



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Antonia Eliene Duarte

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL TOXICOLÓGICO
IN VITRO E *IN VIVO* DE *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer.**

**Santa Maria, RS, Brasil,
2016**

Antonia Eliene Duarte

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL TOXICOLÓGICO
IN VITRO E IN VIVO DE *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marilise Escobar Burger

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva

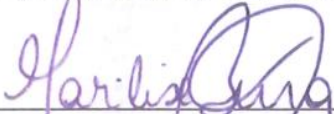
**Santa Maria, RS, Brasil,
2016**

Antonia Eliene Duarte

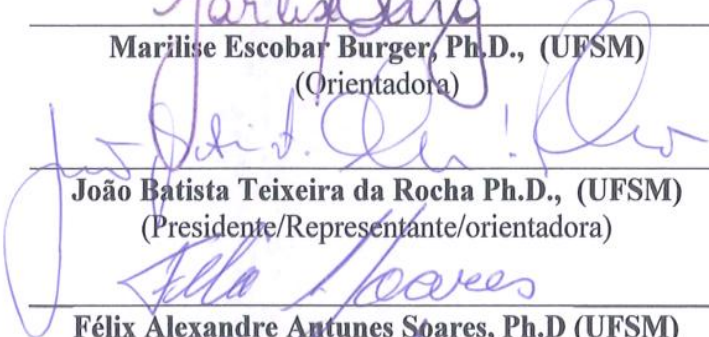
**ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL TOXICOLÓGICO
IN VITRO E IN VIVO DE *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Bioquímica Toxicológica.**

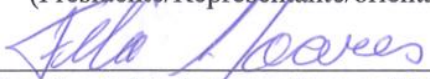
Aprovada em 22 de janeiro de 2016:



Marilise Escobar Burger, Ph.D., (UFSM)
(Orientadora)



João Batista Teixeira da Rocha Ph.D., (UFSM)
(Presidente/Representante/orientadora)



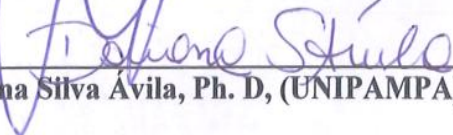
Félix Alexandre Antunes Soares, Ph.D (UFSM)



Maria Rosa Chitolina Schetinger, Ph.D (UFSM)



Irwin Rose Alencar de Menezes, Ph.D (URCA)



Daiana Silva Ávila, Ph. D, (UNIPAMPA)

**Santa Maria, RS
2016**

Ficha catalográfica da obra elaborada elaborada pelo autora através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM.

DUARTE, ANTONIA ELIENE
ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL
TOXICOLÓGICO IN VITRO E IN VIVO DE *Rhaphiodon echinus*
(Nees & Mart) Schauer / ANTONIA ELIENE DUARTE.-2016.
96 p.; 30cm

Orientadora: MARILISE ESCOBAR BURGER
Coorientadora: MARIA ARLENE PESSOA DA SILVA
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2016

1. *Rhaphiodon echinus* Rhamdia quelen 2. Ratos
(Wistar) 3. Toxicologia 4. Modulação 5. Atividade
Antifúngica e Bacteriana. I. BURGER, MARILISE ESCOBAR
II. SILVA, MARIA ARLENE PESSOA DA III. Título.

Todos os direitos autorais reservados a Antonia Eliene Duarte. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só será feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Raimundo Siebra, 101, Bairro Conjunto Belas Artes. CEP.: 63.100-000. Crato-CE.
Fone: (0xx) 88.3102.1204 – Depto. Biologia-URCA. E.mail: duarte105@yahoo.com.br

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jesus Martiniano (*in memorian*) e Maria Socorro, ao meu esposo Dário e aos nossos filhos, Bruninha e Dudu. Dedico também aos meus irmãos: Cícero, João, Elizete, Elizier e Eugênio, por todo o incentivo, carinho e compreensão, pois a família é a base para as conquistas até aqui alcançadas. Sempre estiveram ao meu lado nas decisões que culminaram com a realização deste doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Bioquímica Toxicológica, através do Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha por criar o DINTER, e oportunizar a realização deste doutorado. Pela receptividade, apoio, confiança, e por seus valiosos ensinamentos, além de permitir a minha estada em seu laboratório e por compartilhar o conhecimento quanto às técnicas utilizadas.

