

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

***Glechon spathulata* BENTH.: ESTUDO
FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Teixeira Kunz

Santa Maria, RS, Brasil

2007

***Glechon spathulata* BENTH.: ESTUDO
FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

por

Vanessa Teixeira Kunz

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil

2007

K96g

Kunz, Vanessa Teixeira

Glechon Spathulata Benth. : estudo fitoquímico e biológico / por Vanessa Teixeira Kunz. – 2007.

88 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Melânia Palermo Manfron

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2007

1. Farmácia 2. Medicamentos 3. Plantas medicinais
4. Óleos voláteis 5. Antimicrobianos 6. Antioxidantes
7. *Glechon spathulata* 8. *Artemia salina* I. Manfron,
Melânia Palermo II. Título.

CDU 615.282

615.322

Ficha catalográfica elaborada por
Maristela Eckhardt - CRB-10/737

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Vanessa Teixeira Kunz. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.

Endereço: Rua Almiro Amadeu Beltrame, n. 40, Bairro Nossa Senhora de Lourdes, Santa Maria, RS, 97060-050

Fone (0xx)55 32254096; Cel. (0xx) 81235396; End. Eletr: vakunz@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

***Glechon spathulata* BENTH.: ESTUDO
FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

elaborada por
Vanessa Teixeira Kunz

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Melânia Palermo Manfron, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Ionara Irion Dalcol, Dr^a. (UFSM)

Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 20 de julho de 2007.

*À minha família:
Meus avós, minha mãe, meu padrasto, meus
irmãos e tios pelas horas de convivência
que tive de abdicar pelo trabalho.*

*Ao meu namorado:
Gustavo Luiz Paraginski
por ter estado sempre a meu lado com
a paciência e a compreensão necessária
para que chegasse até aqui.*

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e por fornecer os subsídios necessários para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Departamento de Farmácia Industrial pela estrutura física oferecida.

A CAPES pela bolsa concedida.

À Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron pela orientação, dedicação, incentivo e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial pela amizade, apoio e incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner do Departamento de Análises Clínicas pela colaboração.

À Vera Pereira Pagliarin, pela amizade e dedicação.

Aos bolsistas de iniciação científica e aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, em especial: Carla, Tarcieli, Camila, Vanessa Janovik, Janaina, Walter, Cássia, Rudinei, Guilherme, Fernanda, Patrícia, Cristiani Walker, Miguel Favila e Juliane Müller.

Ao amigo Tiago Juliano Tasso de Souza pela amizade e pelas análises cromatográficas.

Ao meu namorado Gustavo Luiz Paraginski pela colaboração, compreensão, apoio e amor.

Ao meu avô Nelson, a minha avó Marilene, a minha mãe, ao meu padrasto e aos meus irmãos Thiago e André por tudo.

Aos meus tios Marcelo, Dani, Sandro e Solange, primos e à família do meu namorado pelo incentivo e apoio.

*"O valor das coisas não está no tempo que
elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis."*

Fernando Pessoa

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

***Glechon spathulata* BENTH.: ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

AUTORA: VANESSA TEIXEIRA KUNZ

ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de julho de 2007.

Os principais grupos de substâncias de *Glechon spathulata* Benth. foram avaliados por uma análise fitoquímica e o óleo volátil obtido por hidrodestilação foi analisado por CG-EM. O óleo volátil, o extrato bruto etanólico e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica de *G. spathulata* foram submetidos ao teste de letalidade frente a *Artemia salina* Leach., à atividade antimicrobiana por bioautografia e microdiluição em caldo. A atividade antioxidante pelo DPPH em cromatografia em camada delgada (CCD) e pelo ensaio espectrofotométrico também foi avaliada. Flavonóides, taninos, esteróis e/ou triterpenos, saponinas, pigmentos antociânicos, ácidos voláteis e fixos foram encontrados em *G. spathulata*. A CG do óleo revelou a presença de 9 constituintes. Todas as amostras apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina* ($CL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$). O óleo volátil apresentou atividade antimicrobiana avaliada por bioautografia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra *Candida albicans*, o extrato bruto não apresentou atividade contra os microrganismos testados nas mesmas condições do ensaio com o óleo volátil. O óleo volátil, as frações hexânica e acetato de etila mostraram boa atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Através do método do DPPH, todas as amostras mostraram atividade antioxidante por CCD e pelo método espectrofotométrico, as frações acetato de etila, butanólica e o óleo volátil demonstraram excelente atividade antioxidante com CI_{50} de 7,99 $\mu\text{g/ml}$; 11,75 $\mu\text{g/ml}$ e 20,59 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Palavras-chave: *Glechon spathulata*; plantas medicinais; óleos voláteis; atividade antimicrobiana; atividade antioxidante; *Artemia salina*.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Course of Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria

***Glechon spathulata* BENTH.: PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY**

AUTHOR: VANESSA TEIXEIRA KUNZ

ADVISER: PROF^a DR^a MELÂNIA PALERMO MANFRON

Place and date of Defense: Santa Maria, July 20th, 2007.

The main groups of secondary metabolites of *Glechon spathulata* Benth. were evaluated by a phytochemical screening and the volatile oil obtained by hydrodistillation was analyzed by GC-MS. Volatile oil, ethanolic crude extract and hexanic, chloroformic, ethyl acetate and butanolic fractions of *G. spathulata* were submitted to the lethality test against *Artemia salina* Leach., to the antimicrobial activity by bioautographic assay and broth microdilution. Antioxidant activity by DPPH in thin-layer chromatography (TLC) and spectrophotometric assay were also evaluated. Flavonoids, tannins, sterols and/or triterpenoids, saponins, anthocyanic pigments, volatile and fixed acids were found in *G. spathulata*. The GC of the oil revealed the presence of 9 constituents. All samples presented *Artemia salina* toxicity ($LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$). The volatile oil showed antimicrobial activity evaluated by bioautographic assay against Gram-positive and Gram-negative bacteria and against *Candida albicans*, the crude extract didn't show activity against the tested microorganisms in same conditions of assay with volatile oil. Volatile oil, hexanic and ethyl acetate fractions showed good inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial cultures. Through DPPH method all the samples showed antioxidant activity by TLC, by spectrophotometric method, ethyl acetate, butanolic fractions and volatile oil showed excellent antioxidant activity with IC_{50} 7,99 $\mu\text{g/ml}$; 11,75 $\mu\text{g/ml}$ and 20,59 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Keywords: *Glechon spathulata*; medicinal plants; volatile oils; antimicrobial activity; antioxidant activity; *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A, B, C e D mostram diferentes detalhes de <i>Glechon spathulata</i> Benth.....	22
Figura 2 – Estrutura química do diterpeno ácido caurenóico.....	24
Figura 3 – Estrutura química do triterpeno lupeol.....	25
Figura 4 – Estrutura química do cátion flavílio.....	26
Figura 5 – Redução do sal cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio com a enzima desidrogenase resultando no complexo formazan.....	31
Figura 6 – Representação esquemática da redução do radical livre DPPH pelo hidrogênio.....	36
Figura 7 – Esquema do fracionamento do extrato bruto através da partição por solventes orgânicos.....	46
Figura 8 – Gráfico mostrando o rendimento de cada fração obtida a partir do extrato bruto.....	55
Figura 9 – Cromatograma do extrato de <i>G. spathulata</i>	56
Figura 10 – Cromatograma desenvolvido pelo óleo volátil.....	58
Figura 11 – (a) Placa mostrando halo de inibição formado pelo óleo volátil de <i>G. spathulata</i> e a (b) inatividade do extrato bruto frente a <i>K. pneumoniae</i> ..	62
Figura 12 – Determinação da CIM por microdiluição em caldo, ensaio desenvolvido em triplicata.....	65
Figura 13 – Placa de Petri para determinação da CBM.....	66
Figura 14 – Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> (TAS), valores de CL ₅₀ em µg/ml para os extratos e para rutina e quercetina.....	69

- Figura 15 – Cromatoplasmas mostrando a atividade antioxidante de *G. spathulata*....70
- Figura 16 – Gráfico mostrando a porcentagem de inibição dos extratos de *G. spathulata* nas diferentes concentrações do RL DPPH.....72
- Figura 17 – Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para as amostras testadas e para o ácido ascórbico (AA).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características morfológicas de <i>G. spathulata</i> Benth.....	21
Tabela 2 – Comparação dos métodos de extração do óleo volátil de <i>G. spathulata</i> Benth. empregados por Maul, Oliveira (1999).....	23
Tabela 3 – Microrganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana de <i>Glechon spathulata</i>	41
Tabela 4 – Sistemas cromatográficos empregados na avaliação da atividade antioxidante por CCD.....	52
Tabela 5 – Características organolépticas dos extratos aquoso e hidroalcoólico de <i>G. spathulata</i>	57
Tabela 6 – Substâncias presentes no óleo volátil de <i>G. spathulata</i> e suas respectivas concentrações.....	59
Tabela 7 – Atividade antimicrobiana do óleo volátil (OV) e do extrato bruto (EB) de <i>G. spathulata</i> Benth. por bioautografia.....	62
Tabela 8 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima para os extratos de <i>G. spathulata</i> Benth.....	64
Tabela 9 – Valores de CL ₅₀ calculados por regressão linear, expressos em µg/ml...68	
Tabela 10 – Porcentagens de inibição do padrão e das amostras frente ao radical livre DPPH em diferentes concentrações.....	71
Tabela 11 – Equação da reta para cada amostra e para o padrão com respectivo coeficiente de regressão linear e CI ₅₀ das amostras com seus desvios padrão.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Abs. – absorbância
- AA – ácido ascórbico
- Ac. Fórm. – ácido fórmico
- AcOEt – acetato de etila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHE – barreira hemato-encefálica
- BHA – butil-hidroxianisol
- BHT – butil-hidroxitolueno
- BuOH – *n*-butanol
- CBM – concentração bactericida mínima
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CCS – Centro de Ciências da Saúde
- CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CHCl₃ – clorofórmio
- CIM – concentração inibitória mínima
- CI₅₀ – concentração inibitória 50%
- CL₅₀ – concentração letal 50%
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- DFI – Departamento de Farmácia Industrial
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
- EB – extrato bruto (etanólico)
- EM – espectrometria de massas
- EtOH – etanol
- eV – elétron-Volts
- FA – fração acetato de etila
- FB – fração butanólica
- F. Bras. IV – Farmacopéia Brasileira. 4. ed. 1988
- FC – fração clorofórmica

FDA – *Food and Drug Administration*

FH – fração hexânica

FS – fase superior

GF₂₅₄ – gel de sílica com indicador de fluorescência para λ 254 nm

HAc – ácido acético glacial

HFórm. – Ácido fórmico

HSV-1 – *Herpes simplex* do tipo 1

HUSM – Hospital Universitário de Santa Maria

ik – índice de Kovats

ml – mililitro

nm - nanômetro

NCCLS – *National Committee for Clinical, Laboratory Standards*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OV – óleo volátil

q. s. p. – quantidade suficiente para

Rf – fator de retenção

RL – radical livre

SNC – sistema nervoso central

SUS – Sistema Único de Saúde

TR – tempo de retenção

TAS – toxicidade frente a *Artemia salina* Leach.

UFC – Unidade formadora de colônia

UI – Unidades internacionais

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UV – luz ultravioleta

v/v – volume/volume

μ g – micrograma

μ l – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Glechon spathulata</i> Bentham	20
2.2 Metabólitos secundários	23
2.2.1 Compostos polifenólicos.....	25
2.2.2 Óleos voláteis.....	27
2.3 Atividades biológicas	30
2.3.1 Atividade antimicrobiana.....	30
2.3.2 Toxicidade frente ao micro-crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach. (TAS).....	33
2.3.3 Atividade antioxidante.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Obtenção do material vegetal	38
3.2 Equipamentos e acessórios	38
3.3 Solventes e reagentes	39
3.4 Substâncias de referência	39
3.5 Microrganismos	40
3.6 Meios de cultura	42
3.7 Eluentes para CCD	43
3.8 Reveladores para CCD	44
3.8.1 Anisaldeído sulfúrico.....	44
3.8.2 Ácido oxalo-bórico.....	44
3.9 Obtenção, preparo do material vegetal e fracionamento do extrato	45
3.10 Extração e análise do óleo	47
3.10.1 Extração.....	47

3.10.2	Análise cromatográfica do óleo por cromatografia gasosa e determinação do índice de Kovats (ik).....	47
3.10	Análise fitoquímica qualitativa.....	48
3.11	Atividade antimicrobiana.....	49
3.11.1	Bioautografia	49
3.11.2	Microdiluição em caldo	50
3.12	Teste de letalidade por <i>Artemia salina</i> Leach.	51
3.13	Determinação da atividade antioxidante.....	52
3.13.1	Atividade antioxidante por CCD.....	52
3.13.2	Atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1	Rendimento do extrato bruto.....	55
4.2	Rendimento das frações.....	55
4.3	Análise fitoquímica qualitativa.....	57
4.3.1	Características organolépticas do extrato	57
4.3.2	Principais classes de metabólitos secundários de <i>Glechon spathulata</i> Benth.	57
4.4	Atividade antimicrobiana.....	61
4.4.1	Bioautografia	61
4.4.2	Microdiluição em caldo	63
4.5	Teste de Letalidade por <i>Artemia salina</i> Leach.....	68
4.6	Atividade antioxidante	70
4.6.2	Atividade antioxidante por CCD.....	70
4.6.3	Atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico.....	71
5	CONCLUSÕES.....	75
6	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças através de plantas é um dos métodos mais antigos da medicina natural. A origem sobre o conhecimento de plantas medicinais é muito remota, acredita-se que grande parte foi adquirida através da observação e do instinto humano e animal, dessa maneira, o homem passou a distinguir plantas comestíveis ou que poderiam curar doenças de plantas venenosas. Este conhecimento foi transmitido de geração a geração pelas comunidades que conviviam com ervas e dependiam delas para curar doenças (VOX SCIENTIAE, 2005; GONÇALVES, [200-]).

O conhecimento tradicional sobre plantas que poderiam ser utilizadas no tratamento de doenças foi sendo enriquecido aos poucos através de experimentos práticos, que foram possíveis pela evolução da ciência e da tecnologia. Para um medicamento fitoterápico ser produzido a partir de uma planta, ela precisa ser estudada dos pontos de vista botânico-agronômico (levantamento, coleta e manejo); químico-farmacêutico (química e formulação); biomédico (farmacologia, toxicologia e clínica) e industrial (adequação do produto ao mercado) (ELISABETSKY, SOUZA, 2004; GONÇALVES, [200-]; SONAGLIO et al., 2004; BRASIL, 2006).

A importância das plantas na terapêutica está fundamentada no fato de que 80% da população mundial faz uso de plantas ou preparações obtidas a partir destas na atenção primária à saúde. Os países em desenvolvimento possuem 67% das espécies vegetais do mundo e o Brasil é uma grande potência para o desenvolvimento de estudos e descobertas de plantas medicinais, pois detém a maior diversidade vegetal do mundo (BRASIL, 2006).

O interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia, definida como a “terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”. No Brasil o interesse em inserir a fitoterapia no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS) teve início na década de 80, através de diversos documentos que buscavam a introdução de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção básica (BRASIL, 2006). Todavia, a inserção das plantas no

SUS foi concretizada somente em 2006 através da aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo decreto 5.813 de 22 de junho de 2006.

Atualmente a busca por terapias alternativas está em alta, pois se tem em mente idéias de que o “Natural faz bem”, é “isento de efeitos colaterais” e “não interagem com outros medicamentos”, efeitos comuns à maioria dos medicamentos tradicionais. Porém, se sabe que várias plantas que já foram empregadas para curar doenças, após estudos, foram consideradas tóxicas como o confrei (*Symphytum officinale* L.). O uso oral desta planta está relacionado ao aparecimento de tumores malignos, principalmente adenomas hepatocelulares (HIRONO, MORI, HAGA, 1978).

Alguns medicamentos fitoterápicos interagem com outros fármacos, é o que ocorre com o *Hypericum perforatum*, amplamente utilizado como antidepressivo quando administrado juntamente com contraceptivos orais há relatos de diminuição da ação destes (BROUGHTON, DENHAM, 2000). Outra interação de grande relevância é a que ocorre com *Ginkgo biloba*, bastante utilizada por idosos, com varfarina e ácido acetil salicílico, anticoagulantes orais, há risco de hemorragias, devido à inibição da agregação plaquetária (DESTRO et al., 2006; MELNYK, SHEVCHUK, SUE, 2002/2003).

Por outro lado, algumas plantas deram origem a medicamentos, como a vincristina e a vimblastina, alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* (L) G. Don. (OLIVEIRA, 2005) que são empregados no tratamento de leucemias e linfomas principalmente (MÜLLER, 2005; GONÇALVES, 2005).

Várias plantas já tiveram alguma atividade biológica comprovada cientificamente, o guaraná (*Paullinia cupana*), por exemplo, além de sua tradicional atividade estimulante sobre sistema nervoso central (SNC) (ANVISA, 2002), possui atividade antibacteriana (BASILE, 2005). O extrato seco de *Hedera helix* (Araliaceae), conhecida por hera sempre verde é o princípio ativo de um medicamento fitoterápico empregado como expectorante e mucolítico (ABRILAR, 2007).

A importância da atividade antimicrobiana está fundamentada na carência de novos fármacos destinados a esse fim e nos rápidos mecanismos de resistência desenvolvidos por microrganismos patogênicos (WANNMACHER, 2004).

