bignoniaceae pertence à ordem Lamiales e apresenta-se constituída por 110 gêneros e cerca de 800 espécies de ocorrência predominantemente tropical (Souza e Lorenzi, 2012). O Brasil possui várias espécies endêmicas, que são encontradas em diversos tipos de ambientes (Gentry, 1980). Muitas espécies de Bignoniaceae apresentam potencial econômico fornecendo, por exemplo, madeiras variadas inclusive algumas com qualidade excepcional em relação à flexibilidade como é o caso da madeira obtida de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. e Hook. f. ex S. Moore. Muitas espécies também exibem grande potencial paisagístico sendo empregadas na arborização urbana (Lorenzi e Matos, 2002). Algumas

plantas são conhecidas como ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos; *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (sin. *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb). São espécies arbóreas, muito utilizadas como ornamentais, com flores de coloração rosa a lilás, como a exibida na Figura 2, além do seu amplo uso na medicina popular, para o tratamento de inflamações, de doenças parasitárias (Machado et al., 2003) e de câncer (Ferreira, 1996).

Do ponto de vista químico, a família apresenta-se caracterizada pela presença de terpenóides, quinonas, alcaloides, flavonoides e derivados não nitrogenados de cadeia longa da via do acetato. As duas primeiras classes mencionadas merecem destaque, apresentando grande ocorrência na família, o que as caracteriza como marcadores químicos no taxon (Cipriani, 2006).

As naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae expressam várias atividades biológicas, sendo uma das classes químicas mais investigadas do ponto de vista farmacológico nas últimas décadas (Oliveira et al., 1990; Castro e Pinto, 2009; Ferreira et al., 2010).

Esse trabalho visa apresentar as atividades biológicas descritas para as naftoquinonas isoladas de espécies da família Bignoniaceae, em particular dos gêneros *Handroanthus*, *Paratecoma*, *Tabebuia* e *Tecoma*.

Figura 2 – *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. (Fonte: Flávio Cruvinel Brandão. Disponível em <http://www.flickr.com/photos/flaviocb/7451554>. Acesso em 02/12/2012.



Material e métodos

O presente trabalho foi realizado a partir de extensa revisão bibliográfica, até 2010, nas bases de dados Science Direct, Scopus, Web of Science, bem como em obras de referência básica. Foram compilados trabalhos etnobotânicos, químicos e de atividade far-





macológica com citações sobre naftoquinonas em espécies de Bignoniaceae. Posteriormente foi feita a consulta dos artigos, dissertações e testes, visando à aquisição dos dados. Para revisão dos nomes científicos e sinônimos foram consultadas as páginas The plant list (<http://www.theplantlist.org/>) e Angiosperm Phylogeny Website (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

Resultados e Discussão

Os representantes da família Bignoniaceae caracterizam-se pela produção de 1,2- e 1,4-naftoquinonas, já tendo sido descrita a ocorrência dessas substâncias nos gêneros: *Bignonia* L. (Cipriani, 2006), *Catalpa* Scopoli (Fujiwara et al., 1998), *Crescentia* L. (Heltzel et al., 1993), *Cybistax* Mart. ex Meisn. (Rodrigues et al., 2005), *Amphilophium* Kunth (Bedir et al., 2009), *Distictella* Kuntze (Bedir et al., 2009), *Dolichandrone* (Fenzl) Seem. (Houghton, Mat Ali e Azizol., 1997), *Fernandoa* Welw. ex Seem. (Houghton, Mat Ali e Azi-

zol., 1997), *Heterophragma* DC. (Hussain et al., 2007), *Kigelia* DC. (Binutu et al., 1996), *Handroanthus* Mattos (= *Tabebuia* Gomes ex DC) (Cipriani, 2006), *Lundia* DC. (Oliveira et al., 1990), *Markhamia* Seem. ex Baillon (Oliveira et al., 1990), *Melloa* Bureau (Lima et al., 2005), *Millingtonia* L.f. (Hussain et al., 2007), *Newbouldia* Seem. ex Bureau (Gormann et al., 2003), *Oroxylum* Vent. (Houghton, Mat Ali e Azizol., 1997), *Paratecoma* Kuhlm (Thomson, 1971), *Phyllathron* DC. (Hussain et al., 2007), *Radermachera* Zoll. e Moritz (Fonseca, Braga e Santana, 2003), *Stereospermum* Cham. (Thomson, 1971), *Tecoma* Juss, *Tecomella* Seem. (Singh et al., 2008) e *Zeyheria* Mart. (Weinberg, Gottlieb e Oliveira, 1976).

Os resultados apresentados na Tabela 1 relacionam as naftoquinonas isoladas de espécies de Bignoniaceae com as atividades biológicas atribuídas pelo uso popular ou demonstradas em diferentes ensaios farmacológicos. A Figura 3 apresenta algumas estruturas químicas dessas naftoquinonas.

Tabela 1 – Naftoquinonas encontradas em algumas espécies de Bignoniaceae e suas atividades biológicas.

Espécie	Substâncias isoladas	Atividade biológica
<i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm. (sin. <i>Tecoma peroba</i> Record e <i>Paratecoma diandra</i> Kuhlm.)	Cerne: lapachol, lomatol, diidro-iso- α -lapachona, α -etilfuran-1,4-naftoquinona, β -metilpirano-1,4-naftoquinona (Thomson, 1971).	Lapachol: antitumoral (Oliveira et al., 1990)
<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos (sin. <i>Tabebuia avellaneda</i> Lorentz ex Griseb.)	Cerne: 2-metil-3-(γ , γ -dimetil)-1,4-naftoquinona, lapachol e seu éter metílico, desoxilapachol, α - e β -lapachonas, diidro- α -lapachona, cloroidrolapachol e β -xiloidona (de Lima et al., 1962; Thomson, 1971). Lapachenol, 2-acetil-furanonaftoquinona, 2-hidroxi- β -furanonaftoquinona, 8-hidroxi-2-acetil-furanonaftoquinona, 8-hidroxi-2-hidroxi- β -furanonaftoquinona, 2-etil-furanonaftoquinona, 2-isopropil-furanonaftoquinona, 2,3-diidro-2-(2-metiletetil)-furanonaftoquinona (Burnet e Thomson, 1967; Steinert, Khalaf e Rimpler, 1996). Casca interna do tronco: diidro- α -lapachona, lapachol, 2-acetil-8-hidroxi-uranonaftoquinona, 2-acetil-5-hidroxi-furanonaftoquinona, (-)-5-hidroxi- e (\pm)8-hidroxi-2-(1'-hidroxi- β -furanonaftoquinona (Wagner et al., 1989). Madeira: 5-hidroxi- e 8-hidroxi-2-(2'-hidroxi-isopropil)-furanonaftoquinona, 5-hidroxi- e 8-hidroxi-furanonaftoquinona e 2,3-diidro-5-hidroxi-2-(1'-metiletetil)-furanonaftoquinona além dos derivados diidrofuranos correspondentes (Oliveira et al., 1990).	β -lapachona: antibacteriana contra bactérias Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> e Gram-negativa <i>Brucella</i> sp. (de Lima et al., 1962). Cloroidrolapachol: antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa <i>Brucella</i> (de Lima et al., 1962). α -lapachona e diidro α -lapachona: antibacteriana contra <i>S. aureus</i> (Machado et al., 2003). Lapachol, α - e β -lapachonas: tripanocida (Pinto e Castro, 2009).





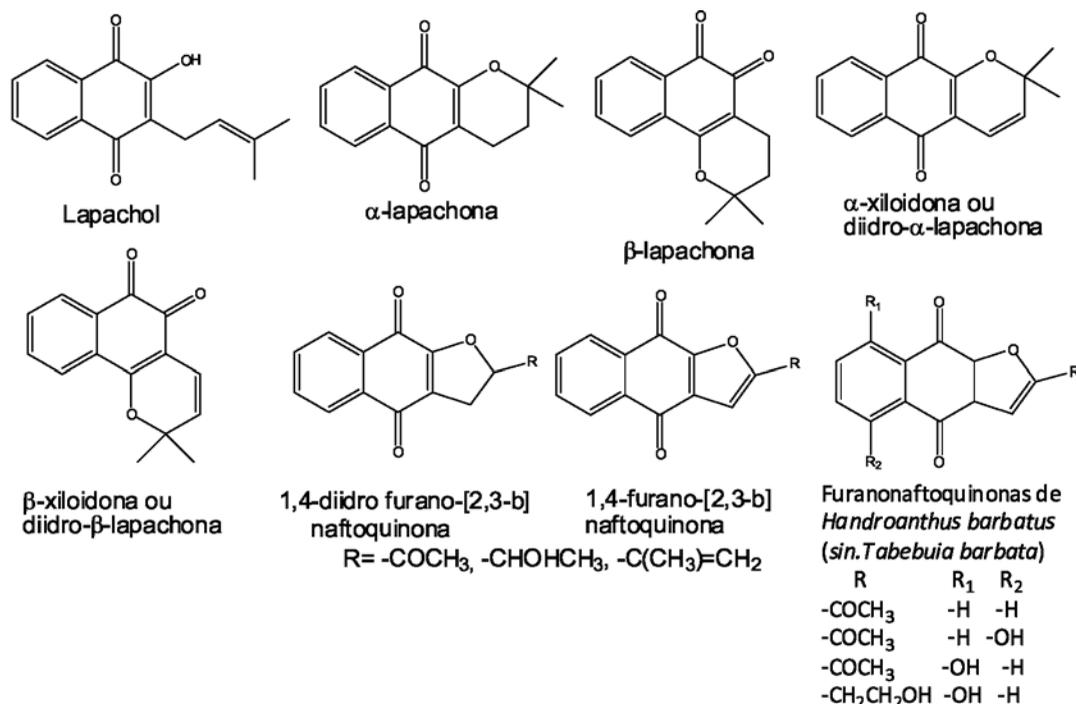
Espécie	Substâncias isoladas	Atividade biológica
<i>Handroanthus barbatus</i> (E. Mey.) Mattos [sin. <i>Tabebuia barbata</i> (E.Mey) Sandwith.]	Lapachol; 2-acetil furanonaftoquinona; 2-acetyl-5-hidroxi e 2-acetil-8-hidroxi-furanonaftoquinona; (+)-8-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil) furanonaftoquinona. Essas substâncias já foram isoladas de outras espécies de <i>Tabebuia</i> , mas ainda não tinham sido identificadas na <i>T. barbata</i> (Saizarbitoria et al., 1997).	Com exceção do lapachol, as quatro furanonaftoquinonas apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais A-549 (adenocarcinoma de pulmão humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e HT-29 (carcinoma de cólon humano) (Saizarbitoria et al., 1997).
<i>Handroanthus lapacho</i> (K. Sehum.) S.O. Grose [sin. <i>Tabebuia flavescens</i> (Velloso) Griseb.]	Lapachol	Lapachol: antimalárico, esquistossomicida, antiviral, antiinflamatório e antitumoral (Fonseca, Braga e Santana 2003; Hussain et al., 2007).
<i>Handroanthus heptaphylla</i> (Vell.) Mattos [sin. <i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.) Toledo e <i>Tecoma ipe</i> Mart.]	Lapachol, lapachenol e derivados, α -lapachona, desidro- α -lapachona, desidroiso- α -lapachona, stenocarpoquinona A, stenocarpona B, rinacantina A e avicequinona A (Hirschmann e Papastergiou, 2003)	Lapachol e derivados: moluscicida, tripanocida, antifúngica e antibacteriana (Hirschmann e Papastergiou, 2003). Lapachol: neoplásica contra tumores cancerígenos sólidos; antibacteriana (gênero <i>Brucella</i>); ativa contra protozoários do gênero <i>Plasmodium</i> (Ferreira, 1996).
<i>Handroanthus impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Mattos [sin. <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.]	Casca: 2-acetil furanonaftoquinona; desidro- α -lapachona; lapachol; 2-(1-hidroxi-etil)-furanonaftoquinona; 5 (ou 8)-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-furanonaftoquinona (Girard et al., 1988). Beta-lapachona (Muller, Sellmer e Wiegrebe, 1999). 5-hidroxi- e 8-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-furanonaftoquinona e 2-(1-hidroxi-etil)-furanonaftoquinona (Koyama et al., 2000).	Lapachol: anticâncer (Thomson, 1971). β -lapachona, 2-acetil-furanonaftoquinona e 8-hidroxi-2-acetil-furanonaftoquinona: atividade antipsoríase (Muller, Sellmer e Wiegrebe, 1999).
<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O. Grose [sin. <i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) G. Nicholson e <i>Tecoma araliacea</i> (Cham.) DC.]	Tronco: lapachol, α -etilfurano-1,4-naftoquinona, desidro- α -lapachona, α -lapachona, tecomaquinona I, desidroiso- α -lapachona, (Tessier et al., 1988; Oliveira et al., 1990).	Lapachol: antifúngica (Hussain et al., 2007) Lapachol (7,64% em <i>Tecoma araliacea</i> DC.): antitumoral (Thomson, 1971)
<i>Handroanthus heptaphylla</i> (Vell.) Mattos (sin. <i>Tecoma ipe</i> Mart.)	5- ou 8-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-furanonaftoquinona	Furanonaftoquinonas: ação antimicrobiana em bactérias Gram positivas, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> e antifúngica, incluindo espécies patogênicas (Nagata et al., 1998).

(*) furanonaftoquinona = nafto-[2,3-b]-furan-4,9-diona





Figura 3 – Pirano-naftoquinonas e furano-naftoquinonas derivadas de lapachol.



Reatividade de naftoquinonas

Quinonas são metabólitos que desempenham funções importantes em vários organismos vivos, atuando como co-fatores de proteínas, no transporte de elétrons, e também na defesa contra patógenos (alelopatias e atividade antimicrobiana) (Thomson, 1971; Cape, Bowman e Kramer, 2006). Parte dessa atividade pode ser atribuída ao caráter fortemente eletrofílico das naftoquinonas que promove suas reações com os grupos tióis das proteínas (McKallip et al., 2010) e à sua capacidade de induzir um ciclo redox, que gera espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion radical superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxila (.OH).

A citotoxicidade de quinonas, assim como a investigação bem detalhada dos mecanismos de ação via ciclo redox e via inibição das topoisomerasas I e II, têm sido alvo de profusos estudos (O'Brien, 1991; Ferreira, Silva e Souza, 2003; Ferreira et al., 2010; Hillard et al., 2008 e Castro e Pinto, 2009).

Grande contribuição para a pesquisa da farmacologia de naftoquinonas, tem resultado dos estudos QSAR (relação estrutura química – atividade biológica), que comprovaram a importância do caráter hidrofóbico na atividade citotóxica dessa classe de substâncias.

Esse tipo de investigação pode direcionar a síntese de novas naftoquinonas com essa característica e potencial atividade anticâncer. (Verma, 2006)

Atividade anti-tumoral de naftoquinonas dos gêneros *Handroanthus*, *Paratecoma*, *Tabebuia* e *Tecoma*

A literatura registra a ocorrência de lapachol, α - e β -lapachonas, além de furano-naftoquinonas isoladas de várias espécies dos gêneros *Tabebuia*, *Tecoma*, *Handroanthus* (Thomson, 1971; Oliveira et al., 1990; Fonseca, Braga e Santana, 2003; Hussain et al., 2007). Os pesquisadores relacionam a atividade anti-tumoral demonstrada por diversas espécies desses gêneros à presença das naftoquinonas lapachol (Fonseca, Braga e Santana, 2003) e β -lapachona, mas também, a outras classes de produtos naturais como lignanas (Hirschmann e Papastergiou, 2003).

Lapachol e β -lapachona

Desde a descoberta por Wendel, em 1946, da atividade antiparasitária do lapachol, uma naftoquinona prenilada, os estudos sobre essa substância e seus derivados intensificaram-se (Figura 3). Posteriormente foi descrito que o lapachol apresentou atividade





antineoplásica, com baixa toxidez, em pacientes humanos (Santana et al., 1980). Para o lapachol ainda foram registradas propriedades outras como: antimalárica, esquistossomicida, antiviral, antiinflamatória e anticâncer (Ferreira, Silva e Souza, 2003; Fonseca, Braga e Santana, 2003; Hussain et al., 2007).

(Ferreira et al., 2010), descreveram que a substância β -lapachona, uma naftoquinona natural derivada do lapachol, encontrava-se em testes clínicos de fase II para tratamento do câncer de pâncreas. Essa substância com grande potencial terapêutico leva a morte celular por apoptose ou necrose através da inibição da replicação do DNA pela clivagem das topoisomerasas I e II. Essa clivagem é induzida pela formação de ligações covalentes entre o anel quinona e as proteínas e ácidos nucleicos, fato constatado por diversos estudos conduzidos sob várias condições (Ferreira, Silva e Souza, 2003; Pinto e Castro, 2009).

As enzimas topoisomerase I e II são essenciais na regulação da topologia do DNA; a topoisomerase I catalisa a relaxação das superhélices positivas via quebra de uma fita simples de DNA, enquanto a topoisomerase II faz uma quebra transitória da fita dupla de DNA (Pinto e Castro, 2009). Por exemplo, a enzima topoisomerase I do DNA foi o primeiro alvo bioquímico da β -lapachona a ser descrito, atuando na clivagem dessa enzima, esta naftoquinona teve seu desempenho comparado a outros inibidores conhecidos como por exemplo, a camptotecina (Averboukh, Li e Pardee, 1993). Posteriormente β -lapachona demonstrou uma fraca inibição da topoisomerase II, numa reação independente de ATP envolvendo a formação de complexos reversíveis (Frydman et al., 1997).

A β -lapachona foi ativa contra linhagens de células malignas humanas em leucemia, melanoma, câncer colorretal, de mama e de próstata, apresentando também ação sinérgica no tratamento radioterápico de tumores com um aumento de 79% no efeito da radiação sobre células de melanoma humano (U1-MEL) resistentes à radiação (Ferreira et al., 2010). Além disso, o uso combinado de β -lapachona com outros fármacos, como por exemplo, o taxol, foi efetivo contra tumores humanos de ovário e próstata (Ferreira et al., 2010). A potencial atividade anticâncer demonstrada pelas naftoquinonas naturais derivadas do lapachol contribuiu para as pesquisas na síntese de derivados com modificações estruturais na cadeia lateral C-2 e no grupo carbonila C1 (Ravelo et al., 2004).

Isolada originalmente de espécies da família Bignoniaceae, incluindo ainda neste artigo mais algumas

espécies de Bignoniaceae brasileiras citadas por Ferreira (1996) como *Handroanthus chryssotrichus* (Mart. ex DC.) [sin. *Tecoma chryssotricha* Mart. (ipê-tabaco verdadeiro)], *Tabebuia angustata* Britton [sin. *Tecoma heptaphylla* (Vell) Mart.] (ipê-roxo)] e *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose [sin. *Tecoma serratifolius* (Vahl) G. Don (ipê-do-cerrado)], a naftoquinona lapachol também é biossintetizada por outras famílias tais como: Avicenniaceae, Fabaceae (=Leguminosae), Malvaceae, Proteaceae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae (Hussain et al., 2007). Já o derivado β -lapachona ocorre nas famílias Bignoniaceae e Verbenaceae (Thomson, 1971; Oliveira et al., 1990).

Considerações finais

O uso popular consagrado de espécies da família Bignoniaceae no tratamento de inflamações, infecções, câncer e doenças parasitárias, aliado à diversidade estrutural das naftoquinonas elaboradas por essa família, que apresentam anéis furano e pirano em estruturas tri e tetracíclicas, torna as Bignoniaceae, candidatas especiais às investigações de perfil químico e do seu potencial farmacológico visando o isolamento de novas substâncias ativas.

As naftoquinonas de origem natural contendo uma cadeia lateral prenila como a β -lapachona e o lapachol isoladas de espécies de Bignoniaceae e de Verbenaceae junto com outras naftoquinonas de Angiospermae, como os isômeros alcanina e chiconina (Boraginaceae), e as naftoquinonas hidroxiladas plumbagina e juglona (Droseraceae, Juglandaceae e Plumbaginaceae) têm sido objeto de intensa investigação tanto em termos de avaliação de múltiplas atividades biológicas e diferentes mecanismos de ação, como também de síntese de derivados, visando a obtenção de novos fármacos mais ativos ou seletivos para se estabelecer uma relação estrutura-atividade. Vale ressaltar que a etnofarmacologia e a quimiosistemática vêm se consolidando como instrumentos poderosos na descoberta de novos medicamentos de origem natural demonstrando a multidisciplinaridade da Química de Produtos Naturais (Maciel, Pinto e Veiga Júnior, 2002).

Referências

Averboukh, L.; Li, C.J. e Pardee, A.B. 1993 - β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *Journal of Biological Chemistry*, v.268, p. 22463-22468.





- Bedir, E.; Pereira, A.M.S.; Khan, S.I.; Chittiboyina, A.; Moraes, R.M. e Khan, I.A. 2009 – A New β -lapachone derivative from *Distictella elongate* (Vahl) Urb. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 2, p.383-386.
- Binutu, O.A.; Adesogan, K.E. e Okogun, J.I. 1996 – Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Medica*, v.62, n. 4, p. 352-353.
- Burnet, A.R. e Thomson, R.H. 1967 – Naturally occurring quinones. X. Quinonoid constituents of *Tabebuia avellanadae*. *Journal of Chemical Society Section C: Organic*, v. 21, p. 2100-2104.
- Cape, J.L.; Bowman, M.K. e Kramer, D.M. 2006 – Computation of the redox and protonation properties of quinones: Towards the prediction of redox cycling natural products. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1781-1788.
- Cipriani, F.A. 2006 - *Aspectos quimiotaxonômicos da família Bignoniaceae*. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, UFRJ. 73f.
- De Lima, O.G.; D'Albuquerque, I.L.; de Lima, C.G. e Maia, M.H.D. 1962 – Antibiotic substances in higher plants. XX. Antimicrobial activity of some derivatives of lapachol as compared with xyloidone, a new natural o-naphthoquinone isolated from extracts of heartwood of *Tabebuia avellanadae*. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, v. 4, n. 1-2, p. 3-17
- Ferreira, V.F. 1996 - Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. *Química Nova na Escola*, n. 4, p. 35-36.
- Ferreira, V.F.; Silva, M.N. e Souza, M.C.B.V. 2003 – Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 407-416.
- Ferreira, V.F.; Ferreira, S.B.; Gonzaga, D.T.G.; Santos, W.C. e Araújo, K.G.L. 2010 – β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual de Química* v.2, n. 2, p. 140-160.
- Fonseca, S.G.C.; Braga, R.M.C. e Santana, D.P. 2003- Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 84, n. 1, p. 9-16.
- Frydman, B.; Marton, L.J.; Sun, J.S.; Neder, K.; Witiak, D.T.; Liu, A.A.; Wang, H.M.; Mao, Y.; Wu, H.Y.; Sanders, M.M. e Liu, L.F. 1997 - Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Research*, v. 57, p. 620–627.
- Fujiwara, A.; Mori, T.; Iida, A.; Ueda, S.; Hano, Y.; Nomura, T.; Tokuda, H. e Nishino, H. 1998 – Antitumor-promoting naphthoquinones from *Catalpa ovata*. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 5, p. 629-632.
- Gentry, A.H. 1980- *Bignoniaceae-Part I (Crescentieae and Tourretieae)*. *Flora Neotropica*. Monograph 25. The New York Botanical Garden, New York, 130p.
- Girard, M.; Kindack, D.; Dawson, B.A.; Ethier, J.C. e Awang, D.V.C. 1988 – Naphthoquinone constituents of *Tabebuia* spp. *Journal of Natural Products*, v. 51, n. 5, p. 1023-1024.
- Gormann, R.; Kaloga, M.; Li, X.C.; Ferreira, D.; Bergenthal, D. e Kolodziej, H. 2003- Furanonaphthoquinones, atraric acid and a benzofuran from the stem barks of *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry*, v. 64, n. 2, p. 583-587.
- Hillard, E.A.; Abreu, F.C.; Ferreira, D.C.M.; Jaouen, G.; Goulart, M.O.F. e Amatore, C. 2008 – Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. *Chemical Communications*, p. 2612-2628.
- Heltzel, C.E.; Gunatilaka, A.A.L.; Glass, T.E. e Kingston, D.G.I. 1993 – Furofuranonaphthoquinones: Bioactive compounds with a novel fused ring system from *Crescentia cujete*. *Tetrahedron*, v. 49, n. 31, p. 6757-6762.
- Hirschmann, G.S. e Papastergiou, F. 2003 - Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug “Tayi Pytá” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Journal of Biosciences*, v. 58, n. 7-8, p. 495-501.
- Houghton, P.J.; Mat Ali, R. e Azizol, M. 1997 - Antimicrobial activity of extracts of some Bignoniaceae from Malaysia. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, v.7, n. 2/3, p. 96-98.
- Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V.U.; Miana, G.A. e Green, I.R. 2007- Lapachol: an overview. *Arkivoc*, v.(ii), p. 145-171.
- Koyama, J.; Morita, I.; Kino, A. e Tagahara, K. 2000 – Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) separation of furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, n. 6, 873-875.
- Karalai, C.; Salae, A.W.; Ponglimanont, C.; Kanjana-Opas, A. e Yuenyongsawad, S. 2010 – Naphthalene derivatives from *Dyospiros wallichii*. *Canadian Journal of Chemistry* v. 88, n. 9, p. 922-927.
- Lima, C.S.A.; de Amorim, E.L.C.; Nascimento, S.C.; de Araújo, C.F.; Agra, M.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Silva, M.S.; da Cunha, E.V.L.; Vieira, I.J.C. e Braz-Filho, R.





