

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

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA  
DE *Solanum guaraniticum* A. ST.-HIL.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Marina Zadra**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Solanum  
guaraniticum* A. ST.-HIL.**

**Marina Zadra**

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 a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Linde Athayde**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Zadra, Marina  
Análise fitoquímica, avaliação da atividade  
antioxidante e antimicrobiana de Solanum guaraniticum A.  
St.-Hil. / Marina Zadra.-2013.  
78 f.; 30cm

Orientadora: Margareth Linde Athayde  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Solanum guaraniticum 2. Jurubeba 3. Polifenóis 4.  
Antioxidantes 5. Atividade antimicrobiana I. Linde  
Athayde, Margareth II. Título.

**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

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Solanum guaraniticum* A.  
ST.-HIL.**

elaborada por  
**Marina Zadra**

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

**Comissão Examinadora:**

**Margareth Linde Athayde, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientador)

**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)**

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 14 de junho de 2013

*Dedico este trabalho a meus pais, Agelio e Maria Luiza,  
meus exemplos de coragem e determinação,  
pela educação, incentivo, amor  
por estarem sempre ao meu lado  
e serem tão importantes em minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força para seguir adiante sempre.

A Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a realização de um curso de mestrado com qualidade, contribuindo para a minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela estrutura e subsídios oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A minha família, em especial aos meus pais Agelio e Maria Luiza, e ao meu querido irmão Marcelo, por estarem sempre comigo mesmo distantes fisicamente, por todo o incentivo, conforto nos momentos difíceis, por serem fundamentais na minha vida e pelo amor incondicional.

A minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Margareth Linde Athayde, pela oportunidade oferecida desde a iniciação científica, por tornar possível a realização de um sonho, pela confiança e amizade.

Aos meus colegas e queridos amigos do Laboratório de Fitoquímica (LabFito), pela incansável ajuda de todas as horas, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo, tornando o dia a dia muito mais agradável.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Thaís Scotti do Canto-Dorow, pela identificação do material vegetal em estudo.

Ao Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares e Sílvio Terra Stefanello, do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica desta instituição, e ao Prof. Dr. Michel Mansur Machado, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIPAMPA, por contribuírem para o engrandecimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e a amiga Luana Rossato, do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), pela colaboração na realização da atividade antimicrobiana dos extratos.

Também, à Prof. Dr<sup>a</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos e a Tanise Dalmolin, pelo auxílio na avaliação da atividade antimicobacteriana da planta.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aos amigos próximos e também aos que, mesmo distantes, sempre estiveram prontos para oferecer apoio e palavras de incentivo.

*Se não houver frutos, valeu a beleza das flores  
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas  
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.*

Henfil

## RESUMO

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

### ANÁLISE FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Solanum guaraniticum* A. ST.-HIL.

AUTORA: MARINA ZADRA  
ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 14 de junho de 2013.

A família Solanaceae é uma das maiores e mais complexas, destacando-se o gênero *Solanum*, com cerca de 1500 espécies. *Solanum guaraniticum* é um arbusto encontrado no Paraguai, Argentina e Brasil, conhecido popularmente como jurubeba ou falsa jurubeba. Este estudo teve como objetivo quantificar as principais classes de metabólitos secundários e determinar as atividades antioxidantes e antimicrobianas das folhas de *S. guaraniticum*. O material vegetal foi coletado no município de Guaporé, RS, Brasil, e está registrado no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria sob o número SMDB 13158. As folhas da planta foram secas, trituradas, e maceradas com etanol (70%) por sete dias. Após este período, o material foi filtrado e o extrato concentrado em evaporador rotatório a fim de obter o extrato aquoso. Parte deste foi levado à secura total originando o extrato bruto (EB), outra parte foi fracionado sucessivamente com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), originando as respectivas frações. Na análise fitoquímica e antioxidante, a fração AcOEt apresentou a maior quantidade de polifenóis (546.57 ± 2,35 mg de equivalentes de ácido gálico/g) e a melhor capacidade antioxidante através do método do DPPH (IC<sub>50</sub> = 9.11 ± 0,75 µg/mL). Já a fração CHCl<sub>3</sub> apresentou os maiores teores de taninos (56,03 ± 0,68 mg de equivalentes de catequina/g), flavonoides (75,73 ± 0,34 mg de equivalentes de rutina/g) e alcaloides (10,79 ± 0,06 mg/g), sendo a fração mais eficaz na remoção de espécies reativas, por inibição da oxidação da diclorofluoresceína (DCFH-DA), apresentando também a melhor atividade de inibição da peroxidação lipídica, avaliada através do método do TBARS, bem como de inibição da oxidação de proteínas, pelo método da proteína carbonil. A análise do EB e frações por CLAE revelou a presença dos ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico, ácidos fenólicos bastante ativos e que podem estar envolvidos nas atividades descritas. No que diz respeito à atividade antimicrobiana, avaliada através de microdiluição em caldo, boas atividades foram verificadas frente a bactérias Gram-positivas, principalmente para o EB (CIM de 32 µg/mL para *M. luteus*) e para a fração AcOEt (CIM de 64 µg/mL para *S. intermedius* e *L. monocytogenes*). Os extratos foram praticamente inativos contra bactérias Gram-negativas e inativos contra fungos. Verificou-se também atividade antimicobacteriana promissora, principalmente para a fração CHCl<sub>3</sub> contra *M. smegmatis* (CIM = 156 µg/mL). Os resultados ajudam a elucidar algumas características fitoquímicas da espécie e mostram que *S. guaraniticum* possui potenciais antioxidante e antimicrobiano consideráveis.