A cura de doenças como alguns tipos de câncer, os quais até pouco tempo não tinham tratamento específico, pois este era baseado na citotoxicidade do

fármaco empregado, levava e ainda leva muitos pacientes a óbito devido à diminuição na qualidade de vida ocasionada pelos diversos efeitos colaterais que se devem à baixa seletividade do agente citotóxico, por isso busca-se uma atividade antitumoral em plantas medicinais, algumas já são utilizadas sem a realização de testes convenientes (WANNMACHER, 2005).

A toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. é um método bastante empregado preliminarmente para avaliar citotoxicidade de extratos de plantas medicinais, pela correlação existente com a atividade antitumoral e pesticida (MEYER, 1982; FAVILA, 2006).

O combate aos radicais livres vem conquistando espaço: muitos cosméticos, suplementos alimentares entre outras formas de consumo estão surgindo com esta promessa. Os radicais livres são agentes responsáveis por causar danos aos tecidos, acelerar o envelhecimento e pelo desenvolvimento de várias doenças (NÚÑEZ-SELLÈS, 2005; FARMÁCIA NATURAL, 2007).

Glechon spathulata (manjeroninha-do-campo) é uma planta empregada como condimento na culinária devido ao fato de seu odor assemelhar-se ao da manjerona (*Origanum majorana*). Na literatura recente, poucas referências a respeito da planta foram encontradas, e pelo fato dela vir sendo utilizada há anos na medicina tradicional como digestiva, expectorante, anti-séptica e diaforética (COIMBRA, 1942; XIFRED, MALLO, 2004; CIBECOL, 2007), justifica-se o estudo da mesma.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar atividades biológicas de *Glechon spathulata* Benth., relacionando-as com classes de metabólitos secundários presentes na espécie.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar os principais grupos de metabólitos presentes em *Glechon spathulata* através da análise fitoquímica qualitativa dos extratos da planta;
- Analisar a composição do óleo de *G. spathulata* por Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM);
- Avaliação da toxicidade do óleo , do extrato bruto e de suas frações frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* Leach. (TAS);
- Determinação da atividade antimicrobiana do óleo , do extrato bruto e de suas frações por bioautografia e por microdiluição em caldo;
- Avaliação qualitativa da presença de compostos com atividade antioxidante e avaliação do potencial antioxidante do óleo volátil do extrato bruto e de suas frações frente ao radical livre DPPH *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Glechon spathulata* Bentham

O gênero *Glechon* Sprengel pertence à família Lamiaceae e compreende 14 espécies distribuídas entre Brasil e Paraguai, sua família compreende 200 gêneros com aproximadamente 3200 espécies distribuídas em todo o mundo (LEMÉE, 1931). São plantas em geral herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas cruzadas, inteiras e em geral com cheiro intenso. As flores são pequenas ou grandes, reunidas em densas inflorescências (BRANDÃO, 1979).

Poucas são as plantas da família Lamiaceae que se adaptam à sombra ou a ambientes úmidos como as mentas, a maioria delas se desenvolve em solo seco e sob intensa luz solar. A família Lamiaceae é conhecida em todo o mundo pelo aroma que suas plantas exalam. Elas produzem essências e, por isso podem ser consideradas plantas aromáticas por excelência, as essências e seus componentes são os principais produtos do metabolismo secundário (FONT QUER, 1990).

O gênero *Glechon*, pertencente à tribo Mentheae, seção Glechonae, é um gênero exclusivamente sul-americano e distribui-se desde o sul do Brasil, compreendendo Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, passando pelo Paraguai, Uruguai ao noroeste da Argentina (XIFREDA, MALLO, 2004). No Rio Grande do Sul existem 4 espécies do gênero, *G. spathulata* Benth., *G. thymoides* Spreng., *G. marifolia* Benth. e *G. squarosa* Benth. (DI PRIMIO, 1946).

G. spathulata é assim denominada, pela morfologia de suas folhas, que podem ser espatuladas a arredondadas, é um subarbusto que atinge de 30 a 60cm de altura e cresce no Rio Grande do Sul, no Uruguai e mais raramente na Argentina (PIO CORREA, 1984; XIFREDA, MALLO, 2004).

As características morfológicas das folhas, ramos e flores de *Glechon spathulata* estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características morfológicas de *G. spathulata* Benth.

FOLHAS	Inserção no caule	Curto-pecioladas		
	Margem	Subcrenada		
	Formato	Espatuladas a arredondadas		
	Base	Cuneada		
	Tamanho	Largura	4 a 7mm	
Comprimento		6 a 10mm		
RAMOS	Característica	Tomentoso-pubescentes		
	Tamanho	Pequenas		
	Disposição	Solitárias		
	Inserção	Tipo	Axilar	
FLORES	Brácteas	Densamente pilosas		
	Cálice	Subséssil		
		Coloração	Branca	
		Corola	Lobo superior	Ereto
	Lobos inferiores		Sub-iguais	
	Grão de pólen	Hexacolpado		

Fonte: LEMEÉ, 1931; PIO CORREA, 1984; XIFREDA, MALLO, 2004.

Na Figura 1-A, B, C e D são mostrados diferentes detalhes da planta.

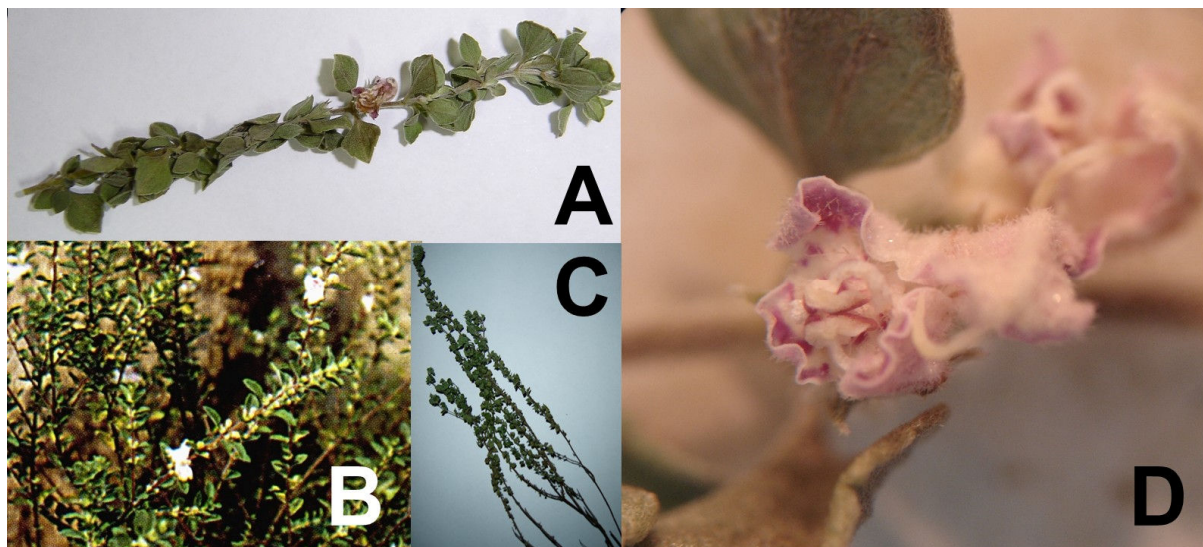


Figura 1 – A, B, C e D mostram diferentes detalhes de *Glechon spathulata* Benth.

A Figura 1-A mostra um ramo de *G. spathulata* em detalhe, nele fica visível o formato espatulado de suas folhas. Em 1-B a planta é mostrada no campo. Em 1-C pode ser visualizada a planta após secagem. Em 1-D a flor de *G. spathulata* fotografada com auxílio de estereomicroscópio binocular, salientando a assimetria das pétalas.

No Brasil, *G. spathulata* Benth. é popularmente conhecida por manjerona-do-campo ou manjeroninha-do-campo, na culinária é empregada como condimento e seu extrato fluido é empregado como estomáquico em dispepsias e flatulências e como expectorante em afecções catarrais das vias respiratórias, resfriados, defluxos, bronquites e laringites (COIMBRA, 1942), na Argentina é empregada como diaforética (XIFREDA, MALLO, 2004). De acordo com Coimbra (1942) os constituintes químicos principais de *G. spathulata* são tanino e óleo volátil (OV).

A importância dos diferentes métodos de extração dos óleos voláteis pode ser evidenciada pelo trabalho de Maul, Oliveira (1999) que avaliaram o potencial da extração por fluidos supercríticos em comparação com a extração por Soxhlet e por Clevenger para *G. spathulata* (Tabela 2). Obtiveram um rendimento de 3,1% de extrato com fluido supercrítico, já com o Clevenger (hidrodestilação), o rendimento foi de 2,5% de OV e com o Soxhlet o rendimento obtido foi de 3,4% de extrato.

Tabela 2 – Comparação dos métodos de extração do óleo volátil de *G. spathulata* Benth. empregados por Maul, Oliveira (1999)

Método de extração	Rendimento do método de extração	Total de não voláteis
Soxhlet	3,4%	31%
Clevenger	2,5%	-*
CO ₂ supercrítico	3,1%	7,5%

*Não houve extração de substâncias não voláteis.

Os autores obtiveram um maior teor de ésteres com a extração por fluidos supercríticos que por hidrodestilação e relataram a presença de linalool e acetato de linalila. O linalool apresentou um teor maior no hidrodestilado e o acetato de linalila no extrato obtido por CO₂ supercrítico. No hidrodestilado havia uma menor quantidade de sesquiterpenos oxigenados pouco voláteis e termolábeis em relação aos hidrocarbonetos monoterpênicos.

Venturi et al. (2004) avaliaram a atividade anti-herpética do extrato hidroalcoólico de *G. spathulata* em microplacas, observando a inibição do efeito citopático viral provocado pelo vírus *Herpes simplex* do tipo 1 (HVS-1) em cultura de células. O extrato mostrou-se ativo contra cepas KOS, “*American type culture collection*” (ATCC) e aciclovir-resistente de herpesvírus. Foi também determinado o mecanismo de ação, que é misto, ou seja, o extrato é virucida antes e após a penetração viral.

2.2 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos químicos distintos dos intermediários e dos produtos do metabolismo primário. Eles variam de acordo com a espécie e a família e alguns são restritos a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENNETT, WALLSGROVE, 1994).

Os vegetais defendem-se de herbívoros e de outras ameaças de várias formas, podem desenvolver estruturas como espinhos ou pêlos urticantes ou defesas químicas como a produção de metabólitos secundários, ambos os métodos consomem energia e desvio do metabolismo básico que pode afetar o crescimento ou a reprodução para defender a planta (MONTEIRO et al., 2005).

Existem várias classes, entre as quais se destacam óleos voláteis, flavonóides, taninos, saponinas, alcalóides, cardiotônicos, antraquinonas, cumarinas, lignóides, glicosídeos cianogenéticos, ácidos graxos, heterosídeos, polissacarídeos (SANTOS, 2004).

Dutra et al. (2000) em estudo sobre o efeito anti-hiperglicemiante de duas plantas perceberam na fração hexânica de *Wedelia paludosa* um significativo efeito, com uma redução de 26,47% da glicemia, sugerindo que esta fração fosse responsável pelo efeito antidiabético apresentado pelo extrato, esta fração tem como composto majoritário um diterpeno, ácido caurenóico (Figura 2), que segundo os autores pode ser o responsável por esta atividade.

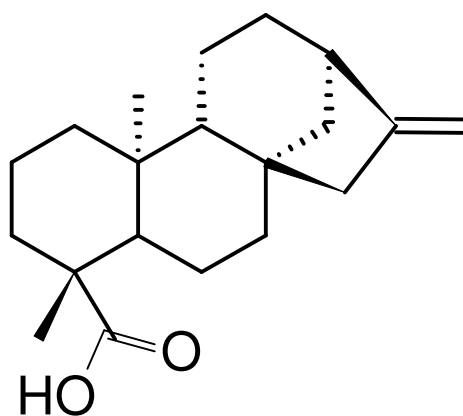


Figura 2 – Estrutura química do diterpeno ácido caurenóico.

O ácido caurenóico é bastante conhecido por suas atividades biológicas, uma vez que tem ação antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatória, antiprotozoário, sendo ativo inclusive contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença

de Chagas. Este diterpeno age na forma tripomastigota do protozoário, porém tem ação lítica sobre os eritrócitos (VIEIRA et al, 2002; SARTORI, 2005). Vieira et al. (2002) testaram esta mesma atividade para derivados do ácido caurenóico a fim de verificar uma diminuição da ação lítica, porém, seus resultados não foram satisfatórios.

A atividade diurética e a citotóxica descrita por Noldin et al. (2003) para *Cynara scolymus* (alcachofra), provavelmente esteja relacionada ao triterpeno lupeol (Figura 3), isolado da fração hexânica da planta, os autores acreditam na possibilidade desse composto ser o responsável pela presença desta atividade na fração hexânica.

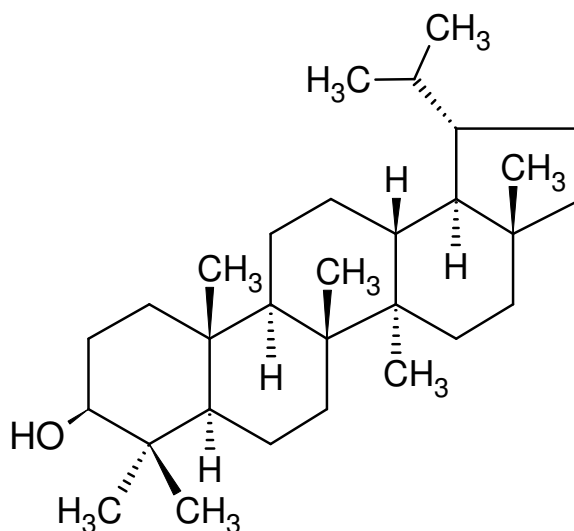


Figura 3 – Estrutura química do triterpeno lupeol.

2.2.1 Compostos polifenólicos

Os polifenóis são efetivos doadores de hidrogênios, particularmente os flavonóides; seu potencial antioxidante depende do número e posição dos grupos hidroxila e de sua conjugação, bem como da presença de elétrons doadores no anel

estrutural, devido à capacidade que possui o grupo aromático de suportar o desemparelhamento de elétrons (KUSKOSKI et al., 2004). A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (MONTEIRO et al., 2005).

Os flavonóides constituem uma classe bastante representativa de metabólitos secundários com estruturas fenólicas variáveis e são encontrados em diversos vegetais, muitos desses flavonóides são responsáveis pela atratividade das plantas através da coloração de flores, frutos e folhas (NIJVELDT et al., 2001).

Esta classe possui grande interesse farmacológico, pois é responsável por diversas atividades biológicas, como antiinflamatória, antitumoral, analgésica, antioxidante, atua na prevenção da aterosclerose, entre outras (LÓPEZ et al., 2002; WILLAIN FILHO, 2005; FONSECA, 2006). Zampini, Vattuone, Isla (2005) em seu estudo com *Zuccagnia punctata* demonstraram que apenas 15 µg dos flavonóides totais da planta são necessários para inibir o crescimento bacteriano.

Os antociânicos são pigmentos flavonoídicos e sua estrutura química contribui para sua atividade antioxidante, podem doar hidrogênios e elétrons aos radicais livres, existem cerca de 300 antociânicos com diferentes substituintes açúcares. A atividade antioxidante está relacionada à presença de hidroxilas livres na estrutura básica do íon flavílio (Figura 4) (KUSKOSKI et al., 2004).

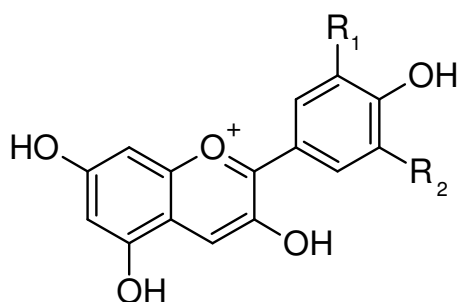


Figura 4 – Estrutura química do cátion flavílio.

Os taninos são compostos fenólicos de interesse econômico e farmacológico, são muito reativos, formam ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, precipitam proteínas, são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por metais. São classificados em hidrolisáveis e condensados, os hidrolisáveis podem ser derivados do ácido gálico ou elágico, os elagitaninos são mais frequentes que os gálicos. Os taninos condensados são também denominados proantocianidinas, são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, apresentam-se como pigmentos avermelhados e estão distribuídos amplamente no reino vegetal (MONTEIRO et al, 2005).

As propriedades farmacológicas dos taninos estão relacionadas com suas propriedades adstringentes, principalmente, por via oral têm efeito antidiarréico e anti-séptico, e por via externa podem ser cicatrizantes. Como eles precipitam proteínas possuem efeito antimicrobiano e antifúngico; várias bactérias são suscetíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (MONTEIRO et al., 2005).

Pelo fato dos taninos precipitarem alcalóides, eles podem ser empregados como antídotos em casos de intoxicação. São hemostáticos e podem apresentar atividades tóxicas devido à sua adstringência. Pelo fato de precipitar proteínas, os taninos inibem enzimas digestivas, afetando a absorção de nutrientes; eles também reduzem a absorção de ferro (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos captam radicais livres, e alguns se apresentam como gastroprotetores. Taninos em concentrações tóxicas são ativos contra HIV por inibir a enzima transcriptase reversa, dificultando a replicação viral (MATHABE et al, 2006; MONTEIRO et al., 2005).