À minha orientadora Prof. Dr. Marilise Escobar Burger, não só pela orientação nesta tese, mas também por todas as oportunidades proporcionadas, pelo carinho, confiança, receptividade, apoio e ensinamentos, decisivos, para o meu desenvolvimento profissional.

Agradeço ainda aos demais professores que fizeram, de um jeito ou de outro, parte desta formação, a co-orientadora Maria Arlene Pessoa da Silva, Irwin Rose Alencar, Henrique Douglas Melo Coutinho, Maria Flaviana Morais Braga e Nadghia Leite.

A Emily, Geisa, Kati, Jean Paul, Marivando e ao grupo FARMATOX, sobretudo pelo companheirismo, com orientação e ajuda nos experimentos, pelo harmonioso convívio diário e pelos momentos de descontração. São em momentos como estes que amizades são consolidadas. Sem o apoio destes, a realização desta tese não seria possível. A Aline Boligon, pela disponibilidade em ajudar.

As professoras e amigas Elisângela Beneval e Marlene Meneses, por todo o carinho, apoio incondicional, e caminhada neste doutorado.

À CAPES, pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro concedido. E as demais pessoas que contribuíram para a minha formação profissional. Meu sincero, muito obrigada!

Não consulte seus medos, mas suas esperanças e sonhos. Não pense sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não desenvolvido. Não se preocupe com os fracassos, acredite naquilo que você ainda realizará.

Papa João XXIII

RESUMO

ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL TOXICOLÓGICO

IN VITRO E *IN VIVO* DE *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer.

Autora: Antonia Eliene Duarte

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marilise Escobar Burger

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Maria Arlene Pessoa da Silva

As plantas medicinais têm sido muito utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, especialmente porque tem baixo custo e baixa toxicidade em comparação com as drogas sintéticas. O interesse tóxico-farmacológico destes produtos têm gerado grande interesse para a comunidade científica. Neste contexto, espécies da família Lamiaceae apresentam importâncias particulares, não só por causa de suas aplicabilidades na indústria de alimentos e cosméticos, mas também devido ao seu uso etnofarmacológico. A espécie *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer, popularmente conhecida como “betônica”, é distribuída na parte Nordeste do Brasil e as infusões de suas folhas são usadas como chá para o tratamento da inflamação, infecção microbiana e como agente antitussígeno. Apesar de seu uso, não existe relatos sobre a toxicidade desta planta. Além disso, não há nenhuma evidência científica que justifica o uso terapêutico de *R. echinus* na medicina popular. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil etnobotânico e toxicológico de *R. echinus* em diferentes modelos experimentais, bem como avaliar seu perfil fitoquímico e seu potencial antioxidante em modelos *in vitro*. Particularmente, avaliamos o perfil toxicológico da infusão do extrato das folhas de *R. echinus* (AEREi) em diferentes espécies (*Artemia salina*, *Rhamdia quelen*, *Rattus norvegicus*) e o potencial antioxidante e citotóxico do extrato aquoso (EARE) e etanólico (EERE) das folhas de *R. echinus*. Adicionalmente, o óleo essencial obtido a partir das folhas de *R. echinus* foi testado sozinho e em combinação com antifúngico (fluconazol e nistatina) e antibióticos (gentamicina, amicacina, ciprofloxacina e imipenem) contra várias cepas bacterianas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) e fúngicas (*Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*). Além disso, a composição química do óleo essencial bem como dos extratos (infusão (EAREi), EARE, EERE) foi avaliado pelo CG-MS e HPLC, respectivamente. Os resultados indicaram que os extratos (extratos infusão (EAREi), EARE, EERE) contêm o ácido gálico, clorogênico, cafeico, elágico, e quercetina e rutina. O valor estimado de IC₅₀ às 24 h e 48 h foi 181,70 µg/mL (124,62-264,93) and 100,63 µg/mL (71,01-142,59), respectivamente com a *Artemia salina* (intervalo de confiança de 95%). No entanto, a exposição de jundiá (*Rhamdia quelen*) a diferentes concentrações de EAREi (1000-5000 mg/mL) não causou mortalidade, revelando ausência de atividade pró-oxidante, como observado em ensaios de geração de espécies reativas (RS) e de peroxidação lipídica (PL) em brânquias, rim, fígado e cérebro. Os níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase (GGT), indicaram que as diferentes concentrações de EAREi não foram hepatotóxicas para os jundiás. Na segunda parte deste trabalho, os extratos aquosos (EARE) e etanólicos (EERE) de *R. echinus* apresentaram atividade antioxidante evidenciado pela sequestro do radical DPPH (IC₅₀ = 111.9 µg/mL (EERE) and IC₅₀ = 227.9 µg/mL (EARE)) e pelo seu potencial de inibir a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzido pelo Fe²⁺ (10 µM) nos homogeneizados de cérebro e fígado de rato. EARE e EERE (30-480 µg/mL) não induziram genotoxicidade, citotoxicidade ou fragilidade osmótica em células de sangue humano. Os resultados obtidos pelo método de microdiluição revelaram baixa atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial das folhas de *R. echinus* (MIC ≥ 1024 µg/mL). No entanto, ele foi capaz de modular a atividade das drogas antimicrobianas testadas, quando adicionado ao meio de crescimento na concentração sub-inibitória (ou seja, MIC/8). O óleo essencial das folhas de *R. echinus* mostrou atividade quelante ao ferro (II), indicando que ele poderia ser de importância relevante no tratamento de doenças neurodegenerativas e infecciosas. O óleo essencial revelou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, os quais podem ser pelo menos em parte, responsáveis pela ação moduladora do óleo, sendo um produto natural capaz de aumentar a atividade antibacteriana e antifúngica, de medicamentos antimicrobianos. Contudo, os resultados sugerem que *R. echinus* pode prevenir/proteger contra doenças associadas aos danos oxidativos, e indicam que o óleo essencial de suas folhas pode modular a atividade antibacteriana e antifúngica de drogas antimicrobianas.