- 2005 – Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrivalvis* (Bignoniaceae). *Natural Products Research*, v. 19, n. 3, p. 217-222.
- Lorenzi, H. e Matos, F.J.A. 2002. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo, 512p.
- Machado, T.B.; Pinto, A.V.; Pinto, M.C.F.R.; Leal, I.C.R.; Silva, M.G.; Amaral, A.C. F.; Kuster, R.M. e Netto-dos Santos, K.R. 2003 - *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 21, n.3, p. 279-284.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. e Veiga Júnior, V.F. 2002 – Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p.429-438.
- McKallip, R.J.; Lombard, C.; Sun, J. e Ramakrishnan, R. 2010 – Plumbagin-induced apoptosis in lymphocytes is mediated through increased oxygen species production, upregulation of Fas, and activation of the caspase cascade. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 247, p. 41-52.
- Muller, K.; Sellmer, A. e Wiegrebe, W. 1999 – Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 8, p. 1134-1136
- Nagata, K.; Hirai, K.I.; Koyama, J.; Wada, Y. e Tamura, T. 1998 – Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n.3, p. 700-702.
- O'Brien, P.J. 1991 – Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, v. 80, p. 1-41.
- Oliveira, A.B.; Raslan, D.S.; Miraglia, M.C.M. e Mesquita, A.A.L. 1990 - Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*, v.13, n.4, p. 302-307.
- Pinto, A.V. e Castro, S.L. 2009 - The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*, v. 14, p. 4570- 4590.
- Ravelo, A.G; Estévez-Braun, A; Chávez-Orellana, H.; Pérez-Sacau, E. e Mesa-Siverio, D. 2004 – Recent studies on natural products as anticancer agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.4, p. 241-265.
- Rodrigues, A.M.S.; de Paula, J.E.; Roblot, F.; Fournet, A. e Espindola, L.S. 2005 - Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia*, v.76, n. 7-8, p. 755-7.
- Saizarbitoria, T.C.; Anderson, J.E.; Alfonso, D. e McLaughlin, J.L. 1997 – Bioactive furonaphthoquinones from *Tabebuia barbata*. *Acta Científica Venezolana*, v.48, n.1, p. 42-46.
- Santana, C.F.; Lins, L.J.P.; Asfora, J. J.; Melo, A.M.; Lima, O.G. e d'Albuquerque, I.L. 1980/1 - Primeiras observações com emprego do lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.20, p. 61.
- Singh, P.; Khandelwal, P.; Hara, N.; Asai, T. e Fujimoto, Y. 2008 - Radermachol and naphthoquinone derivatives from *Tecomella undulata*: complete ¹H and ¹³C NMR assignments of radermachol with the AID of computational ¹³C shift prediction. *Indian Journal of Chemistry Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, v. 47B, n. 12, p. 1865-1870.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2012. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 3ª Ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, São Paulo.
- Steinert, J.; Khalaf, H. e Rimpler, M. 1996 – High-performance liquid chromatographic separation of some naturally occurring naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of Chromatography A*, v. 723, n. 1, 206-209.
- Tessier, A.M.V.; Delaveau, P.; Champion, B. e Jacquemin, H. 1988 – Lipophilic quinones of the trunk wood of *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 46, n. 1, p. 55-57.
- Thomson, R.H. 1971. *Naturally occurring quinones*. 2nd Ed., Academic Press, New York.
- Thomson, R.H. 1991 - Distribution of naturally occurring quinones. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, v.3, n. 2, p. 70-73.





Verma, R.P. 2006 - Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v.6, p. 489-499.

Wagner, H.; Kreher, B.; Lotter, H.; Hamburger, M.O. e Cordell, G.A. 1989- Structure determination of new isomeric naphtha [2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. *Helvetica Chimica Acta*, v. 72, n. 4, 659-667.

Weinberg, M.L.D.; Gottlieb, O.R. e Oliveira, G.G. 1976 -The chemistry of Brazilian Bignoniaceae. Part 2. Naphthoquinones from *Zeyhera tuberculosa*. *Phytochemistry*, v. 15, n. 4, p. 570.

Wendel, W.B. 1946 - The influence of naphthoquinones upon the respiratory and carbohydrate metabolism of malarial parasites. *Federation Proceedings*, v.5, p. 406.

Wu, T.S.; Hsu, H.C.; Wu, P.L.; Leu, Y.L.; Chan, Y.Y.; Chern, C.H.; Yeh, M.Y e Tien, H.J. 1998 - Naphthoquinone esters from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 46, n.3, p. 413-418.

Recebido em novembro de 2012. Aceito em janeiro de 2013



Avaliação Farmacognóstica da Droga Vegetal Flores de Jasmim

Pharmacognostic Study of Jasmine Flowers Vegetable Drug

Ana R. Alpiovezza; Marcelo S. Pinto; Ivair D. Gonçalves; Aguinaldo P. Barbosa; Francisco R. C. de Araújo; Sérgio de Mendonça; Maria C. Marcucci; *Luis C. Marques

Universidade Bandeirante Anhanguera, Programa de Mestrado Profissional em Farmácia
Rua Maria Cândida 1813, 5º andar, CEP 02071-013, Vila Guilherme, São Paulo, SP, Brasil

*Correspondência: e-mail: luis.marques@aedu.com.br

Palavras chave:

Jasminum sp.; Controle de qualidade; Avaliação farmacognóstica; Atividade biológica

Keywords:

Jasminum sp.; Quality control; Pharmacognostic evaluation; biological activity

Resumo

São apresentados os resultados da avaliação farmacognóstica da droga vegetal flores de jasmim (*Jasminum* DV) comercializada no Brasil. A metodologia envolveu avaliação farmacobotânica, testes de pureza, teor de extrativos, *screening* fitoquímico preliminar e determinação quantitativa de fenóis e flavonoides totais. Realizaram-se também testes de atividades antimicrobiana, antioxidante, anticolinesterase e *screening* farmacológico (hipocrático) em camundongos. A identificação botânica não pode confirmar a espécie, pois as chaves botânicas exigem obrigatoriamente a presença de galhos e folhas. Macroscopicamente a flor é completa, há dois estames fundidos ao tubo da corola, antera sagitada, ovário súpero com dois lóbulos e dois óvulos. Microscopicamente se observam tufo de pelos toectores pluricelulares de parede rugosa nas axilas das nervuras principais das folhas (domácias) e mesmo tipo de pelos nas sépalas e pétalas. Obtiveram-se os valores de $7,9 \pm 0,6\%$ de cinzas totais, $0,45 \pm 0,17\%$ de cinzas insolúveis, $9,8 \pm 0,3\%$ de umidade e $42,5 \pm 5,2\%$ de teor de extrativos (aquoso). Encontrou-se a presença de flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, mucilagens, antracênicos, esteroides/triterpenos e traços de óleos essenciais. Em termos quantitativos, encontrou-se índice de espuma de 145 ± 5 mL, índice de intumescimento $1,0 \pm 0,5$ mL, $2,54 \pm 0,01\%$ de polifenóis totais, $2,43 \pm 0,02\%$ de polifenóis não adsorventes, $0,11 \pm 0,03\%$ de polifenóis adsorventes e $0,048 \pm 0,001\%$ de flavonoides totais. O extrato liofilizado mostrou atividade antioxidante na concentração de $31,75 \mu\text{g/mL}$, atividade antimicrobiana positiva para microorganismos diversos dependente de concentração, indícios de atividade anticolinesterase, ausência de efeitos farmacológicos agudos e DL50 acima de 5g/kg (oral) e entre $0,5$ e 2g/kg (i.p.). Os presentes dados caracterizam a droga vegetal comercializada no Estado de São Paulo e apontam a necessidade de estudos posteriores.

Abstract

This paper presents the pharmacognostic evaluation results of the plant drug "jasmine flowers". The methodology involved pharmacobotany evaluation, purity tests, extractives content, preliminary phytochemical screening and quantitative determination of total phenols and flavonoids. Tests of antimicrobial activity, antioxidant, anticholinesterase and pharmacological hippocratic screening in mice were also performed. The plant species were not confirmed due the absence of branches and leaves, which are required by botanic keys. On macroscopic



examination the flower is complete, the calyx shows eight sepals united at the base and ribbed longitudinally, shortly petiolate with an opening at the end; the calyx has two stamens fused to the corolla tube, anther sagittal, superior ovary with two lobes and two ovules. On microscopic examination, we could observe the presence of pluricellular tector trichomes tufts with rugose wall in the in the axils of main veins of leaves (domatia), and the presence of the same type of hair in the base of the sepals. Values of $7.9 \pm 0.1\%$ total ash, $0.45 \pm 0.17\%$ ash insoluble, $9.8 \pm 0.3\%$ loss on drying and $42.5 \pm 5.2\%$ aqueous extractive were obtained. Qualitative screening showed the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, mucilages, anthracenes, steroids/triterpenes and traces of essential oils; foam index $145 \pm 5\text{mL}$, swelling index $1.0 \pm 0.5\text{mL}$, $2.54 \pm 0.01\%$ of total polyphenols, $2.43 \pm 0.02\%$ not adsorbents polyphenols, $0.11 \pm 0.03\%$ adsorbents polyphenols (tannins) and $0.05 \pm 0.01\%$ of total flavonoids were found. The lyophilized extract showed an antioxidant activity (EC50 $31.75 \mu\text{g/mL}$), an anticholinesterase activity in preliminary testing and positive antimicrobial activity to several microorganisms in concentration-dependence, besides LD50 above 5g/kg (oral) and between 0.5 and 2g/kg (intraperitoneal). The present data characterize the vegetable drug marketed in Sao Paulo State and presents the need for further studies.

Introdução

No Brasil, a utilização de plantas medicinais já era tradição do povo indígena, mesmo antes da colonização. O interesse dos colonizadores pelas riquezas brasileiras e pelo conhecimento popular sobre plantas nativas utilizadas pelos pajés esteve presente desde o descobrimento do país (Lorenzi e Mattos, 2002).

A utilização de chás e preparados caseiros à base de plantas medicinais é uma prática comum entre a população brasileira. Pode-se dizer que é resultado do conhecimento empírico de povos primitivos que vem sendo passado de geração a geração e incorporando novas práticas e aprendizados. Planta medicinal, de acordo com a RDC 10, é a planta inteira, ou suas partes, que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (Brasil, 2010). A comercialização de plantas na forma rasurada para preparação de chás pode ser enquadrada também como bebida alimentícia, conforme regulamentações federais como a Portaria GM 519 (Brasil, 1998), e as resoluções Anvisa RDC nº 267 e RDC nº 277 (Brasil, 2005 a,b).

A Portaria nº 519 de 1998 apresenta regulamento técnico para fixações de identidade e qualidade de plantas destinadas a preparação de infusões ou decocções. Segundo a Portaria, chás são produtos constituídos de partes vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas (Brasil, 1998). As plantas que podem ser cadastradas nesta categoria estão definidas nas resoluções supracitadas e devem ter um histórico de uso alimentício. Das espécies contidas nessas normas estão espécies clássicas de uso

fitoterápico e alimentício, como é o caso da camomila, canela, funcho e anis, dentre outras, mas outras espécies são pouco conhecidas no Brasil, sendo ofertadas ao mercado alimentício a partir de costumes europeus ou asiáticos.

Uma dessas espécies citadas nessas normas é o *jasmim*, que corresponde às flores de *Jasminum officinale* L., da família Oleaceae, muito comum nos países asiáticos e de grande importância na preparação de perfumes. O *jasmim* é citado na Portaria 519 e na RDC 267, sendo vendido comercialmente como chá no Brasil, particularmente para consumidores de origem asiática. No entanto, não há nessas normas qualquer especificação técnica sobre essa espécie, seja em termos botânicos, de pureza ou químicos.

A literatura mostra existirem mais de 200 espécies pertencentes ao gênero *Jasminum*, presentes principalmente na África, Ásia, Austrália, ilhas do Pacífico Sul, uma na região mediterrânea e 43 espécies na China. Geralmente são árvores ou arbustos, eretos ou escandentes, de folhas simples opostas ou alternadas, inflorescências cimosas dispostas em panículas, racemos, corimbos ou umbelas, flores bissexuadas fortemente aromáticas, de cálice campanulado, corola branca o amarelada, 4-16 lobos, 2 estames, anteras dorsifixas; frutos baga e sementes sem endosperma. *Jasminum officinale* L. é a mais conhecida delas, incluindo ainda três variedades (*J. officinale* var. *tibeticum*; *J. officinale* var. *officinalis*; *J. officinale* var. *piliferum*) (Mei-Chen et al., 1996).

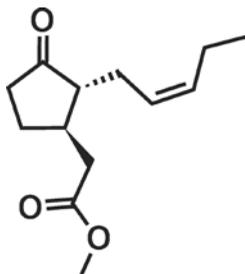
J. officinale habita a França, Itália, China, Japão, Índia, Marrocos e Egito e apresenta nomes populares como Royal Jasmine, Jasmine italiano, Jasmine Catalão, Jasmim dos Poetas, dentre outros (Gruenwald et al., 2000). Quimicamente, as folhas de espécies de *Jasminum* apresentam, como principais constituintes, óleos contendo eugenol, farnesol, geraniol, terpineol, jasmone e outros; alcalóides de subclasse não esta-





belecida; saponinas triterpênicas diversas; secoiridóides diversos; flavonoides glicosídeos e jasmonatos, uma série de compostos derivados de lipídeos que atuam na planta como fitohormônios (Demole e Wilhalm, 1964; Gruenwald et al., 2000; Zhao et al., 2007; Zhao e Dong, 2008).

Figura 1. Jasmonato de metila, um dos ingredientes das flores de jasmim



De acordo com Gruenwald e colaboradores (2000), as flores de *J. officinale* são utilizadas terapeuticamente na medicina chinesa para hepatite, dores abdominais, cirrose hepática e disenteria. Já na medicina indiana são usadas para dores de estômago, de cabeça, dentes e olhos, para hanseníase, coceiras e problemas dermatológicos bem como para dismenorréia. Em relação a riscos ou efeitos tóxicos, não há citação de tais efeitos dentro de dosagens usuais para chás, geralmente estabelecidas na faixa de 2-3 g (Brasil, 2010).

A monografia para a droga vegetal *flores de jasmim* não foi encontrada nas edições da Farmacopéia Brasileira, *United States Pharmacopoeia*, *British Pharmacopoeia* ou *European Pharmacopoeia*. Informações a respeito foram encontradas apenas na *The Ayurvedic Pharmacopoeia of India* (sem data), porém a monografia contida nessa referência se refere exclusivamente às folhas como a parte usada, contendo informações macro e microscópicas e dados de pureza, bem como a proposta de análise por cromatografia em camada delgada.

Tal condição de ausência de padrões de controle de qualidade estimulou a realização deste trabalho visando o desenvolver e propor especificações para as flores de jasmim (*Jasmin DV*), já que esta é a parte usada no Brasil não havendo citação ou conhecimento da oferta ou uso das folhas em termos comerciais.

Materiais e métodos

Obtenção do material botânico

As amostras foram adquiridas na distribuidora de drogas vegetais Santosflora Comércio de ervas Ltda., localizada em São Paulo, que forneceu material rotulado e identificado como *Jasminum officinale* L. e com

número de lote JASM 01.0609, originária da China e com validade junho de 2012.

Identificação botânica

A identificação botânica foi realizada com base no artigo de Mei-Chen e colaboradores (1996), complementada pela chave do gênero obtido da Flora da China (*Jasminum*, 2011). Os dados também foram revisados pela botânica especialista do Instituto Botânico de São Paulo, profa. Dra. Lúcia Rossi. Utilizou-se, também, comparação microscópica com a monografia disponível na *The Ayurvedic Pharmacopoeia of India* (sem data), com base nas folhas.

Caracterizações farmacognósticas

Foram realizadas as caracterizações organolépticas, macro e microscópica de acordo com metodologia convencional de farmacognosia (Oliveira et al., 1991; Farmacopéia Brasileira, 2010). Empregou-se microscópio estereoscópico e microscópio de marca Leica DMLB com capturador de imagem Samsung digital color câmera SCC-131A.

Testes físico-químicos

Foram realizados os testes de perda por dessecação a 105°C durante 5 horas, teor de extrativos a quente (aquoso), determinação de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, todos os testes utilizando análises em triplicata (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Análise fitoquímica preliminar

A metodologia utilizada foi obtida de referências rotineiras em pesquisa fitoquímica preliminar (Matos, 1988), bem como da Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Todos os testes foram realizados com reagentes pró-análise e devidamente acompanhados de amostras de drogas padrão para cada grupo químico avaliado.

Foram verificados os grupos de flavonoides (reação de Shinoda), cumarinas (separação e verificação de fluorescência em luz UV), antracênicos (reação de Bornträeger direta e após hidrólises ácida e oxidativa), taninos (reação com cloreto férrico, gelatina, solução de metais pesados; reação de Stiasny para verificação do subtipo de taninos), saponinas (teste e índice de espuma), alcalóides (reação de Dragendorff, direta e após purificação), esteroides/triterpenos (reação de Liebermann-Buchard e reagentes para cardiotônicos) e teste para mucilagens (índice de intumescimento). A classe de óleos essenciais foi verificada organolepticamente bem como extraída em destilador de Clevenger para quantificação.





Determinação do teor de polifenóis e taninos

Os teores de polifenóis totais, polifenóis não adsorventes e taninos totais foram determinados conforme o método na literatura (Glasl, 1983), com pequenas modificações, empregando-se pó de pele levemente cromado (Freiberg, Alemanha) e reação colorimétrica com o reagente de Folin-Ciocalteu, medindo-se a absorvância em 691 nm, empregando-se a água como branco.

Determinação do teor de flavonoides totais

Este doseamento foi realizado conforme literatura (Bankova e Marcucci, 2000), empregando solução hidroalcoólica a 70%, reação com solução de cloreto de alumínio e leitura espectrofotométrica a 425 nm, calculando-se a concentração de flavonoides totais expressos em quercetina usando-se a faixa linear de uma curva de calibração.

Atividade antimicrobiana

Empregou-se a metodologia da difusão em disco, padronizado internacionalmente pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2005), com ágar Mueller-Hinton (lote 1166914, validade 31/03/2016, Difco). Os padrões e cepas utilizados foram: disco de antibiótico contendo amoxicilina 10 µg (lote 10718005, validade 07/07/2013, Laborclin); amoxicilina com ácido clavulânico 30 µg (lote 10715009, validade 30/06/2013, Laborclin); cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 (lote 10721046, validade 05/07/2014, Laborclin) e *Escherichia coli* ATCC25922 (lote 10711051, validade 05/07/2014, Laborclin). Como substância teste, foi utilizada uma amostra de extrato de *Jasmim* DV (5 ou 2 mg do liofilizado), com a qual se realizou o ensaio de difusão.

Avaliação da atividade supressora de radicais livres

Este método tem por base a redução do radical 2,2'-difetil-1-picril-idrazila (DPPH•) em solução de etanol, onde apresenta máximo de absorção entre 515-528 nm. Ao fixar um H•, abstraído do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorvância, o que permite calcular, após estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH• (CE50) (Hatano et al., 1989). Foi construído um gráfico de Absorvância (em %) versus a concentração da solução-mãe (mg/mL) e calculada a CE50 pela planilha, pelo método dos mínimos quadrados.

Atividade anticolinesterase *in vitro*

Preparou-se um decocto a 20% (p/v) com etanol 50%, que foi filtrado, concentrado até cerca de 30% do vo-

lume inicial. Este foi aplicado em placas cromatográficas de sílica gel Merck, que foram eluídas em diversos sistemas de solventes conforme a classe química que se pretendia avaliar (Markhan, 1982; Wagner e Bladt, 1996).

- taninos: tolueno – n.butanol-ácido acético-água (50:25:25:5)
- saponinas: clorofórmio-metanol-água (64:50:10)
- alcalóides: acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10)

Estabelecidos os sistemas eluentes com adequada separação das substâncias, as placas foram borrifadas com solução aquosa 1 mM de iodeto de acetilcolina (substrato), seguida da aplicação do reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico da Sigma-Aldrich®), e em seguida com a enzima acetilcolinesterase 3 UI/mL (Sigma-Aldrich®). A inibição da atividade enzimática foi verificada pelo surgimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo amarelado (Rhee et al., 2001). Correu-se, em paralelo e com sistema eluente próprio, extrato de sementes de *Paullinia cupana* (guaraná em pó da Purifarma®, lote 104, validade 12/2012), aplicando-se sobre esta placa a mesma sequência de reagentes citada acima.

Screening farmacológico hipocrático

Preparou-se o extrato hidroalcoólico das flores a 20% (p/v) com etanol hidratado 50%, seguido da concentração e liofilização. Foram utilizados camundongos suíços machos, jovens (2 meses), pesando entre 20-30 g, oriundos do biotério da Unicamp (CEMIB). Os animais foram aclimatados no LAFE Uniban, pesados e distribuídos em caixas com 5 animais cada uma. Como roteiro básico, utilizou-se o protocolo estabelecido por Carlini (1972), o qual avalia vários sinais gerais, tais como: micção, defecação, contorções abdominais, dentre outros. Para tanto, sete grupos de 5 camundongos machos (N= 35) foram colocados em sala separada e deixados em jejum por cerca de 12 horas antes da administração. Os animais foram pesados e receberam água (grupo controle) ou o liofilizado do extrato de flores de jasmim (via oral 100 e 5000 mg/Kg g/kg; via intraperitoneal 1, 100, 500, 2000 mg/Kg). Os animais foram observados continuamente até 2 horas e depois de 4 e 24 horas, completando-se o acompanhamento até 14 dias.

Resultados e Discussão

O laudo enviado pelo fornecedor Santosflora Comércio de ervas referia as flores de jasmim (*Jasmim* DV) como oriundas da China. Para conferência dessa indicação, foi utilizada a chave de Mei-Chen e colaboradores (1996), complementada pelos dados da chave do gênero (*Jasminum*, 2011). Porém, nas duas referências são necessárias informações preliminares sobre os galhos e as folhas, sua filotaxia, se as folhas são

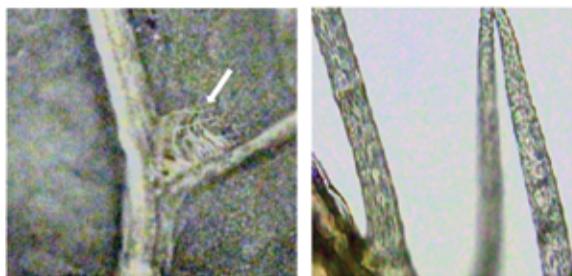




simples ou compostas e, se compostas, de quantos folíolos, não tendo sido possível aplicar os dados das chaves para confirmação botânica. Essa situação foi confirmada pelo parecer da botânica profa. Dra. Lúcia Rossi, do Instituto Botânico de São Paulo, que confirmou o gênero se declarou impossibilitada de chegar à identificação ao nível da espécie.

Em outra tentativa, compararam-se pedaços de folhas presentes no material comercial com informações da monografia existente na *The Ayurvedic Pharmacopeia of India* vol. III (sem data). Esta cita a presença, nas folhas de *J. officinale*, de pelos tectores unicelulares de pontas agudas e, mais raramente, pelos glandulares ocorrentes na superfície superior (abaxial); no material comercial encontraram-se apenas grupamentos de pelos tectores pluricelulares de paredes rugosas nas axilas do encontro das nervuras secundárias com a central, denominados domácias (figura 2). Desse modo, os padrões encontrados são totalmente distintos daqueles descritos na literatura, o que permite conclusão apenas de que o material comercial não se trata de *J. officinale* conforme está no rótulo do produto.

Figura 2 - Fotos dos pelos tectores presentes nas folhas do lote comercial de jasmim (*Jasminum DV*). A- Domácias (20x); B- Pelos tectores pluricelulares de parede rugosa (100x)



A busca por referências das outras espécies, que permitissem a tentativa de identificação do material comercializado, levou a dois estudos sobre *J. sambac*. Desse modo, Sabharwal e colaboradores (2011), em termos microscópicos, citam a presença de pelos tectores uni e pluricelulares presentes nas duas epidermes, bem como presença ainda de pelos glandulares de célula terminal pluricelular, sem citação da ocorrência. Essas informações foram replicadas por (Krishnavenil e Taakur, 2011) com basicamente o mesmo perfil de dados. Portanto, novamente o perfil em termos de pelos é totalmente distinto do encontrado no material comercial, levando à conclusão de que a droga vegetal em estudo também não pode ser identificada como *J. sambac*.

Portanto, declara-se impossível, nas condições do material adquirido, proceder à efetiva identificação

da espécie comercializada no Brasil. Foi realizado o contato com o fornecedor importador, a quem se deu ciência da situação 'fraudulenta' ao consumidor, e se solicitou auxílio na obtenção de uma exsicata completa do vegetal correspondente, a partir da qual fosse possível aplicar os dados botânicos disponíveis na literatura. Após alguns meses, o retorno foi negativo, com clara manifestação de desinteresse em qualquer auxílio à resolução dessa situação.

Caracteres organoléticos

A droga vegetal é comercializada exclusivamente na forma de flores isoladas, que se apresentam como pequenas massas de tonalidade creme, bege clara a marrom claro, dependendo do estado da flor, em botão ou totalmente aberta, de odor suave agradável e levemente adocicado; nota-se a presença de pedaços de folhas, as quais podem ser consideradas matéria estranha à droga vegetal flores e aceitáveis até o máximo de 2-3%, como usualmente estabelecido nas monografias farmacopeicas.

Caracteres macroscópicos

O botão floral mede 1,8 cm de comprimento e 0,7 cm de largura na parte mais larga; já as flores abertas medem 10-30 mm de comprimento por 0,5-1,0 cm de largura na parte mais aberta. A flor é completa, apresenta sépalas, pétalas, androceu e gineceu. O cálice mostra 8 sépalas unidas na base e estriadas no sentido longitudinal. A flor é curtamente peciolada, presença de dois estames que se situam na mesma altura, fundidos ao tubo da corola, as anteras têm forma sagitada ou lanceolada, com deiscência longitudinal. O ovário é súpero e apresenta 2 lóbulos e dois óvulos.

Caracteres microscópicos

A avaliação microscópica das flores demonstrou a presença marcante de pelos tectores pluricelulares, uniseriados, de parede rugosa, presentes em quantidade moderada no bordo do cálice bem como no tubo das pétalas. Na avaliação das folhas encontraram-se os mesmos tipos de pelos, distribuídos em ambas as faces das folhas, geralmente sobre a nervura central; citando-se aqui também a presença de domácias, que são tufo de pelos que se aglomeram nas axilas das nervuras secundárias no ponto de inserção na nervura principal, com ocorrência apenas na epiderme inferior.

Determinações físico-químicas

Os dados físicos químicos foram realizados em triplicata e constam da tabela 1.



**Tabela 1 - Testes físico-químicos das flores de *Jasminum* sp (média ± dp).**

Testes	%
Cinzas totais	7,9 ± 0,6
Cinzas insolúveis	0,45 ± 0,17
Perda por dessecação	9,8 ± 0,3
Teor de extrativos (aquoso)	42,5 ± 5,2

Os dados sobre as cinzas foram discutidos com base no laudo do fornecedor e no trabalho de caracterização farmacognóstica do *Jasminum sambac*. O laudo cita o teor de cinzas totais como 9,52% com especificação máxima de 11,5%; para cinzas insolúveis cita-se o valor de 5,12% e especificação máxima de 10%, sem qualquer referência quanto à origem dessas informações. Os dados obtidos neste estudo mostram-se mais exigentes que os declarados pelo fornecedor, cujo lote não atenderia à especificação estabelecida. Já os dados descritos para *J. sambac* (Sabharwal et al., 2011) são de 10,76% para cinzas totais e de 2,58% para cinzas insolúveis, valores discrepantes em relação aos obtidos no lote comercial avaliado.