2.2.2 Óleos voláteis

Óleos voláteis são geralmente misturas complexas de substâncias lipofílicas, a maioria deles são odoríferos e líquidos. São produtos vegetais extraíveis por arraste de vapor de água, constituídos usualmente por terpenóides, principalmente mono e sesquiterpenos e/ou lignóides: alil, propilfenóis e cumarinas (COSTA, 1994; GOTTLIEB, 1986).

Os óleos voláteis têm sua análise dificultada devido ao grande número de compostos com propriedades físico-químicas semelhantes. Podem ser feitas análises para determinar produtos específicos, como contaminantes ou substâncias de interesse farmacológico ou técnico. Existe a necessidade de métodos analíticos seletivos com alta sensibilidade, exatidão e precisão (CIOLA, 1986).

A análise espectrofotométrica é, na maioria das vezes, inviável devido a grande variedade de substâncias contidas em uma essência, através dessa análise pode-se identificar um grupo de substâncias, como álcool, éster, desde que não haja nenhuma interferência. A espectrometria de massas (EM) encontra a mesma dificuldade, porém, quando acoplada à cromatografia gasosa (CG) é capaz de resolver misturas complexas como um óleo volátil, tornando possível a análise (CIOLA, 1986).

O fato dos óleos voláteis possuírem uma grande diversidade de constituintes reflete em manifestações diferentes da atividade farmacológica. Propriedades bastante comuns a muitas essências são as ações carminativa, antiespasmódica e estimulante digestivo. Eles também possuem atividade antidismenorréica e alguns podem ser abortivos. Existem ainda óleos que agem sobre o sistema nervoso central (SNC) (COSTA, 1994).

A composição química dos óleos voláteis pode variar dentro de uma mesma espécie, geneticamente determinada, gerando os diferentes quimiotipos. Esta diferença foi observada para *Cunila galioides*, estudo no qual os autores concluíram que dependendo do local de coleta o óleo volátil da planta não apresentava determinados constituintes, ou apresentava em concentrações consideravelmente reduzidas (ECHEVERRIGARAY et al., 2003), também foi demonstrada por Azevedo et al. (2001) e por Ngassoum et al. (2004) em seu estudo com óleos voláteis de duas variedades de *Ocimum canum*.

Óleos voláteis de algumas plantas utilizadas como condimentos possuem atividade antimicrobiana e podem ser empregados como conservantes de alimentos. Espécies dos gêneros *Origanum*, *Thymbra* e *Satureja* são um exemplo desta atividade (BAYDAR et al., 2004).

Flach (2000), em seu estudo sobre os óleos voláteis de *Calea serrata*, identificou por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) um epóxido terpenóide e o denominou caleol. Também testou a atividade antimicrobiana por difusão em ágar, empregando discos de papel embebidos no

óleo das folhas, flores e no caleol isolado.

Carvalho et al. (2004) extraíram o óleo volátil das partes aéreas de *Cordia verbenacea* (erva baleeira) utilizando Clevenger modificado, determinaram o rendimento da extração, e após identificaram α -pineno, trans-cariofileno e aloaromadendreno por CG-EM.

Vagi et al. (2005), determinaram os componentes do óleo volátil de *Origanum majorana* obtido por extração com etanol em aparelho de Soxhlet comparando-os com os obtidos por CO₂ supercrítico. Tanto no extrato alcoólico, quanto no obtido pela extração supercrítica, o componente principal foi o terpinen-4-ol; porém, o hidrato de *cis*-sabineno foi encontrado somente no extrato supercrítico em uma pequena concentração.

Várias plantas da família Lamiaceae, que é mundialmente conhecida pelo aroma de suas plantas, tiveram os constituintes de seus óleos voláteis identificados. Estes óleos possuem uma diversidade enorme de substâncias. Grande parte possui mais de 50 substâncias diferentes como os óleos de *Stachys aleurites* (FLAMINI et al, 2005), *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* (SENATORE, ARNOLD, PIOZZI, 2004), *Salvia hypoleuca* (NICKAVAR, MOJAB, ASGARPAHAH, 2005) entre outras (MELKANI et al., 2005; FLAMINI, CIONI, MORELLI, 2004; PALÁ-PAÚL et al., 2004; SANTOS, P. A. G. et al., 2005; DOB et al., 2005). Outros possuem menos de 20, como *Agastache mexicana* subespécie *mexicana* e subespécie *xolocotziana*, que possuem 3 e 4 constituintes diferentes, respectivamente (ESTRADA –REYES et al., 2004), *Ocimum selloi*, com 7 substâncias (PADILHA DE PAULA. GOMES-CARNEIRO, PAUMGARTTEN, 2003), *Cunila galioides* com 14 constituintes (ECHEVERRIGARAY et al, 2003).

Os óleos voláteis de algumas plantas da família Lamiaceae podem ser compostos majoritariamente por sesquiterpenos não-oxigenados como *Salvia hypoleuca* (NICKAVAR, MOJAB, ASGARPAHAH, 2005), sesquiterpenos oxigenados, como *Teucrium leucocladum* (EL-SHAZLY, HUSSEIN, 2004), monoterpenos não-oxigenados, como *Hyptis suaveolens* (AZEVEDO et al, 2001), monoterpenos oxigenados como o óleo de *Lavandula dentata* (DOB et al, 2005).

2.3 Atividades Biológicas

2.3.1 Atividade antimicrobiana

O surgimento da terapia antimicrobiana se deu por volta da década de 40, e a partir daí esta terapia foi muito empregada. Por esse motivo o uso indiscriminado de antibióticos gerou um aumento na população de microrganismos patogênicos resistentes, o que tornou necessária a busca por novos fármacos (FUCHS, 1992).

Dentre as metodologias que podem ser empregadas para avaliar a presença de atividade antimicrobiana, temos os ensaios por difusão em ágar, que podem ser quantitativos, determinando-se a potência de uma determinada substância com relação a um padrão de referência, os ensaios por turbidimetria, e o método de microdiluição em caldo que possibilita a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida ou fungicida mínima (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; CLSI, 2003). Há ainda a técnica de bioautografia, uma combinação de cromatografia em camada delgada (CCD) com bioensaio. Através dela pode-se biomonitorar um extrato para isolar um constituinte com atividade biológica; após o isolamento pode-se ainda determinar a quantidade inibitória mínima (QIM) de uma substância isolada (HAMBURGER, CORDELL, 1987).

A importância da bioautografia está justamente em poder localizar exatamente uma substância com atividade antimicrobiana presente em uma matriz complexa. A técnica mais empregada é denominada “overlayer agar” (o ágar é depositado sobre a cromatoplaça), a qual permite testar diversos microrganismos entre fungos e bactérias, variando-se a composição do meio de cultura, conforme o microrganismo. Com essa técnica são obtidos halos de inibição bem definidos, os quais podem ser melhor visualizados através do emprego de corantes enzimáticos. Em geral, usa-se um sal de tetrazólio, cujo mecanismo se dá quando os microrganismos estão metabolicamente ativos e sua enzima desidrogenase converte o sal de tetrazólio em um complexo colorido denominado formazan (Figura 5) (BOCHNER, SAVAGEAU, 1977; RAHALISON et al., 1991; SILVA, 2005).

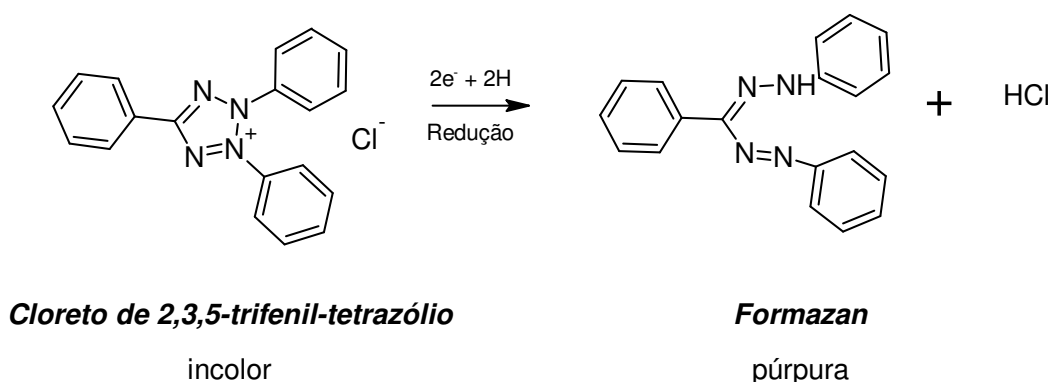


Figura 5 – Redução do sal cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio com a enzima desidrogenase resultando no complexo formazan.

Várias plantas possuem atividade antimicrobiana atribuída à presença de óleos voláteis. A canela do ceilão (*Cinnamomum verum*), a menta (*Mentha piperita*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) possuem atividade antimicrobiana contra diversos tipos de microrganismos. O tomilho (*Thymus vulgaris*) possui terpenos ativos contra vírus, bactérias e fungos, a *Centella asiatica* possui terpenóides ativos contra *Mycobacterium leprae* a erva cidreira (*Aloysia triphyla*) é ativa contra *Ascaris*. O provável mecanismo de ação dos óleos voláteis seria a ruptura das membranas celulares dos microrganismos. Existem ainda plantas contendo óleos voláteis com atividade anti-HIV, como o gengibre, cujo mecanismo de ação é desconhecido e o alecrim que age sobre a protease do vírus (COWAN, 1999).

Há vários estudos realizados utilizando a técnica de bioautografia, Gonzaga (2003) testou atividade antimicrobiana de alcalóides isolados de *Zanthoxylum rhoifolium* e dos óleos voláteis, determinando a QIM. Simionatto (2004) testou atividade antimicrobiana de óleos voláteis de diversas plantas nativas e cultivadas no Rio Grande do Sul, como *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata*, *Matricaria chamomilla*, *Pluchea quitoc*, *Aloysia selowii*, *Aeollanthus suaveolens*, *Cunila microcephala* e *Zanthoxylum hyemale*.

O óleo volátil de *Ocimum gratissimum* da família Lamiaceae teve sua atividade antimicrobiana avaliada por bioautografia, o óleo foi ativo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Bacillus*

subtilis ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25992 e *Salmonella setubal* ATCC 19796 utilizando o antibiótico amoxicilina como controle (KRAUSE et al., 2003).

Carvalho et al. (2004) determinaram atividade antimicrobiana do óleo volátil das partes aéreas de *Cordia verbenacea* pelo método de difusão em ágar, empregando discos de papel embebidos em 100 µl do óleo. O óleo foi ativo contra a maioria das bactérias gram-positivas testadas e muito pouco ativo contra as gram-negativas. Contra os fungos testados, o óleo demonstrou boa atividade.

Khalil (1997) isolou um diterpeno do extrato etanólico de *Nepeta septemcrenata*, uma erva perene que cresce no sul do Sinai. Testou a atividade antimicrobiana desse composto pelo método de difusão em ágar. O diterpeno demonstrou uma moderada atividade contra *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva), porém, nenhuma atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Zampini, Vattuone, Isla (2005) em seu estudo com *Zuccagnia punctata* encontraram CIM de 0,10 µg/ml para 2',4'-dihidroxichalcona frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e *Acinetobacter baumannii*.

Shazly, Hussein (2004) testaram a atividade antimicrobiana do óleo volátil e da fração hexano-éter de *Teucrium leucocladum* (Lamiaceae) por difusão em ágar, contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra *Candida albicans*. Utilizaram ciprofloxacino e nistatina como controles para bactérias e o fungo, respectivamente.

Tepe et al. (2005) testaram atividade antimicrobiana do óleo volátil e dos extratos hexânico, diclorometano e metanólico de *Salvia tomentosa*. A metodologia empregada foi difusão em ágar para os extratos e em disco para óleo volátil. Determinaram-se as CIMs do óleo volátil frente a alguns microrganismos: bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos. O óleo de sálvia teve uma melhor atividade que os extratos, em geral, a atividade contra bactérias gram-negativas foi fraca.

Rigano et al. (2006) em seu estudo sobre a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Iris pseudopumila* mostrou que este extrato teve boa inibição contra as bactérias testadas com CIM entre 7,8 µg/ml e 250 µg/ml, porém contra *S. aureus* a CIM foi elevada (512 µg/ml). Com as bactérias Gram-negativas como *Enterobacter*

aerogenes ATCC 13048 e *Escherichia coli* ATCC 11229 a CIM foi de 7,8 µg/ml, portanto significativamente mais sensíveis que as Gram-positivas.

A fração polar do extrato metanólico de *Zataria multiflora* Boiss., uma planta nativa do Irã, pertencente à Família Lamiaceae e com uso popular semelhante ao de *G. spathulata* foi ativa contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*; enquanto sua fração não-polar e seu óleo volátil foram mais ativos contra Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexnerii* (SHARIFIFAR, 2006).

Yu et al. (2004) em seu trabalho sobre a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Scutellaria barbata*, uma planta pertencente à família Lamiaceae, tradicionalmente utilizada na medicina chinesa, avaliaram os diâmetros dos halos de inibição por difusão em ágar, e a CIM e a CBM por microdiluição em caldo.

2.3.2 Toxicidade frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* Leach. (TAS)

Existem vários ensaios para avaliar a citotoxicidade de plantas, alguns bastante específicos, que determinam atividade antiviral, antitumoral, os quais empregam linhagens de células, encarecendo bastante o trabalho (BENTACUR-GALVIS et al., 2002). Outras técnicas avaliam atividade larvicida e moluscida, empregando para estas, respectivamente, larvas de *Aedes aegypti*, segundo a metodologia da Organização Mundial de Saúde (OMS) e ovos e adultos de *Biomphalaria glabrata* (LUNA et al., 2005).

Uma metodologia mais simples e de menor custo que vem sendo bastante utilizada é a toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. Apesar de ser um método não específico, possui uma boa correlação com toxicidade com células tumorais e atividade pesticida (MEYER, 1982; MCLAUGHLIN, CHANG, SMITH, 1991).

Para este ensaio, é importante a realização de um teste preliminar, o qual permite estabelecer o intervalo das concentrações que serão avaliadas. Para substâncias químicas é recomendado o uso de 10000, 1000, 100, 10, 0.1, 0.01 µg/ml e 10 náuplios, como controle negativo utiliza-se água marinha artificial

(VANHAECKE et al., 1981).

Dolabela (1997 apud GALOTTA, BOAVENTURA, 2005) em seus estudos concluiu que substâncias cuja CL_{50} estivesse entre 80 $\mu\text{g/ml}$ e 250 $\mu\text{g/ml}$ poderiam apresentar atividade tripanocida e substâncias com CL_{50} menor que 145 $\mu\text{g/ml}$, atividade anti-tumoral. Neste mesmo estudo, Dolabela (1997 apud MELO et al., 2006) também estabeleceu critérios de avaliação da toxicidade considerando altamente tóxicos os extratos com CL_{50} menor que 80 $\mu\text{g/ml}$, moderadamente tóxicos extratos com CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/ml}$ e 250 $\mu\text{g/ml}$ e pouco tóxicos ou não tóxicos aqueles com CL_{50} maior que 250 $\mu\text{g/ml}$.

Lima et al. (2002) avaliaram a toxicidade do lapachol, do isolapachol e de seus sais de potássio contra *Biomphalaria glabrata*, cercárias de *Schistosoma mansoni*, *Artemia salina* e *Tilapia nilotica*. Frente a *Artemia salina* foram testados apenas os sais de potássio, obtendo CL_{50} de 70,765 $\mu\text{g/ml}$ para o sal de lapachol e CL_{50} de 0,236 μg para o sal de isolapachol, sendo este bem mais tóxico para o microcrustáceo.

Luna et al. (2005) avaliaram a toxicidade frente a *Artemia salina*, empregando timol como controle positivo, para plantas como o pau-brasil (folhas) que se apresentou 78% tóxico, ou seja, matou 78% dos náuplios, a pitanga com 45% de toxicidade e o juá com 83%.

Silva (2003) testou a toxicidade dos óleos voláteis de várias partes de *Xanthium cavanillesii* frente a *Artemia salina*, obtendo CL_{50} sempre menor que 10 $\mu\text{g/ml}$, considerado bastante tóxico para o microcrustáceo. Neste trabalho ficaram evidenciadas a elevada sensibilidade e reprodutibilidade do método.

Moreira et al. (2003) avaliaram a atividade de *Baccharis pseudotenuifolia* frente a *Artemia salina*, eles testaram o extrato clorofórmico e metanólico de *B. pseudotenuifolia* e encontraram uma maior atividade para o extrato clorofórmico com CL_{50} de 115 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que a CL_{50} para o extrato metanólico foi de 813 $\mu\text{g/ml}$.

Os extratos etanólicos das plantas *Costus pisonis* (Costaceae), *Cymbopogon nardus* (Poaceae), *Eclipta alba* (Asteraceae), *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae), *Erigerium foetidum* (Apiaceae), *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae), *Mikania hirsutissima* (Asteraceae), *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), *Solidago microglossa* e *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae) apresentaram TAS menor que 1000 $\mu\text{g/ml}$, sendo considerados tóxicos para o microcrustáceo (BRASILEIRO et al., 2006).

2.3.3 Atividade antioxidante

O ser humano possui vários mecanismos antioxidantes que controlam os radicais livres e evitam os danos produzidos por espécies reativas de oxigênio (EROs), que são compostos potencialmente agressivos às células, principalmente os neurônios. As enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase constituem dois exemplos de antioxidantes fisiológicos que auxiliam no combate a estes radicais livres (RLs) (LÓPEZ et al., 2002).