**Palavras-chave:** *Solanum guaraniticum*, jurubeba, compostos fenólicos, CLAE, antimicrobianos naturais.



## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Solanum guaraniticum* A. ST.-HIL.**

AUTHOR: MARINA ZADRA

ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Place and Date of the Defense: Santa Maria, June 14, 2013.

The Solanaceae family is one of the largest and most complex, especially the *Solanum* genus, with about 1500 species. *Solanum guaraniticum* is a shrub found in Paraguay, Argentina and Brazil, popularly known as jurubeba or false jurubeba. This study aimed to quantify the main classes of secondary metabolites and determine the antimicrobial and antioxidant activities of the leaves of *S. guaraniticum*. The plant material was collected in the city of Guaporé, RS, Brazil, and is registered in the herbarium of the Biology Department at the Federal University of Santa Maria under number SMDB13158. The leaves of the plant were dried, triturated and macerated with ethanol (70%) for seven days. After this period, the material was filtered and the extract concentrated in rotary evaporator to obtain the aqueous extract. Part of this was taken to complete dryness yielding the crude extract (CE), another part was successively fractionated with chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (AcOEt) and butanol (BuOH), yielding the respective fractions. In the antioxidant and phytochemical analysis, the AcOEt fraction showed the highest amount of polyphenols (546.57 ± 2.35 mg of gallic acid equivalents/g) and the best antioxidant capacity by DPPH method (IC<sub>50</sub> = 9.11 ± 0.75 µg/ mL). The CHCl<sub>3</sub> fraction showed the highest contents of tannins (56.03 ± 0.68 mg of catechin equivalents/g), flavonoids (75.73 ± 0.34 mg rutin equivalents/g) and alkaloids (10.79 ± 0.06 mg/g), being more effective in scavenging reactive species, by inhibition of dichlorofluorescein oxidation (DCFH-DA), also showing the best activity of inhibition of lipid peroxidation by the TBARS method, as well as inhibition of protein oxidation, by the protein carbonyl method. HPLC analysis of CE and fractions revealed the presence of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids, very active phenolic acids that may be involved in the activities described. Regarding antimicrobial activity, assessed by broth microdilution, good activities were observed against Gram-positive bacteria, especially for CE (MIC of 32 µg/mL for *M. luteus*) and the AcOEt fraction (MIC of 64 µg/mL for *S. intermedius* and *L. monocytogenes*). The extracts were practically inactive against Gram-negative bacteria and inactive against fungi. It was also verified promising antimycobacterial activity, mainly to the CHCl<sub>3</sub> fraction against *M. smegmatis* (MIC = 156 µg/mL). The results contributed to reveal some phytochemical characteristics of this species, and show that *S. guaraniticum* possesses considerable antimicrobial and antioxidant potential.