Em relação à perda por dessecação, a faixa farmacopeica definida para esse parâmetro situa-se entre 8-14% (Farmacopeia Brasileira, 2010), estando os dados presentes dentro do adequado, pois a presença de umidade em quantidade excessiva em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de micro-organismos, insetos e hidrólise dos ativos, com consequente deterioração de constituintes do material vegetal.

O teor de extrativos empregando-se a água como líquido extrator, embora não aponte os ativos responsáveis pela ação farmacológica, corresponde a uma técnica quantitativa extremamente acessível, de fácil execução e baixo custo, motivo pelo qual tem sido estimulada nos últimos anos como fator de caracterização das matérias primas vegetais (Hubinger et al., 2009).

No caso do jasmim, obteve-se o valor de 42,5 ± 5,2%, teste inexistente no laudo do fornecedor, bem como ausente também na monografia das folhas da *Indian Pharmacopoeia Ayurvedica*, dificultando sua discussão frente aos dados anteriormente publicados.

Determinações fitoquímicas preliminares

Classicamente, em análises preliminares, sem o objetivo de isolamento de substâncias químicas, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido efetuada pela realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitados característicos (Simões et al., 2004). Os resultados obtidos neste trabalho constam da tabela 2.

Tabela 2 - Testes fitoquímicos preliminares das flores de jasmim

Testes	Resultado
Alcaloides	+
Antracênicos	+
Cardiotônicos	Negativo
Cumarinas	Negativo
Esteroides /triterpenos	+
Flavonoides	+
Mucilagens	+
Óleos essenciais	Traços
Saponinas	+
Taninos	+
Subtipo hidrolisáveis	+
Subtipo condensados	+

Nota-se serem as flores de jasmim extremamente ricas em termos de classes fitoquímicas, pois quase todos os testes mostraram-se positivos, à exceção de cardiotônicos e cumarinas.

No caso dos óleos essenciais, que emprestam fama mundial às flores de jasmim, o teste de hidrodestilação resultou em traços não quantificáveis para o rendimento, com testes realizados em triplicata, apesar do aroma levemente perfumado das flores. O teor mínimo de óleos essenciais nas flores de jasmim não está estabelecido oficialmente, embora algumas referências comerciais citem a obtenção de 0,1% de extrato que emprega solventes ('concreto líquido') a partir das flores de *Jasminum officinale*, dentro do qual estão as substâncias aromáticas (Jasmine essential oil information, 2013). Portanto, o teor de óleos essenciais presente nas flores avaliadas (*Jasminum* DV) é insuficiente para ser evidenciado na técnica da hidrodestilação utilizada neste trabalho.

Determinações fitoquímicas quantitativas

Os resultados dos testes quantitativos constam da tabela 3.

Tabela 3 - Teores quantitativos de classes fitoquímicas obtidos nos lotes comerciais de jasmim (*Jasminum* DV) (média ± dp)

Testes	unidade
Índice de espuma	145 ± 5,0 (mL)
Índice de intumescimento	1,0 ± 0,5 mL
Polifenóis totais	2,54 ± 0,01%
Polifenóis não adsorventes	2,43 ± 0,02%
Taninos totais	0,11 ± 0,03%
Flavonoides totais	0,05% ± 0,01%





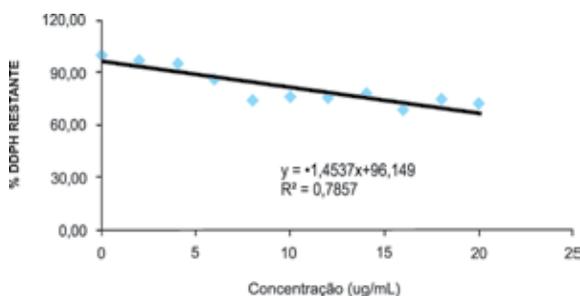
A presença dos polifenóis poderiam justificar algumas das propriedades terapêuticas citadas popularmente para essa droga vegetal para problemas de pele como coceiras e irritações, como é o caso da espécie *Casearia sylvestris* SW (guaçatonga), rica em taninos e muito usada em problemas dermatológicos inclusive em herpes labial (Cury, 2005).

Já o teor em flavonoides é muito baixo para ser apontado como a classe mais provável envolvida nos usos populares da planta. A literatura não refere valores de flavonoides para outras espécies de jasmim, embora análises fitoquímicas preliminares tenham apresentado resultado positivo para flavonoides em *J. sambac* (Krishnavenil e Taakur, 2011).

Atividade antioxidante

Os resultados do teste da atividade antioxidante estão expressos na figura 3. A atividade antioxidante expressa em CE_{50} (concentração efetiva, que elimina 50% dos radicais livres) indica o quão antioxidante é a amostra, isto é quanto menor o valor da CE_{50} mais ativa é a amostra. Verifica-se, no resultado estimado da CE_{50} igual a 31,75 $\mu\text{g/mL}$, que esta droga apresenta uma boa atividade antioxidante, comparada com a rutina (27,80 $\mu\text{g/mL}$) ou ácido gálico (24,27 $\mu\text{g/mL}$) (Souza et al., 2007) destacando-se o fato destas substâncias isoladas e o extrato de jasmim (*Jasminum* DV) serem uma mistura bruta de dezenas ou centenas de substâncias.

Figura 3 - Cinética da descoloração do radical DPPH em presença de extrato de jasmim (*Jasminum* DV), com CE_{50} projetado de 31,75 $\mu\text{g/mL}$ expressos em $\mu\text{g/mL}$



Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 4. O extrato liofilizado demonstra uma marcante atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas Gram positivas e negativas e uma cepa de fungo, porém depende do emprego da concentração adequada (5 mg/disco), visto que a concentração de 2 mg/disco foi ineficaz.

Tabela 4 - Inibição microbiana pelo extrato de flores de jasmim (*Jasminum* DV)

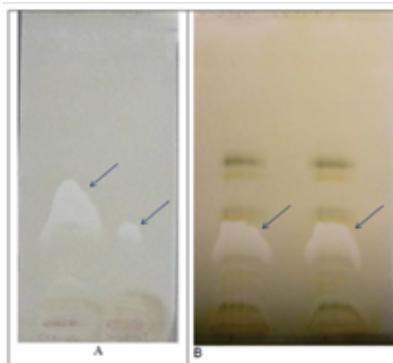
Cepas	2 mg liofilizado /disco)		5 mg liofilizado/disco)	
	resultado	halo (mm)	resultado	halo (mm)
<i>E. coli</i>	negativo	0	+	07
<i>S. aureus</i>	negativo	0	+	07
<i>B. cereus</i>	negativo	0	+	07
<i>C. albicans</i>	negativo	0	+	09
<i>S. epidermidis</i>	negativo	0	+	09

A literatura sobre espécies de jasmim mostra o claro potencial antimicrobiano do óleo essencial, seja sobre bactérias como *E. coli* (Rath et al., 2008) ou outros micro-organismos como vírus (Zhao et al., 2009). No entanto, além dos componentes da fração essencial, provavelmente outras classes fitoquímicas estejam também envolvidas nessa atividade antimicrobiana, como é o caso dos polifenóis, mas tal afirmação merece novas investigações.

Atividade anticolinesterase

A atividade anticolinesterase foi realizada com placas de cromatografia em camada delgada desenvolvidas com vários sistemas eluentes, direcionados às classes de taninos, saponinas e alcaloides, reveladas pelo reagente de Ellman (Rhee et al., 2001). As placas desenvolvidas para revelar a classe de saponinas mostraram-se positivas, isto é, formaram-se pontos claros sobre fundo amarelado, um sinal da expressão da inibição da enzima acetilcolinesterase (figura 4). O resultado obtido indica que tanto extratos de folhas como de flores de jasmim apresentam indícios de atividade anticolinesterase quando comparados com extrato de guaraná usado como padrão (Trevisan e Macedo, 2003 – dados não mostrados).

Figura 4 - Perfil cromatográfico de extrato hidroalcoólico de flores (A) e de folhas (B) de jasmim (*Jasminum* DV) reveladas com o reagente de Ellman





Screening farmacológico hipocrático

Após a administração das várias doses de extrato hidroalcoólico liofilizado das flores de jasmim, observaram-se os animais constantemente durante 4 horas. Não foi verificado nenhum comportamento estranho ou que positivasse anotação dos vários parâmetros especificados no protocolo (micção, ataxia, ptose, salivação entre outros). Destaque deve ser dado ao grupo de cinco camundongos tratados com a dose máxima de 2000 mg/kg pela via intraperitoneal, que apresentaram tremores entre 5-10 minutos após a administração, entre os quais três morreram após 15 minutos, o quarto após 25 minutos e o quinto após 1 hora da administração. Estes animais foram abertos e avaliados macroscopicamente, não apresentando nenhum sinal de hemorragia ou outro indício que indicasse a *causa mortis* ou alterações nos órgãos. Completadas 24 horas de observação até 14 dias depois, não ocorreu mais nenhuma morte ou alteração digna de nota. Desse modo, estima-se a DL_{50} para o extrato liofilizado com valor acima de 5g/kg (oral) e entre 0,5 e 2g/kg (i.p.).

Conclusão

O trabalho realizado constatou que o jasmim proveniente da China comercializado em São Paulo não corresponde ao rotulado pelo importador como *Jasminum officinale* ou *Jasminum sambac*. Trata-se de uma droga vegetal pouco estudada em termos farmacognósticos e ausente em monografias farmacopeicas, apesar do grande volume de comercialização e sua presença em normas federais da área de alimentos.

Apesar disso, o perfil fitoquímico variado e os efeitos biológicos encontrados apontam para sua potencial utilidade terapêutica, em termos antioxidantes, antimicrobianos e como possível anticolinesterase. No entanto, a definição básica da identidade botânica dificulta a relação dos dados obtidos neste trabalho com uma ou outra espécie.

Este caso é um exemplo que sugere à Anvisa, quando incluir determinadas matérias primas em normas para produtos destinados ao consumo humano, que busquem estabelecer em paralelo as devidas especificações técnicas, sem as quais fica impossível qualquer avaliação de sua qualidade.

REFERÊNCIAS

Bankova, V.S.; Marcucci, M.C. 2000. Standardization of própolis: present status and perspectives. *Bee World*, v.81, n.4, p.182-188..

Brasil 2010. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RDC nº 10 de 09.03.2010. Define sobre a noti-

ficação de drogas vegetais. *Diário Oficial da União*, 10.03.2010.

Brasil 2005a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 267 de 22.09.2005. Aprova o regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás. *Diário Oficial da União*, 23.09.2005.

Brasil 2005b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 277 de 22.09.2005. Aprova o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva mate e produtos solúveis. *Diário Oficial da União*, 23.09.2005.

Brasil 1998. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 519 de 26.06.1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de chás. *Diário Oficial da União*, 29.06.1998.

Brasil 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Normativa nº 14 de 31.03.2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 31.03.2010.

Brasil 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Normativa no 277 de 22.09.2005. Aprova o "Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. *Diário Oficial da União*, 22.12.2005.

Brasil 1998. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 519 de 26.06.1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções". *Diário Oficial da União*, 29.06.1998.

Carlini, E.A. 1972. Screening farmacológico de plantas brasileiras. *Revista Brasileira de Biologia*, v.32, n.2, p.65-274.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA, 2005.

Cury, V.G.C. 2005. *Eficácia terapêutica da Casearia sylvestris sobre herpes labial e perspectiva de uso em saúde coletiva*. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado profissional, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Farmacopeia Brasileira 2010. 5ª edição. Brasília: Anvisa.

Glasl, H. 1983. Zur Photometrie in der Drogensstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.123, p.1979-1987.





- Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C 2000. *PDR for herbal medicines*. Montvale: Medical Economics Company.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T., Okuda, T. 1989. Effects of interaction tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* v.37, p.2016-2021.
- Hubinger, S.Z.; Salgado, H.R.N.; Moreira, R.R.D. 2009. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis Benth.*, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. v.19, n.3, p.690-696.
- Jasmine Essential Oil Information 2013. Obtido de <http://www.essentialoils.co.za/essential-oils/jasmine.htm> em 25 de Abril de 2013.
- Jasminum 2011. Flora of China – Oleaceae. Obtido de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=116771 em 30 de Setembro de 2011.
- Krishnaveni, A. e Thaakur S.R. 2011. Preliminary pharmacognostical and phytochemical standardization of *Jasminum sambac*. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, v.3, p77-82.
- Lorenzi, H. e Matos, F. J.A. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa.
- Markhan, K.R. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London.
- Matos, F.J.A. 1988. *Introdução à fitoquímica experimental*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Mei-Cheng C, Lian-Qing Q, Green PS. 1996. Oleaceae. *Flora of China* v.15, p.272–319. Obtido de <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume15/oleaceae.published.pdf> em 30 de Setembro de 2011.
- Oliveira, F.; Akisue, G.; Akisue, M.K. 1991. *Farmacognosia*. Atheneu, São Paulo.
- Rath, C.C.; Devi, S.; Dash, S.K. e Mishra, R.K. 2008. Antibacterial potential assessment of jasmine essential oil against *E. coli*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* v.70, n.2, p.238-241.
- Rath C.C, Devi S, Dash SK, Mishra RK. 2008. Antibacterial potential assessment of jasmine essential oil against *E. coli*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* v.70, n.2, p. 238-41.
- Sabharwal, S.; Vats, M.; Sardana, S.; Aggarwal, S. 2011. Pharmacognostical, physico and phytochemical evaluation of the leaves of *Jasminum sambac* Linn. (Oleaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3, n.4, p.237-241.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre, Florianópolis.
- Sousa, C.M.M; Silva, H.R.; Vieira-Jr., G.M.; Ayres, M.C.C; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* v.30, n.2, p.351-355.
- The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, part. I, v. III sem data. Government of India, Ministry of Health and Family Welfare. Obtido de <http://www.ayurveda.hu/api/API-Vol-3.pdf> em 30 de Setembro de 2011.
- Trevisan, M.T.S. e Macedo, F.V.V. 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, v.26, n.3, p.301-304,
- Wagner, H. e Bladt, S. 1996. *Plant drug analysis: a thin-layer chromatography atlas*. 2.ed. Springer Verlag, Berlin.
- Zhao, G.Q. E Dong, J.X. 2008. Triterpenoid saponins from flower bud of *Jasminum officinale* var. *grandiflorum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v.33, n.1, p.38-42.
- Zhao, G.Q.; Xia, J.J. E Dong, J.X. 2007. Glycosides from flowers of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Yao Xue Xue Bao*, v.42, n.10, p.1066-9.
- Zhao, G.Q.; Yin, Z.F. e Dong, J.X. 2008. A new secoiridoid from the flowers of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Yao Xue Xue Bao*, v.43, n.5, p.513-7.
- Zhao, G., Yin, Z. e Dong J. 2009. Antiviral efficacy against hepatitis B virus replication of oleuropein isolated from *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. *Journal of Ethnopharmacology* v.125, n.2., p.265-8.

Recebido em março de 2013. Aceito em abril de 2013



Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)

Pharmacognostic Study of the Flowers of *Tagetes patula* L. (Asteraceae)

¹Vanessa M. Munhoz; ¹Renata Longhini; ²Tayara A. P. Silva; ³Audrey A. S. G. Lonni; ⁴José Roberto P. Souza; ¹Gisely C. Lopes; ¹João Carlos P. Mello*

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

²Aluna de Iniciação Científica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

⁴Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*Correspondência: e-mail: mello@uem.br

Palavras chave:

Tagetes patula; Avaliação farmacognóstica; Triagem fitoquímica; Perfil cromatográfico; Flavonoides.

Keywords:

Tagetes patula; Pharmacognostic evaluation; Phytochemical screening; Chromatographic profile; Flavonoids.

Resumo

O estudo foi conduzido para o desenvolvimento de parâmetros farmacognósticos de flores de *Tagetes patula* L. As avaliações foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira e/ou literatura especializada. Testes colorimétricos detectaram a presença de flavonoides, taninos e fenólicos simples. Por meio de técnicas cromatográficas: cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível desenvolver um perfil cromatográfico adequado e estabelecer a presença das substâncias quercetina e rutina. Os resultados para a perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco e teor em flavonoides totais foram de: 9,35%, 5,50%, 39,54%, 46,61% e 5,24% respectivamente. No ensaio por hidro-destilação, o rendimento do óleo essencial nas flores foi de 0,15%. Estes dados fornecem informações importantes para a correta identificação e padronização de flores de *T. patula*.

Abstract

The current study was conducted to develop the pharmacognostic standards for *Tagetes patula* flowers. These evaluations were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia and/or literature specialized. Colorimetric tests detected the presence flavonoids, tannins and simple phenolics. By thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) it was possible to develop a fingerprint suitable and correlating the presence of chemical substances, quercetin and rutin. The results for loss on drying, total ash content, extractives content, total solids content and total flavonoid content were: 9.35%, 5.50%, 39.54%, 46.61%, and 5.81%, respectively. The yield of essential oil in flowers was 0.15%. This study provides important information for correct identification and standardization of flowers of *T. patula*.

* Autor para correspondência: João Carlos Palazzo de Mello, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil, E-mail: mello@uem.br, Tel. + 55 44 3011 4816, Fax: + 55 44 3011 5050.



Introdução

Tagetes patula L. (Asteraceae), popularmente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão, tem origem no México. Foi introduzida no Brasil há muitos anos, onde se aclimatou perfeitamente, tornando-se subespontânea. A espécie é muito utilizada como ornamental em jardins e floreiras, sendo comercializada livremente em feiras populares e floriculturas (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997). Na medicina popular suas flores e folhas têm sido utilizadas como antisséptica, diurética, depurativa e repelente de insetos (Chadha, 1976).

A investigação de sua composição química aponta até o presente, flores e folhas ricas em terpenos (Dharmagadda et al., 2005; Restello, Menegatt e Mossi, 2009) flavonoides (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a), alcaloides (Faizi e Naz, 2002), carotenoides (De Las Rivas, 1989), tiofenos (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004) e ácidos graxos (Deineka et al., 2007), substâncias estas que provavelmente estejam envolvidas com as atividades biológicas relatadas até o momento, entre elas: atividade inseticida (Wells, Bertsch e Perich, 1993), nematocida (Buena et al., 2008), larvicida (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004; Dharmagadda et al., 2005; Faizi et al., 2011b), hepatoprotetora (Vasilenko et al., 1990), anti-hipertensiva (Saleem et al., 2004), analgésica (Faizi et al., 2011a), anti-inflamatória (Kasahara et al., 2002), antibacteriana (Rondón et al., 2006), antiviral (Ananil et al., 2000), antifúngica (Mares et al., 2004; Romagnoli et al., 2005; Faizi et al., 2008) e como corante para alimentos (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997).

No entanto, apesar da ampla literatura sobre as propriedades biológicas e constituição química da espécie, não existem relatos publicados sobre os parâmetros farmacognósticos para a avaliação da droga vegetal *T. patula*. Assim, diante do potencial da espécie para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou insumos naturais inseticidas e nematocidas, é premente o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a espécie. Visando dar uma contribuição ao estudo farmacognóstico da espécie *T. patula*, este trabalho tem o intuito de pesquisar a presença de constituintes do metabolismo secundário, determinar o teor de óleo essencial, perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco, teor em flavonoides, e estabelecer um perfil cromatográfico a partir de flores cultivadas.

Materiais e métodos

Material vegetal: Sementes de *T. patula* foram fornecidas por doação por Syngenta Flowers Brazil e cultivadas organicamente no Horto de Plantas Mediciniais

da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As flores de *T. patula* foram coletadas em novembro de 2011 e o material foi identificado pelo Prof. Dr. Jimi Naoki Nakagima, da Universidade Federal de Uberlândia. Material testemunho encontra-se depositado como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUM 21.907.

As flores foram secas em estufa de circulação forçada de ar (Pardal), aquecida a 38 ± 2 °C e cominuídas em moinho de martelo (Tigre ASN5).

Preparação do extrato: Para a obtenção do extrato, a droga vegetal foi utilizada sem separação granulométrica. O material vegetal foi inicialmente desengordurado com *n*-hexano por maceração dinâmica durante seis dias. Após secagem, as flores desengorduradas ficaram em maceração por 10 min e em seguida foram submetidas à extração utilizando dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, na proporção de 2,5% (m/v), utilizando como líquido extrator uma mistura etanol:água (1:1 v/v), por um período de 9 min, com intervalos de 10 min, para que a temperatura não excedesse 40 °C. Após, o extrato foi filtrado, evaporado sob pressão reduzida e liofilizado (EB).

Solventes e reagentes: Todos os solventes e reagentes utilizados apresentavam grau analítico. Quercetina (Acros Organics) e Rutina (Fluka) foram usados como substâncias químicas de referência. Soluções estoques dos padrões foram preparadas na concentração de 100 µg/mL em metanol.

Avaliação físico-química: As análises para a determinação de perda por dessecação e determinação do teor de cinzas totais, foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). A determinação do teor de extrativos, empregando-se a água como solvente, está de acordo com a técnica descrita em Deutsches (1986). Para a avaliação do teor de resíduo seco, foi produzido um extrato a 2,5% (m/v) em dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, com 9,0 min de agitação e temperatura inferior a 40 °C, utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol na proporção de 1:1:1 (v/v). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Análise fitoquímica preliminar: A droga vegetal foi submetida à análise fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação, característico para cada classe de substâncias estudadas (Harborne, 1998; Schenkel, Gosmann e Athayde, 2011).

Análise cromatográfica: Para o ensaio por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas





placas de alumínio de gel de sílica F254 (Merck®), (100 x 50 mm). O cromatograma foi desenvolvido em câmara saturada, empregando como fase móvel uma mistura de tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v), tendo como substâncias de referência, quercetina e rutina. O EB foi retomado em metanol na concentração de 1,45 mg/mL. Alíquotas do extrato (20 µL) e das soluções padrões (10 µL) foram adicionadas sobre a placa com o auxílio de micropipetas volumétricas, na forma de bandas. A placa foi desenvolvida a uma distância de 80 mm, à temperatura ambiente. Após o desenvolvimento, foi seca em estufa à temperatura de 105 °C, e em seguida pulverizada com difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 a 5% (p/v) em metanol. Após, foi examinada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) para visualização das bandas.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, o EB foi retomado em metanol na concentração de 725 µg/mL. Foi empregado cromatógrafo líquido Thermo® equipado com PDA (photo diode array), detector espectrofotométrico (modelo Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas e degasser integrado (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus), equipado com um loop de 10 µL e controlador de software Chromquest. A temperatura do forno para coluna foi mantida em 25 °C e os cromatogramas foram observados a 210, 254 e 370 nm. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, foram usados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex®, modelo Gemini, porosidade 5 µm. A separação cromatográfica foi realizada utilizando água (fase A) e acetonitrila (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 1,0 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. Após, 5 min para reequilíbrio da coluna com 5% da fase B.

Determinação de flavonoides totais: Medições espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis, modelo PC-1650, com cubetas de quartzo QS. A determinação do teor de flavonoides totais na droga vegetal foi realizada seguindo o método proposto na monografia da calêndula, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, (2010), com algumas modificações. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação do teor de óleos essenciais: A determinação do teor de óleos essenciais foi conduzida de acordo com o método geral proposto para a determinação de óleos voláteis em drogas vegetais (Farmacopeia Brasileira, 2010). A avaliação foi realizada em triplicata.

Análise estatística: A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Software STATISTICA® e Excel®.

Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação físico-química estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas de flores de *T. patula* (n=3).

Especificação	(%) Média ±DP (CV%)
Perda por dessecação	9,35±0,2 (2,14)
Teor de cinzas totais	5,50±0,2 (3,61)
Teor de extrativos	39,54±0,52 (1,32)
Teor de resíduo seco	46,61±0,49 (1,05)

DP= desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em percentagem

A perda por dessecação, ensaio importante para a qualidade de drogas vegetais, refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na espécie. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, com a possibilidade da degradação de constituintes químicos e desenvolvimento de fungos e bactérias (Farias, 2011). De acordo com Simões et al. (2011), o teor máximo de umidade estabelecido para drogas vegetais em diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas em monografias. O valor obtido no ensaio para *T. patula* foi inferior a 14%, indicando que as operações preliminares empregadas no processamento pós-coleta (secagem e armazenamento), foram efetivas quanto à normalização do teor de umidade na droga vegetal. Em estudo realizado por Gazim et al. (2007), com as flores de calêndula, os resultados encontrados foram 11,6% de umidade residual nas flores secas, valor indicado como adequado, pois segundo os autores, o teor de umidade permitido em flores secas deve permanecer entre 8 a 15%. Assim, pode-se afirmar que valores característicos de perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de qualidade para as flores de *T. patula*.

A determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza para verificar impurezas inorgânicas não-voláteis, que podem estar presentes como contaminantes (Farmacopeia Brasileira, 2010). O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (Simões et al., 2011). Isso significa que essa determinação é uma referência de qualidade e caracterização de um vegetal. Assim, a finalidade desse ensaio foi estabelecer o parâmetro de cinzas totais para *T. patula*, visto que o mesmo ainda não foi descrito na literatura. Na análise de cinzas totais o resultado foi 5,50±0,2 (3,61%). Como não existem





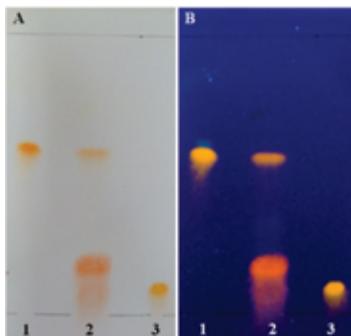
teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, este dado pode nortear futuras averiguações de cinzas totais na espécie.

A determinação do teor de extrativos (TE) é um ensaio utilizado para estimar o potencial de substâncias extraíveis da droga vegetal em água, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. Esta característica individual pode ser considerada como um parâmetro importante na avaliação da qualidade da droga vegetal, pois está relacionada às características sazonais, ou seja, a produção de determinados grupos de metabólitos secundários, durante as estações do ano. As flores de *T. patula* apresentaram um teor de extrativos de $39,54\% \pm 0,52$ (1,32%), que poderá ser utilizado como parâmetro para a avaliação de novos lotes de matéria-prima vegetal. Outro parâmetro avaliado, e considerado como uma característica individual para a droga vegetal é a determinação do teor de resíduo seco (RS), utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol em proporção volumétrica. Neste ensaio o resultado foi de $46,61\% \pm 0,49$ (1,05%).

A triagem fitoquímica foi conduzida para caracterizar a composição química das flores de *T. patula*. Os resultados obtidos na avaliação fitoquímica preliminar corroboraram dados de literatura sobre a presença de compostos fenólicos na espécie, entre eles flavonoides, fenólicos simples e taninos. Foi observada uma maior intensidade nas reações para flavonoides. Essa intensidade pode ser devido à função desses constituintes em proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteger contra insetos, fungos, vírus e bactérias. As reações para os taninos foram menos acentuadas do que para os fenólicos simples.