A atividade antioxidante vem sendo bastante pesquisada em plantas, devido à probabilidade dos antioxidantes sintéticos, como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) empregados na conservação de alimentos estarem associados a efeitos nocivos a saúde (TEPE et al., 2005; KULISIC et al., 2004).

Esta atividade antioxidante está relacionada à presença de grupos hidroxila em substâncias como taninos, flavonóides e alguns compostos voláteis (KULISIC et al., 2004). Estas substâncias agem interagindo com os radicais livres que dão início às reações de oxidação, ou seja, na inibição dos processos oxidativos, diminuindo a atividade das enzimas oxidases ou na complexação com íons metálicos que catalisam reações de oxidação (DAWIDOWICKS, WIANOWSKA e BARANIAK, 2005; ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, 2005).

Em estudos recentes evidenciaram que alimentos ricos em substâncias antioxidantes desempenham papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e doenças neurodegenerativas, incluindo Mal de Parkinson e Mal de Alzheimer e também inflamações e problemas causados pelo envelhecimento das células (LÓPEZ et al., 2002; NÚÑEZ-SELLÉS, 2005; TEPE et al., 2005).

Sabe-se que flavonóides como a quercetina possuem uma potente atividade antioxidante, tanto *in vitro* como *in vivo*, inclusive em doenças neurodegenerativas, porém necessitam de uma formulação especial para transpor a barreira hematoencefálica (BHE) (DAJAS et al., 2003).

Existem várias metodologias descritas para avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias de origem vegetal, entre estas, a capacidade de inibir a

formação de peróxidos (MORTEZA-SEMNANI, SAEEDI, SHAHANI, 2006) e de seqüestrar radicais livres é bastante utilizada, destacando-se o ensaio que emprega o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (SILVA, 2005).

A atividade antioxidante pelo DPPH pode ser determinada qualitativamente através de cromatografia em camada delgada (CCD) conforme estudo de Sanches et al. (2005) que determinou a atividade antioxidante de *Stryphnodendron obovatum*.

Esta atividade também pode ser quantificada pelo método fotocolorimétrico, o qual tem como base a redução do DPPH (Figura 6) em solução etanólica na presença de substâncias antioxidantes capazes de doar hidrogênio. A solução demonstra uma forte absorção na banda de 517 nm, exibindo uma coloração violeta. Com a diminuição da absorção, ocasionada pelo emprego de antioxidantes, ocorre uma descoloração proporcional ao grau de redução. A quantidade de DPPH que não sofrer redução é medida após um período determinado e é inversamente proporcional à atividade antioxidante (KULISIC et al., 2004).

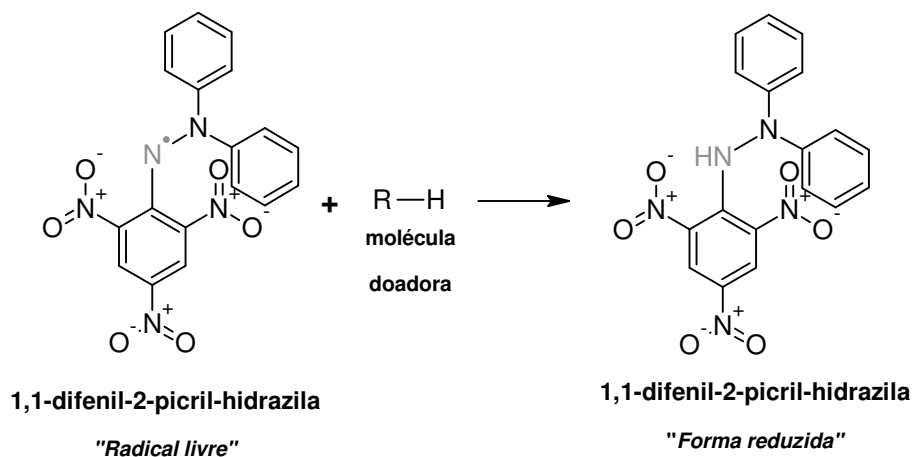


Figura 6 – Representação esquemática da redução do radical livre DPPH pelo hidrogênio.

Teucrium marum é uma planta altamente aromática como a maioria das plantas da família Lamiaceae, popularmente é utilizada como antimicrobiana, antiinflamatória e antipirética, sua atividade antioxidante foi avaliada frente ao DPPH,

foram obtidos resultados melhores que os padrões ácido ascórbico (AA) e BHT (RICCI et al, 2005).

Lamium album, *Lamium purpureum* e *Viscum album*, plantas medicinais polonesas da família Lamiaceae também tiveram sua atividade antioxidante avaliada frente ao DPPH (BUDZIANOWSKI, BUDZIANOWSKA, 2006).

Radic, Mimica-Dukic (2006) determinaram a atividade antioxidante dos óleos voláteis de várias plantas da família Lamiaceae frente ao radical livre DPPH por CCD. Os pesquisadores observaram que os compostos dos óleos com maior capacidade em neutralizar o DPPH foram os aromáticos, os aldeídos e as cetonas monoterpênicas e alguns hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal em estudo constituiu-se de folhas, caules, flores e raízes de *Glechon spathulata* Benth. coletadas no município de Dilermando de Aguiar/RS. A identificação foi realizada pelo Dr. Gilberto Dolejal Zanetti e um exemplar encontra-se registrado no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob a exsicata SMDB 10.279.

3.2 Equipamentos e acessórios

- Alças de repique microbiológico estéreis, descartáveis
- Aquário
- Autoclave
- Bomba de oxigênio
- Clevenger
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas
- Câmera digital
- Cubas de vidro para cromatografia
- Espectrofotômetro de UV/Visível
- Estereomicroscópio binocular
- Estufa de esterilização e secagem
- Estufas microbiológicas
- Evaporador rotatório acoplado a banho d'água
- Moinho de facas com tamis de malha 0,86 μm
- Papel filtro
- Placas de Petri
- Placas de vidro para CCD

- Placas teste para cultura de tecidos
- Pipetas de Pasteur
- Soxhlet
- Termostato

3.3 Solventes e reagentes

Foram empregados solventes e reagentes das marcas Vetec[®], Sigma[®] e Merck[®].

- Acetato de etila PA
- Ácido acético glacial PA
- Ácido clorídrico PA
- Ácido fórmico PA
- Álcool etílico PA
- Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio
- Clorofórmio PA
- Cromatofolhas de silicagel GF₂₅₄
- 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
- Éter etílico PA
- Hexano PA
- Silicagel GF₂₅₄
- Sulfato de sódio anidro
- Tolueno PA

3.4 Substâncias de referência

- Ácido Ascórbico – Merck[®]
- Amoxicilina (978,9 µg/mg)
- Cloridrato de berberina – Sigma[®]

- Nistatina (2464,38 UI/mg)
- Quercetina
- Rutina
- Timol – Merck®

3.5 Microrganismos

Para determinação da atividade antimicrobiana, utilizaram-se cepas “*American Type Culture Collection*” (ATCC) e cepas isoladas de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) (Tabela 3). Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM e do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM.

Tabela 3 – Microrganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana de *Glechon spathulata*

	Microrganismos	Cepa
Bactérias	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
	<i>Corynebacterium</i> sp.	(*)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	(*)
	<i>Micrococcus</i> sp.	(*)
	<i>Oerskovia</i> sp.	(*)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(*)
	Gram-positivas	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Staphylococcus aureus</i> β -hemolítico	(*)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(*)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	(*)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	(*)
	<i>Enterobacter cloacae</i> Multirresistente	(*)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11103	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(*)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	
Gram-negativas		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL + 23	(*)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>Ralstonia pickettii</i>	(*)	
<i>Salmonella typhimurium</i>	(*)	
<i>Shigella sonnei</i>	(*)	
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 1600

(*) – isolado clínico

3.6 Meios de Cultura

Os meios de cultura, cuja composição encontra-se descrita a seguir, foram solubilizados a quente e esterilizados por calor úmido em autoclave a 120° por 15 minutos.

- Ágar Mueller-Hinton

Infuso de carne	300 g
Caseína hidrolisada	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar-ágar	17 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

- Ágar Saboraud Dextrose 2%

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada q. s. p.	1000 ml

- Ágar simples

Cálcio nutriente	8,0 g
Ágar-ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

- Caldo triptona-Soja

Caseína tratada por suco pancreático	17,0 g
Farinha de soja por digestão papaínica	3,0 g
Dextrose	2,5 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Água destilada	1000 ml

- Caldo Mueller-Hinton

Infusão desidratada de carne	17,5 g
Hidrolisado de caseína	10,0 g
Amido	2,0 g
Água destilada q. s. p.	1000 ml

3.7 Eluentes para CCD

- I Hexano, éter etílico e acetato de etila na proporção 80:20:0,5.
- li Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água destilada na proporção 100:11:11:27.
- lii Fase superior de butanol, ácido acético glacial e água destilada na proporção 40:10:50

3.8 Reveladores para CCD

Foram utilizados os seguintes reveladores para CCD:

3.8.1 Anisaldeído sulfúrico

- 0,5 ml de anisaldeído
- 10 ml de ácido acético glacial
- 85 ml de metanol
- 5 ml de ácido sulfúrico concentrado
 - ✓ Nebuliza-se a placa com esta solução
 - ✓ Leva-se a placa a estufa à 100°C por 5 – 10 min
 - Coloração violácea no visível pode indicar a presença de saponinas e/ou óleos voláteis

3.8.2 Ácido oxalo-bórico

- 15 ml de solução aquosa de ácido bórico a 3%
- 5 ml de solução aquosa de ácido oxálico a 10%
 - ✓ Nebuliza-se a placa com esta solução
 - ✓ Leva-se a placa para a estufa à 120°C por 15 min
 - Fluorescência amarelo-esverdeada no ultravioleta (UV) a 254 nm é um indício da presença de flavonóides

3.9 Obtenção, preparo do material vegetal e fracionamento do extrato

O material coletado foi desidratado em estufa a 45°C e triturado a grosso modo. Após ser reduzida a pó em moinho de facas, a droga foi armazenada em frasco âmbar para posterior obtenção dos extratos.

A droga em pó foi macerada em etanol (70%) a frio com renovação do solvente. Após o solvente foi evaporado em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo seco. Parte do resíduo seco foi retomada e submetida a fracionamento por extração seqüencial com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH) de acordo com Falkenberg, Santos, Simões (2004), obtendo-se respectivamente as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FA) e *n*-butanólica (FB) (Figura 7). Foram calculados os rendimentos do extrato bruto e de cada fração obtida na partição seqüencial com os solventes orgânicos.

O fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando padrões adequados de acordo com Wagner, Bladt, Zgainski (1984).

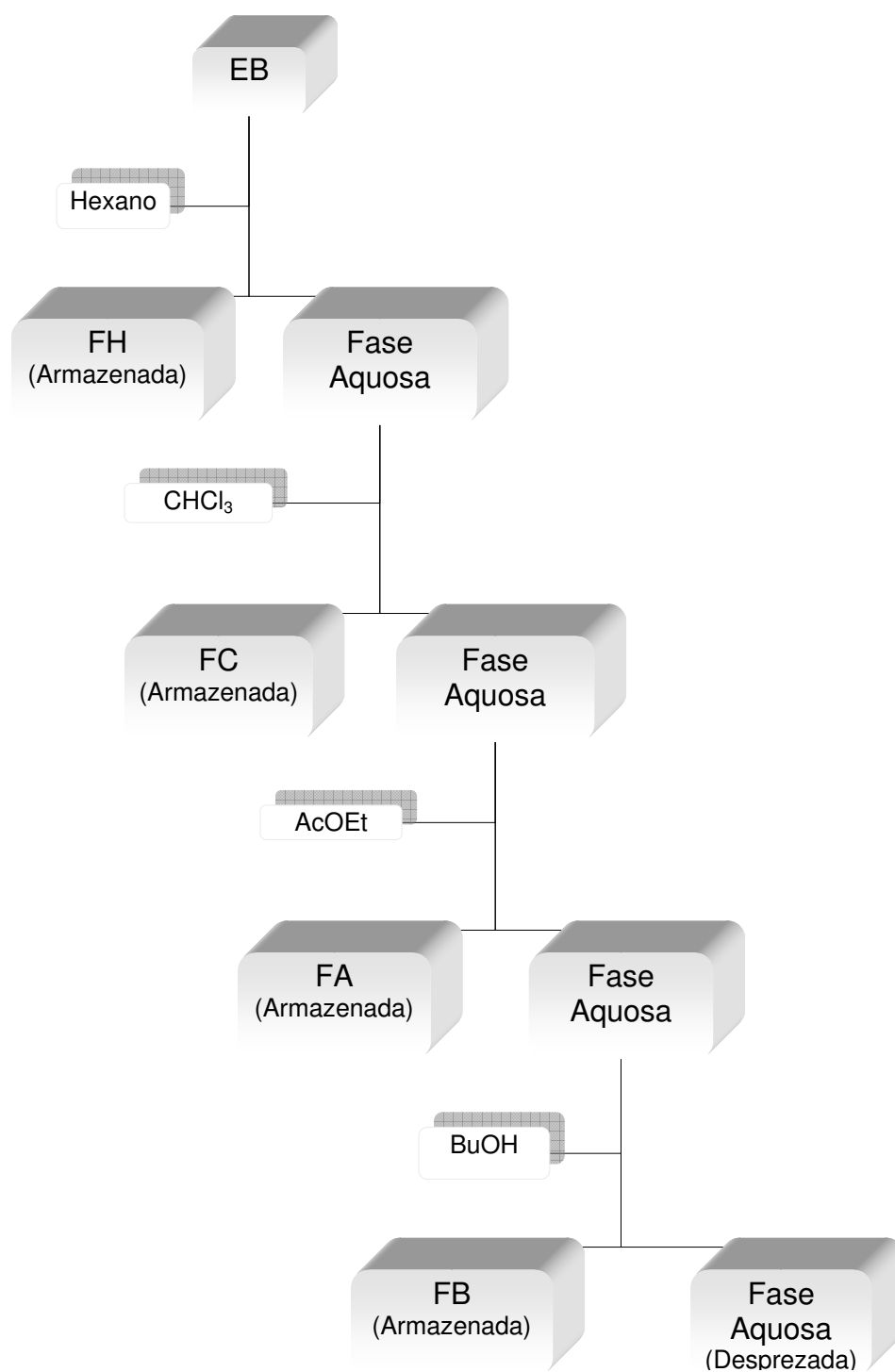


Figura 7 – Esquema do fracionamento do extrato bruto através da partição por solventes orgânicos.

3.10 Extração e análise do óleo

3.10.1 Extração

O óleo foi extraído do material vegetal fresco, constituído de toda planta, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por Wasicky, Akisue (1969) e separado da água com éter etílico em funil de separação, a água residual foi eliminada empregando-se sulfato de sódio anidro e após o óleo diluído em éter etílico foi filtrado para eliminação do sulfato, o éter etílico foi evaporado à 35°C e o óleo foi pesado para determinação do rendimento da extração. Parte do óleo foi submetida à análise por CG-EM após a eliminação do solvente. O restante foi armazenado à temperatura de aproximadamente 4°C, ao abrigo da luz onde foram estudadas a atividade antimicrobiana, antioxidante e tóxica frente à *Artemia salina* Leach.

3.10.2 Análise cromatográfica do óleo por cromatografia gasosa e determinação do índice de Kovats (ik)

Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo SHIMADZU acoplado a espectrômetro de massas (EM) operando a 70 eV. Utilizou-se uma coluna DB-5 com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Foi utilizando como gás de arraste hélio a 80 kPa de pressão (1 ml/min). O EM utilizado apresentou detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; os fragmentos foram detectados de 29 a 400 Da.

A amostra para CG foi preparada (solução 2% do óleo em éter etílico) e um volume de 1 µl foi injetado.

Cada componente foi identificado através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura (ADAMS,1995) e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura.

A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de

seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra. Os índices de retenção de Kovats (i_k) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de n -alcanos (C9-C22) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras calculados através da fórmula:

$$i_{k_x} = 100n + 100\Delta n[(tr_x - tr_n)/(tr_m - tr_n)]$$

Onde:

i_{k_x} = índice de retenção de Kovats da substância desconhecida “x”

n = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes de x

Δn = número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois de x menos o número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes de x

tr_x = tempo de retenção da substância desconhecida

tr_n = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes de x

tr_m = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de x

3.11 Análise fitoquímica qualitativa

A análise fitoquímica qualitativa seguiu a técnica descrita por Moreira (1979), com o extrato etanólico obtido por maceração e decocção, eventualmente algumas técnicas mais específicas descritas por Costa (1982) foram empregadas.

3.12 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada pelos métodos da bioautografia e microdiluição em caldo.

3.12.1 Bioautografia

Por bioautografia, a atividade antimicrobiana foi determinada conforme Hamburger, Cordell (1987) e Rahalison et al. (1991), como controle positivo foi empregado padrão de amoxicilina para bactérias e de nistatina para fungos, preparados conforme FDA (1991).