Palavras-chave: *Rhaphiodon echinus*, *Rhamdia quelen*; Ratos (Wistar); toxicologia, modulação, atividade antifúngica e bacteriana.

ABSTRACT

ESTUDO ETNOBOTÂNICO, MICROBIOLÓGICO E PERFIL TOXICOLÓGICO

IN VITRO E *IN VIVO* DE *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer.

Author: Antonia Eliene Duarte

Advisor: Prof. Dr. Marilise Escobar Burger

Co-supervisor: Prof. Dr. Arlene Maria da Silva Pessoa

Medicinal plants have long been used in traditional medicine for the treatment of various diseases, especially because they have low cost and lower toxicity compared to synthetic drugs. The pharmaco-toxicological interest of these products have generated considerable interest to the scientific community. In this context, species of Lamiaceae family deserve particular importance not only because of their applicability in food industry and cosmetics, but also due to their ethnopharmacological use. The species *Rhaphiodon echinus* (Nees and Mart) Schauer, popularly known as “betônica”, is distributed in Northeastern part of Brazil and infusions of its leaves are used as a tea for the treatment of inflammation, microbial infection and as antitussive agent. In spite of its use, there is however no report on the toxicity of this plant. In addition, there is no scientific evidence that can support the therapeutic use of *R. echinus* in Brazilian folk medicine. Thus, the objective of this study was to investigate the ethnobotanical and toxicological profile of *R. echinus* in different experimental models, as well as to evaluate its phytochemical profile and antioxidant potential in *in vitro* models. Particularly, we evaluated the toxicity profile of the infusion of the leaf extracts of *R. echinus* (AEREi) in different species (*Artemia salina*, *Rhamdia quelen*, *Rattus norvegicus*) and the potential antioxidant and cytotoxic activity of aqueous (EARE) and ethanolic (EERE) extracts of the leaves of *R. echinus*. In addition, *R. echinus* leaf essential oil was investigated alone or in combination with anti-fungal (fluconazole and nystatin) and antibiotics (gentamycin, amikacin, ciprofloxacin and imipenem) against various bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) and fungal (*Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*) strains. Furthermore, the chemical composition of *R. echinus* leaf essential oil and the extracts (infusion (EAREi), EARE, EERE) was performed using CG-MS and HPLC respectively. The results indicated that the extracts (infusion (EAREi), EARE, EERE) contain gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids, quercetin and rutin. The estimated IC₅₀ at 24 h and 48 h was 181.70 µg/mL (124.62-264.93) and 100.63 µg/mL (71.01-142.59), respectively with *Artemia salina* (confidence interval of 95%). However, the exposition of *Rhamdia quelen* to different concentrations of EAREi (1000-5000 mg/mL) was not associated with any mortality, indicating the absence of pro-oxidant activity. This was consistent with no change in reactive species (RS) generation and lipid peroxidation (LP) in the gills, kidneys, liver and brain in comparison to their respective control. The plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), alanine aminotransferase (ALT) and gamma glutamyl transferase (GGT), indicated that various concentrations of EAREi were not hepatotoxic to *Rhamdia quelen*. In the second part of this study, the aqueous (EARE) and ethanolic (EERE) extracts of *R. echinus* displayed antioxidant activity by eliminating DPPH radicals IC₅₀ = 111.9 µg/mL (EERE) and IC₅₀ = 227.9 µg/mL (EARE). Both extracts inhibited the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), induced by Fe²⁺ (10 µM) in rat brain and liver homogenates. EARE and EERE (30-480 µg/mL) did not induce genotoxicity, cytotoxicity or osmotic fragility on human blood cells. The results obtained by the microdilution method revealed low antifungal and antibacterial activity of *R. echinus* leaf essential oil with MIC ≥ 1 024 µg/mL). However, it was able to modulate the activity of the antimicrobial agents tested, when added to the growth medium at the sub-inhibitory concentration (i.e., MIC/8 = 128 µg/mL). *R. echinus* leaf essential oil showed the potential to chelate Fe(II), indicating that it may be of therapeutic importance for the treatment of neurodegenerative and infectious diseases. The essential oil revealed the presence of monoterpenes and sesquiterpenes, which can be at least partly responsible for the modulatory action of the oil, being a natural product capable of enhancing the antibacterial and antifungal activity of antimicrobial drugs. However, the results suggest that *R. echinus* can prevent / protect against diseases associated with oxidative damage, and indicate that the essential oil of the leaves can modulate the antibacterial and antifungal activity of antimicrobial drugs.