Todas as identificações na CCD foram baseadas na comparação das distâncias de migração (valores de Rf) e da cor das bandas entre a amostra e os padrões utilizados, antes e após a pulverização da placa com o agente cromogênico específico (Figura 1).

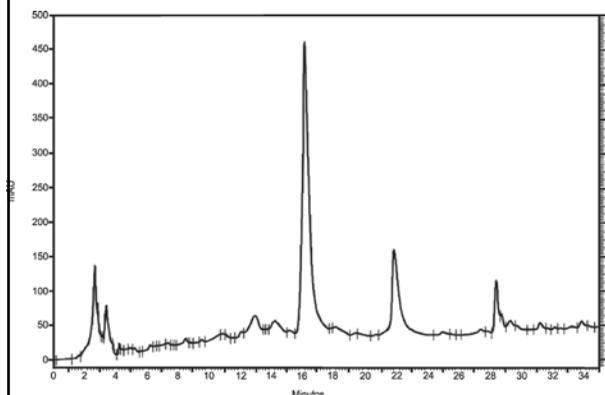
Figura 1. Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) extrato bruto; (3) rutina.



A CCD é uma ferramenta que permite analisar a composição e a pureza do material estudado, auxiliando na identificação de problemas como a adulteração ou falsificação da espécie vegetal de interesse. É um método descrito em monografias de droga vegetais de vários códigos oficiais como ensaio de identificação e autenticidade. De acordo com o perfil cromatográfico obtido e correspondência com os valores de Rf dos padrões verifica-se que EB apresenta manchas correspondentes à quercetina (Rf= 0,58) e rutina (Rf= 0,10) com maiores intensidades, bem como uma terceira banda muito intensa com valor de Rf de 0,18. Assim, a metodologia desenvolvida na obtenção de um perfil cromatográfico por CCD para o EB de flores de *T. patula* mostrou-se adequada para o reconhecimento da espécie, e pode ser utilizado como “*impressão digital*” para a droga vegetal, nas condições avaliadas.

Através do desenvolvimento de um sistema gradiente para a separação dos constituintes químicos do EB por CLAE (Figura 2), foi possível obter uma boa separação dos picos de interesse em 35 min. Por esse sistema foi possível determinar o tempo de retenção da quercetina (15,96 min) através dos dados espectroscópicos do padrão.

Figura 2. Perfil cromatográfico a 210 nm do EB de flores de *T. patula*. Pico correspondente a quercetina em 15,96 min. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5 µm), C-18, coluna (250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), Phenomenex® Gemini C-18; fase móvel: água (fase A) e acetonitrila (fase B); 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. com 5 min para reequilíbrio da coluna; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 210 nm.



Os resultados obtidos com as análises cromatográficas (CCD e CLAE) mostraram que os métodos desenvolvidos são ferramentas simples e sensíveis, e que podem ser prontamente utilizadas como adequados para assegurar a autenticidade de flores de *T. patula*. A presença de flavonoides em *T. patula* foi confirmada pela expressiva intensidade na reação de Shino-





da, e corroborada pelos dados de literatura sobre o isolamento desta classe de metabólitos secundários na espécie (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a). Assim, optou-se pela determinação do teor de flavonoides na droga vegetal. O resultado do ensaio para a determinação de flavonoides totais foi de $5,24\% \pm 0,08$ (1,53%), média muito superior ao encontrado para drogas vegetais ricas em flavonoides descritas na literatura (Santos e Blatt, 1998; Petrovick e Mello, 2000; Borella e Fontoura, 2002). Provavelmente, este dado esteja relacionado com a época de colheita (sazonalidade) e com a intensidade de insolação, visto que a espécie foi cultivada em canteiros ensolarados.

O rendimento de óleo essencial em massa seca foi de $0,15\% \pm 0,007$ (4,66%). Resultado muito semelhante aos 0,14 % (m/m) descrito por Szarka e colaboradores (2006), que avaliaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e tiofenos em flores de *T. patula*.

No Brasil, um dos grandes desafios na utilização das plantas medicinais é a baixa qualidade das matérias-primas vegetais. Os problemas mais frequentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações, que podem ocorrer em qualquer uma das etapas na cadeia produtiva (Farias et al., 1985). Portanto, o estabelecimento de parâmetros de qualidade para as drogas vegetais de uso medicinal é fundamental para a consolidação da Fitoterapia, como prática médica segura e eficaz.

Assim, os resultados obtidos neste estudo desempenham um papel significativo na definição de parâmetros farmacognósticos para a caracterização e identificação de flores de *T. patula*, e contribuem para a obtenção de padrões de qualidade para a espécie vegetal.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação Araucária, Agro Aliança Comercial Atibaia Ltda., distribuidor exclusivo da Syngenta Flowers Brazil pela doação das sementes e a Admir Arantes e Claudio Roberto Novello pela colaboração e auxílio técnico.

Referências

Ananil, K.; Hudson, J.B. Souza, C. Akpaganal, K. Tower, G.H.N. Amasom, J.T. e Gbeasson, M. 2000 - Investigation of medicinal plants of togo for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, v.38, p. 40-45.

Borella J.C.; Fontoura, A. 2002 -. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.12, p.63-67.

Buena, A.P.; Diez-Rojo, M.A. Lopez-Perez, J.A. Robertson, L. Escuer, M. Bello, A. 2008 - Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of Meloidogyne. *Crop Protection*, v.27, p.96-100.

Chadha, YR. 1976 -. *Tagetes* Linn (Compositae). *The Wealth of India*, v.10, p.109-112.

De Las Rivas, J. 1989 - Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *Journal of Chromatograph*, v.464, p.442-447.

Deineka, V.I.; Sorokopudov, V.N. Deineka, L.A. Tret'yakov, M.Y. 2007 - Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of *xanthophylls*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v.41, p.540-542

Deutsches Arzneibuch. 1986 - 9 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche.

Dharmagadda V.S.S.; Naik, S.N. Mittal, P.K. Vasudevan P. 2005 - Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, v.96, p.1235-1240.

Faizi, S.; Naz, A. 2002 - Jafrine, a novel and labile β -carboline alkaloid from the flowers of *Tagetes patula*. *Tetrahedron*, v.58, p.6185-6197.

Faizi, S.; Siddiqi, H. Bano, S. Naz, A. Mazhar, K. Nasim, S. Riaz, T. Kamal, S. Ahmad, A. Khan, A.S. 2008 - Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: preparation of patuletin derivatives. *Pharmaceutical Biology*, v.46, p.309-320.

Faizi, S.; Dar, A. Siddiqi, H. Naqvi, S. Naz, A. Bano, S. Lubna, A. 2011a -. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharmaceutical Biology*, v.49, p.516-525.

Faizi, S.; Fayyaz, S. Bano, S. Iqbal, E.Y. Lubna, A. Siddiqi, H. Naz, A. 2011b - Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zaeae* infective stage larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.9080-9093.

Farias M.R.; Schenkel, E.P. Bergold, A.M. Petrovick, P.R. 1985 - O problema na qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v.1, p.73-82.

Farias M.R. 2011 - Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões C.M.O.; Schenkel E.P.; Gosmann G.; Mello J.C.P.; Mentz L.A.; Petrovick P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, p. 199-222. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC.





- Farmacopeia Brasileira. 2010 - 5. ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.
- Gazim Z.C.; Ferreira G.A.; Rezende C.M.; Nakamura C.V.; Dias Filho B.P.; Cortez D.A.G. 2007 - Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p.118-121.
- Harborne, J.B. 1998 - *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed., London: Chapman and Hall.
- Kasahara, Y.; Yasukawa, K. Kitanaka, S. Khan, T.M. Evans, F.J. 2002 - Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytotherapy Research*, v.16, p.217-222.
- Mares, D.; Tosi, B. Poli, F. Andreotti, E. Romagnoli, C. 2004 - Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, v.159, p.295-304.
- Mello, J.C.P.; Petrovick, P.R. 2000 - Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). hydroalcoholic extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.19, p.213-215.
- Piccaglia, R.; Marotti, M. Grandi, S. 1998 -. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *Tagetes erecta*. *Industrial Crops and Products*, v.8, p.45-50.
- Rajasekaran, T.; Ravishankar, G.A. Reddy, B.O. 2004 - In vitro growth of *Tagetes patula* L. hairy roots, production of thiophenes and its larvicidal activity. *Indian Journal of Biotechnology*, v.3, p.92-96.
- Restello, R.M.; Menegatt, C. Mossi, A.J. 2009 - Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.53, p.304-307.
- Romagnoli, C.; Bruni, R. Andreotti, E. Rai, M.K. Vicentini, C.B. Mares, D. 2005 - Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capita from wild Indian *Tagetes patula* L. *Journal Protoplasma*, v.225, p.57-65.
- Rondón, M.; Velasco, J. Hernández, J. Pecheneda, M. Rojas, J. Morales, A. Carmona, J. Díaz, T. 2006 - Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela andes. *Revista Latinoamericana de Química*, v.34, p.32-36.
- Saleem, R.; Ahmad, M. Naz, A. Siddiqui, H. Ahmad, S.I. 2004 - Hypertensive and toxicological study of citric acid and other constituents from *Tagetes patula* roots. *Archives of Pharm. Research*, v.27, p.1037-1042.
- Santos, M.D.; Blatt, C.T.T. 1998 -. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, v.21 n.2, p.135-140.
- Schenkel, E.P.; Gosmann, G. Athayde, M.L. 2011 - Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, p. 711-740.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2011 - *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Editora UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.
- Szarka, S.Z.; Hethelyi, E. Lemberkovics, E. Kuzovkina, I.N. Banyai, P. Szoke, E. 2006 - GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, v.63, p.S67-S73.
- Vasilenko Y.K.; Bogdanov, A.N. Frolova, L.M. Frolov, A.V. 1990 - Hepatoprotective properties of preparations from spreading marigold. *Khimico Farmatsevticheskii Zhurnal*, v.24, p.53-56.
- Vasudevan, P.; Kashyap, S. Sharma, S. 1997 - Tagetes: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, v.62, p.29-35.
- Wells, C.; Bertsch, W. Perich, M. 1993 - Insecticidal volatiles from the marigold plant (genus *Tagetes*). Effect of species and sample manipulation. *Chromatographia*, v.35, p.209-215.



Anatomia Foliar de *Ocimum basilicum* L. “Genovese” (Lamiaceae)

Leaf Anatomy of *Ocimum basilicum* L. “Genovese” (Lamiaceae)

Marcos Roberto Furlan¹, Elisa M. Aoyama^{2*}, Alexandre Indriunas³, Cláudia Mauro⁴

¹Departamento de Ciências Agrárias, Universidade de Taubaté – UNITAU, Rua 4 de março, 432, centro, 12020-270, Taubaté, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Rodovia BR 101 Norte km 60, Bairro Litorâneo, 29932-540, São Mateus, ES, Brasil.

³Centro Universitário SENAC - Campus Santo Amaro, Av. Engenheiro Eusébio Stevaux, 823, Santo Amaro, CEP 04696-000, São Paulo, SP.

⁴Facis/Ibehe, Rua Bartholomeu de Gusmão, 86, Vila Mariana, 04111-020 São Paulo, SP, Brasil.

*Correspondência: *e-mail: elisaoyama@yahoo.com.br

Palavras chave:

estrutura foliar; tricomas; manjeriço.

Keywords:

leaves structure; trichomes; basil.

Resumo

O controle botânico de uma espécie, principalmente o anatômico, é imprescindível para as indústrias farmacêuticas e de condimentos, porém, ainda são poucas as espécies destinadas a esses usos que tiveram suas características analisadas. Dentre elas as espécies de *Ocimum*, que apresentam complexidade devido à ampla ocorrência de variedades e cultivares. Este trabalho teve por objetivo caracterizar anatomicamente as folhas de *Ocimum basilicum* L. “Genovese” manjeriço-italiano. Folhas das plantas cultivadas na UNITAU, Taubaté, SP, foram coletadas e submetidas a técnicas usuais de histologia. Em vista frontal, células epidérmicas de paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces; são anfiestomáticas, com estômatos do tipo diacítico; apresentam numerosos tricomas tectores, unisseriados e pluricelulares, e glandulares sésseis, com mais frequência na região da nervura central, e glandulares peltados e capitados. O pecíolo, em vista transversal, tem secção côncavo-convexa; epiderme unisseriada, cutícula lisa e delgada. Na epiderme superior, foram observados numerosos tricomas tectores unisseriados, uni a tricelulares, e glandulares, com pedicelo e glândula capitada unicelulares. O feixe vascular colateral em forma de arco raso aberto; e os elementos de vaso do metaxilema e protoxilema estão enfileirados, com poucas fibras esclerenquimáticas. Os caracteres observados complementam as informações para a espécie, descrevendo dados inéditos para o cultivar, possibilitando uma diagnose mais acurada e eficiente.



Abstract

The botanical control of species especially anatomical is necessary for the pharmaceutical and spices industries. Nevertheless, there are few species that had their characteristics analyzed. Among these aim *Ocimum* species, which have a complexity because of the widespread occurrence of varieties and cultivars. This work aimed to characterize anatomically the leaves of *Ocimum basilicum* L. 'Genovese'. Leaves of plants grown at UNITAU, Taubate, SP, were collected and subjected to the usual techniques of histology. The leaves blades have in front view, epidermal cells sinuous anticlinal walls on both sides, amphistomatic, with diacytic stomata; uniseriate and multicellular trichomes, and sessile glandular trichomes, most frequently in the midrib region, and peltate and capitate glandular trichomes. The petiole, in transverse view, has a concave-convex section, uniseriate epidermis, cuticle smooth and thin, and at the upper epidermis numerous uniseriate trichomes were observed, as well as uni-tricellular and glandular trichomes with unicellular pedicel and unicellular capitate glands, collateral vascular bundle is present in the form of shallow open arc with few sclerenchyma fibers. The set of anatomical characters observed in this study complement the information for the species *Ocimum basilicum*, describing unpublished data to the cultivar. This enables a more accurate and efficient diagnosis of the cultivar.

Introdução

Para o controle de qualidade de uma espécie utilizada na indústria de fármacos e condimentos é imprescindível que seja feito pelo menos uma das etapas da análise farmacognóstica, à caracterização das amostras vegetais (organoléptica, macroscópica e microscópica), as quais podem auxiliar nas determinações da autenticidade dos produtos e também podem ser determinantes para diferenciá-la de outras espécies, inclusive as que são semelhantes externamente ou botanicamente próximas.

Conforme Mentz e Bordignon (2004), as pesquisas que fornecem características botânicas comparativas contribuem para a detecção de espécies adulterantes. (Leite et al. 2007), trabalhando com *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae), observam que os estudos que realizaram, relacionados à anatomia vegetal desta espécie, contribuíram para ampliar e aprofundar as informações contidas nas Farmacopeias Brasileiras (1929, 1959), acrescentando que as características estruturais contribuem para a identificação da espécie e fornecem parâmetros que poderão ser aplicados, futuramente, no controle de qualidade e farmacognóstico.

Apesar da importância desses estudos, ainda são poucas as plantas medicinais ou condimentares, de alto valor econômico, que tiveram suas características anatômicas analisadas, como, por exemplo, as espécies do gênero *Ocimum* L., pertencente à família Lamiaceae.

Com relação a esse gênero *Ocimum*, (Blank et al. 2010) apontam que compreende em torno de 3.200 espécies, originárias do sudeste asiático e da África Central, e que se adaptaram muito bem aos solos brasileiros. Dentre os cultivares e as variedades do gênero *Ocimum*, de maior aplicação nas indústrias,

encontra-se o *Ocimum basilicum* L. "Genovese", o manjeriço-italiano, que, apesar de ser um dos cultivares de maior importância econômica, carece de informações relevantes sobre seus aspectos anatômicos.

A identificação botânica das espécies de *Ocimum* é extremamente complicada, devido à ampla ocorrência de variedades, além de diferenças na composição química de seus óleos essenciais (Ehlert et al., 2006). (Labra et al. 2004) justificam que, devido à interferência do homem com o cultivo, a seleção e a hibridação, no gênero, ocorre grande variação morfológica entre as suas diferentes espécies.

Estudos sobre a anatomia desta espécie trarão contribuições para diferenciar ou auxiliar na comprovação das identificações das espécies, dos cultivares ou das variedades do gênero *Ocimum*. Portanto, objetivou-se, no presente estudo, a caracterização anatômica das folhas de *Ocimum basilicum* L. "Genovese".

Material e Métodos

Para a análise foram coletados, na Fazenda Experimental do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté, Taubaté - SP, 10 exemplares do cultivar "Genovese", em pleno florescimento. Essas plantas foram cultivadas a partir de sementes importadas da Itália, cadastrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Registro Nacional de Cultivar (RNC) sob o número 09704.

Para o estudo anatômico foram analisadas folhas do manjeriço-italiano no Laboratório de Botânica da Faculdade Oswaldo Cruz, em São Paulo, SP.

Após a coleta, as folhas frescas, retiradas do 2º e 3º nós, do manjeriço-italiano foram colocadas em solução de FAA (formaldeído: ácido acético: álcool etílico





70%, 2:1: 18, v/v), de acordo com Johansen (1940), por 48 horas e, posteriormente, transferidos para etanol 70%.

Com o auxílio de isopor e com uma lâmina de aço inoxidável, foram realizadas secções transversais a mão livre na região mediana do limbo e do pecíolo. Em seguida, as secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 30% (Kraus e Ardium, 1997), lavadas com água destilada e, imediatamente, fez-se a coloração em solução alcoólica de azul de alcian a 1% e solução alcoólica de fucsina básica a 1% (Luque, Souza e Kraus, 1996). As secções foram montadas em lâminas temporárias com glicerina a 50% (Purvis, Collier e Walls, 1964).

Cortes paradérmicos de ambas as faces do limbo, na região mediana, foram realizados a mão livre, para a observação de estômatos, seguindo o mesmo procedimento de clarificação e coloração.

As lâminas foram analisadas ao microscópio fotônico, e as imagens obtidas no microscópio binocular Coleman, acoplado à câmara clara (modelo XSZ-107 BN), e as fotos na máquina Minolta a 507 SI, Asa 100, ambos com projeção de escala micrométrica. A descrição seguiu as convenções estabelecidas em Metcalfe e Chalk (1979).

Resultados e Discussão

A folha de *Ocimum basilicum* L. "Genovese", em vista frontal, apresenta células epidérmicas, com paredes anticlinais sinuosas, nas faces adaxial e abaxial. As folhas são anfiestomáticas, com estômatos do tipo diacítico (figura 1), com mais abundância na face abaxial. Segundo Metcalfe e Chalk (1979), folhas anfiestomáticas é uma característica comum às Lamiaceae. Darrah (1974) relata que, com relação à presença de estômatos na espécie *O. basilicum*, estes são distribuídos em ambas as faces da folha, enquanto que, nas espécies *O. sanctum*, *O. canum* e *O. kilimandscharicum*, são encontrados somente na face abaxial.

Quanto ao tipo, Ogunkunle e Oladele (1997), em estudo sobre o complexo estomático de espécies nigerianas de *Ocimum basilicum*, observaram estômatos dos tipos diacítico, anisocítico e anfidiacítico. (Martins et al., 2009) observaram, em *O. gratissimum*, estômatos do tipo anomocítico. Porém, Olowokudejo e Pereira-Sheteolu (1988) apontam que o tipo característico do gênero *Ocimum* é o anfidiacítico.

Na superfície são observados numerosos tricomas tectores, podendo ser unisseriados e pluricelulares, além de tricomas glandulares sésseis encontrados com mais frequência na região da nervura central (figura 3), e tricomas glandulares peltados e capitados.

Conforme citado por Metcalfe e Chalk (1979), é comum entre as espécies dessa família, a presença de vários tipos de tricomas na folha, sendo considerada uma característica de grande valor para a identificação taxonômica, como já observada em estudos com espécies de *Mentha* (Martins, 2002; Deschamps et al., 2006) e com espécies de *Cunila* (Toledo, Alquimi e Nakashima, 2004; Xifreda e Mallo, 2006).

(Werker et al., 1993) observaram, em *O. basilicum*, tricomas glandulares de dois tipos, os capitados, que são pequenos, com uma célula na base, uma no pedúnculo e uma ou duas constituindo a cabeça; e peltados com base e pedúnculo semelhantes ao anterior, mas com a cabeça formada por 4 células. Com relação aos numerosos tricomas glandulares, Hay e Svoboda (1993) observaram que são os responsáveis pelo armazenamento e a síntese dos compostos terpenícos.

Youngken (1951) observa que os elementos mais importantes para o reconhecimento de *O. basilicum* são os tricomas não glandulares uni ou bicelulares, com ampla base, extremidade pontiaguda e cutícula finamente verrugosa, assim como os glandulares com cabeças composta por 2 a 4 células.

A lâmina, em secção transversal, apresentou epiderme unisseriada, constituída de células retangulares, periclinamente muito compactadas (figuras 2 e 3), recobertas por uma cutícula lisa e extremamente delgada em ambas as faces. O mesofilo é dorsiventral, constituído por uma a duas camadas de parênquima paliçádico e duas a quatro camadas de parênquima lacunoso (figuras 2 e 3).

Na região da nervura central, há um feixe colateral, em forma de arco (figura 2); e constataram-se 3 a 4 camadas de colênquima angular (figura 3). Satil e Kaya (2007) e Satil, Ünal e Hopa, (2007) observaram organização anatômica semelhante para outras espécies de Lamiaceae.

O pecíolo, em vista transversal, tem secção côncavo-convexa; epiderme unisseriada, constituída por células muito pequenas e compactadas em relação às demais, com formato isodiamétrico; e, na epiderme superior, foram observados numerosos tricomas tectores unisseriados, uni a tricelulares, e tricomas glandulares (menos frequentes), com pedicelo unicelular e glândula capitada unicelular; e não foram observados na epiderme inferior (figura 4), portanto, a face abaxial é glabra.

Logo abaixo da epiderme foram encontradas de 2 a 3 camadas de colênquima angular; o córtex do pecíolo é constituído por parênquima homogêneo isodiamétrico, com meatos (figura 4); não foram observados cristais de oxalato de cálcio.

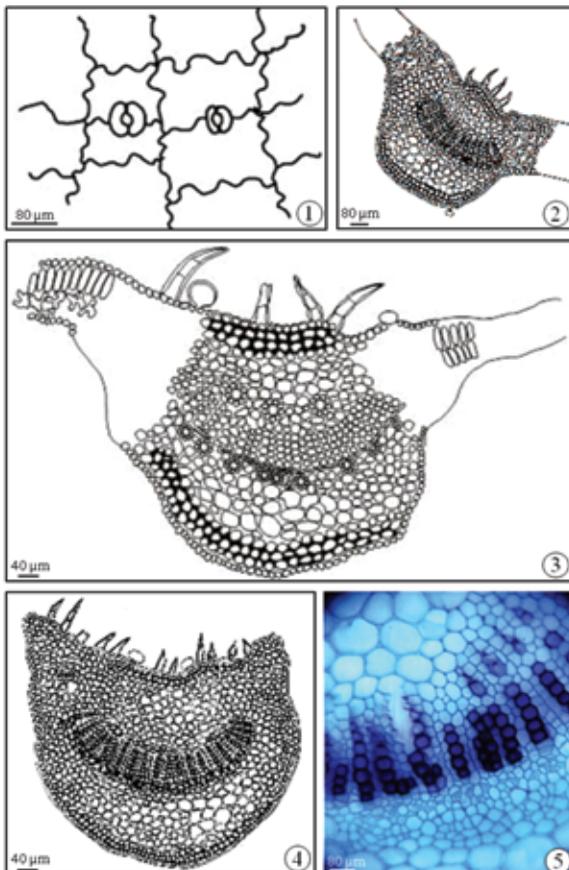




O feixe vascular colateral se apresenta em formato de arco raso aberto; e os elementos de vaso do metaxilema e protoxilema estão enfileirados (figura 5), com raios parenquimáticos, formados por 1 a 2 fileiras de células, em intervalos regulares (figura 5), com poucas fibras esclerenquimáticas.

As características observadas de modo geral são muito semelhantes àquelas descritas por (Costa et al., 2009), para *Ocimum gratissimum*, e de Duarte e Lopes (2007), para *Plectranthus neochilus*. Segundo Metcalfe e Chalk (1979), a estrutura vascular do pecíolo também apresenta importância taxonômica.

Figuras 1-5. Secções foliares de *Ocimum basilicum* L. "Genovese". 1 – vista frontal da epiderme da face abaxial evidenciando os estômatos diacíticos; 2 a 5 – secções transversais, 2 - limbo; 3 – nervura central; 4 – pecíolo; 5 – detalhe do feixe vascular do pecíolo.



Considerações Finais

As comparações das descrições anatômicas obtidas ficam comprometidas, pois não foram encontradas referências específicas sobre a espécie *Ocimum basilicum* L. "Genovese". O conjunto de caracteres

anatômicos observados no presente trabalho complementam as informações para a espécie *Ocimum basilicum*, descrevendo dados inéditos para *Ocimum basilicum* L. "Genovese". Isto possibilita uma diagnose mais acurada e eficiente desta cultivar. A atribuição da relevância desses caracteres, como valor taxonômico para este cultivar, requer estudos estruturais adicionais, relativos a uma investigação ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura da superfície e a comparação com outras cultivares e variedades de *Ocimum basilicum* L.

Referências Bibliográficas

- Blank, A. F.; Souza, E. M.; Paula, J. W. A.; Alves, P. B. 2010 - Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. *Horticultura Brasileira*, v.28, p. 305-310.
- Costa, V. B. S.; Corrêa, P. G.; Dutra, M.; Chagas, M. G. S.; Pimentel, R. M. M. 2009 - Anatomia da folha e do caule de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) sob condições naturais. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Darrah, H. H. 1974 - Investigation of the cultivars of the basil (*Ocimum*). *Economic Botany*, v.28, p.63-7.
- Deschamps, C.; Zanatta, J. L.; Roswalka, L.; Oliveira, M. C.; Bizzo, H. R.; Alquini, Y. 2006 - Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha cf. aquática* L. *Ciência e Natura*, v.28, p. 23-34.
- Duarte, M. R.; Lopes, J. F. 2007 - Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., Lamiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p. 549-556.
- Ehlert, P. A.; Blank, A. F.; Camêlo, L. C.; Alves, P. B.; Menezes, A. P. P. 2006 - Variação química de seis genótipos de manjeriço no Estado de Sergipe. 46º Congresso Brasileiro de Oleicultura: diversificação e industrialização na horticultura, Goiás.

Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 1929. Companhia Editora Nacional. São Paulo:

Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 1959. 2. ed. Siqueira. São Paulo.