Para obtenção dos inóculos, as culturas de microrganismos indicadores ATCC foram lavadas com solução fisiológica estéril, obtendo-se uma suspensão, a qual foi lida em colorímetro no comprimento de onda de 520 nm a fim de obter 25% de transmitância. Após, as suspensões de inóculos foram adicionadas aos meios de cultura adequados na proporção de 0,5% em meio de ágar Mueller-Hinton para as bactérias e em ágar Saboraud Dextrose 2% para os fungos.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri (20 x 100 mm de diâmetro) estéreis e descartáveis. Em cada placa de Petri foi depositada uma cromatoplaça de silicagel GF₂₅₄ medindo 50 x 60 mm de espessura com os cromatogramas desenvolvidos. Sobre a cromatoplaça foram adicionados 5 µl de amostra: óleo volátil a 10% em clorofórmio e extrato bruto a 10% em etanol e 5 µl do padrão: amoxicilina para bactérias e nistatina para fungos preparados conforme FDA (1991). O óleo volátil foi testado diretamente e o extrato bruto foi eluído em acetato de etila; ácido fórmico; ácido acético glacial e água na proporção 100:11:11:27.

Sobre a cromatoplaça foi adicionado 15 ml do meio de cultura liquefeito e inoculado com o microrganismo indicador. Com a solidificação do meio, levou-se para incubação a 35°C para os meios inoculados com bactérias por 18 horas e a 25°C para os meios inoculados com fungos por 48 horas. Após o período de incubação foi nebulizada sobre a placa a solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (20 mg/ml) para detecção de halos de inibição, incubou-se novamente por

mais 2 horas, quando o experimento foi registrado por fotografias.

3.12.2 Microdiluição em caldo

Para avaliação da atividade antibacteriana, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrita pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2003), antigo NCCLS (*National Committee for Clinical, Laboratory Standards*).

Os ensaios foram realizados em triplicata com séries de diluições de cada extrato em placas estéreis com 96 cavidades. Foi empregado controle positivo de crescimento para cada bactéria (inóculo, caldo Mueller-Hinton) e controle negativo (caldo Mueller-Hinton, extrato) para descartar alguma possível contaminação nos extratos.

As amostras foram inicialmente solubilizadas em etanol, e adicionadas aos poços de modo que ficassem diluídas a dez diferentes concentrações (1600 a 3,125 µg/ml).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de bactérias ativadas, as quais foram repicadas em ágar Mueller-Hinton com um dia de antecedência, em solução salina e ajustado com uso de espectrofotômetro para a escala 0,5 de MacFarland, a qual corresponde a 1×10^8 UFC/ml (a leitura do inóculo foi ajustada para 0,08 a 0,1 de absorbância no comprimento de onda 625 nm contra o branco). Após homogeneização, a suspensão bacteriana foi inoculada nas cavidades da microplaca de modo que a concentração bacteriana final fosse de 5×10^5 UFC/ml, como preconiza o CLSI (2003).

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. Após este período, a leitura das CIMs foi feita utilizando-se como revelador o corante enzimático cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio diluído a 2% em água. Este corante é incolor e se torna avermelhado em meios reduzidos, como aqueles em que houve a multiplicação bacteriana, ou seja, a CIM foi visualizada como sendo inibição do crescimento em 80% ou mais (CLSI, 2003), comparado visualmente com a cor avermelhada do controle positivo.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada quando houve inibição do crescimento bacteriano. Para isto foram realizados repiques a partir dos poços onde houve inibição para placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton. A ausência de crescimento bacteriano indicou que o extrato foi bactericida na concentração testada.

3.13 Teste de letalidade por *Artemia salina* Leach.

Foi determinada a letalidade do óleo, do extrato bruto e de suas frações frente a *Artemia salina* Leach., conforme McLaughlin (1991). Como controle positivo foi empregado timol. Os ovos de *Artemia salina* e o sal marinho foram adquiridos no comércio local.

Os ovos foram colocados no aquário adaptado contendo água marinha artificial com temperatura controlada, mantida em torno de 25°C e aeração constante. Após um período de aproximadamente 48 horas houve a eclosão dos ovos que deram origem a náuplios.

As amostras diluídas em água e, eventualmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) foram aplicadas com pipeta automática em tubos de ensaio contendo 10 náuplios cada. Adicionou-se solução salina (aproximadamente 35 g/l) até completar 5 ml de volume final. Os ensaios foram realizados em triplicata, foi utilizado como controle negativo solução salina e como controle positivo foi empregado timol nas concentrações de 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml e 0,5 µg/ml. Após 24 horas fez-se a leitura, observando-se a média do número de mortos, a qual foi empregada para determinar a CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% dos náuplios) por regressão linear.

3.14 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada *in vitro* qualitativamente e quantitativamente frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH).

3.14.1 Atividade antioxidante por CCD

Para avaliar qualitativamente a atividade antioxidante de *G. spathulata*, o óleo foi diluído em éter etílico a 10%, o extrato bruto e suas frações foram retomados em metanol a 10% e um volume de 5 µl de cada amostra foi aplicado em cromatoplasmas de Silicagel GF₂₅₄ (Merck). Estas amostras foram eluídas no melhor sistema eluente definido através de testes, observando os cromatogramas mais bem resolvidos, estes sistemas, bem como as substâncias de referência empregadas para cada amostra são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Sistemas cromatográficos empregados na avaliação da atividade antioxidante por CCD

Amostra	Substância de referência	Eluente
OV	Timol	i
EB	Quercetina e Rutina	ii
FH	Quercetina	iii
FC	Quercetina	iii
FA	Quercetina	ii
FB	Quercetina	ii

Com a evaporação total do eluente, nebulizou-se a placa com uma solução de DPPH a 0,2% em metanol de acordo com Sanches et al. (2005) e após trinta minutos, à temperatura ambiente fez-se a leitura da atividade antioxidante, caracterizada pela formação de manchas amareladas comparáveis com as

observadas para os padrões sobre a coloração violeta, característica do DPPH (CHOI et al., 2002).

3.14.2 Atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH seguiu a metodologia de GAO et al. (1999) e CHOI et al. (2002).

No ensaio foram utilizados o óleo volátil, o extrato bruto e suas frações, o ácido ascórbico (AA) foi utilizado como padrão para avaliação desta atividade. Os extratos secos, o ácido ascórbico e o óleo foram solubilizados em etanol.

Para a curva de calibração foram colocados 2,5 ml de solução etanólica de ácido ascórbico em cada tubo de ensaio nas seguintes concentrações: 200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; 3,125 µg/ml e 1,5625 µg/ml. Após adicionou-se 1 ml de DPPH 0,3 mM em etanol, incubou-se no escuro por 30 min e fez-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 518 nm, Este ensaio foi realizado em triplicata para todas as concentrações do padrão e das amostras. O espectrofotômetro foi zerado com etanol e como controle negativo utilizou-se 1 ml de DPPH em 2,5 ml de etanol. Como branco para cada concentração foram utilizadas leituras das absorbâncias das amostras que geralmente se apresentavam coradas. A absorbância do controle negativo foi 0,705, este foi o valor empregado para determinar a porcentagem de inibição de acordo com a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [100(A_A - A_B) / A_C]$$

Onde:

A_A = absorbância da amostra

A_B = absorbância do branco

A_C = absorvância do controle negativo

A CI_{50} (concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%) foi calculada para as amostras e para o padrão ácido ascórbico através da equação da reta obtida por regressão linear, mesma metodologia empregada por Zanon (2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento do extrato bruto

A partir da droga (pó das partes aéreas secas de *G. spathulata* Benth.), obteve-se o extrato bruto (hidro-etanólico) com um rendimento de 19,6%.

4.2 Rendimento das frações

A partir do fracionamento do extrato bruto houve um rendimento total de 32,44%; sendo 9,140% para a FH; 8,346% para a FC; 6,203% para a FA e 8,751% para a FB (Figura 8).

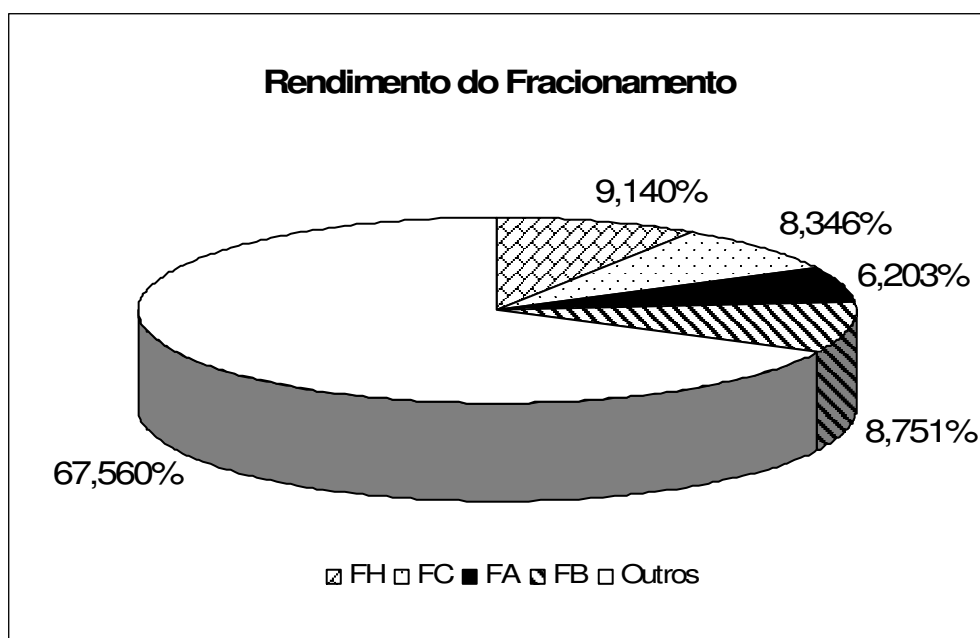


Figura 8 – Gráfico mostrando o rendimento de cada fração obtida a partir do extrato bruto.

A FH foi a de maior rendimento e apresentou-se de forma pastosa com alguns cristais, é provável que esta fração seja constituída basicamente por substâncias altamente lipofílicas, óleos voláteis e lipídeos (SONAGLIO et al., 2004). Estudos mostram que a fração hexânica exibe potencial para o interesse farmacológico, como observado para *Cynara scolymus* L., a popular alcachofra, sua fração hexânica demonstrou considerável atividade citotóxica avaliada pela metodologia do microcrustáceo *Artemia salina* Leach., além de atividade diurética. Nesta fração foi isolado o triterpeno lupeol, provável responsável por estas atividades (NOLDIN et al., 2003).

A FB foi a segunda em termos de rendimento, é provável que nesta se concentrem principalmente substâncias polifenólicas mais polares que na FA. Através da análise por CCD empregando silicagel GF₂₅₄ como fase estacionária, o eluente ii como fase móvel e ácido oxalo-bórico como revelador foram encontradas substâncias nos mesmos fatores de retenção (Rfs) da rutina e da quercetina e com coloração semelhante, o mesmo fato ocorreu para a FA, como se observa na Figura 9.

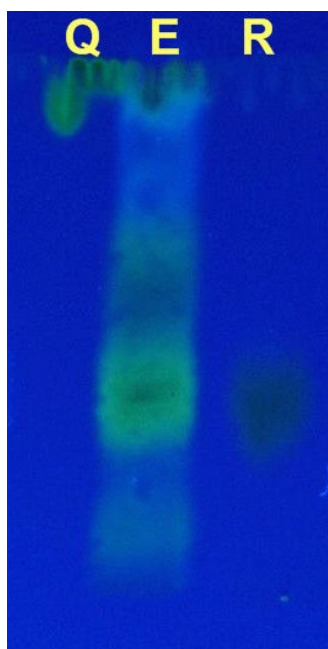


Figura 9 – Cromatograma do extrato de *G. spathulata*.

Q: quercetina; E: extrato; R: rutina
Eluente: AcOEt:HAc:HFórm.:H₂O (100:11:11:27)
Revelador: Ácido oxalo-bórico

Favila (2006) em seu estudo com *Conyza bonariensis* (Asteraceae) encontrou nas FA e FB uma maior concentração de compostos fenólicos, provável responsável pela maior atividade antioxidante descrita para estas frações.

4.3 Análise fitoquímica qualitativa

4.3.1 Características organolépticas do extrato

Através da análise sensorial, o extrato aquoso foi caracterizado (Tabela 5):

Tabela 5 – Características organolépticas dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *G. spathulata*.

	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
Coloração	Verde-escuro Semelhante ao de <i>Origanum</i>	Verde-escuro Semelhante ao de <i>Origanum</i>
Odor	<i>majorana</i>	<i>majorana</i>
pH	4,5	4,0
Sabor	Adstringente	Adstringente

4.3.2 Principais classes de metabólitos secundários de *G. spathulata* Benth.

Através da análise fitoquímica ficou evidenciada a presença de flavonóides, ácidos voláteis, heterosídeos antociânicos, fenóis com posição orto, meta e para livres, taninos condensados. Saponinas hemolíticas, esteróides, triterpenos e açúcares foram menos evidentes, mas obtiveram reações positivas. *G. spathulata* também apresentou traços de taninos hidrolisáveis. Antracênicos, aminogrupos, alcalóides, cumarinas e heterosídeos cianogenéticos resultaram em reação negativa, o que caracteriza a ausência ou quantidade insuficiente de substâncias pertencentes a essas classes de metabólitos, não sendo possível a detecção por esta metodologia.

As classes de flavonóides e taninos, e também algumas substâncias voláteis são geralmente as responsáveis pela atividade antioxidante, pois possuem oxidrilas, as quais são muito reativas e são capazes de seqüestrar os radicais livres (KULISIC, 2004).

O sabor adstringente percebido através da análise sensorial provavelmente esteja relacionado à presença de taninos evidenciada pela análise fitoquímica. O fato de *G. spathulata* apresentar saponinas e estas por sua vez, quando presentes em algumas plantas medicinais, são responsáveis pela atividade expectorante (ABRILAR, 2007), atividade já relatada para *G. spathulata* (COIMBRA, 1942) pode servir de argumento para novos estudos sobre estes metabólitos secundários presentes em *G. spathulata*.

Através da extração por Clevenger obteve-se um rendimento de 1,87% de OV de *G. spathulata*. Com a análise cromatográfica por CG-EM pôde-se ter idéia das substâncias que o compõem. O cromatograma desenvolvido (Figura 10) resultou na separação de nove substâncias, 100% das substâncias que compõem o óleo volátil foram separadas por CG.

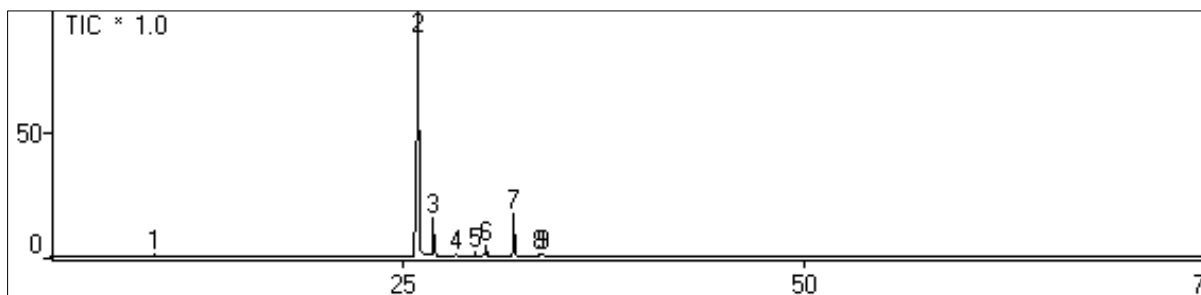
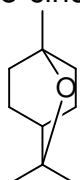
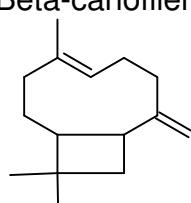
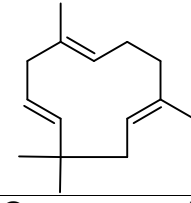
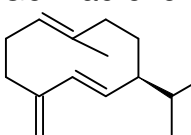
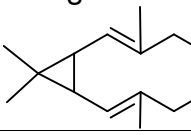
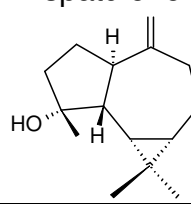
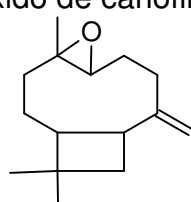


Figura 10 – Cromatograma desenvolvido pelo óleo volátil.

Os nove constituintes do óleo volátil de *G. spathulata* Benth. são mostrados na Tabela 6 com seus respectivos tempos de retenção (TR), índice de Kovats e concentração.

Tabela 6 – Substâncias presentes no óleo volátil de *G. spathulata* e suas respectivas concentrações

Pico	TR	Ik	IK ADAMS (1995)	%	Substância
1	9.651	1029	1033	0,22	1,8-cineol 
2	26.078	1385	-	84,39	NI*
3	27.017	1406	1418	5,84	Beta-cariofileno 
4	28.447	1438	1454	0,26	Alfa-humuleno 
5	29.626	1465	1480	0,52	Germacreno D 
6	30.283	1480	1494	1,61	Biciclogermacreno 
7	32.016	1523	-	6,91	NI
8	33.590	1567	1576	0,16	Espatuleno 
9	33.764	1572	1581	0,09	Óxido de cariofileno 

*NI: substância não identificada.

A substância 1, a menos apolar, através da análise por espectrometria de massas, comparando seu índice de Kovats e seu padrão de fragmentação, provavelmente seja o monoterpeneo 1,8-cineol. Esta substância representou 0,22% da composição do óleo volátil.