Keywords: *Rhaphiodon echinus*, *Rhamdia quelen*; Rats (Wistar); toxicology, modulation, antifungal and antibacterial activity

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Aspartato transaminase
AST	Alanina aminotransferase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EARE	Extrato aquoso de <i>Rhaphiodon echinus</i>
EAREi	Extrato aquoso de <i>Rhaphiodon echinus</i> (infusão)
EERE	Extrato etanólico de <i>Rhaphiodon echinus</i>
EO	Estresse oxidativo
GGT	Gama glutamil transpeptidase ou Gama-GT
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
OE	Óleo essencial de <i>Rhaphiodon echinus</i>
RL	Radical livre
RN	Espécies reativas de nitrogênio
RO	Espécies reativas de oxigênio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Rhaphiodon Echinus</i> (Nees & Mart) Schauer E ESTUDO ETNOBOTÂNICO	13
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE	15
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES NATURAIS	17
1.4 DOENÇAS INFECCIOSAS, AGENTES ANTIMICROBIANOS, RESISTÊNCIA E TERAPIAS ALTERNATIVAS	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	23
3.1 ARTIGO 1: Ethnobotanical and toxicological study of <i>Rhaphiodon echinus</i> (Nees and Mart) Schauer in three different animal species: brine shrimp (<i>Artemia salina</i>), silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) and rat (<i>Rattus novergicus</i> , Wistar)	25
3.2 ARTIGO 2: Antimicrobial activity and Modulatory action of Antimicrobial drugs by <i>Rhaphiodon echinus</i> (Nees and Mart) Schauer leaf essential oil	44
3.3 ARTIGO 3: Polyphenolic composition and evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic fragility and Cytotoxic effects of <i>Rhaphiodon echinus</i> (Nees & Mart.) Schauer	64
4. DISCUSSÃO	80
5. CONCLUSÕES	85
6. PERSPECTIVAS	86
7. REFERÊNCIAS	87

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, contém uma Revisão da Literatura concisa sobre os temas desenvolvidos nesta tese.

Os itens **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO**, estão na forma de artigos. Nestes trabalhos constam as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências.

A realização dos experimentos de pesquisa envolvendo animais e humanos, teve aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais e Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos, da Universidade Federal de Santa Maria e os animais foram mantidos e usados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, elaborado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com estes números de aprovações (107-2014, peixes); (076.2012-2 ratos); (0089.0.243.000-07, humanos).

O item **DISCUSSÃO**, encontrado no final desta tese, se trata de uma discussão dos resultados obtidos nos três estudos científicos.

As **REFERÊNCIAS**, referem-se somente as citações que aparecem na introdução e discussão desta tese.