Hay, K. M.; Svoboda, K. P. 1993 - Botany. In: Hay, K. M., Waterman, P. G. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry, and production*. Longman, Scientific & Technical, Harlow.

Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. Mc Graw Hill. New York.





- Kraus, J. E.; Arduim, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR-Editora Universidade Rural. Seropédica.
- Labra, M.; Miele, M.; Ledda, B.; Grassi, F.; Mazzei, M.; Sala, F. 2004 - Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*, v.167, p. 725-731.
- Leite, J. P. V.; Pimenta, D. S.; Gomes, R. S. D. L.; Dantas-Barros, Q. M. 2007 - Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) - Alismataceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p. 242-248.
- Luque, R.; Sousa, H. C.; Kraus, J. E. 1996 - Métodos de coloração de Roeser (1972) – modificado – e Kropp (1972) visando a substituição do azul de Astra por azul de Alciação 8GS e 8GX. *Acta Botanica Brasilica*, v. 10, p. 199-212.
- Martins, M. B. G. 2002 - Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata x suaveolens* (Lamiaceae). *Bragantia*, v.61, p. 205-218.
- Martins, J. R.; Alvarenga, A. A.; Castro, M. C.; Silva, A. P. O.; Oliveira, C.; Alves, E. 2009 - Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivados sob malhas coloridas. *Ciência Rural*, v.39, p. 82-87.
- Mentz, L. A.; Bordignon, S. A. L. 2004 - Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: Simões, C. M. O; Schenkel, E.P.; Gosman, G.; Palazzo de Melo, J.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, p. 211-227. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis.
- Metcalf, C. R.; Chalk, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. vol. 1. 2. ed. Clarendon Press. Oxford.
- Ogunkunle, A. T. J.; Oladele, F. A. 1997 - Stomatal Complex types in some nigerian species of *Ocimum* L., *Hyptis* Jacq. and *Tinnea* Kotsch and Peyr (Lamiaceae). *Bioscience Research Communications*, v.9, p. 93-100.
- Olowokudejo, J. D.; Pereira-Sheteolu, O. 1988 - The taxonomic value of epidermal characters in the genus *Ocimum* (Lamiaceae). *Phytomorphology*, v.38, p. 147-158.
- Purvis, M.; Collier, D. C.; Walls, D. 1964. *Laboratory techniques in botany*. Butterworths. London.
- Satil, F.; Kaya, A. 2007 - Leaf anatomy and hairs of Turkish *Satureja* L. (Lamiaceae). *Acta Biologica Cra-coviensia, Series Botanica*, v.49, p. 67-76.
- Satil, S.; Ünal, M.; Hopa, E. 2007 - Comparative morphological and anatomical studies of *Hymenocrate bituminosus* Fisch. & C.A. Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, v.31, p. 269-275.
- Toledo, M. G. T.; Alquimi, Y.; Nakashima, T. 2004 - Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, p. 487-493.
- Werker, E.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N.; Katzir, I. 1993 - Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annals Botany*, v.71, p.43-50.
- Xifreda, C. C.; Mallo, A. C. 2006 - El género *Cunila* (Lamiaceae, Mentheae) em Argentina. *Darwiniana*, v.44, p. 298-308.
- Youngken, H. W. 1951. *Tratado de Farmacognosia*. Editorial Atlante. Cidade do México.

Recebido em outubro de 2012. Aceito em Janeiro de 2013



Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae)

***Maria Dutra Behrens; Carla J. Moragas Tellis; Maria do Socorro Chagas**

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ – Laboratório de Química de Produtos Naturais. Rua Sizenando Nabuco, 100 – Manguinhos CEP. 21041-250 – Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

***Correspondência:** *e-mail: mbehrens@far.fiocruz.br

Palavras chave:

Arrabidaea, cajiru, antocianidinas, antiinflamatório, cicatrização de feridas.

Keywords:

Arrabidaea, cajiru, anthocyanidins, anti-inflammatory, wound healing.

Resumo

As folhas de *Arrabidaea chica* são empregadas popularmente no tratamento de cólica intestinal, diarreia, anemia, inflamação uterina e de feridas cutâneas como cicatrizante. Tradicionalmente são usadas também na produção de matéria corante devido à presença de 3-desoxiantocianidinas, constituintes químicos característicos da espécie. *A. chica* é descrita no presente trabalho em termos de botânica, farmacognosia, farmacologia e toxicologia com vistas ao desenvolvimento de um fitoterápico.

Abstract

The leaves of *Arrabidaea chica* are popularly used in the treatment of intestinal pain, diarrhea, anemia, uterine inflammation and for the healing of skin wounds. Traditionally they are also used to produce a red pigment derived from the 3-deoxyanthocyanidines, characteristic of the species. *A. chica* is here described in terms of its botany, pharmacognosy, pharmacology and toxicology, with a view to developing a phytherapeutic medicine.



Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl. Fotografia de A. Gentry, do acervo de plantas tropicais do Missouri Botanical Garden



Taxonomia

Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot pertence à família Bignoniaceae, que compreende cerca de 100 gêneros e 800 espécies predominantemente neotropicais (Fischer et al., 2004). Taxonomicamente, a espécie foi classificada por Cronquist (1981) como pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Scrophulariales, família Bignoniaceae, gênero *Arrabidaea*.

Sinonímia

Adenocalyma portocalymma A. Stahl; *Arrabidaea acutifolia* A. D C; *Arrabidaea cuprea* (Charm.) Bornm.; *Arrabidaea larensis* Pittier; *Arrabidaea rosea* D C; *Bignonia chica* Humb. & Bonpl.; *Bignonia cuprea* Cham., *Bignonia erubescens* S. Moore; *Bignonia triphylla* Willd. Ex D C; *Lundia chica* (Humb. & Bonpl.) Seem.; *Temnocydia carajura* Mart. Ex D C.; *Vasconcellia acutifolia* C. Mart. Ex D C.

Nomes comuns

Crajiru, carajiru, carajuru, cajuru, crejeru, carajunu, chica, china, cipó-cruz, coá-piranga, cuica, guajuru, guajuru-piranga, guarajuru, oajuru, oajuru-piranga, pariri, paripari, crejer (Mors et al., 2002; Van den Berg, 1993; Von-Poser, 2000; Corrêa, 1984).

Descrição botânica

Descrição macroscópica

A espécie apresenta-se como uma liana lenhosa, arbustiva ou arbórea e também trepadeira (Joly, 1993). Possui folhas compostas, bi ou trifolioladas, penaticompostas do tipo imparipenadas, de folíolos glabros, oblongo-lanceolados, com glândulas esparsas e com fitotaxia tipo oposta dística. Sua cutícula é estriada e os estômatos são anisocíticos. As flores são campanuladas róseo-lilacinas dispostas em panículas terminais, medindo entre 18 e 20 cm de comprimento. O fruto tem o aspecto de uma cápsula linear, alongada, aguda em ambos os lados, glabra e castanho-ferrugínea, com uma nervura média saliente nas valvas e sementes ovóides (Albuquerque, 1980; Corrêa, 1984; Sandwich, 1974; Vázquez-Yanes & Segovia, 1993; Vieira & Silva, 2002). A fixação ao substrato é feita através de folhas modificadas denominadas gavinhas, consideradas órgãos de suporte do vegetal (Corrêa, 1984). O caule apresenta estruturação reticulada de parênquima e esclerênquima junto aos tecidos condutores e aos cristais prismáticos na medula (Puhl et al., 2007).

Descrição microscópica

De acordo com Alves (2008), o corte transversal do caule evidencia as porções da casca e cilindro central em estrutura secundária. Ambos apresentam-se envolvidos por uma periderme que contém algumas lenticelas em sua superfície além de um felogênio bem característico e feloderme. Estão presentes ainda algumas fibras isoladas e calotas de fibras no parênquima cortical externo, enquanto o parênquima cortical interno apresenta faixas esclerenquimáticas contínuas entre as células do parênquima. O floema secundário apresenta-se estreito, comprimido entre o parênquima cortical interno e o xilema secundário. O câmbio vascular mostra grande diferenciação entre o floema e a camada mais externa de crescimento do xilema. As folhas em corte transversal apresentam pecíolo com formato plano-convexo ou levemente côncavo-convexo em toda a sua extensão, epiderme uniestratificada apresentando tricomas e cutícula delgada. O colênquima angular é observado subjacente à epiderme em toda a extensão do pecíolo. As folhas são hipoestomáticas e dorsiventrals, com mesófilo heterogêneo, formado por dois estratos de parênquima paliçádico abaixo da epiderme adaxial e por seis estratos de parênquima lacunoso abaixo da epiderme abaxial.

Variedades

A espécie apresenta diversas variedades, algumas descritas na literatura. São estas: *acutifolia* (*Arrabidaea acutifolia* DC., *Arrabidaea rosea* DC., *Temnocydia carajuru* M., *Vasconcellia acutifolia* M.) de folhas maiores (até 15 cm de comprimento), com reticulado purpúreo e corola menor (até 2cm); *angustifolia*, de porte menor, folhas lanceoladas e menores (até 5cm de comprimento); *cuprea* (*Bignonia cuprea* Cham.), de folhas menores, estreitas, curto-obtusos-acuminadas, com reticulado cor de cobre na página inferior; *thyrsioidea* (*Bignonia chica* HBK., *Bignonia thyrsioidea* DC.), de folhas maiores, agudíssimas (até 10 cm de comprimento e 6 cm de largura), panícula maior e corola de 3cm (Corrêa, 1984).

Distribuição geográfica

Os principais centros de distribuição geográfica de *Arrabidaea chica* são o continente africano (Von Poser et al., 2000) e as Américas Central, desde o México, Belize, Guianas, Porto Rico e Trinidad e Tobago, e do Sul, destacando-se o Peru e Brasil Central, com prevalência desde a Região Amazônica até o Rio Grande do Sul, incluindo regiões de Cerrado e de Mata Atlântica (Lorenzi et al., 2002; Paullet et al., 2003; Sandwich & Hunt, 1974).





Parte usada

Folhas (frescas ou secas)

Propriedades organolépticas

Coloração rósea a avermelhada, sabor levemente adstringente.

Uso popular e tradicional

As folhas de *Arrabidaea chica* são empregadas popularmente no tratamento de cólica intestinal, diarreia com sangramento, anemia, inflamação uterina e de feridas cutâneas como cicatrizante. Na medicina tradicional são usadas também no tratamento de enfermidades da pele como psoríase, impingem, úlceras e piodermites. Segundo relatos, algumas tribos indígenas faziam uso do infuso das folhas no tratamento da conjuntivite aguda e sob a forma de cataplasma contra o ataque de insetos. *A. chica* é utilizada na Amazônia como anti-inflamatória, adstringente e na desinfecção das partes íntimas da mulher (Borrás, 2003; Chapman et al., 1927; Corrêa, 1984; Oliveira et al., 2009; Kalil Filho et al., 2000). No Maranhão, é usada no controle da pressão arterial (Rego, 1995). As folhas de *A. chica*, ricas em pigmentos de coloração vermelho-escuro a vermelho-tijolo, produzem matéria corante empregada no tingimento de fibras artesanais, enfeites, utensílios e vestuários, bem como para fazer tatuagens, como repelente de insetos e protetor solar. Também usada por comunidades indígenas na sua pintura corporal. Os pigmentos obtidos das folhas de *A. chica* tiveram alto valor comercial em épocas anteriores. Atualmente, vários cosméticos e produtos contendo esses pigmentos são industrializados e comercializados, principalmente na região do norte do Brasil. Tais produtos exploram a cor vermelho-acastanhada dos extratos das folhas da espécie, bem como as suas propriedades anti-infectante e adstringente (Schiozer, 2012).

Química

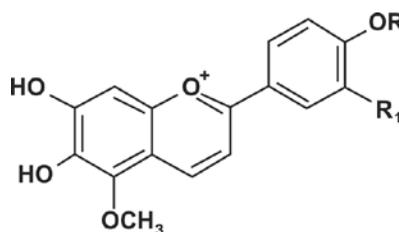
O gênero *Arrabidaea* é conhecido como fonte de flavonóides, particularmente antocianidinas. *Arrabidaea chica*, por exemplo, caracteriza-se pela ocorrência de 3-desoxiantocianidinas. Na espécie foram identificados também outros fenólicos, antraquinonas, esteróides, triterpenos e saponinas (Harborne, 1967; Takemura et al., 1995; Zorn et al., 2001; Alcerito et al., 2002; Devia et al., 2002; Pauletti et al., 2003).

3-desoxiantocianidinas

Chapman e cols. (1927) foram os primeiros a estudar as folhas de *Arrabidaea chica*, isolando dois pigmen-

tos denominados carajurina (1) (6,7-diidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio) e carajurona (2) (6,7,4'-triidroxi-5-metoxi-flavílio), cuja estrutura foi completamente elucidada por Zorn e cols. (2001), como os principais responsáveis por conferir coloração avermelhada característica dos extratos deste vegetal. Harbone (1967) e Scogin (1980) propuseram que a ocorrência na família Bignoniaceae destes pigmentos raros era provavelmente restrita à espécie *A. chica*. A partir de suas folhas, Zorn e cols. (2001) isolaram e caracterizaram espectrometricamente quatro antocianidinas (Figura 1): carajurina; carajurona; 6,7,3'-triidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (3) e 6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavílio (4). O isolamento das 3-desoxiantocianidinas 1, 3 e 4, sua determinação estrutural, incluindo a análise de carajurina por cristalografia de raios-x, também foi efetuado por Devia e cols. (2002).

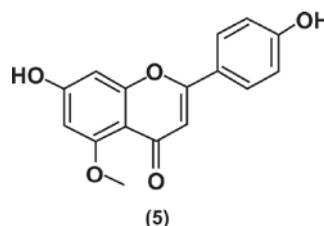
Figura 1. Estruturas químicas das substâncias 1 a 4.

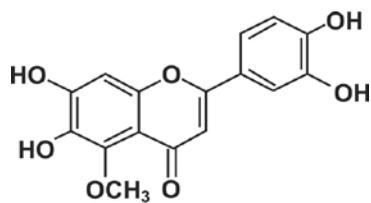


	R	R1
1	CH3	H
2	H	H
3	CH3	OH
4	H	OH

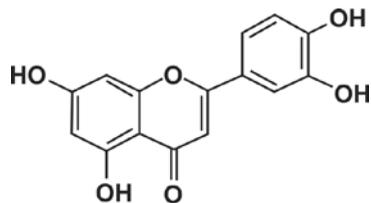
Flavonas

Takemura (1993) isolou das folhas de *Arrabidaea chica* o flavonóide thevetiaflavona (5) (4',7-diidroxi-5-metoxiflavona) e, posteriormente, carajuflavona (6) (6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxiflavona) e luteolina (7) (Takemura et al., 1995). Barbosa e cols. (2008) relataram o isolamento de 4'-hidroxi-3,7-dimetoxi-flavona (8) e vicenina-2 (9) e Zorn e cols. (2001) determinaram a presença de acetina (10).

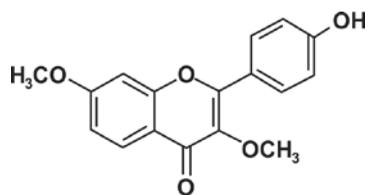




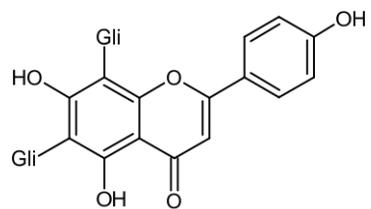
(6)



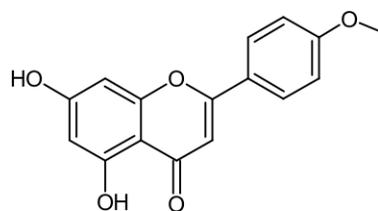
(7)



(8)



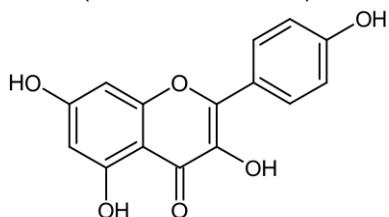
(9)



(10)

Flavonóis

Kaempferol (11) foi também isolado das folhas de *Arrabidaea chica* (Barbosa et al., 2008)



(11)

Farmacologia

Atividade antianêmica

Embora a *Arrabidaea chica* seja utilizada pela população como antianêmica, os trabalhos de Oliveira e cols. (1995) mostraram que esta ação terapêutica ainda não foi totalmente comprovada cientificamente. Um estudo realizado em ratos Wistar demonstrou que após a administração diária por via oral do extrato por um período de 60 dias, os animais apresentaram aumento dos valores de micro-hematócrito (11,3%), hemoglobina (22,4%), hematimetria (14,4%) e leucometria (38,9%) em relação aos mesmos parâmetros medidos antes do tratamento. Estes valores, no entanto, diminuíram significativamente após a interrupção do tratamento. Desta forma é possível concluir, de acordo com Arakian (1998), que o ferro presente nas folhas de *A. chica* não é assimilável (Cartágenes, 2009).

Atividade anti-hipertensiva

Estudos *in vitro*

Os testes *in vitro* realizados em modelo de artérias mesentéricas de ratos Wistar demonstraram o efeito anti-hipertensivo e vaso-relaxante do extrato etanólico a 70% (v/v) das folhas de *Arrabidaea chica* (10-500 µg/mL). Os resultados sugerem que este efeito deve ser mediado por uma via independente de endotélio que parece envolver o bloqueio de influxo de cálcio (Ca²⁺) na membrana citoplasmática com atividade sobre os receptores de rianodina (Cartágenes, 2009).

Estudos *in vivo*

Ratos Wistar espontaneamente hipertensos foram utilizados na comprovação da atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico a 70% (v/v) das folhas de *Arrabidaea chica* (10-500 µg/mL). A atividade observada, segundo a autora, deveu-se à diminuição da resistência vascular periférica com provável envolvimento do influxo de Ca²⁺ através dos canais tipo L operados por voltagem (Cartágenes 2009).

Atividade anti-hepatotóxica

Estudos *in vitro*

O efeito do extrato das folhas de *Arrabidaea chica* (0,25-1,25 mg/mL) no metabolismo hepático, avaliado por De Souza e cols. (2009), mostrou ser o de inibir a respiração acoplada à fosforilação de ADP, que promove um aumento na hidrólise de ATP na mitocôndria, efeito característico de drogas anti-inflamatórias não esteroidais.





Estudos *in vivo*

Ao avaliar o efeito do extrato etanólico a 70% (v/v) das folhas de *Arrabidaea chica* em ratos Wistar, Medeiros e cols. (2011) demonstraram que a administração oral do extrato nas doses de 300, 500, ou 600mg/kg durante sete dias foi capaz de inibir os danos hepáticos causados por tetracloreto de carbono. Verificou-se uma diminuição nos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), de 85,3%, 88,6% e 93,7% respectivamente, e transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) de 56,9%, 65,3% e 68,9%, respectivamente. Os níveis séricos de bilirrubina apresentaram redução de 83,8%, 83,1% e 84,1% respectivamente. Tais valores foram similares aos obtidos com o fármaco padrão, silimarina, na dose de 35 mg/kg.

Atividade antioxidante

Amaral e cols. (2012) avaliaram, mediante a capacidade sequestrante do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* e de suas partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125, e 250 µg/mL. Os resultados deste estudo demonstraram que a fração diclorometânica foi a mais eficaz, o que pode ser atribuído à alta concentração de luteolina presente nesta fração, corroborando os estudos previamente realizados por Jorge (2008), quando apontou uma atividade antioxidante moderada do extrato etanólico das folhas de *A. chica*.

Atividade antitumoral

Estudos *in vitro*

Lima e cols. (2010) avaliaram o potencial anticarcinogênico de *Arrabidaea chica* mediante ensaios de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. Foram utilizadas 10 linhagens de células tumorais: U251 (SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT29 (cólon) e K562 (leucemia). O extrato bruto etanólico das folhas não apresentou atividade anticarcinogênica *in vitro* nas células tumorais avaliadas. Entretanto, o extrato obtido após tratamento com xilanase, que libera as agliconas, apresentou atividade com seletividade para as células NCI-460 (pulmão) e MCF-7 (mama). A concentração de carajurina no extrato obtido após o tratamento aumentou significativamente (ca. 59%) quando comparada à sua concentração no extrato obtido sem o tratamento (ca. 37%).

Atividades citotóxica e pró-apoptótica em linhagens de células tumorais leucêmicas e mamárias *in vitro*

As atividades citotóxica e pró-apoptótica dos extratos aquoso, etanólico e metanólico das folhas de *Arrabidaea chica*, bem como de frações destes extratos, foram avaliadas por Ribeiro (2012). Foi realizada uma triagem farmacológica utilizando-se modelos *in vitro* de células leucêmicas humanas das linhagens Jurkat (leucemia linfóide), HL60 (leucemia mielóide) e MCF-7 (carcinoma mamário). Os extratos etanólicos foram os que apresentaram maior potencial citotóxico enquanto que os extratos aquosos e o extrato metanólico não apresentaram atividade citotóxica significativa contra as células estudadas. A autora sugere que a atividade pró-apoptótica esteja relacionada ao conteúdo de kaempferol, cuja presença foi caracterizada no extrato por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Estudos *in vivo*

As atividades antitumoral e imunomoduladora do extrato etanólico, e sua fração aquosa, obtido das folhas de *Arrabidaea chica* foram avaliadas por Ribeiro e cols. (2012). Neste experimento foi utilizado um modelo *in vivo* de inflamação em camundongos Swiss com os extratos administrados por via oral na dose de 30 mg/kg por um período de 10 dias. Ambos os extratos mostraram-se eficazes na redução do desenvolvimento do tumor sólido de Erlich, no entanto, os mecanismos que conduziram a este efeito pareceram distintos. O efeito da fração aquosa parece estar relacionado à atividade anti-inflamatória, antiangiogênica e imunomoduladora, enquanto o extrato etanólico apresenta atividades pró-apoptótica, anti-inflamatória e antiangiogênica. Segundo os autores, tais mecanismos podem ser explicados pelo fato de que a fração aquosa promove uma redução das células NK e de linfócitos TCD3+ no tecido, associada à diminuição de células TCD8+, sem, no entanto, promover alterações nos linfócitos TCD4+. No sangue, a fração aquosa levou a uma redução nos níveis de TCD4+, sem alterar outros tipos celulares. Já o extrato etanólico parece atuar na diminuição percentual de linfócitos TCD4+ sem modificar a população de células mononucleares no microambiente tumoral.

Atividade antifúngica

Barbosa e cols. (2008) demonstraram o potencial do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* na inibição do crescimento total do fungo *Trichophyton mentagrophytes*, quando avaliado na concentração de 3,1 mg/mL. O efeito observado foi associado à presença de quinonas e flavonóides no extrato. Ribeiro (2008) avaliou a atividade antifúngica do extrato eta-





nólico das folhas de *Arrabidaea chica* frente à levadura *Candida albicans*, determinando a concentração inibitória de 500 mg/mL.

Atividade antibacteriana

Ribeiro (2008) avaliou a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* frente a *Staphylococcus aureus*, determinando a concentração inibitória de 62,5 mg/mL, e *Pseudomonas aeruginosa*, que não se mostrou ativo.

Atividade anti-inflamatória

Estudos *in vitro*

O extrato lipofílico (200 µg/mL) das folhas de *Arrabidaea chica* mostrou ação anti-inflamatória *in vitro* pelo método que avalia a capacidade de inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB, do inglês, nuclear factor-κB), um mediador central da resposta imune em seres humanos, que regula a transcrição de genes que codificam várias citocinas pró-inflamatórias, entre outros, e enzimas inflamatórias, como iNOS, COX-2, 5-LOX e fosfolipase A2 citosólica. Carajurina foi capaz de inibir completamente o NF-κB a 500 µM, concentração inibitória correspondente à do flavonóide quercetina (Zorn et al., 2001).

Estudos *in vivo*

A atividade antiedematogênica do extrato aquoso das folhas de *Arrabidaea chica* foi avaliada no modelo de edema de pata induzido por venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus* ruruima em camundongos Swiss (Oliveira et al., 2008). Este estudo demonstrou a inibição do edema apenas quando o extrato foi administrado pelas vias intraperitoneal (2,5 g/kg) e subcutânea (10,6 g/kg), não apresentando efeito quando administrado por via oral. Os resultados sugerem que as substâncias responsáveis por esse efeito inibitório não são absorvidas por via oral, ou que as mesmas passem por alterações no trato intestinal, e/ou no fígado, alterando com isso a sua função inibitória. Os dados observados corroboram os estudos realizados por Oliveira e cols. (1995) que haviam demonstrado a atividade dos extratos de *A. chica* no modelo de pleurisia induzida por zimozan e no modelo de ativação *in vivo* de linfócitos em camundongos.

Atividade anti-inflamatória e antiangiogênica

Ribeiro (2012) avaliou a atividade do extrato etanólico, e sua fração aquosa, obtido das folhas de *Arrabidaea chica* sobre a angiogênese e a migração de células inflamatórias em modelo murino de implante de esponja. As esponjas de poliuretano-poliéster foram implantadas no dorso de camundongos Swiss

que então foram tratados por via oral durante 10 dias com o extrato etanólico (30 ou 300mg/kg/dia) ou sua fração aquosa (300mg/kg/dia). Após esse período de tratamento, tanto o extrato etanólico quanto a fração aquosa foram capazes de reduzir a neoformação vascular, contudo sem alterações nos valores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de uma redução no número de neutrófilos infiltrados na esponja, avaliados pela atividade de mieloperoxidase (MPO). O estudo demonstrou também que o tratamento com os extratos da *A. chica* não exerceu influência no peso úmido nem no recrutamento de macrófagos, avaliada pela atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) nos implantes de esponja. Também não houve alterações nos perfis de proteínas séricas, nem nas concentrações das citocinas Th1/Th2. Conclui-se, portanto, que o extrato etanólico, e sua fração aquosa, obtido de *A. chica* apresentam atividade anti-inflamatória, ao interferir na atividade de neutrófilos e na atividade antiangiogênica, sem alterar a concentração local de VEGF ou os valores circulantes das citocinas Th1/Th2. A ação antiangiogênica do extrato aquoso bruto de *A. chica* já havia sido demonstrada por Garrido (2006), quando foi empregado como alternativa para o tratamento da queimadura ocular em coelhos. O resultado evidenciou que a formação vascular na córnea foi inibida pelo uso do extrato, porém não suprimida. Esse efeito inibitório foi semelhante ao apresentado pela dexame-tasona, utilizada como controle positivo.