O 1,8-cineol, também conhecido por eucaliptol está presente nos óleos voláteis de outras espécies da família Lamiaceae, como *Cunila galioides* (ECHEVERRIGARAY et al., 2003), *Salvia multicaulis* (SENATORE, ARNOLD, PIOZZI, 2004), *Salvia tomentosa* (TEPE et al., 2005), é um dos principais constituintes de *Hyptis suaveolens* (AZEVEDO et al., 2001), é o constituinte majoritário no óleo de *Lavandula dentata* e de outras espécies de *Lavandula* (DOB et al., 2005).

A substância nº2 foi o constituinte majoritário, 84,39% do óleo volátil foi representado por esta substância, a qual não foi identificada pelo estudo do índice de Kovats, porém, através da semelhança de sua fragmentação com derivados do eugenol, provavelmente seja um derivado ainda não identificado, bem como a substância representada pelo pico cromatográfico nº7, a qual, corresponde à segunda substância mais concentrada, perfazendo 6,91% do óleo e pode ser um isômero de 2, uma vez que possuem a mesma massa molecular e, embora seus ik não estejam muito próximos, seus espectros de massas são semelhantes.

A substância representada pelo pico nº3 foi a terceira mais concentrada no óleo, representando 5,84% do total, possivelmente este pico caracterize o beta-cariofileno, pois devido às análises comparativas do seu índice de Kovats e espectro de massas (ADAMS, 1995) foi observada uma grande semelhança.

O beta-cariofileno, um sesquiterpeneo não-oxigenado esteve presente nos óleos voláteis de várias plantas da família Lamiaceae, entre elas, *Stachys aleurites* da Turquia, seu óleo é composto por cerca de 30% desta substância (FLAMINI et al., 2005), algumas espécies de *Salvia* (SENATORE, ARNOLD, PIOZZI, 2004; NICKAVAR, MOJABA, ASGARPAHAH, 2005), *Lavandula canariensis* (PALÁ-PAÚL et al., 2004), algumas espécies de *Lamium* (FLAMINI, CIONI, MORELLI, 2005) e *Thymus caespititius* (SANTOS et al., 2005).

Outro sesquiterpeneo não-oxigenado encontrado no óleo foi o alfa-humuleno, que também caracterizou os óleos de outras espécies da família Lamiaceae, como *Ocimum canum* (NGASSOUM et al., 2004).

O sesquiterpeno germacreno D é um dos constituintes do óleo de *Salvia tomentosa* (TEPE et al., 2005), *Lavandula canariensis* (PALÁ-PAÚL, 2004), *Thymus caespititius* (SANTOS et al., 2005), é o constituinte majoritário de *Lamium purpureum*, *Lamium hybridum*, *Lamium bifidum* (FLAMINI, CIONI, MORELLI, 2005).

O biciclogermacreno representa 14,5% do óleo de *Stachys aleurites* (FLAMINI et al., 2005), foi o constituinte majoritário do óleo de *Salvia hypoleuca* (NICKAVAR, MOJAB, ASGARPAHAH, 2005) e é um dos principais constituintes do óleo de *Hyptis suaveolens* (AZEVEDO et al., 2001).

O óleo de *Salvia hypoleuca* é constituído por 12,5% de espatulenol (NICKAVAR, MOJAB, ASGARPAHAH, 2005), o de *Salvia tomentosa* possui menos de 1% (TEPE et al., 2005) e esta substância também está presente no óleo de *Stachys aleurites* (FLAMINI et al., 2005).

O óleo volátil de *Lavandula canariensis* possui 2% de óxido de cariofileno (PALÁ-PAÚL et al., 2004), os óleos de *Lamium hybridum*, *Lamium bifidum* possuem menos que 1% (FLAMINI, CIONI, MORELLI, 2005) e o óleo de *Cyclotrichium organifolium* possui traços desta substância (TEPE et al., 2005).

4.4 Atividade antimicrobiana

4.4.1 Bioautografia

Foram avaliados através da bioautografia o óleo volátil e o extrato bruto. Os resultados observados foram classificados como positivos e negativos (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade antimicrobiana do óleo volátil (OV) e do extrato bruto (EB) de *G. spathulata* Benth. por bioautografia.

	Microrganismos	ATCC	OV	EB	
Bactérias	Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538p	+	-
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	+	-
	Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	11103	+	-
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	+	-
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	+	-
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	10231	+	-	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1600	-	-	

(*) não houve halo de inibição

Os halos de inibição (Figura 11) formados pelas bactérias permitem aferir que o óleo foi mais ativo contra bactérias Gram-positivas que negativas. Dentre as Gram-negativas testadas, o óleo apresentou uma maior atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*. O padrão utilizado não apresentou atividade, o que já foi observado por El-Shazly, Hussein (2004) quando verificou que o óleo de *Teucrium leucocladum* (Lamiaceae) foi mais ativo contra *P. aeruginosa* que o antibiótico empregado como padrão.

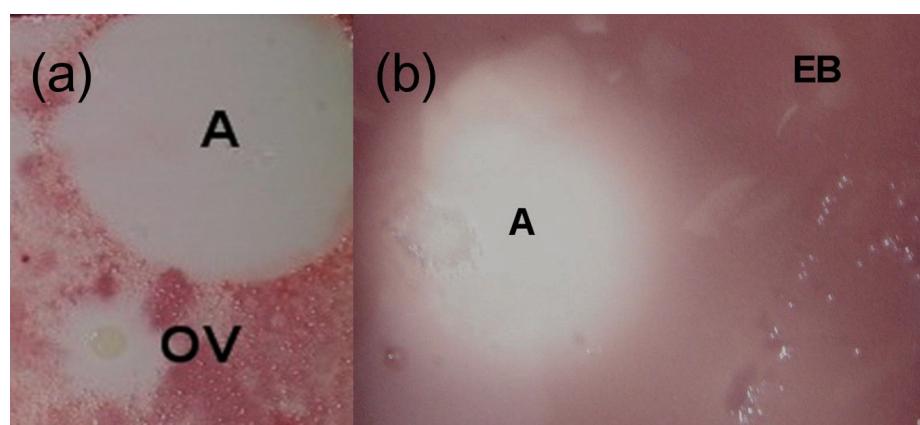


Figura 11 – (a) Placa mostrando halo de inibição formado pelo óleo volátil de *G. spathulata* e a (b) inatividade do extrato bruto frente a *K. pneumoniae*.

A – amoxicilina; OV – óleo volátil; EB – extrato bruto

Quanto às leveduras, o óleo foi ativo contra *C. albicans*, tendo sido mais ativo que nistatina, o antifúngico empregado como padrão, El-Shazly, Hussein (2004) em seu trabalho com *T. leucocladum* também verificaram uma maior atividade do óleo que do padrão nistatina contra a *C. albicans*. O óleo de *Scutellaria barbata* (Lamiaceae) inibiu fracamente *C. albicans* e os autores não referem a utilização de nenhum antifúngico como padrão (YU et al., 2004).

O extrato bruto não apresentou atividade para os mesmos microrganismos nas mesmas condições do óleo volátil.

Krause et al., (2003) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo volátil de *Ocimum gratissimum* por bioautografia, o óleo foi ativo contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*. Baydar et al (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos voláteis de plantas da família Lamiaceae, estes óleos inibiram o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas e negativas testadas (BAYDAR et al., 2004).

4.4.2 Microdiluição em caldo

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto (EB), das frações e do óleo volátil (OV) frente aos microrganismos testados foram determinados por microdiluição em caldo (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para os extratos de *G. spathulata* Benth.

EXTRATO	FA	FB	FC	EB	FH	OV
Bactérias Gram-positivas						
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	100/400*	400/400	200/800	200/800	200/800	NT**
<i>Corynebacterium</i> sp.	400/800	800/-***	1600/-	400/1600	200/1600	200/800
<i>Listeria monocytogenes</i>	200/1600	>1600/-	400/1600	100/1600	100/-	400/1600
<i>Micrococcus</i> sp.	200/1600	>1600/-	800/-	100/-	800/-	50/800
<i>Oerskovia</i> sp.	100/400	400/800	200/800	400/800	100/400	NT
<i>Rhodococcus</i> sp.	200/800	>1600/-	1600/1600	800/1600	1600/-	800/-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200/400	800/-	400/-	400/800	400/800	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> β -hemolítico	200/800	1600/-	1600/-	800/-	400/1600	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	400/800	>1600/-	100/-	50/-	100/-	800/1600
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	200/800	400/1600	400/1600	400/800	400/800	NT
Bactérias Gram-negativas						
<i>Acinetobacter baumannii</i>	400/800	800/1600	400/800	400/800	400/800	NT
<i>Enterobacter cloacae</i> M-R	1600/-	1600/-	1600/-	1600/-	800/-	200/-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200/800	200/1600	200/800	400/1600	400/1600	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	800/1600	800/-	800/-	800/-	800/-	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL + 23	800/-	800/-	800/-	800/-	800/-	NT
<i>Ralstonia picketti</i>	400/1600	1600/-	400/-	1600/1600	400/-	100/800
<i>Salmonella typhimurium</i>	1600/-	>1600/-	>1600/-	>1600/-	1600/-	400/-
<i>Shigella sonnei</i>	1600/-	>1600/-	1600/-	>1600/-	1600/-	400/1600

*CIM/CBM ($\mu\text{g/ml}$)

**não testado

***Inativo

O ensaio desenvolvido em triplicata com as concentrações analisadas está representado na Figura 12.

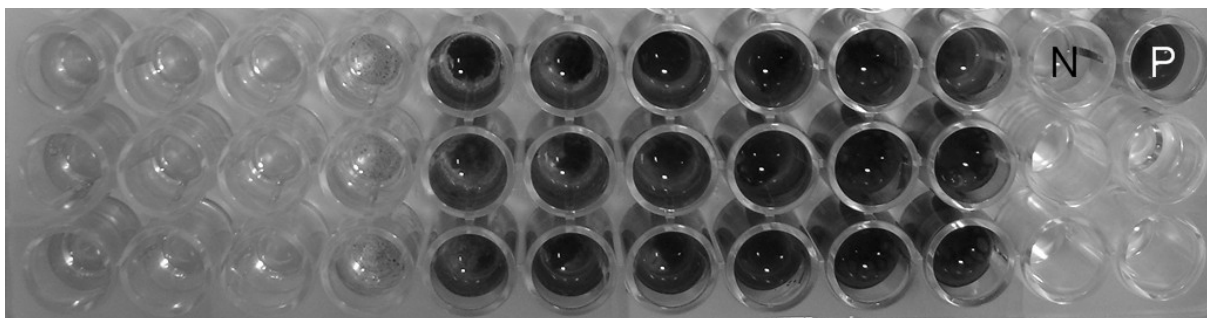


Figura 12 – Determinação da CIM por microdiluição em caldo, ensaio desenvolvido em triplicata.

Suscetibilidade de *Bacillus cereus* ATCC 14579 à FA.

N = controle negativo (meio de cultura + extrato na maior concentração + 2,3,5-trifenil-tetrazólio)

P = controle positivo (meio de cultura + inóculo + 2,3,5-trifenil-tetrazólio)

Na Figura 12 é mostrada a atividade antibacteriana da FA contra o *Bacillus cereus*, a concentração desta fração variou de 1600 $\mu\text{g/ml}$ a 3,125 $\mu\text{g/ml}$ da esquerda para a direita. Foi realizado um controle negativo contendo extrato, meio de cultura e cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio para descartar a possibilidade de contaminação do extrato.

O ensaio para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), o qual foi realizado em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton como meio de cultura está ilustrado na Figura 13. Para esta placa foi repicado o conteúdo das cavidades onde não houve crescimento bacteriano.

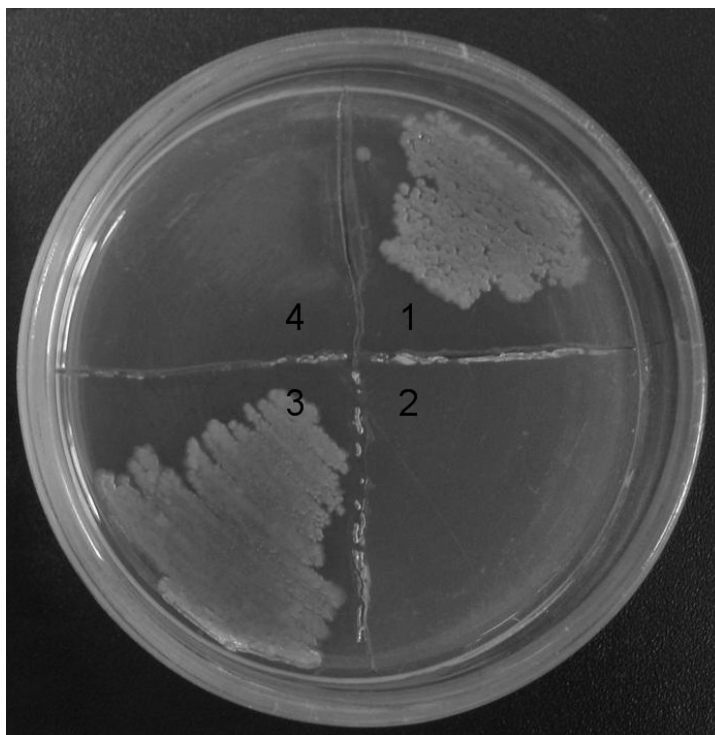


Figura 13 – Placa de Petri para determinação da CBM.

- 1 = FA 800 $\mu\text{g/ml}$ frente a *P. aeruginosa*
- 2 = FA 1600 $\mu\text{g/ml}$ frente a *P. aeruginosa*
- 3 = FB 800 $\mu\text{g/ml}$ frente a *P. aeruginosa*
- 4 = FB 1600 $\mu\text{g/ml}$ frente a *P. aeruginosa*

A menor CIM observada foi 50 $\mu\text{g/ml}$, a CIM do extrato etanólico bruto contra *S. epidermidis* e do óleo volátil contra *Micrococcus* sp. Em geral, a FA foi a de maior atividade e a FB, a de menor atividade. A FA, a FH e o OV inibiram o crescimento de 100% das bactérias Gram-positivas e negativas testadas. O EB inibiu 100% das bactérias Gram-positivas e 75% das Gram-negativas, a FC inibiu 100% das Gram-positivas e 87,5% das negativas, a butanólica inibiu 60% das Gram-positivas e 75% das negativas.

Os resultados mostram que em geral as amostras avaliadas obtiveram uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas e, excepcionalmente, a fração butanólica demonstrou uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas. O estudo de Zampini, Vattuone, Isla (2005) com *Zuccagnia punctata* mostrou que flavonóides isolados desta planta são bastante ativos contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*.

Zataria multiflora, uma Labiada nativa do Irã e com uso popular semelhante ao de *G. spathulata* também teve estudada a atividade antibacteriana do óleo volátil, do extrato metanólico e de suas frações polares e apolares. A menor CIM observada no estudo foi de 2,4 mg/ml, menor concentração do óleo volátil necessária para inibir o crescimento da bactéria *Shigella flexneri* (SHARIFIFAR et al., 2006). Embora os autores tenham considerado forte a atividade antibacteriana da planta em estudo, esta CIM foi superior a menor CIM encontrada em nosso estudo com *G. spathulata*, mostrando que a planta brasileira possui maior atividade antibacteriana.

Bacillus cereus foi sensível a todas as amostras testadas, a fração acetato de etila foi a mais ativa contra este microrganismo com CIM de 100 µg/ml, a menos ativa foi a butanólica com CIM de 400 µg/ml.

A bactéria Gram-positiva do gênero *Corynebacterium* foi menos sensível que *Bacillus cereus*, mas foi sensível a todos os extratos e ao óleo volátil, o óleo e a fração hexânica tiveram a menor CIM, ambos com CIM de 200 µg/ml, a fração butanólica e a fração clorofórmica não foram bactericidas nas concentrações testadas.

O crescimento de *Listeria monocytogenes* não foi inibido pela fração butanólica, porém frente a esta bactéria, a fração hexânica e o extrato bruto obtiveram CIM de 100 µg/ml.

Micrococcus sp. foi resistente a fração butanólica e sensível a todos os outros extratos testados, foi mais sensível ao óleo volátil com CIM de 50 µg/ml, apenas a fração acetato de etila e o óleo volátil foram bactericidas nas concentrações testadas com CBM de 800 µg/ml e 1600 µg/ml respectivamente.

Uma bactéria pouco sensível foi *Rhodococcus* sp., seu crescimento foi inibido por todos os extratos, com CIM entre 800 µg/ml e 1600 µg/ml, porém a fração acetato de etila obteve CIM de 200 µg/ml, não foi encontrada na literatura, nenhuma referência do estudo de extratos de plantas frente a esta bactéria.

Para *Escherichia coli* a CIM do EB foi de 400 µg/ml e a CBM de 800 µg/ml, no estudo de Zampini, Vattuone, Isla (2005) a CIM e a CBM do extrato etanólico de *Zuccagnia punctata* foi de 100 e 200 µg/ml, respectivamente, os autores também observaram que em seu estudo geralmente a CBM correspondeu ao dobro da CIM.

O estudo de Yu et al. (2004) vem de encontro ao nosso trabalho, já que com *Scutellaria barbata*, também da família Lamiaceae, as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao óleo volátil que as Gram-negativas, as CIMs foram

expressas em mg/ml e a menor CIM foi a encontrada para *S. epidermidis*, 0,77 mg/ml e os autores consideraram o óleo da planta como uma potente fonte de antimicrobianos

4.5 Teste de Letalidade por *Artemia salina* Leach.

O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi desenvolvido em triplicata. Determinou-se a CL₅₀ para as amostras e para o timol por regressão linear tendo sido calculadas as médias das CL₅₀ para as amostras e seus respectivos desvios padrão (s), estes valores podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de CL₅₀ calculados por regressão linear, expressos em µg/ml.