Atividade cicatrizante

Estudos *in vitro*

Jorge e cols. (2008) avaliaram a atividade cicatrizante do extrato metanólico das folhas de *Arrabidaea chica* a partir da dosagem de hidroxiprolina, para análise da síntese de colágeno *in vitro*. Os resultados evidenciaram que a dose de 250 µg/mL do extrato foi capaz de aumentar a produção de colágeno de forma semelhante à vitamina C (25 µg/mL) e alantoína (250 µg/mL), utilizados como controle positivo.

O efeito do extrato metanólico das folhas de *Arrabidaea chica* sobre o crescimento de fibroblastos também foi avaliado, empregando alantoína como controle positivo (Jorge et al., 2008). O extrato de *A. chica* e alantoína (0,25-250 µg/mL) estimularam de forma dose-dependente o crescimento de fibroblastos com CE₅₀ de 30 µg/mL para *A. chica* e CE₅₀ de 2 µg/mL para alantoína. O valor da CE₅₀ representa a concentração efetiva em que 50% do efeito máximo é observado; neste caso, a concentração necessária para aumentar em 50% a concentração de fibroblastos iniciais.





Estudos *in vivo*

Os testes *in vivo* realizados por Jorge e cols. (2008) avaliaram a eficácia do extrato metanólico das folhas de *Arrabidaea chica* em modelo de cicatrização de feridas cirúrgicas de ratos Wistar. Este estudo demonstrou que o extrato foi capaz de reduzir as lesões na pele em aproximadamente 13%, em apenas dois dias de aplicação tópica. Ao final de 10 dias de tratamento, o grupo tratado com o extrato de *A. chica* apresentou 96% de cicatrização das feridas, enquanto o grupo controle, tratado apenas com salina, apresentou somente 36% de cicatrização. Já o grupo controle positivo, tratado com alantoína, apresentou 87% de cicatrização, mostrando que o extrato foi mais eficaz que o controle positivo. Jorge (2008) considerou que a atividade cicatrizante pudesse ter correlação tanto com o efeito estimulante da proliferação de fibroblastos e da síntese de colágeno, quanto com a atividade antioxidante das antocianinas. Entretanto, Taffarello (2009) demonstrou, mediante ensaio *in vitro* de indução de crescimento de fibroblastos, que o maior teor da aglicona carajurina é inversamente proporcional à ação cicatrizante. Extratos obtidos sem tratamento enzimático apresentaram maior ação cicatrizante (CE₅₀ de 35 µg/mL) do que aqueles obtidos com o tratamento, que libera as agliconas.

A atividade cicatrizante do extrato metanólico das folhas de *Arrabidaea chica* (500 mg/kg e 1000 mg/kg) administrado por via oral foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos (Jorge, 2008), reduzindo em 76% e 90%, respectivamente, o índice de lesões ulcerativas, enquanto que carbenoxolona (200 mg/kg), empregada como controle positivo, foi capaz de reduzir o índice em 96%. A determinação da DE₅₀ (dose efetiva em que 50% do efeito máximo é observado) foi efetuada mediante construção de uma curva dose-resposta nas concentrações de 100, 300 e 1000 mg/Kg, com valor de DE₅₀ de 453 de mg/Kg.

Atividade diurética

A atividade diurética do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* e de suas frações obtidas com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, respectivamente, bem como do flavonóide isolado luteolina, foi avaliada em ensaios *in vivo* com ratos. Os extratos e a luteolina foram administrados nas doses de 25, 50, 10 e 200 mg/kg, com furosemida como controle positivo (50 mg/Kg). Após o tratamento, os volumes de urina foram medidos por um período de 6 horas com coletas a cada 2 horas. A fração hexânica, na dose de 100 mg/kg, foi eficaz em aumentar o volume urinário em 79%, quando comparado ao controle negativo (água). Já o tratamento com a luteolina demonstrou um aumento de 94% quando administrada na mesma dose (Amaral et al., 2012).

Toxicologia

As toxicidades aguda e crônica do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* foram determinadas por Oliveira e cols. (2008), indicando um valor para a DL50 em camundongos acima de 2 g/kg por via intraperitoneal e 6 g/kg via oral. Nos ensaios de toxicidade crônica não foram observadas alterações histopatológicas significativas para o extrato aquoso, o que sugere baixa toxicidade. Ao avaliar o efeito da administração oral dos extratos etanólico (30 e 300mg/kg) e aquoso (300mg/kg), por período experimental de 10 dias, Ribeiro (2012) demonstrou que os animais tratados com os extratos não apresentaram sinais de toxicidade, tais como diarreia, perda de peso ou alterações na atividade motora dos animais. As funções hepática e renal também não foram alteradas significativamente pelo tratamento com os extratos na dose de 300 mg/kg.

Cartágenes (2009) demonstrou que o extrato etanólico a 70% (v/v) das folhas de *Arrabidaea chica* quando administrado por via oral em ratos, em doses de até 3.5g/kg, e por via intraperitoneal em camundongos, em doses de até 2g/kg de peso, não apresentou sinais de toxicidade por um período de 14 dias após administração do extrato. No entanto, a dose de 5g/kg foi capaz de provocar diarreia nos ratos apenas nos primeiros dias de administração. Amaral (2012), corroborando os resultados já publicados por outros autores, demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *A. chica* e suas partições em *n*-hexano, diclometano, acetato de etila, *n*-butanol, assim como luteolina isolada, não apresentaram efeitos tóxicos, no modelo de toxicidade de *Artemia salina*.

Considerações finais

A introdução no mercado de um novo produto medicinal, que se baseia no uso tradicional de uma planta, pode ter seu trajeto abreviado, a partir da validação científica desta evidência. *Arrabidaea chica* compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennisus) publicada pelo Ministério da Saúde em 2009 (Brasil, 2009). Tal fato evidencia a importância do estudo de seu perfil químico, a padronização de seus extratos e a comprovação de suas propriedades farmacológicas e avaliação do seu caráter de toxicidade. A partir das informações aqui reunidas, esperamos contribuir para a difusão do conhecimento científico sobre a espécie e o desenvolvimento de produtos fitoterápicos padronizados que possam suprir as demandas de saúde pública.

Referencias Bibliográficas

Albuquerque, J.M. 1980 - Plantas tóxicas no jardim e no campo.. Belém: FCAP, 120p.





- Alcerito, T.; Barbo, F. E.; Negri, G.; Santos, D.Y.A.C.; Meda, C. I.; Young, M.C.M.; Chávez, D.; Blatt, C.T.T. 2002 - Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*. p. 677-683.
- Alves, M.S.M. 2008 - Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA.
- Amaral, R.R.; Santos, A.A.D.; Saravia, A.; Botas, G.; Cruz, R.A.S.; Fernandes, C.P.; Rocha, L e Boylan, F. 2012 - Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verlot. leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*. v. 31(3), p. 451- 455.
- Arakian, S.K.L.; Silva, S.F.; Yuyama, L.K.O. 1998 - Biodisponibilidade de ferro das folhas de crajirú (*Arrabidaea chica* Verlot). Estudo em ratos; Anais do XV Congresso Brasileiro de Nutrição; 1; XV Congresso Brasileiro de Nutrição; Brasília.
- Araújo, N.R.R. 2010 - Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microorganismos relacionados à lesão de mucosite oral. 99f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA.
- Barbosa, W.L.R.; Pinto, L.N.; Quignard, E.; Vieira, J.M.S.; Silva Jr., J.O.C. e Albuquerque, S. 2008 - *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18(4), p. 544-548.
- Brasil. 2009 - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília, DF: Ministério da Saúde [acesso em 13 de maio de 2011]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENI-SUS.pdf>
- Borrás, M.R.L. 2003 - Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Ed. Valer.
- Cartágenes, M.S.S. 2009 - Investigação dos efeitos tóxicos e hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae). Tese de Doutorado - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.
- Chapman, E.; Perkin, A. G.; Robinson, R. 1927. The colouring matters of carajura. *Journal of Chemical Society*, v. 49, p. 3015.
- Corrêa, M.P. 1984 - Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. vol. 1. Ministério da Agricultura, IBDF.
- Cronquist, A. 1981 - An integrated system of classification of flowering plants. Columbia. Univ. Press.
- De-Souza, A.S.; Pagadigorria, C.L.S. Ishii-Iwamoto, E.L.; Bracht, A.; Cortez, D.A.G.C.; Yamamoto, N.S. 2009. Effects of the *Arrabidaea chica* extract on energy metabolism in the rat liver. *Pharmaceutical Biology*, v. 47(2), p. 154-161.
- Devia, B.; Llabres, G.; Wouters, J.; Dupont, L.; Escribano-Bailon, M. T.; Pascual-Teresa, S.; Angenot, L.; Tits, M. 2002 - New 3-deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p.114–120.
- Fischer, E.; Theisen, I.; Lohmann, L.G. 2004 - Bignoniaceae. In: Kubitzki, K.; Kadereit, J.W. (Org.). The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer. p.9-98.
- Harbone, J.B. 1967. Comparative Biochemistry of the flavonoids- VI – Flavonoid Patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, v.6, p.1643-1651.
- Joly, A.B. 1993. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 776p
- Jorge, M.P. 2008 - *Atividade cicatrizante do extrato bruto de Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot*. Dissertação (Mestrado em Clínica Clínica Médica na área de Ciências Básicas) – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Campinas.
- Jorge, M.P.; Madjarof, C.; Ruiz, A.L.T.G.; Fernandes, A. T.; Rodrigues, R.A.F.; Sousa, I.M.O.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E. 2008 - Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.118, p.361-366.
- Kalil Filho, A. N.; Costa Kalil, G.P.; Luz, A.I.R. 2000. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da amazônia brasileira para uso humano. 4p. (MAPA -Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, n. 50
- Lima, J. Queiroga, C.L.; Alves, A.; Oliveira, D.; Rodrigues, A.F.R.; Sousa, I.M.O., Figueira, G.M., Ruiz, A.L.; Tinti, S. Carvalho, J.E.; Foglio, M.A. 2010 - Atividade anticâncer *in vitro* em células tumorais humanas do composto 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina), isolado a partir da espécie *Arrabidaea chica* Verlot. Resumo – SBQ.





- Lorenzi, H.; Matos, J.F.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum, 512p.
- Medeiros, B.; Costa, K.; Ribeiro, J.F.A.; Silva, J.O.C.; Barbosa, W.L.R.; Carvalho, J.C.T. 2011. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verlot. (pariri). *Pharmacognosy Res.* v.3(2), p. 79–84.
- Mors, W. B.; Rizzini, C. T.; Pereira, N. A. 2000 - *Medicinal Plants of Brazil*, Reference Publications, Inc. Alonac, Michigan.
- Oliveira, D.P.C.; Borrás, M.R.L.; Ferreira, L.C.L.; Lopez-Lozano, J.L. 2009 - Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19(2B), p.643-649.
- Oliveira, D.P.C.; Matsuura, M.M.; Borrás, M.R.L. 1995 - Estudo da atividade biológica da *Arrabidaea chica* Verlot. Crajiru. Relatório de Pesquisa, curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
- Pauletti, P. M.; Bolzani, V.S.; Yung, M.C.M. 2003. Constituintes químicos da *Arrabidaea samyoides* (Bignoniaceae). *Química Nova*, v. 26(5), p. 641-643.
- Puhl, M.C.M.N.; Milaneze-Gutierrez, M.A.; Nakamura, C.V. e Cortez, D.A.G. 2007 - Morfoanatomia das folhas e dos caules jovens de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. (Bignoniaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, p. 224-229.
- Rego, T.J.A. 1995 - Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão. 2. Ed. São Luis. EDUFMA.
- Ribeiro, A.F.C. 2012 - Avaliação das atividades anti-inflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Belo Horizonte – UFMG.
- Ribeiro, A.F.C.; TellesII, T.C.; FerrazIII, V.P.; Souza-Fagundes, E.M.; Cassali, G.D.; Carvalho, A.T. e Melo, M.M. 2012 - Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22(2), p. 364-373.
- Ribeiro, A.F.C.; Melo, M.M.; Cassali, G.D.; Ferraz, V.P.; Cardoso, G.M.M.; Telles, T.C. e Souza-Fagundes, E.M. 2010 - Antileukemic potential of crude extracts of *Arrabidaea chica*. XII International Congress of Toxicology. p.46, Barcelona, Spain.
- Ribeiro, C.M. 2008 - Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais –Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará – UFPA.
- Sandwich, N.Y. e Hunt, D.R. 1974 - Bignoniáceas. *Floresta Ilustrada Catarinense*, Itajaí, v. 1, p.172.
- Schiozer, A.L.; Cabral, E.C.; Godoy, A.A.F. Chaves, F.C.M.; Poppi, R.J.; Riveros, J.M.; Eberlinb, M.N. e Barata, L.E.S. 2012 - Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 23(3), p. 409-414.
- Scogin, R. 1980 - Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* v.8, p. 273-276.
- Taffarello, D. 2008 - Extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Takemura, O.S. 1993 - Flavonóides em folhas de *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot. - Carajuru, Bignoniaceae. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Takemura, O.S.; Nozawa, Y.; Inuma M.; Tosa, H.; Mi-guel, O.G. e Moreira E.A. 1995 - A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry*, v. 38(5), p.1299-1300.
- Van den Berg, M.E. 1982 - Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático, CNPq/Programa Trópico Úmido/MPEG, Gráfica Falangola Editora Ltda, p. 13.
- Vázquez-Yanes, C. e Segovia, A.O. 1983 - Padrões de germinação e longevidade das sementes na floresta tropical. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v 24, p. 69-87.
- Vieira, R.F. e Silva, S.R. 2002 - Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. Resultados da 1a reunião técnica. Brasília: CNPq, p. 184.
- Von Poser, G.L.; Schripsema, J.; Henriques, A.T. e Jensen, S.R. 2000 – *Biochemical and Systematics Ecology*. v. 28, p. 351-366.
- Zorn, B.; Garcia-Piñeres, A. J.; Castro, V.; Murillo, R.; Mora G. e Merfort, I. 2001 - 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, v. 56, p.831–835.

Recebido em março de 2013. Aceito em maio de 2013.



Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus*(Kunth.) Micheli (Alismataceae)

Antinociceptive activity of essential oil from *Echinodorus macrophyllus*(Kunth.)Micheli (Alismataceae)

¹Daniele C. Fernandes; ¹Leosvaldo S. M. Velozo; ¹Rafael A. Alves; ¹Helena A. A. Siqueira; ¹Girlaine P. Silva; ¹Shirley V. M. Santos; ¹Carlos R. M. Gayer; ¹Marsen G. P. Coelho

¹Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Centro Biomédico – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 4o andar, CEP-20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Correspondência: *e-mail: marsengpc@hotmail.com

Palavras chave:

Echinodorus macrophyllus, óleo essencial, hidrodestilação, potencial antinociceptivo.

Keywords:

Echinodorus macrophyllus, essential oil, hydrodistillation, antinociceptive potential.

Resumo

A *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Mich., é uma planta de hábitos aquáticos, popularmente conhecido no Brasil como “chapéu de couro”, sendo utilizada no tratamento do reumatismo e outras afecções, comodiurético e antissifilítico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (OEE), obtido através da hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. A análise de seu perfil cromatográfico por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) possibilitou a identificação de 21 componentes, sendo três majoritários (dillapiol, 2-tridecanona e óxido de cariofileno). Para a avaliação da atividade antinociceptiva do OEE foi empregado o modelo de hiperalgisia induzido por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético. Camundongos Swiss Webster (SW) machos, que foram tratados com OEE, por via oral (v.o.) nas doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram inibição significativa das contorções induzidas por ácido acético de 65% e 59%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Esta atividade possivelmente está relacionada à inibição de receptores específicos da nocicepção, promovendo assim, a analgesia.

Abstract

Echinodorus macrophyllus (Kunth.) Mich. is a plant of aquatic habits popularly known in Brazil as “chapéu de couro”, being used for the treatment of rheumatism and other inflammatory diseases, as a diuretic and antisyphilitic. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effects of essential oil of *Echinodorus macrophyllus* (EOE), obtained through hydrodistillation for two hours, in Clevenger-type modified apparatus. The EOE chromatographic profile analyses on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) allowed the identification of 21 components which three are majority (dillapiole, 2-tridecanone and caryophyllene oxide). The evaluation of the antinociceptive activity of EOE, was done using the hyperalgisia model induced by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid. Swiss Webster (SW) male mice were orally (p.o.) treated with EOE with 50 and 100 mg/kg EOE doses (p.o.), showed significant inhibition of acetic acid-induced contortions by 65% and 59% respectively, compared with the control group. This activity possibly is related to the inhibition of nociception-specific receptors, thereby, analgesia.





Introdução

O uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Desta forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (Maciel et al., 2002; Cragg e Newman, 2013).

O Brasil, porém, não faz uso satisfatório de sua biodiversidade e conhecimento popular, necessitando de mais pesquisas sobre o assunto, para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos (Calixto, 2005). A sustentabilidade de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na diversidade biológica e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico (BrazFilho, 2010). Neste contexto, a espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.)Mich., planta de hábitos aquáticos e conhecida popularmente por “chapéu-de-couro”, “chá-mineiro”, “erva-de-pântano”, “erva-de-bugre”, “congonha-do-campo” e “erva-do-brejo” (Ferrari, 1961; Correa, 1974; Cronquist, 1981; Rego, 1988), pertence à família Alismataceae (Rataj, 1978), que é constituída de 11 gêneros e aproximadamente 75 espécies, nativas de zonas temperadas e tropicais (Haynes e Holm-Nielsen, 1994). *Echinodorus* e *Sagittaria* são os gêneros neotropicais desta família, que apresentam maior diversidade de espécies (Fasset, 1955; Rogers, 1983).

As folhas de *E. macrophyllus* são utilizadas no tratamento das sífilis, do reumatismo, como diurético (Coimbra, 1994) e em outras afecções. A toxicidade *in vitro* e *in vivo*, de seu extrato aquoso foi analisada por Lopes e colaboradores (2000), em experimentos com camundongos, sem efeito genotóxico. *E. macrophyllus* está listada na Farmacopeia Brasileira (em 1926 e 1959), havendo necessidade de promover pesquisa para a sua utilização, como medicamento fitoterápico, (Flor et al., 2011). A fitoquímica parcial da espécie detectou a presença de polifenóis, flavonoides e diterpenos (Kobayashi et al., 2000; Pimenta et al., 2000; Shigemori et al., 2002; Silva et al., 2012).

Os óleos essenciais são compostos voláteis do meta-

bolismo secundário dos vegetais e por meio do modo de extração, principalmente destilação (vapor ou hidrodestilação) é possível obter uma variedade de moléculas voláteis, tais como terpenos e terpenoides, componentes derivados de fenol aromáticos e componentes alifáticos. Os ensaios físico-químicos *in vitro* caracterizam a maioria destes compostos como antioxidantes (Bakkali et al., 2008), apresentando propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e analgésicas (Pattnaik et al., 1997; Siani et al., 1999; Santos e Rao, 2000; Medeiros et al., 2003; Salud Pérez et al., 2011).

A dor é uma experiência consciente, uma interpretação da entrada no sistema nociceptivo influenciada pelas memórias, emocionais, fatores patológicos, genéticos e cognitivos. A dor resultante não está necessariamente relacionada linearmente para a unidade de percepção nociceptiva e nem tem exclusivamente a função vital de proteção. A dor é, portanto, uma experiência altamente subjetiva, como ilustrado pela definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (Merksey e Bogduk, 1994): “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrito em termos de tal dano”. Esta patologia afeta cerca de 20% da população adulta, especialmente mulheres e idosos (Breivik et al., 2006). Entre os brasileiros a dor crônica acomete 30 a 40% da população e constitui a principal causa de absenteísmo, licenças médicas, aposentadorias por doença, indenizações trabalhistas e baixa produtividade no trabalho (Ministério da Saúde (BR), Ato Portaria Nº 19/GM, 2002).

Apesar do uso popular de infusões de folhas de *E. macrophyllus* no alívio da inflamação, não há relatos quanto à atividade analgésica. O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial analgésico do óleo essencial proveniente de suas folhas em modelo experimental de nocicepção induzida por estímulo químico. O óleo essencial de *E. macrophyllus* foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector por ionização de chama e 70,8% de seus compostos foram identificados.

Material e Métodos

Material vegetal

A planta *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae) foi adquirida no distribuidor de Plantas Medicinais (Alcântara – Rio de Janeiro), tendo sido coletado em Nova Friburgo,





Rio de Janeiro, seguido de posterior secagem e trituração. O material foi então, ensacado e mantido em freezer a -5°C . A planta foi identificada no Herbário Bradeanum da UERJ (Rio de Janeiro – Brasil), onde uma exsicata foi depositada sob o número HB84807.

Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos machos da linhagem de Swiss Webster (SW), de 3–4 meses, pesando 25–35 g criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro doados pelo Instituto Vital Brazil, e mantidos em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada (24°C), com ciclo de luminosidade de 12 h sendo alimentados com água e ração *ad libitum*. A higiene e desinfecção das caixas foram realizadas em dias alternados, com hipoclorito de sódio, sendo utilizada maravalha estéril. Os experimentos foram realizados seguindo os padrões éticos para o uso de animais de experimentação e aprovado pelo Comitê de Ética do IBRAG-UERJ segundo Protocolo 05/2009.

Obtenção do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (OEEem)

Para a extração do óleo essencial de *E. macrophyllus* (OEEem), 50 g de partes aéreas (secas) de *E. macrophyllus* foram reduzidas a pequenos fragmentos e submetidas à hidrodestilação, por duas horas, em aparelho de Clevenger modificado. A fração volátil foi extraída da água de coação por partição líquido-líquido com diclorometano, sendo a fração orgânica submetida à secagem com sulfato de sódio anidro.

Análise por cromatografia com fase gasosa (CG-DIC)

Análise quantitativa do OEEem foram realizadas em cromatógrafo CP-3380-FID Varian usando coluna capilar de gel de sílica fundida CP-SIL 8 CB, CP 8752, Varian (30m x 0,32mm x 0,25 μm). A programação de temperatura usada foi: injetor 260°C , detector 290°C e coluna aquecida de 50°C até 290°C ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$). O OEEem foi solubilizado em diclorometano, sendo injetado 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Hidrogênio e ar sintético foram usados como gases de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min.

Análise por Cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise qualitativa do OEEem foi efetuada em equipamento Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010 Plus,

usando coluna capilar de gel de sílica fundida Rtx-5MS, da marca Restek (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm), sob as mesmas condições citadas para a análise por CG-DIC.

Identificação das substâncias do óleo essencial

A identificação dos componentes do óleo essencial de partes aéreas de *E. macrophyllus* foi realizada pela comparação dos seus índices de retenção e espectros de massas (MS) com dados da literatura publicados e com a biblioteca WILEY 275 e NIST 3.0, fornecidas pelo sistema CG-EM (Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010Plus). Os resultados também foram confirmados comparando a ordem de eluição dos compostos com seus índices de retenção relativo relatados na literatura (Adams, 2001). Os índices de retenção foram calculados para todos os componentes voláteis utilizando os dados de retenção de n-alcenos lineares com C9-C30, conforme descrito por Holler e colaboradores (2009).

Modelo de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético

Com objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo do OEEem, foi realizado o modelo de contorção abdominal. Os animais foram previamente tratados com OEEem (v.o.) 1 h antes da injeção i.p. de ácido acético 0,6% v/v (HAc; 10 $\mu\text{L}/\text{g}$ peso corporal (p.c.)) de acordo com Koster e colaboradores (1959). As contorções, definidas como uma sequência que se inicia com o arqueamento do lombo, contração do abdômen, contorção do tronco e/ou pélvis, terminando geralmente com a extensão dos membros foram observadas após 5 min da injeção do ácido, por um período de 10 min (Loro et al., 1999).

Análise estatística

O Teste One-way ANOVA seguido de Tukey foi utilizado para analisar os dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (Dawson-Saunders e Trapp, 1994). Foram utilizados os programas Microsoft® Office Excel e GraphPad Prism® 5 for Windows.

Resultados

Perfil cromatográfico do OEEem por CG-EM

As substâncias dilapiol, 2-tridecanona e óxido de cariofileno foram identificadas como as majoritárias do óleo essencial de *E. macrophyllus* (Tabela 1).



Tabela 1 – Identificação dos constituintes do óleo essencial de *E. macrophyllus*por CG-EM

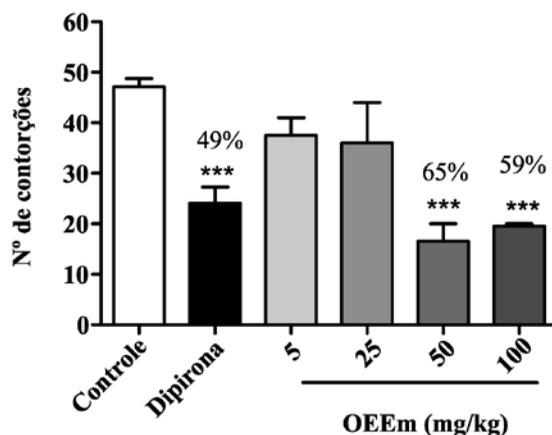
	Substância	^a IR ^{Lit}	^b IR	HD%
1	2-undecanona	1296	1294	0,27
2	β-cariofileno	1419	1419	1,49
3	α-humuleno	1455	1455	0,36
4	geranilacetona	1455	1457	0,94
5	(E)-β-ionona	1489	1489	0,57
6	2-tridecanona	1496	1498	14,57
7	miristicina	1520	1530	0,72
8	elimicina	1557	1563	0,50
9	(E)-nerolidol	1563	1567	0,60
10	ácido dodecanoico	1567	1572	0,75
11	óxido de cariofileno	1581	1585	7,09
12	1,2-epóxido de humuleno	1608	1611	1,15
13	dilapiol	1621	1631	24,03
14	α-cadinol	1654	1659	0,41
15	apiol	1680	1687	0,68
16	heptadecano	1700	1701	5,45
17	heptadecanal	1716	1714	0,98
18	ácido palmítico	1968	1971	6,52
19	palmitato de etila	1993	1997	0,37
20	octadecanol	2078	2086	2,16
21	(Z)-fitol	2114	2116	1,19

% Somatório das substâncias identificadas: 70,8; ^aIR^{Lit}: Índice de retenção da literatura (Adams, 2001); ^bIR: Índice de retenção calculado; HD: Hidrodestilação.

Modelo de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético

O tratamento com o OEE m apresentou inibição significativa no número de contorções induzidas por ácido acético de 65% e 59% nas respectivas doses de 50 e 100 mg/kg por peso corporal em relação ao grupo controle (Figura 1).

Figura 1: Efeito do tratamento com OEE m no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético. Foram administradas (v.o.) as doses de 5, 25, 50 e 100 mg OEE m/kg p.c. em camundongos machos SW (n=5/grupo). Os resultados são estatisticamente significativos quando comparados com o controle tratado com veículo e dipirona 50 mg/kg (v.o.) 60 min antes da injeção de ácido acético 0,6% (i.p.). *p <0,05, **p <0,01 e ***p <0,001 em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Tukey).





Discussão

A espécie *Echinodorus macrophyllus*, uma planta conhecida popularmente como chapéu de couro apresenta atividade anti-inflamatória sugerida pelo uso na medicina popular. Castro (2004) relatou o potencial anti-edematogênico e antinociceptivo do OEEm e Fernandes (2006) observou o potencial anti-inflamatório neurogênico, o que serviu de base para o presente estudo.

O óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) foi extraído das partes aéreas da planta, com rendimento de 0,01% a partir de 50 g de material vegetal seco. A análise do OEEm por CG-EM possibilitou a identificação de 21 componentes, totalizando 70,8% de substâncias identificadas, sendo majoritários o dilapiol, a 2-tridecanona e o óxido de cariofileno. Na literatura encontram-se descritos os efeitos biológicos para tais substâncias: o dilapiol, um arilpropanoide bastante conhecido, apresenta propriedade inseticida e sinergismo com outras substâncias (Fazolin et al., 2005); a 2-tridecanona é um metabólito especial secretado pelos tricomas glandulares de folhas dos vegetais (Gilardón, et al., 2001). Suas funções estão relacionadas com a sobrevivência da espécie: a toxicidade e repelência, que são mecanismos de defesa (herbivoria, predatismo e microrganismos) e a atração de polinizadores (Maxwell e Jennings, 1980); o óxido de cariofileno é descrito na literatura por suas atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-úlceras (Chavan et al., 2010; Lima et al., 2012).

A fim de comprovar o efeito biológico do OEEm, utilizou-se o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, adaptado de Koster e colaboradores (1959), o qual é um método utilizado rotineiramente e sensível para o *screening* da eficácia de agentes analgésicos periféricos e centrais (Collier et al., 1963). A hiperalgesia causada pelo ácido acético é explicada devido à liberação e aumento do nível de vários mediadores, como a histamina e serotonina que atuam por estimulação dos neurônios nociceptivos periféricos (Cui et al., 2010).

Para o tratamento com a dose 50 mg/kg de OEEm, o efeito antinociceptivo neste modelo apresentou 65% de inibição das contorções, enquanto que a dipirone, escolhida como droga padrão, inibiu em média 49%. Este resultado mostra-se relevante quando comparado com dados da literatura em que, os óleos essenciais de “candeieiro” (*Vanillosmopsis arborea*) e “sambacaitá” ou “canudinho” (*Hyptis pectinata* (L.) Poit), que também apresentam em sua composição cariofileno, mostraram porcentagem de inibição de 31 e 48% respectivamente, observada para o tratamento com a dose de 100 mg/kg (Leite et al., 2011; Raymundo et al., 2011), para o modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético.

Podemos sugerir que a atividade antinociceptiva observada no modelo de contorções abdominais pode estar relacionada à inibição da liberação de mediadores em resposta ao agente de nocicepção química (ácido acético), como a bradicinina, SP, prostaglandina e algumas citocinas como Interleucina 1β (IL-1β), Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e Interleucina 8 (IL-8) (Correa et al., 1996; Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Vanderlei et al., 2010).

Referências

- Adams, R.P. 2001 - *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation. Carol Stream.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. e Idaomar, M. 2008 - Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p.446–475.
- Braz Filho, R. 2010 - Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33 p. 229–239.
- Breivik, H.; Collett, B.; Ventafridda, V.; Cohen, R. e Gallacher, D. 2006 - Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*, v.10, p. 287–333.
- Calixto, J.B. 2005 - Twenty-five years of research on medicinal plants in latinamerican: A Personal viewer. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p. 131–134.
- Castro, F.L. 2004 - *Atividade anti-edematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso de folhas de Echinodorus macrophyllus*. Monografia de conclusão da graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Chavan, M.J.; Wakte, P.S. e Shinde, D.B. 2010 - Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annonasquamosa* L. bark. *Phytomedicine*, v.17, p.149–151.
- Coimbra, R. 1994 - *Manual de fitoterapia*. Editora CEJUP. Belém.
- Collier, H.O.J.; Dineen, L.C.; Johnson, C.A. e Schneider, C. 1963 - The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, v. 32, p. 295–310.
- Correa, C.R.; Kyke, D.J.; Chakraverty, S. e Calixto, J.B. 1996 - Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC18688 in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 8, p. 117–152.





- Correa, P.M. 1974. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério de Agricultura. Rio de Janeiro.
- Cragg, G.M.; Newman, D.J. 2013 - Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. Disponível em: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>). Acesso em 15 abr. 2013.
- Cronquist, A. 1981 - *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University. New York.
- Cui, J.; Hu, W.; Cai, Z.; Liu, Y.; Lis, S.; Tao, W. e Xiang, H. 2010. New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. *Pharmacology and Biochemical Behavior*, v. 95, p.166–172.
- Dawson-Saunders, B., Trapp, R. G. 1994 - *Basic & Clinical Biostatistics*. Editora Appleton & Lange. Connecticut.
- Fasset, N.C. 1955 - *Echinodorus* in the American tropics. *Rhodora*, v. 57, p.133–156, p.174–188, p. 202–212.
- Fazolin, M.; Estrela J.L.V.; Catani, V.; Lima M.S. e Alcécio, M.R. 2005 - Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Ceratomyxomacrus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). *Neotropical Entomology*, v.34, p. 485–489.
- Fernandes, D.C. 2006 - Análise da atividade anti-inflamatória neurogênica do extrato aquoso de folhas de *Echinodorus macrophyllus* e fitoquímica. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Castelo Branco.
- Ferrari, J.M. 1961. *Contribuição ao estudo das Monocotyledoneae medicinais indígenas da Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 126 p. Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Flor, R.V.; Campos, M.A.A.; Solano, A.G.R.; Jokl, L. e Dantas-Barros, A.M. 2011 - Drying of *Echinodorus macrophyllus* and autoclaving and lyophilization of the fluid-extract: effects on the pharmacological composition. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 518–524.
- Gilardón, E.; Pocovi, M.; Hernández, C.; Collavino, G. e Olsen A. 2001 - Papel da 2-tridecanona e dos tricomas glandulares tipo VI na resistência do tomateiro a *Tuta absoluta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, p. 929–933.
- Haynes, R.R. e Holm-Nielsen, L.B., 1994 - The Alismataceae. *Flora Neotropica*, v. 64, p. 1–112.
- Holler, F.J.; Skoog, D.A. e Crouch, S. R. 2009 - *Princípios de análise instrumental*. Editora Artmed. Porto Alegre.
- Ikedo, Y.; Ueno, A.; Naraba, H. e Oh-Ishi, S. 2001 - Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Science*, v. 69, p. 2911–2919.
- Kobayashi, J.; Sekiguchi, M.; Shigemori, H. e Obsaki, A. 2000 - Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Tetrahedron Letters*, v. 41, p.2939–2943.
- Koster, R.; Anderson, M. e De Beer, E.J. 1959 - Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v. 18, p. 412.
- Leite, G.O., Leite, L.H. I.; Sampaio, R.S.; Araruna, M.K.A.; Rodrigues, F.F.G.; Menezes, I.R.A.; Costa, J.G.M. e Campos, A.R. 2011 - Modulation of topical inflammation and visceral nociception by *Vanillosmopsis borea* essential oil in mice. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 1, p. 216–222.
- Lima, D.K.S.; Ballico, L.J.; Lapa, F.R.; Gonçalves, H.P.; Souza L.M.; Iacomini M.; Werner, M.F.P.; Baggio, C.H.; Pereira, I.T.; Silva L.M.; Facundo, V.A. e Santos, A.R.S. 2012 - Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, p. 274–282.
- Lopes, C.L.; Albano, F.; Laranja, G.A.T.; Alves, L.M.; Martins e Silva, L.F.; De Souza, G.P.; Araújo, I.M.; Nogueira-Neto, J.F.; Felzenszwalb, I. e Kovary, K. 2000 - Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology Letters*, v. 116, p. 189–198.
- Loro, J.F.; del Rio, I. e Pérez-Santana, L. 1999 - Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 213–218.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr., V.F.; Grynberg, N.F. e Echevarria, A. 2002 - Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429–438.
- Maxwell, F.G. e Jennings, P. 1980 - *Breeding plants resistant to insects*, p.682. J. Wiley. New York.
- Medeiros, J.R.; Campos, L.B.; Mendonça, S.C.; Davin, L.B. e Lewis, N.G., 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. *Phytochemistry*, v. 64, p. 561–565.





- Merksey, H. e Bogduk, N. 1994 - *Classification of Chronic Pain*. International Association for the Study of Pain Press. Seattle.
- Ministério da Saúde (BR). Ato Portaria Nº 19/GM de 03 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002>. Acesso em 17 ago. 2009.
- Pattnaik, S.; Subramanyam, V.R.; Bapaji, M. e Kole, C.R. 1997 - Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, v. 89, p. 39–46.
- Pimenta, D.S., Figueiredo, M.R. e Kaplan, M.A.C. 2000 - Chemical studies on cultivation of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schl.) Mich. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 72, p. 294.
- Rataj, K. 1978 - Alismataceae of Brazil. *Acta Amazonica*, v. 8, p. 1–54.
- Raymundo, L.J.; Guilhon, C.C.; Alviano, D.S.; Matheus, M.E.; Antonioli, A.R., Cavalcanti, S.C.; Alves, P.B., Alviano C.S. e Fernandes, P.D. 2011 - Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis spectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p. 725–732.
- Rego, S.C.A. 1988 - *Alismataceae*. Dissertação (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.; Poole, S. e Ferreira, S.H. 2000 - Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 387, p. 111–118.
- Rogers, G.K. 1983 - The Alismataceae in the Southeastern United States. *Journal of Arnold Arboretum*, v. 64, p. 383–420.
- Salud Pérez, G.; Miguel Zavala, S.; Lucina Arias, G. e Miguel Ramos, L. 2011 - Anti-inflammatory activity of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, p. 38–44.
- Santos, F.A. e Rao, V.S., 2000 - Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 240–244.
- Shigemori, H.; Shimamoto, S.; Sekiguchi, M.; Ohsaki, A. e Kobayashi, J. 2002 - Echinodolides A and B, new cembranoid diterpenoids with an eight-membered lactone ring from the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 82–84.
- Siani, A.C.; Ramos, M.F.S.; Menezes-de-Lima Jr., O.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Fernandez-Ferreira, E.; Soares, R.O.A.; Rosas, E.C.; Susunaga, G.S.; Guimarães, A.C.; Zoghbi, M.G.B. e Henriques, M.G.M.O. 1999 - Evaluation of anti-inflammatory related activity of essential oils from the leaves and resin of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 57–69.
- Silva, T.M.; Dias, M.D.; Pereira, M.T.; Takahashi, J.A.; Ferraz, V.P.; Piló-Veloso, D. e Alcântara, A.F.C. 2012 - Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, p. 22–26.
- Vanderlei, E.S.O.; Patoilo, K.K.N.R.; Lima, N.A.; Lima, A.P.S.; Rodrigues, J.A.; Silva, L.M.C.M.; Lima, M.E.P.; Lima, V. e Benevides, N.M.B. 2010 - Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpacupressoides*. *International Immunopharmacology*, v. 10, p. 1113–1118.

Recebido em Dezembro de 2012. Aceito em março de 2013.



Evaluation of *in vitro* antileishmanial and antimycobacterial activities of *Stiffia chrysantha* J.C. Mikan extracts

Rachel R. P. Machado^{1,2}, André M. Marques^{3*}, Wilson Valente Júnior⁴; Elaine S. Coimbra⁴; Rafael S. Duarte⁵; Geraldo Luiz G. Soares⁶; Maria Auxiliadora C. Kaplan³

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal – Centro de Ciências Médicas e da Saúde (CCS). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). CEP: 21945-970. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

²Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde. SUPREMA, BR040, Km 796, Salvaterra. CEP: 36033-005. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

³Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN). Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). CCS, Bloco H, Cidade Universitária. CEP: 21945-970. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Laboratório de Parasitologia - Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia. Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). CEP: 36036-900. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

⁵Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia, CCS. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). CEP: 21941-590. Rio de Janeiro, Brasil.

⁶Departamento de Botânica, Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV – Prédio 43433. CEP: 91509-900. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Correspondência: *e-mail: andrefarmaciarj@yahoo.com.br

Palavras chave:

Stiffia chrysantha; diadem; methyl salicylate; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium smegmatis*; leishmaniasis.

Keywords:

Stiffia chrysantha; diadem; methyl salicylate; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium smegmatis*; leishmaniasis.

Resumo

Stiffia chrysantha J.C. Mikan é uma planta pertencente à família Asteraceae cujo principal uso pela população é o ornamental e atualmente se encontra sob risco moderado de extinção. É sabido que a planta foi utilizada no tratamento de afecções respiratórias por quilombolas. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial efeito antimicrobiano de diferentes extratos de *S. chrysantha* contra algumas espécies de micobactérias e formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania*. Os testes foram realizados *in vitro* utilizando MTT ou Resazurina em métodos colorimétricos, de acordo com o microrganismo avaliado. Os resultados mostraram baixa atividade dos extratos contra as culturas de micobactérias. Por outro lado, um efeito inibidor do crescimento foi observado no extrato metanólico das folhas e no extrato hexânico da casca contra as culturas de promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀ = 55,16 µg/mL extrato metanólico and 38,61 µg/mL extrato hexânico) and *L. chagasi* (CI₅₀ = 72,05 µg/mL extrato hexânico). Novos estudos são necessários para descobrir as substâncias responsáveis pela inibição do crescimento das formas promastigotas.

* Correspondent author: andrefarmaciarj@yahoo.com.br



Abstract

Stiffia chrysantha J.C. Mikan is a plant that belongs to Asteraceae family, mainly used for ornamental purposes and it is moderately endangered to die out nowadays. It is known this plant has been used on the treatment of respiratory affections by quilombo communities (Brazilian hinterland settlement founded by people of African origin). The aim of this study was to investigate the potential antimicrobial effect of different extracts from *S. chrysantha* against some species of mycobacterias and promastigote forms of two *Leishmania* sp. *In vitro* assays were performed using colorimetric methods with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide or Resazurin, according to the microorganism evaluated. The results showed low activity of extracts against mycobacterial cultures. On the other hand, a growth inhibitory effect was observed in the methanol extract from leaves and on the hexane extract from bark against promastigote culture of *L. amazonensis* (IC₅₀ = 55.16 µg/mL methanol extract and 38.61 µg/mL hexane extract) and *L. chagasi* (IC₅₀ = 72.05 µg/mL hexane extract). New studies are necessary to discover the substances that were responsible for the growth inhibition of promastigote forms.

Introduction

Stiffia chrysantha J.C. Mikan (Asteraceae) is popularly known as diadem, fox tail or gold rain due to the color and shape of its inflorescences. Brazilian popular names of the plant are: rabo-de-cotia, diadema, pompom, flor-da-amizade, esponja, esponja-de-ouro, jambeiro do-mato, pincel. Its main use by the population is ornamental and it is moderately endangered to die out nowadays, according to list annexed to the Decree 19.149 published by the Rio de Janeiro Environmental Protection Bureau (2000). It can be found in Protected Areas such as the National Park of Tijuca, Rio de Janeiro Botanical Garden and Grajaú-Jacarepaguá Road, in Rio de Janeiro, RJ, Brazil (Crespo et al., 2010). Few studies on the chemical composition of this plant have been reported. Oliveira (1999) described flavonoids isolated from its flowers while Marques (2012) found a significant predominance of methyl salicylate in the volatile fractions from fruits ranging from 85% to 95% in the volatile mixture as well as such presence in all aerial parts of the plant during all seasons of the year.

The organic ester methyl salicylate seems to take part in the attraction process of pollinators and in the defense of the plant. Besides, the metabolic conversion of methyl salicylate into salicylic acid and subsequently into acetyl salicylic could justify the ancient use of the plant by quilombo communities for treatment of flu, colds and respiratory affections (Marques et al., 2005). This metabolic conversion from methyl salicylate to salicylic acid is also important for the plant's defense system and for signaling against predators' attacks. Salicylic acid is known as an important phytoalexin present in responses to physical and biological stresses suffered by the plant (Durrant et al., 2004). Employing a rapid radiometric method, Lall et al. (1999) detected a significant inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv exposing the bacteria to the

extracts of *Polygala myrtifolia* (Polygalaceae), a plant that shows high concentration of methyl salicylate. The reported activity found in *P. myrtifolia* and the similar major compound content present in the aerial parts of *Stiffia chrysantha* motivated the investigation about the biological potential this native Brazilian endangered risk species *S. chrysantha* extracts and also to the pure methyl salicylate against mycobacteria. We also tested the activity of the extracts against promastigote forms of leishmania. The diseases caused by mycobacteria and *Leishmania* sp. represent important disorders for Public Health, since long times are needed for effective treatment by using drugs that may cause potential side effects (Almeida et al., 2005; Medeiros et al., 2005; Coll et al., 2009; Sundar et al., 2007). Many research works have been performed with the attempt to identify new therapeutically potential drugs against tuberculosis, mycobacteriosis and leishmaniasis. Such studies have been characterized by the use of preliminary approaches with *in vitro* experiments, before *in vivo* ones and clinical trials (Lahlou et al., 2004).

Material and Methods

Reagents: Dimethyl-sulfoxide (DMSO); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and Methyl salicylate were purchased from Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA); Resazurin sodium salt powder was purchased from Acros Organic N.V., Geel, Belgium).

Collection of aerial parts and roots of *S. chrysantha*: Aerial parts and roots of *S. chrysantha* (leaves, flowers, barks, branches and fruits) were collected under supervision of botanist Roberto L. Esteves in the garden of National Museum of Rio de Janeiro in December 2004. The voucher number is R208153. The plant material was collected early in the morning from the same chosen specimen and it was taken immediately to the laboratory and separately reduced into small pieces. The powdered materials were air-dried.





Preparation of *S. chrysantha* extracts: Air-dried and powdered plant materials (50g of leaf; 30g of bark and 40g of flower) were separately extracted under static maceration using hexane as solvent, and followed by methanol. Removal of residual solvent under reduced pressure was performed using a Büchi rotatory evaporator, equipped with warm bath under controlled temperature (40°C). The same procedure was carried out with methanol as solvent extractor.

Extracts used: hexane extract from leaves and bark of *S. chrysantha*; and methanol extract from leaves and fruits of *S. chrysantha*.

Methyl salicylate: methyl salicylate was used in the experiments on mycobacteria at the following concentrations: 250 µg/mL, 125 µg/mL, 63 µg/mL, 31 µg/mL, 16 µg/mL and 8 µg/mL and using DMSO as diluent.

***Leishmania* sp. assays:** promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br75/Josefa) isolated from a patient who had diffuse cutaneous form of leishmaniasis) were cultured in Warren medium (BHI, plus hemin and folic acid) and promastigote forms of *L. chagasi* (MHOM/Br74/PP75 isolated from patients who had visceral form of leishmaniasis) were cultured in 199 medium, both supplemented with fetal bovine serum and maintained at 24°C during one week. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, São Paulo, Brazil). Brain heart infusion (BHI) from Himédia (Mumbai, Indian). Hemin, folic acid, and 199 medium were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Biological activity against promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi* was determined using the MTT colorimetric method based on reduction of the salt by mitochondrial dehydrogenases (Mossman et al., 1983). Promastigote forms in logarithmic growth stage of *in vitro* growth of both species were used in the experiments. They were added to flat-bottomed 96-well plastic tissue-culture plates at the concentrations 2.0×10^6 cells/mL and 3.0×10^6 cells/mL of *L. amazonensis* and *L. chagasi*, respectively. After 1h and at 24°C, the parasites were exposed to different concentrations of extracts of *S. chrysantha* previously solubilized in DMSO. Concentrations (C) of the extracts were 250.0 µg/mL, 125.0 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.3 µg/mL, 15.6 µg/mL and 7.8 µg/mL and each concentration were performed in triplicate and in two independent assays. The promastigote forms were exposed to the extracts, to Amphotericin B (standard drug used

as the positive control) and to the DMSO solution at 0.01% for 72h 24°C. The colorimetry was assessed by absorbance using SPECTRAMAX 190, Molecular Devices spectrometer and 570nm filter. For the results analysis, *GraFit* (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K) software version 5 was used.

Experiments using rapidly and slow growing mycobacteria: the susceptibility tests for mycobacteria using extracts were performed in 96-well plates using the colorimetric test based on resazurin reduction following the procedure used by Palomino et al. (2002). All experiments were performed in triplicates and at least three repetitions. Concentrated solutions (5mg/mL) of the extracts were prepared by initially solubilizing the extracts in DMSO and subsequently in sterile water. The total content of DMSO in each well reached 10%, which did not inhibit mycobacterial growth. In flat-bottomed 96-well plastic tissue-culture plates, dilutions of the extract were prepared in Middlebrook 7H9 broth (BD-lote.2112134-USA) culture medium enriched with OADC (Becton-Dickinson) at the following concentrations: 2500 µg/mL; 1250 µg/mL; 625 µg/mL; 313 µg/mL; 156 µg/mL and 78 µg/mL resulting in a final volume of 100 µL in each well. Next, 100 µL of slow-growing mycobacteria (*M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, *M. bovis* – BCG (Monroe) or rapidly growing mycobacteria (*M. smegmatis* – ATCC 14468, *M. abscessus* – ATCC 199777, *M. chelonae* – ATCC 5752) suspension was added to the extract solutions separately. The final concentrations of the extracts into the wells were: 1250 µg/mL; 625 µg/mL; 313 µg/mL; 156 µg/mL; 78 µg/mL and 39 µg/mL. The suspensions were prepared in Middlebrook 7H9 (Difco) culture medium enriched with OADC (Becton-Dickinson) at 1:25 concentration from the initial suspension and turbidity equivalent to 1.0 in McFarland scale. Standard drugs were used as positive control for inhibition of mycobacteria growth, such as rifampicin (3-(4-methylpiperazinyloxy)ethyl)-rifamycin – Lot 780773 – SIGMA) against slow-growing mycobacteria (*M. tuberculosis* and *M. bovis*) and ciprofloxacin (ALDRICH Chemistry – Lot: 17850) against rapidly growing mycobacteria (*M. smegmatis*, *M. abscessus* and *M. chelonae*) at the following concentrations: rifampicin – $32 - 0.3 \times 10^{-6}$ µg/mL and ciprofloxacin – $0.5 - 0.9 \times 10^{-7}$ µg/mL, considering a serial dilution (1:2) for both drugs. The plates were sealed and kept at 37°C for 7 days. On the seventh day, in sterile environment, 10 µL of resazurin 0.01% (diluted in ethylenglicol and sterile distilled water) was





added (Resazurin Sodium Salt Powder Acros Organic N.V., Geel, Belgium). Extracts were considered as active against mycobacteria when exhibited MIC < 200 µg/mL (Tosun et al., 2004).

Results and Discussion

The experiments performed in order to evaluate potential antimycobacterial activity of extracts from different parts of *S. chrysantha* did not show biological activity against any of the mycobacteria tested. This judgment is based on a criterion established by Tosun et al. (2004), which considers a substance as active if its MIC < 200 µg/mL. However this limit is controversial. Lima (2006) evaluated the antimicrobial activity of extracts obtained from different Brazilian plant species and verified antimycobacterial activity of methanol extracts from leaves of *Lafoesia pacari* against *M. smegmatis* (MIC = 1250 µg/mL), *M. fortuitum* (MIC = 1250 µg/mL) and *M. phlei* (MIC = 625 µg/mL) not considering hence, the activity limits determined by Tosun et al. (2004).

In our study, two MIC values were determined: one against *M. smegmatis* which resulted from the methanol extract from leaves ($1125.1 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$) and another against *M. chelonae* ($312.5 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$), related to methanol extract from flowers, as shown in Table 1. These found MIC values may indicate the presence of substances capable of interfering with the metabolism of *M. chelonae* and *M. smegmatis*. The other evaluated plant products did not show antimycobacterial activity even at higher concentration. It still has to be discovered the active compounds in the *S. chrysantha* extracts. It is known that the *S. chrysantha* extracts contain considerable amounts of quercetin an important flavonoid (Oliveira, 1999). As it is known, several functions can be attributed to the flavonoids, such as protection of the plants against insects, fungal and bacterial colonization, viral infections as well as attraction of pollinators due to the remarkable colors of these compounds (Salvador et al., 2008). Boligon (2012) studied antimycobacterial activity of quercetin against slowly and rapidly growing mycobacteria and they encountered a MIC > 200 µg/mL that might indicate that quercetin is one of the active compounds of the *S. chrysantha* extract.

Seasonal evaluation of *S. chrysantha* volatile fractions revealed methyl salicylate as the major constituent of flowers, fruits and leaves. The high content

of this compound was observed mainly in the fruits and flowers during the whole year, suggesting an importance in the attraction process of pollinators, defense system and/or for signaling against predators' attacks (Marques et al., 2012). Methyl salicylate has already been related to antimycobacterial activity by Lall and co-workers (1999) that verified a significant effect of *Polygala myrtifolia* (Polygalaceae) extract, which contains great quantities of methyl salicylate. In addition, methyl salicylate (83.8%, 89.1% and 97.8%) was found as the main volatile constituent in roots of the *P. sabulosa*, *P. paniculata* and *P. cyparissia*, respectively (Pizzolati et al. 2009). Therefore, one might surmise that this compound could be responsible for antimycobacterial properties.

In our study, antimycobacterial activity of methyl salicylate has been evaluated for the first time and the results revealed no inhibitory activity on the mycobacterial growth (Table 1). The results suggest that the significant inhibition of *M. tuberculosis* H37Rv found by Lall (1999), is not due to the exclusive action of methyl salicylate, the major compounds of that extract. This preliminary screening against *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv was performed using acetone and water plant extracts. The minimal inhibitory concentration of *Polygala myrtifolia* was 0.1 mg/ml, being also active against the resistant strain at 0.1 mg/ml. Despite of the good activity displayed by *P. myrtifolia* extract, no phytochemical separation was performed in the related study. A chemical investigation of the genus *Polygala* showed the occurrence of a variety of secondary metabolites, such as xanthenes, saponins, oligosaccharides, flavonoids, coumarins and styrylpyrones (Johannl et al. 2011). Some of these compounds are able to be extracted by the acetone and/or water preparations and could be acting against the *M. tuberculosis* studied strain.

The hexane extract from the bark was active against both *Leishmania* species (*L. amazonensis*: IC₅₀ = $38.61 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$; *L. chagasi*: IC₅₀ = $72.05 \pm 4.28 \mu\text{g/mL}$), while the methanol extract from the leaves was active only against *L. amazonensis* (IC₅₀ = $55.16 \pm 5.08 \mu\text{g/mL}$). The other extracts did not reveal inhibitory activity of promastigote forms growth, at least in the range of experiments performed.