Extrato/substância	CL ₅₀ (µg/ml)	s*
OV	35,61	± 3,70
EB	258,21	± 7,85
FH	21,52	± 2,51
FC	44,59	± 0,83
FA	10,70	± 0,40
FB	215,33	± 31,51
Rutina	195,77	± 20,65
Quercetina	2,30	± 0,25
Timol	1,78	± 0,11

*desvio padrão

As amostras foram consideradas ativas quando TAS menor que 1000 µg/ml, sendo assim, todas as amostras foram ativas (Figura 14).

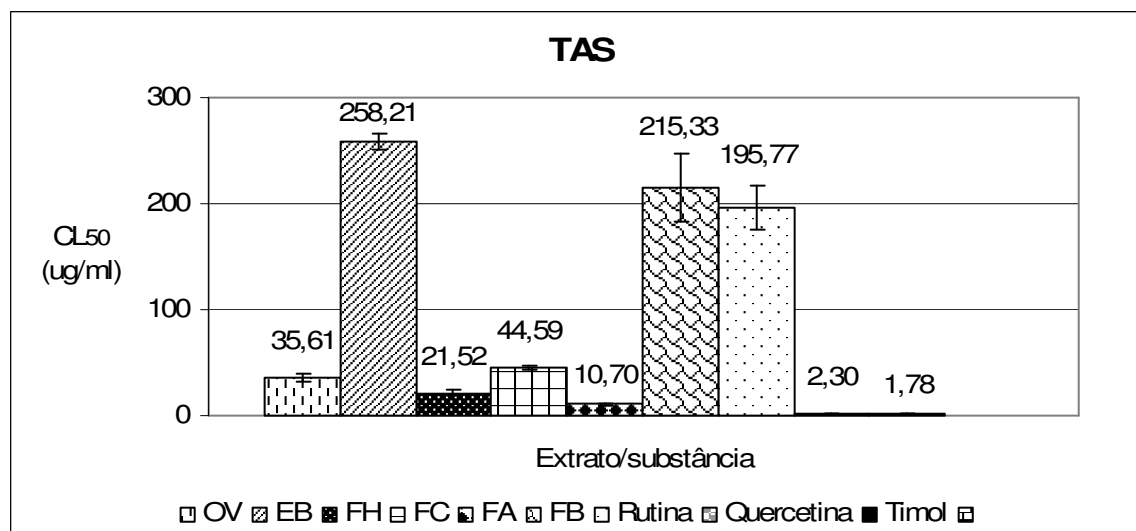


Figura 14 – Toxicidade frente a *Artemia salina* (TAS), valores de CL₅₀ em µg/ml para os extratos e para rutina e quercetina.

De acordo com a classificação estabelecida por Dolabela (1997 apud MELO, 2006) a quercetina, o OV e as frações FH, FC e FA mostraram-se altamente tóxicas, a FB e a rutina foram moderadamente tóxicas enquanto o extrato bruto foi pouco tóxico para o microcrustáceo.

Um extrato menos polar pode ser mais tóxico para *Artemia salina* que um mais polar, este fato ocorreu para *Baccharis pseudotenuifolia* (MOREIRA et al., 2003). Neste trabalho, os autores atribuíram a atividade do extrato clorofórmico à presença de ácido oleanólico, o qual obteve CL₅₀ de 85 µg/ml.

A FB e a rutina, apesar de serem moderadamente tóxicas para *Artemia salina* podem estar associadas à atividade tripanocida (CL₅₀ entre 80 e 250 µg/ml) (DOLABELA, 1997 apud GALOTTA, BOAVENTURA, 2005).

É provável que na FA (CL₅₀ = 10,70 µg/ml) encontrem-se substâncias bastante tóxicas para *Artemia salina*, isto pode ser explicado pelo fato desta fração conter substâncias mais polares como compostos fenólicos em geral e flavonóides (rutina e quercetina) que estão presentes em muitos vegetais e possuem diversas atividades biológicas (LÓPEZ et al., 2002; WILLAIN FILHO, 2005; FONSECA, 2006).

A CL₅₀ da quercetina foi de 2,30 µg/ml, altamente tóxica para o microcrustáceo, sendo considerada citotóxica, já que a TAS é empregada para avaliar citotoxicidade devido à correlação existente entre estas atividades (MEYER, 1982). Como também pode ser associado à atividade antitumoral (FONSECA, 2006).

4.6 Atividade antioxidante

4.6.1 Atividade antioxidante em CCD

A presença de compostos com atividade antioxidante no OV, no EB e em suas frações é evidenciada pela formação de manchas amareladas em CCD comparáveis com os padrões (Figura 15).

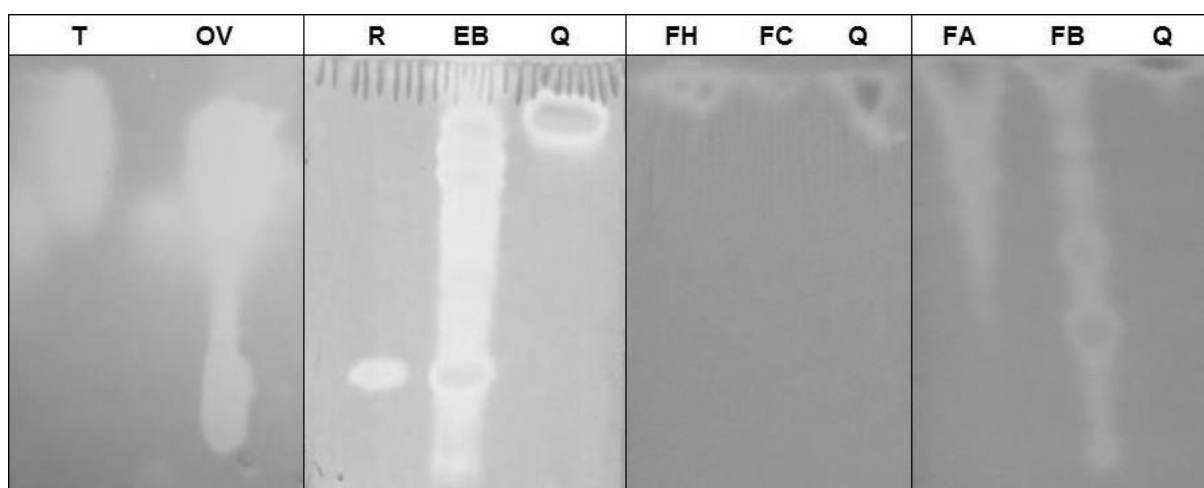


Figura 15 – Cromatoplasmas mostrando a atividade antioxidante de *G. spathulata*.

T: timol; R: rutina; Q: quercetina.

Eluentes: OV – eluente i; EB – eluente ii; FH e FC – eluente iii; FA e FB – eluente ii.

Como pode ser visto, existem substâncias presentes no extrato bruto (EB) de *G. spathulata* com os mesmos valores de Rf dos padrões empregados, a rutina e a quercetina são flavonóides normalmente utilizados como padrões para esta atividade e segundo Choi et al. (2002) apresentam uma forte e rápida reação de neutralização do radical livre DPPH.

Várias plantas da família Lamiaceae possuem atividade antioxidante *Scutellaria baicalensis* (GAO et al., 1999), *Teucrium marum* (RICCI et al., 2005), *Phlomis bruguieri*, *Phlomis herba-venti*, *Phlomis olivieri*, *Stachys byzantina*, *Stachys*

inflata, *Stachys lavandulifolia* e *Stachys laxa* (MORTEZA-SEMNANI, SAEEDI, SHAHANI, 2006).

O óleo de *G. spathulata* apresentou atividade antioxidante. Radic, Mimica-Dukic (2006) observaram que outras plantas da família Lamiaceae também possuem óleos voláteis com esta atividade e os compostos com maior capacidade em neutralizar o DPPH foram aromáticos, aldeídos e cetonas monoterpênicas e em menor grau, hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos.

4.6.2 Atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico

A média das porcentagens de inibição das amostras frente ao radical livre encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Porcentagens de inibição do padrão e das amostras frente ao radical livre DPPH em diferentes concentrações.

PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO							
[]* (µg/ml)	AA	OV	EB	FH	FC	FA	FB
200	92,06	70,21	72,77	61,13	90,35	96,6	94,89
100	91,91	63,97	61,84	40,24	74,33	94,33	84,4
50	91,35	55,32	48,51	33,19	59,29	88,37	64,4
25	90,21	52,91	32,91	22,55	42,84	82,41	52,39
12,5	86,38	44,68	21,42	19,24	36,45	73,33	36,88
6,25	74,47	36,88	13,47	15,22	30,92	40,57	32,34
3,125	60,57	35,03	8,79	13,76	25,39	27,52	24,77
1,5625	50,78	29,58	0,42	6,46	15,74	13,33	17,12

[] = concentração (µg/ml).

As amostras foram o óleo volátil de *G. spathulata*, o extrato bruto e suas frações FH, FC, FA e FB. O ácido ascórbico foi empregado como controle positivo.

Todas as amostras apresentaram alguma capacidade de neutralizar o poder reativo do radical livre DPPH, todavia, algumas apresentaram maior atividade antioxidante que outras (Figura 16).

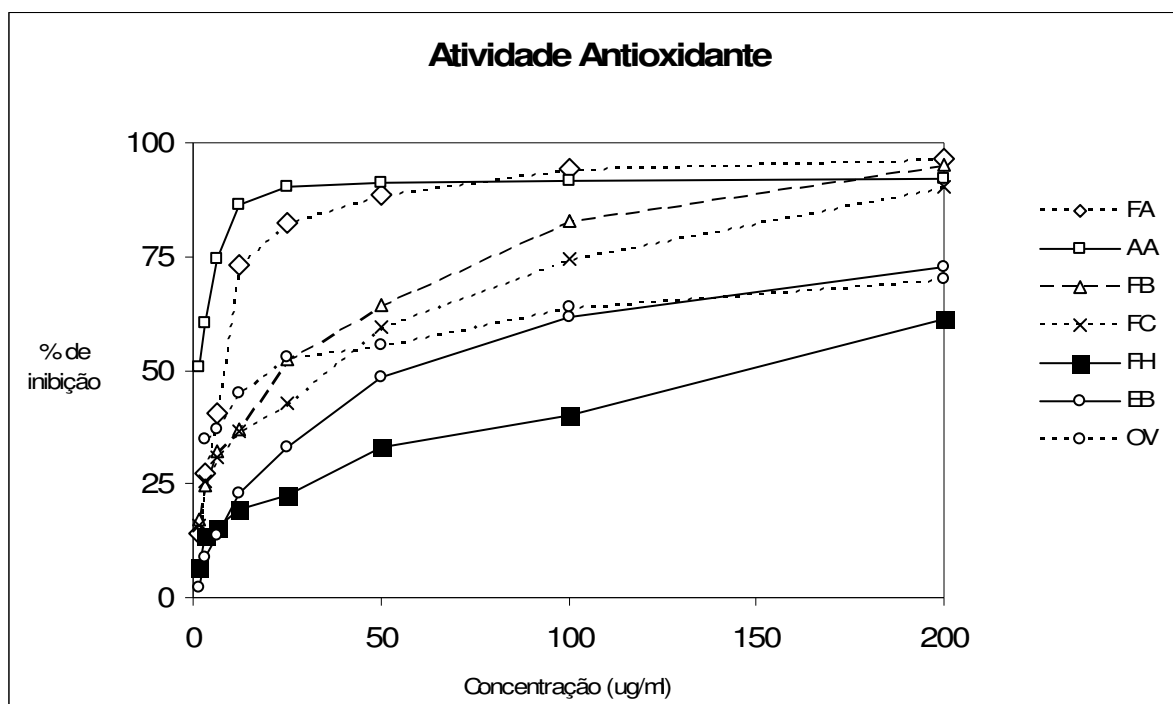


Figura 16 – Gráfico mostrando a porcentagem de inibição dos extratos de *G. spathulata* nas diferentes concentrações do RL DPPH.

As concentrações 200 e 100 $\mu\text{g/ml}$ da fração acetato de etila e 200 $\mu\text{g/ml}$ da fração butanólica foram mais ativas que o ácido ascórbico, porém ao diminuir estas concentrações observou-se que houve uma diminuição diferente para estas frações com relação à diminuição observada para o ácido ascórbico.

Como observado por Tepe et al. (2005) em seu estudo com *Salvia tomentosa* (Lamiaceae) observou que os extratos mais polares demonstraram uma maior capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH que os menos polares, estes resultados assemelham-se aos encontrados para *G. spathulata*.

A partir das curvas das porcentagens de inibição do óleo volátil, do extrato bruto, de suas frações e do padrão ácido ascórbico obteve-se a equação da reta (regressão linear) que melhor representava cada amostra calculando-se a partir desta a CI_{50} (Tabela 11).

Tabela 11 – Equação da reta para cada amostra e para o padrão com respectivo coeficiente de regressão linear e CI_{50} das amostras com seus desvios padrão.

Amostra	Equação da reta	R^2	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm s*	CV%**
AA	$y = 4,98x + 43,78$	0,99	$144,57 \pm 0,02$	2,18
OV	$y = 0,93x + 30,78$	0,95	$20,59 \pm 0,25$	1,21
EB	$y = 0,89x + 6,79$	0,94	$48,29 \pm 1,21$	2,51
FH	$y = 0,25x + 14,18$	0,94	$144,57 \pm 3,18$	2,20
FC	$y = 0,78x + 22,37$	0,91	$35,60 \pm 0,64$	1,80
FA	$y = 5,22x + 8,273$	0,99	$7,99 \pm 0,15$	1,88
FB	$y = 3,12x + 13,36$	0,96	$11,75 \pm 0,17$	1,45

*desvio padrão, **Coeficiente de variação em porcentagem.

A fração mais ativa capaz de inibir 50% a absorvância do radical DPPH (CI_{50}) foi a FA, tendo CI_{50} de $7,99 \mu\text{g/ml}$, seguida da FB com CI_{50} de $11,75 \mu\text{g/ml}$, do OV, $20,59 \mu\text{g/ml}$, da FC, $35,60 \mu\text{g/ml}$, do extrato bruto, $48,29 \mu\text{g/ml}$ e da fração hexânica, $144,57 \mu\text{g/ml}$ (Figura 17).

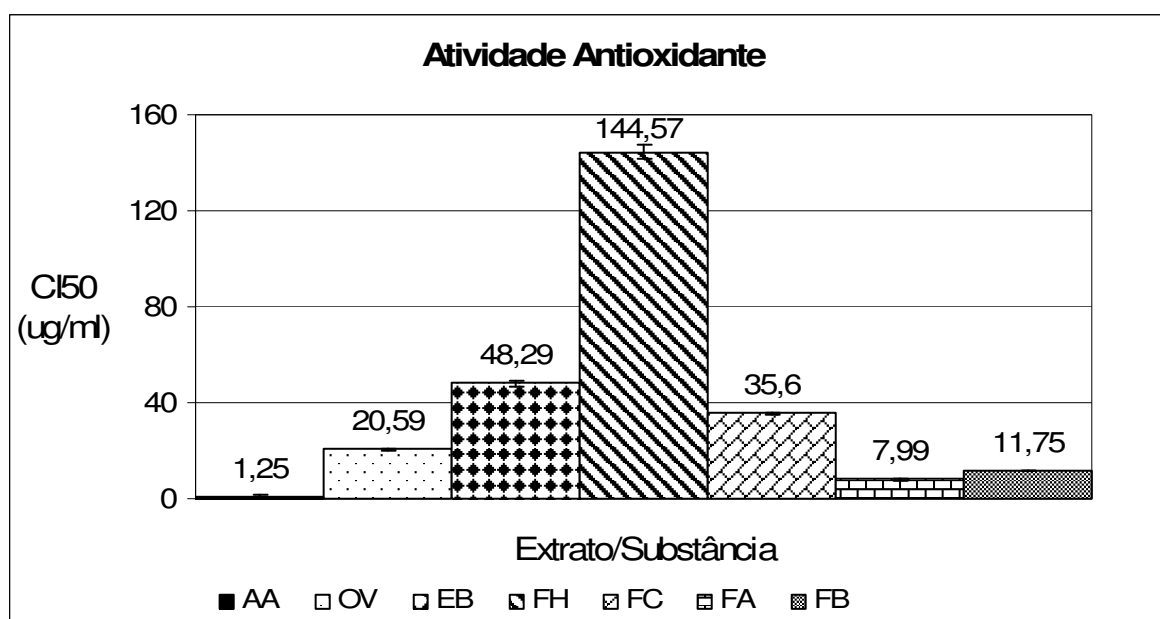


Figura 17 – Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para as amostras testadas e para o ácido ascórbico (AA).

As frações FA e FB foram as que apresentaram melhor atividade antioxidante e este resultado coincide com o encontrado por Tepe et al (2005) para *Salvia tomentosa*, eles obtiveram CI_{50} de 18,7 $\mu\text{g/ml}$ para a fração mais polar em estudo. Estas frações exibiram atividade antioxidante comparável ao padrão ácido ascórbico, embora menos potente, fato que coincide com os resultados apresentados por Favila (2006) em seu estudo com *Conyza bonariensis*.

É provável que a atividade antioxidante observada para as frações FA e FB esteja relacionada à presença de constituintes mais polares como fenóis, flavonóides e taninos que estão presentes em *G. spathulata*.

O óleo volátil, com CI_{50} de 20,59 $\mu\text{g/ml}$ foi o terceiro antioxidante mais potente de *G. spathulata*, em relação ao padrão ácido ascórbico, o óleo foi menos potente, porém este resultado é comparável ao obtido para o óleo de *Teucrium marum*, pertencente à Família Lamiaceae, com CI_{50} de 13,13 $\mu\text{g/ml}$ (RICCI et al., 2005).

Kulisic et al. (2004) em seu estudo com *Origanum vulgare* (orégano) obtiveram CI_{50} de 0,5 g/l para o óleo volátil, 0,5 g/l para o timol e 0,4 g/l para o carvacrol. Quando comparado a estes resultados, o óleo de *G. spathulata* demonstrou uma maior atividade antioxidante que o óleo de orégano.

5 CONCLUSÕES

- A fração hexânica foi a que obteve um maior rendimento através da partição por solventes orgânicos;
- *Glechon spathulata* é composta por flavonóides, esteróis e/ou triterpenos, ácidos voláteis, ácidos fixos, saponinas, heterosídeos antociânicos, flavonóides, taninos condensados e traços de taninos hidrolisáveis;
- O óleo volátil de *G. spathulata* extraído por Clevenger obteve um rendimento de 1,87% e apresentou nove substâncias, como constituinte majoritário (84%), um composto oxigenado não identificado, o restante era composto por sesquiterpenos e um monoterpeno, provavelmente o 1,8-cineol, o qual representou 0,22% do óleo;
- A fração acetato de etila foi a fração com menor CL_{50} frente à *Artemia salina* Leach., sendo assim, a fração mais tóxica para o microcrustáceo;
- Por bioautografia, o óleo volátil foi ativo contra uma cepa ATCC de *Candida albicans* e algumas cepas bacterianas
- O extrato bruto na mesma concentração do óleo não demonstrou atividade antimicrobiana por bioautografia;
- Por microdiluição em caldo, óleo volátil, a fração hexânica e a fração acetato de etila inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas. O óleo volátil foi bastante ativo contra *Micrococcus* sp. e o extrato bruto contra *S. epidermidis* ambos com CIMs de 50 µg/ml;
- Pode-se considerar que *G. spathulata*, em geral, foi mais ativa contra bactérias Gram-positivas que negativas pelas metodologias utilizadas;

- O extrato bruto, suas frações e o óleo volátil de *G. spathulata* apresentaram atividade antioxidante;
- As frações acetato e butanólica na maior concentração apresentaram atividade antioxidante superior ao ácido ascórbico.

6 REFERÊNCIAS

ABRILAR: xarope. Responsável técnico Wessel de O. Cunha. Rio de Janeiro: Farmoquímica, 2007. Bula de medicamento.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry.** New York: Academic Press, 1995, 469p.

ANVISA, Consulta Pública nº 84 de 22 de outubro de 2002. Diário Oficial da União de 23 de outubro de 2002. Disponível em:
<<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B2920-1-0%5D.PDF>>
Acesso em 06/02/2007.

ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I. Biodiversity as a source of new pharmacophores: A new theory of memory. Part 3. **Pure Appl. Chem.** V. 77 (1), p. 75-81, 2005.

AZEVEDO, N. R. et al. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Phytochemistry.** V, 57, p. 733-736, 2001.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology.** V. 102, p. 32-36, 2005.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oil from *Origanum*, *Thymbra* e *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control.** V. 15, p. 169-172, 2004.

BENTACUR-GALVIS, L. A et al. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V. 97 (4), p. 541-546, 2002.

BOCHNER, B. R.; SAVAGEAU, M. A. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology.** V 33 (2), p. 434-444, 1977.

BRANDÃO, Aylton. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** 5ª edição, São Paulo: Editora Nacional, 1979, p. 582-586.

BRASIL, Decreto Nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Seção I, nº119, 23 de junho de 2006, 10 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, Port. 971 de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. 18 p.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 42(2), p. 195-202, 2006.

BROUGHTON, A.; DENHAM, A. Potential interactions of St. Johnswort (*Hypericum perforatum*) with pharmaceutical drugs. **Canadian Journal of Herbalism**. p. 10-37. Reprinted with permission from the European Journal of Herbal Medicine. V. 5 (2), 2000.

BUDZIANOWSKI, J.; BUDZIANOWSKA A. Chromatographic and spectrophotometric analyses of the DPPH free radical scavenging activity of the fractionated extracts from *Lamium album* L., *Lamium purpureum* L. and *Viscum album* L. V. 52 (1/2), p. 51-57, 2006.

CARVALHO, P. M. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 95(2), p. 279-301, 2004.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. V. 163, p. 1161-1168, 2002.

CIBECOL INDUSTRIAL FARMACÊUTICA. Porto alegre, 1969. Disponível em: <<http://www.cibecol.com.br/noticias.php?in=detalhes&id=11>>. Acesso em: 16 janeiro 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI – formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards- NCCLS). **Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard.** Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 , Wayne, Pa. USA, 2003.

COIMBRA, Raul. **Notas de Fitoterapia.** 1ª edição, Rio de Janeiro: Laboratório Silva Araújo, 1942, p. 166.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews.** V. 12, n° 4, p. 584-582, 1999.

COSTA, A.F. **Farmacognosia I.** 5ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, p. 360-772.

COSTA, A. F. **Farmacognosia III.** 2ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982, 1032 p.

DAJAS, F. et al. Neuroprotection by flavonoids. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V. 36 (12), p. 1613-1620, 2003.

DAWIDOWICKS, A. L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **LWT.** V. 39 (3), p. 308-315, 2005.

DESTRO, M. W. B. et al. Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sanguínea. **Rev. Col. Bras. Cir.** V. 33 (2), p. 107-111, 2006.

DI PRIMIO, R.F. **Flora do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Oficinas Gráficas da Imprensa Oficial, 1946, p. 244-247.

DOB, T. et al. Chemical Composition of the essential oil of *Lavandula dentate* L. from Algeria. **The International Journal of Aromatherapy.** V. 15, p. 110-114, 2005.

DUTRA, D. et al. Avaliação do efeito anti-hiperglicemiante das frações semi-purificadas de duas plantas medicinais da flora catarinense: *Marrubium vulgare* e *Wedelia paludosa*. In: **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 23 a 26 de maio de 2000. Disponível em: < <http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/0985/index.html> > acesso em: 20/03/2007.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and relation with geographic distribution. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 31, p. 467-475, 2003.

ELISABETSKY, E., SOUZA G. C. Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias Ativas. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 107-122.

EL-SHAZLY, A. M.; HUSSEIN, K.T. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss. (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 32, p. 665-674, 2004.

ESTRADA-REYES, R. et al. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana*. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 32, p. 685-694, 2004.

FALKENBERG, M. B., SANTOS, R. I., SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 230-245.

FARMÁCIA NATURAL. Disponível em: <<http://www.farmacianatural.com.br>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. **Ensaio Microbiológico de Antibióticos**. São Paulo: Ateneu, 1988, V.5.2.1.

FAVILA, M. A. C. **Estudo químico e biológico de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FLACH, A. **Estudo do Óleo Essencial de *Calea serrata* Less. (Asteraceae)**. 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*. **Food Chemistry**. V. 91, p. 63-68, 2005.

FLAMINI, G. et al. Essential oil of *Stachys aleurites* from Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 33, p. 61–66, 2005.

FONSECA, C. S. **Avaliação *in vivo* e *in vitro* dos efeitos dos flavonóides quercetina, naringenina e ipriflavona na prevenção e tratamento do tumor ascítico de Ehrlich**. 2006. 136 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales: El Diocórides Renovado**. 12^a ed., Barcelona: Editorial Labor, 1990, p. 640.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations**. 1991, cap. 21, p. 300-499.

FUCHS, F. D. Farmacologia Clínica da Infecção: Princípios Gerais. In: Fuchs, F. D.; Wannmacher, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992, p. 172-183.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Quim. Nova**. V. 28 (4), p. 610-613, 2005.

GAO, Z. et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochimica et Biophysica**. V. 1472, p. 643-650, 1999.

GONÇALVES et al. **A cura está na natureza: Medicina Natural**. São Paulo: Editora Brasil 21, [200-] 544 p.

GONÇALVES, C. B. C. Vimblastina. In: WANNMACHER, L. **Fármacos utilizados em neoplasia: evidências farmacológico-clínicas**. Disponível em: <http://www.usoracional.com.br/index_arquivos/Neoplasia.html>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2007.

GONZAGA, W. A. **Zanthoxylim rhoifolium Lam. (Rutaceae):** Determinação estrutural de alcalóides benzofanantridínicos, estudo dos óleos essenciais das folhas, flores e frutos e atividade antimicrobiana. 2003. 160 p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

GOTTLIEB, O. R. Evolução e Função dos Óleos Essenciais. In: I Simpósio de Óleos Essenciais, 1985, São Paulo. Campinas: Fundação Cargill, 1986, p. 175-191.

HAMBURGER, M. O. & CORDELL G. A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of natural products**. V. 50 (1), p. 19-22, 1987.

HIRONO, I.; MORI, H.; HAGA, M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. **J. Natl. Cancer Inst.** 1978. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=278864>. Acesso em 13 de fevereiro de 2007.

KHALIL, A. T. A Diterpene from *Nepeta septemcrenata*. **Phytochemistry**. V. 44 (3), p. 475-478, 1997.

KRAUSE, A. C. et al. Estudo químico e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo), Lamiaceae. XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL), Pelotas, RS – 5 a 7 de Novembro de 2003. Química Orgânica e Produtos Naturais. **Livro de Resumos**. Resumo QO 25.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**. V. 85, p. 633-640, 2004.

KUSKOSKI, E. M. et al. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V. 24 (4), p. 691-693, 2004.

LEMÉE, Albert. **Dictionnaire descriptif et synonymique des genres de plantes phanérogames**, tomo III, Paris: Brest, 1931, p. 264.

LIMA, N. M. F. et al. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**. V. 83, p. 43-47, 2002.

LÓPEZ, E. A. S. et al. Aspectos nutricios de la enfermedad de Alzheimer. **Revista de Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría**. V. 35 (3), p. 150-155, 2002.

LUNA, J. S. et al. A study of larvicidal and moluscicidal activities of some medicinal plants of northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 97 (2), p. 199-206, 2005.

MATHABE, M.C. et al. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 105, p. 286-293, 2006.

MAUL, A. A., OLIVEIRA, M. N. Extração supercrítica da mangerona (*Glechon spathulata* BENTHAM, LABIATAE). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 35, supl. 1, p. 93, 1999.

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C-J., SMITH, D. L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in Natural Product Chemistry**. V.9. Pergamon Press, London, p. 383-389, 1991.

MELKANI, A. B. et al. Constituents of the essential oil of a new chemotype of *Elsholtzia strobilifera* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 33, p. 419-425, 2005.

MELNYK, P. S.; SHEVCHUK, Y. M.; SUE, M. Should warfarin and *Ginkgo biloba* be taken together? Response from community pharmacists and health food store personnel to an interaction query. **CPJ/RPC (Canadian Pharmaceutical Journal/La Revue Pharmaceutique Canadienne)**. P. 30-35, 2002/2003.

MELO, L. F. A. et al. Avaliação da toxicidade de extratos brutos hexânico e etanólico de três espécies de cnidários sobre *Artemia salina* Leach. In: **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, SP, 19 a 22 de maio de 2006. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T1422-2.pdf> > acesso em: 21/03/2007.

MEYER, B.N., et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**. V.45, p.31-34, 1982.

MONTEIRO et al. Taninos: uma abordagem da química à biologia. **Quím. Nova**. V. 28 (5), p. 892-896, 2005.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hasssleri* A. Zaheb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**. V. 47, nº 1, p. 13-39, 1979.

MOREIRA, F. P. M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quim. Nova**. V. 26 (3), p. 309-311, 2003.

MORTEZA-SEMNANI, K.; SAEEDI, M.; SHAHANI, S. Antioxidant activity of the methanolic extracts of some species of *Phlomis* and *Stachys* on sunflower oil. **African Journal of Biotechnology**. V. 5 (24), p. 2428-2432, 2006.

MÜLLER, C. D. B. Vincristina. In: WANNMACHER, L. **Fármacos utilizados em neoplasia: evidências farmacológico-clínicas**. Disponível em: <http://www.usoracional.com.br/index_arquivos/Neoplasia.html>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2007.

NGASSOUM, M. B. et al. Aroma compounds of essential oils of two varieties of the spice plant *Ocimum canum* Sims from northern Cameroon. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 17, p. 197-204, 2004.

NICKAVAR, B.; MOJAB, F.; ASGARPAHAH, J. Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca* Benth. **The International Journal of Aromatherapy**. V. 15, 51-53, 2005.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clinical Nutrition**. V. 74, p. 418-425, 2001.

NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quím. Nova**, V. 26 (3), p. 331-334, 2003.

NÚÑEZ-SELLÈS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **J. Braz. Chem. Soc.** V. 16 (4), p. 699-710, 2005.

OLIVEIRA, A. C., **Vincristina**. Farmacologia Médica, Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: <<http://www.unb.br/fm/disciplinas/123676/vin.pdf>> .Acesso em 21 de janeiro de 07.

PADILHA DE PAULA, J.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 88, p. 253-260, 2003.

PALÁ-PAÚL, J. et al. Análisis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemism species, growing in Australia. **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 32, p. 55-62, 2004.

PIO CORREA. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** V. V, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, p. 94 e 97.

RADIC, N.; MIMICA-DUKIC, N. Odredivanje komponenti etarskih ulja porodice Lamiaceae skevindžer efektom/Identification of the active radical scavenging compounds in the essential oils of the Lamiaceae family. **Studentski radovi.** V. 1 (2), p. 14-19, 2006.

RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of fungal compounds from higher plants. **Phytochemical analysis.** V. 2, p. 199-203, 1991.

RICCI, D. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology.** V. 98, p. 195–200, 2005.

RIGANO, D. et al. Antibacterial and allelopathic activity of methanolic extract from *Iris pseudopumila* rhizomes. **Fitoterapia.** V. 77, p. 460–462, 2006.

SANCHES, A. C. C. et al. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** V. 41 (1), p. 101-107, 2005

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. rev. e ampliada. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 403-434.

SANTOS, P. A. G. et al. Chemical polymorphism of populations of *thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. **Plant Science.** V. 169, p. 1112-1117, 2005.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG. (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE).** 2005. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SENATORE, S., ARNOLD, N. A., PIOZZI, F. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. **Journal of Chromatography A**. V. 1052, p. 237-240, 2004.

SHARIFIFAR, F, et al. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**. Manuscrito aceito em 08/04/2006.

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

SILVA, R. M. **Xanthium cavanillesii Schow**: farmacobotânica e constituintes químicos voláteis. 2003. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos Constituintes Químicos de Óleos Voláteis de Plantas Medicinais do Rio Grande do Sul**: Isolamento, Determinação e Modificação Estrutural e Atividade Biológica. 2004. 160 p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5^a ed.rev. e ampliada. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 289-326.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**.V.90, p. 333-340, 2005.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engineering**. V. 69, p. 335-342, 2005.

VAGI, E. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. **Food Research International**. V. 38, p. 51-57, 2005.

VANHAECKE, P. et al. A Short-Term Toxicity Test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 5, p. 382-387, 1981.

VENTURI, C. R. et al. Estudo da atividade antiherpética do extrato de *Glechon spathulata* Benth. In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos (CD)**, resumo 268 p, 2004, p. 577.

VIEIRA, H. S. et al. Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. **J. Braz. Chem. Soc.** V. 13 (2), p. 151-157, 2002.

VOX SCIENTIAE: Produto do Núcleo José Reis de Divulgação Científica da ECA/USP. São Paulo. Maio/Junho de 2003, Ano 3, Nº14. Disponível em: <http://www.eca.usp.br/nucleos/njr/voxscientiae/cassia14.html>. Acesso em: 5 de setembro 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlim: Springer-Verlag, 1984, 320 p.

XIFREDA, C. C., MALLO, A. C. Las especies argentinas de *Glechon* (Lamiaceae, Mentheae). **Darwiniana**, V. 42 (1 - 4), p. 333 - 346, 2004.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos**: temas selecionados. V. 1 (4), p. 1-6, 2004.

WANNMACHER, L. **Fármacos utilizados em neoplasia**: evidências farmacológico-clínicas. I Congresso Brasileiro sobre uso racional de medicamentos, 2005. Disponível em: http://www.usoracional.com.br/index_arquivos/Neoplasia.html. Acesso em: 12 de fevereiro de 2007.

WASICKY, R.; AKISUE, G. Um aparelho aperfeiçoado para a extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. São Paulo, V. 7 (2), p. 339-405, 1969.

WILLAIN FILHO, A. **Potencial analgésico de flavonóides**: mecanismo de ação da quercetina. 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

YU, J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. **Phytochemistry**. V. 65, p. 881-884, 2004.

ZAMPINI, I.C., VATTUONE, M. A., ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia*

punctata Cav. ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 102, p. 450-456, 2005.

ZANON, R.B. **Metabólitos secundários em *Vernonia tweedieana* Baker**. 2006. 180 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.