Table 1: Inhibitory effect of *Stiffia chrysantha* extracts and methyl salicylate against *Mycobacterium* and *Leishmania* species of medical interest.

EVALUATED PRODUCT	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	
Fruit (MeOH)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Flower (MeOH)	N.I.	312.5 ± 0.16	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Leaves (MeOH)	1125.1 ± 0.13	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	55.16 ± 5.08	N.I.
Bark (Hex)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	38.61 ± 0.48	72.05 ± 4.28
Leaves (Hex)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
Methyl salicylate	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.E.	N.E.
Ciprofloxacin	0.018 ± 0.012	0.014 ± 0.015	0.21 ± 0.26	---	---	---	---
Amphotericin B	---	---	---	---	---	0.9 ± 0.0001	1.9 ± 0.0001
Rifampicin	---	---	---	0.818 ± 1.280	0.004 ± 0.001	---	---

In vitro Antimycobacterial and antileishmanial experiments using extracts of *S. chrysantha*, methyl salicylate and standard antimicrobials.
N.I.: No inhibition; N.E.: Not evaluated.





Guided by the considerations concerning about antimycobacterial activity one may guess that the leishmanicidal activity might also be related to the quercetin. This hypothesis is supported by findings in the literature. For example, Sarkar and colleagues (2002) detected reduction of leishmanias in the spleen of hamsters of this phytocompound. This reduction is probably due to an interference of quercetin in the leishmania's iron metabolism (Sen et al., 2008).

In conclusion, the biological activities verified from the extracts from different parts of *S. chrysantha* aggregate a relevant value to the plant, once it was the first time that the antimycobacterial and antileishmanial potential activity has been evaluated. Despite the low activity found against mycobacteria culture, the promastigote culture suffered a significant inhibition of its growth. However, new studies are necessary in order to elucidate which phytocompounds in the plant material are responsible for the biological activity and how they act against the *Leishmania* species exposed to the products used in this study.

Acknowledgment:

We thank Marlei da Silva Gomes (Microbiology Institute – Centro de Ciências da Saúde – UFRJ) for preparation of materials for mycobacterial assays.

References

- Almeida, P.; Oliveira, M.M.; Hinrichsen, S.L.; Kawasaki, A.M.; Lima, E.H.M. 2005 - Tuberculose. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1ª edição, ed.: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 281-296.
- Boligon, A.; Agertt, V.; Janovik, V.; Cruz, R.C.; Campos, M.M.A.; Guillaume, D.; Athayde, M.L.; Santos, A.R.S. 2012 - Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n.1, p. 45-52.
- Coll, P. 2009 - Fármacos com actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, p. 474-480.
- Crespo, M.S. 2010 - *Essências florais de espécies nativas da Mata Atlântica brasileira*. 1ª Edição, São Paulo, Florais da Mata Atlântica bem estar equilíbrio e harmonia.
- Durrant, W.E.; Dong, X. 2004 - Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 42, p. 185-209.
- Johann1, S.; Mendes, B.G.; Missau, F.C.; Resende, M.A.; Pizzolatti, M.G. 2011 - Antifungal activity of five species of *Polygala*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 1065-1075.
- Lall, N.; Meyer, J.J.M. 1999 - *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 347-354.
- Lahlou, M. 2004 - Methods to study the phytochemistry and activity of essential oils. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 435-448.
- Lima, M.R.F.; Azevedo-Ximenes, E.C.P.; Luna, J.; Goulart-Sant'Ana, A.E. 2006 - The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 300-306.
- Marques, A.M.; Garcia, A.I.C.; Esteves, R.; Lima, M.C.H.P.; Araújo-Filho, H.C.; Kaplan, M.A.C. 2005 - *Potencialidades da fração volátil de Stiffia chrysantha Mikan*. In: XXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, Rio de Janeiro, Livro de Resumos, Rio de Janeiro, p. 38-39.
- Marques, A.M.; Lima, C.H.P.; Esteves, R.; Araújo-Filho, H.C.; Kaplan, M.A.C. 2012 - Evaluation of the volatile components and the seasonal variation of the methyl salicylate from *Stiffia chrysantha* Mikan by HS-SPME/GC-MS. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 11, p. 413-419.
- Medeiros, I.M.; Nascimento, E.L.T.; Hinrichsen, S.L. 2005 - Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1ª edição, ed.: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 398-409.
- Mossman, T. 1983 - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*, v. 16, p.55-63.
- Oliveira, M.C.C.; Carvalho, M.G.; Ferreira, D.T.; Braz-Filho, R. 1999 - Flavonóides das flores de *Stiffia chrysantha* Mikan. *Química Nova*, v. 22, p. 182-185.
- Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. 2002 - Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2720-2722.
- Pizzolatti, M. G.; Mendes, B. G.; Soldi, C.; Missau, F. C.; Bortoluzzi, J. H.; Carasek, E. 2009 - Analysis of Volatile Compounds Released From Flowers and Roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by





Headspace/SPME. *Journal of Essential Oil Research*, v. 21, n. 3, p. 265-269.

Salvador, M.C. 2008 - *Efeito de genótipos de soja e de flavonóides na biologia e no intestino médio de Anticarsia gemmatalis*. Jaboticabal 129p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal.

Sarkar, S.; Mandal, S.; Sinha, S.; Mukhopadhyay, S.; Basu, M.K. 2002 - Quercetin: Critical Evaluation as an Antileishmanial Agent In Vivo in Hamsters Using Different Vesicular Delivery Modes. *Journal of Drug Targeting*, v. 10, n. 8, p. 573-578.

Secretaria do Meio Ambiente – Prefeitura Municipal do Rio de Janeiro 2011. Espécies Ameaçadas de Ex-

tinção. Disponível em <http://www.rio.rj.gov.br/smac/esp_est_flo_3.php> acesso em: maio de 2011.

Sen, G.; Mukhopadhyay, S.; Ray, M.; Biswas, T. 2008 - Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 1066-1075.

Sundar, S.; Olliaro, P.L. 2007 - Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 3, n. 5, p. 733-740.

Tosun, F.; Akyüz, K.C.; Sener, B.; Vural, M.; Palittapongarnpim, P. 2004 - Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 273-275.

Received in October 2012. Accepted in January 2013.



Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase

Essential oils as acetylcholinesterase inhibitors

¹Stefânia P. de Souza; ²Simone S. Valverde; ³Raphael L.N.R. da Silva; ⁴Keila S.C. Lima; ⁵Antônio L.S. Lima

^{1,2,4,5}Instituto Militar de Engenharia (IME), Urca, Praia vermelha. CEP. 22290270 – Rio de Janeiro, RJ - Brasil

^{1,2,3}Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos – FarManguinhos /FIOCRUZ. Rua Sizenando Nabuco, 100 – Manguinhos. CEP. 21041-250 – Rio de Janeiro, RJ - Brasil

*Correspondência: *e-mail: stefaniasouza@far.fiocruz.br

Palavras chave:

acetilcolinesterase; Alzheimer; óleos essenciais.

Keywords:

acetylcholinesterase; Alzheimer's disease; essential oils.

Resumo

Produtos naturais identificados a partir do uso tradicional de plantas medicinais representam uma grande oportunidade para o desenvolvimento de novos tipos de terapias. A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa, progressiva, que afeta principalmente a população idosa, responsável por 50-60% dos casos de demência em pessoas com mais de 65 anos de idade. Um dos mais promissores caminhos para tratar esta doença é aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Este trabalho traz uma atual revisão de estudos envolvendo óleos essenciais como inibidores da AChE.

Abstract

Natural products identified from the traditional herbal use represent a significant opportunity for developing new types of therapies. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder, progressive, affecting mainly the elderly population, accounting for 50-60% of dementia cases in people over 65 years of age. One of the most promising approaches for treating this disease is to increase the level of acetylcholine in the brain inhibiting acetylcholinesterase (AChE). This paper presents a review of current studies involving essential oils as inhibitors of AChE.



Introdução

A acetilcolina (ACh) é encontrada em vertebrados e artrópodes e é um dos principais compostos pelos quais, os impulsos elétricos são conduzidos por células nervosas, transmitidos para outras células nervosas ou para músculos voluntários e involuntários. Foi descoberta em 1867 como um composto sintético e detectado em tecido humano em 1906 em extratos de glândula supra-renal a partir da qual a adrenalina havia sido removida (Hunt e Taveau, 1906). Dois tipos principais de receptores sensíveis à ACh são conhecidos: muscarínicos e nicotínicos.

Os receptores muscarínicos são principalmente associados ao sistema nervoso periférico e às musculaturas lisa e cardíaca. O efeito de ligação com a acetilcolina é geralmente associado com a estimulação do sistema nervoso parassimpático. Os sintomas clássicos da estimulação parassimpática são: diminuição da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, constrição dos brônquios, aumento da salivação, a promoção da digestão e aumento da motilidade intestinal, a liberação de líquidos da bexiga e acomodação dos olhos para visão de perto, com a contração das pupilas (Lanari et al., 2006).

Os receptores nicotínicos são encontrados no sistema nervoso central (SNC) e na extremidade das placas motoras, que são as sinapses entre nervos e músculo esquelético. No SNC, a estimulação da ACh nos receptores nicotínicos parece estar associada com os processos cognitivos e memória, enquanto que em músculos esqueléticos provoca a ACh contração (Lombardi et al., 2011).

ACh é armazenada nos terminais nervosos em estruturas chamadas vesículas. O conteúdo dessas vesículas é liberado a partir das terminações nervosas quando o terminal do nervo é despolarizado, e a ACh liberada entra na sinapse e se liga ao receptor. A ACh que é liberada possui uma meia-vida muito curta devido à presença de grandes quantidades da enzima acetilcolinesterase (AChE) que hidroliza a ligação éster na molécula de ACh, levando à perda de sua atividade estimuladora. A inibição da AChE, portanto, resulta em um prolongamento da existência e atividade da ACh. Este conceito tem sido empregado na medicina para o tratamento de estados de doença associados a níveis insuficientes de acetilcolina, e na toxicologia, para causar intoxicação ou morte por meio da estimulação colinérgica em excesso (Silman e Sussman, 2005).

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que afeta principalmente a população idosa e é considerada como responsável pela maioria dos casos de demência em pessoas

de 65 anos ou mais. Esta doença é caracterizada por vários sintomas como perda de memória e distúrbios de linguagem, disfunção cognitiva e distúrbios comportamentais (depressão, agitação e psicose), que se tornam progressivamente mais graves. Devido à sua natureza debilitante, gera problemas sociais e econômicos na sociedade (Brookmeyer et al., 2007).

O déficit de acetilcolina é uma característica neuroquímica de pacientes com diagnóstico clínico da doença de Alzheimer. Usar inibidores da acetilcolinesterase (AChE) para retardar a hidrólise catabólica da acetilcolina, visando compensar essa deficiência em particular nos terminais sinápticos, tem sido sugerido como um dos remédios mais diretos para o tratamento DA. Até o momento, apenas três inibidores da acetilcolinesterase, rivastigmina, donepezil e galantamina, foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA para a tratamento da DA. Atualmente, não há cura para o transtorno, assim, há uma real necessidade de novas pesquisas para o tratamento DA (Racchi et al., 2004; Lanari et al., 2006).

A atividade psicoativa de extratos obtidos de plantas terrestres é utilizada pela humanidade há milhares de anos. Atuam sobre o nível de consciência, cognição e sobre aspectos emocionais, sendo usados com vários fins na terapêutica, mas também em rituais espirituais e outros menos nobres. Estudos na farmacologia de produtos naturais como neurotransmissores destacam o papel de alcalóides e de terpenos, entre os quais, vários são compostos voláteis oriundos de óleos essenciais (Loizzo et al., 2009).

Óleos essenciais são compostos obtidos de partes de plantas principalmente, através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como por processos de prensagem (como por exemplo do pericarpo de frutos cítricos). São constituídos de terpenos (principalmente mono e sesquiterpenos) e fenilpropanóides, metabólitos estes, que conferem suas características organolépticas, devido ao seu baixo peso molecular e alta pressão de vapor. Os terpenóides são produzidos pela natureza a partir do ácido mevalônico, do qual se obtém a unidade isoprênica, o pirofosfato de isopentenila. O encadeamento da unidade isoprênica produz diversas classes de terpenos, entre os quais os monoterpenos, compostos com dez átomos de carbono e os sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono (Alves, 2001).

Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para a obtenção e a produção de óleos essenciais, a exemplo dos óleos de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos e como o próprio medicamento. São empregados prin-





principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas orais e tópicas, sendo comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (Bizzo et al., 2009).

Terpenóides como inibidores da AChE

Numerosos óleos essenciais têm demonstrado atividade de inibição contra a AChE, incluindo *Narcissus poeticus* L. (Okello et al., 2008), espécies de *Melaleuca* (Mills et al., 2004), *Acorus calamus* L. (Mukherjee et al., 2007), *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Sira-mon et al., 2009), *Marlierea racemosa* Kiaersk. (Souza et al., 2009), *Cymbopogon schoenanthus* Spreng. (Khadri et al., 2008) e diversos óleos da família Lamiaceae (Dohi et al., 2009; Loizzo et al., 2008 e 2009; Houghton et al., 2007).

Muitos dos constituintes destes óleos têm sido identificados como inibidores da AChE incluindo monoterpenos como neral, geranial e linalol (Dohi et al., 2009; Picollo et al., 2008; Perry et al., 2000), sesquiterpenos como óxido de cariofileno e tumerona (Fujiwara et al., 2010) e alguns fenilpropanóides como eugenol (Dohi et al., 2009).

Estudos sobre a relação estrutura-atividade entre AChE e monoterpenóides mostraram que os hidrocarbonetos apresentam forte inibição comparados a álcoois e cetonas. A presença do grupo funcional oxigenado diminui a força de inibição da AChE (Miyazawa

e Yamafuji, 2005). E mais recentemente, estudos de estrutura-atividade com sesquiterpenóides do tipo bisabolano, por Fujiwara e colaboradores (2010) constataram que estes inibem a AChE na seguinte ordem de potência: cetonas < álcoois < hidrocarbonetos.

Alguns óleos essenciais e seus constituintes têm sido investigados por seus efeitos potenciais nos distúrbios cognitivos. Esses estudos incluem principalmente os óleos de *Salvia officinalis* L. e *S. lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae), que inibem a AChE *in vitro* e influenciam positivamente a função colinérgica e cognitiva *in vivo* (Perry et al., 1996; Perry et al., 2002). As substâncias 1,8-cineol e α -pineno são considerados os componentes inibitórios da AChE mais ativos do óleo de *S. lavandulifolia* Vahl. (α -pineno é também um componente anti-AChE do óleo de *S. potentillifolia* Boiss. & Heldr. ex Benth.), embora outros de seus constituintes também possam inibir a AChE, provavelmente por sinergismo (Perry et al., 2000; Savelev et al., 2003).

O extrato das partes aéreas de outro membro das Lamiaceae, *Teucrium polium* L., é anti-amnésico *in vivo* e inibe a AChE *in vitro*, mas os compostos responsáveis por essa atividade ainda não foram determinados (Orhan e Aslan, 2009). O limoneno e álcool perfílico, componentes dos óleos essenciais de *Citrus* (Rutaceae), melhoram o comprometimento da memória induzida por escopolamina, que é possivelmente devido à inibição da AChE (observada *in vitro*). Os resultados mais recentes envolvendo inibição da AChE por óleos essenciais estão relatados na tabela 1.





Tabela 1. Inibição da AChE por óleos essenciais.

Plantas	Família	Inibição do óleo (IC ₅₀)	Moléculas Isoladas (IC ₅₀)	Referência
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	Asteraceae	0,058 mg/mL	1,8-cineol (0,015 mg/mL), α-pineno (0,022mg/mL), eugenol (0,48 mg/mL), α-terpineol (1,3 mg/mL), terpinen-4-ol (3,2 mg/mL)	Dohi et al., 2009
<i>Inula graveolens</i> L.,	Asteraceae	0,27 mg/mL		Fujiwara et al., 2010
<i>Lavandula officinalis</i> Chaix	Lamiaceae	0,82 mg/mL		Mata et al., 2007 e Miyazawa et al., 1998
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Lamiaceae	1,6 mg/mL		
<i>Peltophorum dasyrachis</i> Kurz ex Bakar	Fabaceae	2,8 µg/mL	(S)-ar-turmerona (191,1 µM), (S)-dihidro-ar-turmerona (81,5 µM)	
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	Apiaceae	252 µg/mL	verbenona (163 µg/mL), carvacrol (115 µg/mL), (E)-anetol (5,9 µg/mL)	
<i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae	357 µg/mL		Kivrak et al., 2009
<i>Mentha pulegium</i> L.	Lamiaceae	324 µg/mL		Savelev et al., 2003 e 2004
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	69,8 µg/mL		
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Lamiaceae	190 µg/mL		
<i>Salvia potentillifolia</i> Boiss. and Heldr ex Bentham	Lamiaceae	>200 µg/M		
<i>Salvia fruticosa</i> Mill.	Lamiaceae	0,06 mg/mL	α-pineno (81,7 µg/M)	
<i>Salvia lavandulaefolia</i> Vahl.	Lamiaceae	0,12 mg/mL	α-pineno (0,1 mg/mL), β -pineno (0,2 mg/mL), 3-careno (0,03 mg/mL), β -cariofileno (0,03mg/mL)	
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	0,08 mg/mL		
<i>Salvia officinalis</i> L. <i>purpurea</i>	Lamiaceae	0,24 mg/mL		
<i>Myrceugenia myrcioides</i> (Cambess.) O. Berg.	Myrtaceae	21,88 µg/mL		Souza et al., 2010
<i>Eugenia riedeliana</i> O. Berg.	Myrtaceae	67,3 µg/mL		Tel et al., 2010
<i>Salvia chionantha</i> Boiss.	Lamiaceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 56,7%		Kiendrebeogo et al., 2011
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnhardt	Myrtaceae	18,98 µg/mL		
<i>Ocimum canum</i> Sims	Lamiaceae	36,16 µg/mL		
<i>Mentha aquatica</i> L.	Lamiaceae	27 µg/mL	(-)-piperitona (136 µg/mL), (+)-pulegona (136µg/mL), piperitenona (100 µg/mL), viridiflorol (25 µg/mL), elemol (34 µg/mL), 1,8-cineol(41 µg/mL)	Miyazawa et al., 1998





Plantas	Família	Inibição do óleo (IC50)	Moléculas Isoladas (IC50)	Referência
<i>Mentha arvensis</i> L.	Lamiaceae	49 µg/mL		
<i>Mentha citrata</i> (Ehrh.)	Lamiaceae	38 µg/mL		
<i>Mentha gentilis</i> (Mint)	Lamiaceae	52 µg/mL		
<i>Mentha japonica</i> (Miq.) Makino	Lamiaceae	120 µg/mL		
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	74 µg/mL		
<i>Mentha requienii</i> (Corsican Mint)	Lamiaceae	130 µg/mL		
<i>Mentha spicata</i> L.	Lamiaceae	109 µg/mL		
<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel	Myrtaceae	51,2 µg/mL	1,8-cineol(49 µg/mL)	Miyazawa e Yamafuji 2006
<i>Eupatorium ballotifolium</i> Kunth	Asteraceae	inibição em CCD		Albuquerque et al., 2010
<i>Teucrium polium</i> L.	Lamiaceae	0,55 mg/ml		Orhan e Aslan, 2009
<i>Salvia triloba</i> L.	Lamiaceae	0,71 mg/ml		
<i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.	Lamiaceae	0,31 mg/ml		Perry et al., 2002
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> L. Spreng.	Poaceae	0,26 mg/ml		Khadri et al., 2008
<i>Ajuga bracteosa</i> Wall ex. Benth	Lamiaceae	14 µM		Riaz et al., 2007
<i>Pimpinella anisoides</i> V Brig.	Apiaceae	227,5 µg/mL	limoneno (225,9 µg/mL), trans-anetol (134,7 µg/mL), sabineno (176,5 µg/mL)	Menichini et al., 2009
<i>Hypericum undulatum</i> Willdenow	Hypericaceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 81,7 %		Ferreira et al., 2006
<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 56,1 %		
<i>Lavandula pedunculata</i> (Miller.) Cav	Lamiaceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 67,8 %		
<i>Malva silvestris</i> L.	Malvaceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 25 %		
<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	0,5 mg/mL de óleo inibe 53,1 %		
<i>Origanum ehrenbergii</i> Boiss	Lamiaceae	0,3 µg/mL		Loizzo et al., 2009
<i>Origanum syriacum</i> L.	Lamiaceae	1,7 µg/mL		





Conclusão:

O presente trabalho mostra que muitos óleos essenciais têm apresentado atividade inibidora da acetilcolinesterase e podem ser considerados para estudos posteriores no tratamento da doença de Alzheimer (DA). Em particular, as espécies que pertencem à família Lamiaceae têm sido as mais estudadas. Os monoterpenos 1,8-cineol e α -pineno apresentaram forte atividade de inibição quando testados isoladamente. Mais pesquisas são necessárias para seguir explorando estes terpenos para a busca de tratamentos promissores para DA.

Referências

- Albuquerque, M.R., Jane, R., Santos, H.S., Souza, E.B., Silva, R.M., Menezes, J.E.S.A., Pessoa, O.D.L., Braz-Filho, R., Costa, S.M.O. 2010. Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, p. 615-620.
- Alves, H.M. 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v.3, p.10-15.
- Bizzo, H.R., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M. 2009. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, p. 588-594.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, v. 3, p. 186-191.
- Dohi, S., Terasaki, M., Makino, M. 2009. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 4313-4318.
- Ferreira, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p. 31-37.
- Fujiwara, M., Yagi, N., Miyazawa, M. 2010. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 2824-2829.
- Houghton, P.J., Howes, M., Lee, C.C., Steventon G. 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 391-400.
- Hunt, R., Taveau, R.D. 1906. On the physiological action of certain cholin derivatives and new methods for detecting cholin. *British Medical Journal*, v. 2, p. 1788-1791.
- Khadri, M.L.M., Serrakheiro, J.M.F., Nogueira, M., Neffati, S., Smiti, M.E.M., Araujo, A. 2008. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils from Tunisian *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of Chemical Composition by GC-MS and ¹³C-NMR. *Food Chemistry*, v. 109, p. 630-637.
- Kiendrebeogo M., Ahmed, Y. Coulibaly, R.C.H., Nebie, B.Z., Lamien, C.E., Lamien-Meda, A., Nacoulma, O.G. 2011. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 21, p. 63-69.
- Kivrak, I., Mehmet, E.D., Mehmet, O., Nazime, M., Mansur, H., Gulacti, T. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, v. 116, p. 470-479.
- Lanari, A., Amenta, F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D., Parnetti, L. 2006. Neurotransmitter Deficits in Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer's Disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, p. 158-165.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Menichini, F. 2008. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: An update. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1209-1228.
- Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A.M., Statti, G.A., De Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F., Frega, N.G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. Essential Oils. *Food Chemistry*, v. 117, p. 174-180.
- Lombardi, E.M.S., Prado, G.F., Santos, U.P., Frederico, L.A.F. 2011. Women and smoking: Risks, impacts, and challenges. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 37, p. 118-128.





- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo, M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, v. 103, p. 778–786.
- Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Marrelli, M., Statti, G.A., Menichini, F., Conforti, F. 2009. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia*, v. 80, p. 297–300.
- Mills, C., Cleary, B.J., Gilmer, J.F., Walsh, J.J. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, p. 375-9.
- Miyazawa, M., Hitomi, W., Kazuyasu, U., Hiromu, K. 1998. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of *Mentha* Species. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 46, p. 3431-3434.
- Miyazawa, M., Yamafuji, C. 2005. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1765–1768.
- Miyazawa, M., Yamafuji, C. 2006. Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids. *Flavour Fragrance*. v. 21, p. 198–201.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J. 2007. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oil and its main constituents of *Acorus calamus*. *Planta Medica*, v. 73, p. 283-285.
- Okello, E.J., Dimaki, C., Howes, M.R., Houghton, P.J., Perry, E.K. 2008. In vitro inhibition of human acetyl- and butyryl-cholinesterase by *Narcissus poeticus* L. (Amaryllidaceae) flower absolute. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, v. 2, p. 105-110.
- Orhan I., Aslan, M. 2009. Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 327–332.
- Perry, N., Court, G., Bidet, N., Court, J., Perry, E. 1996. European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 11, p. 1063–1069.
- Perry, N.S., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E.K. 2000. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 895–902.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Jenner, P., Keith, A., Perry, E.K. 2002. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. *Phytomedicine*, v. 9, p. 48-51.
- Picollo, M.I., Toloza A.C., Mougabure C.G., Zygadlo, J., Zerba, E. 2008. Anticholinesterase and pediculi- cidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia*, v. 79, p. 271–278.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., Govoni, S. 2004. Acetylcholinesterase Inhibitors: Novel Activities of Old Molecules. *Pharmacological Research*, v. 50, p. 441-451.
- Riaz, N., Sarfraz, A., Nawaz, N.M., Abdul, M., Nighat, A., Samar, A., Shafi, U., Pir, M., Iqbal, C. 2007. Isolation and Enzyme-Inhibition Studies of the Chemical Constituents from *Ajuga bracteosa*. *Chemistry & Biodiversity*, vol. 4, p. 345-351.
- Savelev, S., Okello, S.E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M., Perry, E.K. 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 75, p. 661–668.
- Savelev, S., Edward, U., Okello, J., Elaine K. Perry, E.K. 2004. Butyryl- and Acetyl-cholinesterase Inhibitory Activities in Essential Oils of *Salvia Species* and Their Constituents. *Phytotherapy. Research*, v. 18, p. 315–324.
- Silman, I., Sussman, J.L. 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 5, p. 293–302.
- Siramon, P., Ohtani, Y., Ichiura, H. 2009. Biological performance of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal of Wood Science*, v. 55, p. 41–46.
- Souza, A., Silva, M.C., Cardoso-Lopes, E.M., Cordeiro, I., Sobral, M.E.G., Young, M.C.M., Moreno, P.R.H. 2009. Differential acetyl cholinesterase inhibition by volatile oils from two specimens of *Marlierea racemosa* (Myrtaceae) collected from different areas of the





Atlantic rain forest. *Natural Product Communications*, v. 4, p. 1143-1146.

Souza, A., Elaine, M.C.L., Michelle, C.S., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E. G., Moreno, P.R.H. 2010. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, p. 175-179.

Tel, G., Mehmet, O., Mehmet, E.D., Mansur, H., Gulacti, T. 2010. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 3189–3193.

Recebido em Março de 2012. Aceito em Julho de 2012