**Keywords:** *Solanum guaraniticum*, jurubeba, phenolic compounds, HPLC, natural antimicrobials.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1	– Estrutura química da solasodina.....	18
Figure 2	– <i>Solanum guaraniticum</i> – Aspecto geral.....	20
Figure 3	– Estruturas químicas dos ácidos fenólicos identificados e quantificados por CLAE-DAD nas folhas de <i>S. guaraniticum</i> . (1) ácido clorogênico, (2) ácido cafeico e (3) ácido rosmarínico.....	60

### ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1	– Antioxidant capacity of CE and fractions from leaves of <i>S. guaraniticum</i> by DPPH assay (n = 3).....	31
Figure 2	– Effect of <i>S. guaraniticum</i> CE and fractions on scavenging of ROS in supernatant of rat brain homogenate, by DCFH-DA method.....	32
Figure 3	– Effect of <i>S. guaraniticum</i> CE and fractions on TBARS production in supernatant of rat brain homogenate.....	33
Figure 4	– Effect of <i>S. guaraniticum</i> CE and fractions on protein carbonyl content in serum samples.....	34
Figure 5	– HPLC/DAD phenolics profile of CE (A), CHCl <sub>3</sub> (B), AcOEt (C) and n-BuOH (D) fractions of <i>S. guaraniticum</i> leaves. (1) chlorogenic acid, (2) caffeic acid,(3) rosmarinic acid, (*) unknown peaks.....	34
Figure 6	– Method of fractionation of <i>S. guaraniticum</i> extract.....	36

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1	– Total polyphenols (TP), total flavonoids (TF), condensed tannins (CT) and total alkaloids (TA) in the CE and fractions from leaves of <i>S. guaraniticum</i> .....	30
Table 2	– IC <sub>50</sub> values for DPPH (1), TBARS (2) and Carbonyl (3) assays.....	31
Table 3	– Quantification of polyphenols in CE and fractions of <i>S. guaraniticum</i> by HPLC/DAD.....	35

### MANUSCRITO 1

Table 1	– Minimum inhibitory concentrations (MIC) for CE and fractions of <i>S. guaraniticum</i> against bacteria and fungi.....	49
Table 2	– Minimum inhibitory concentrations (MIC) for CE and fractions of <i>S. guaraniticum</i> against mycobacteria.....	50

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC – Ácido cafeico

ACG – Ácido clorogênico

AR – Ácido rosmarínico

AcOEt – Acetato de etila

BuOH - Butanol

CHCl<sub>3</sub> – Clorofórmio

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DCFH-DA – Diclorofluoresceína diacetato

DCFH – Diclorofluoresceína

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EB – Extrato bruto

EO – Estresse oxidativo

ERs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERs – Espécies reativas

MDA – Malondialdeído

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Geral</b> .....	14
<b>2.2 Específicos</b> .....	14
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
<b>3.1 Plantas medicinais</b> .....	15
<b>3.2 Metabólitos secundários</b> .....	16
<b>3.3 Descrição da planta</b> .....	17
3.3.1 Família Solanaceae .....	17
3.3.2 Gênero <i>Solanum</i> .....	17
3.3.3 <i>Solanum guaraniticum</i> A. St.-Hil .....	19
<b>3.4 Atividade antioxidante</b> .....	21
3.4.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....	21
3.4.2 Compostos fenólicos .....	23
<b>3.5 Atividade antimicrobiana</b> .....	24
<b>4 RESULTADOS</b> .....	27
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1 – Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the leaves of <i>Solanum guaraniticum</i> A. St.-Hil.</b> .....	27
Introduction .....	29
Results and Discussion .....	30
Experimental .....	35
Conclusions .....	39
References .....	40
<b>MANUSCRITO 1 – <i>In vitro</i> evaluation of the antimicrobial and antimycobacterial activities of <i>Solanum guaraniticum</i> A. St.-Hil.</b> .....	43
Introduction .....	45
Materials and methods .....	46
Results and Discussion .....	48
Conclusions .....	49
References .....	50
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	55
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. Até hoje, alguns povos ainda fazem uso consciente de medicamentos fitoterápicos tradicionais relacionados com saberes e práticas que foram adquiridas ao longo dos séculos (FERREIRA e PINTO, 2010).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, e entre os elementos que a compõem estão as plantas medicinais, que são matérias-primas para a produção de fitoterápicos e outros medicamentos (BRASIL, 2009). As plantas medicinais brasileiras são consideradas altamente promissoras, porém são pouco conhecidas, sob qualquer ponto de vista (SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para a assistência primária à saúde. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas, e estima-se que cerca de 25-30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005).

De acordo com a legislação sanitária brasileira, fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004).

Os fitoterápicos representam uma parcela significativa no mercado de medicamentos (em torno de 7%), movimentando globalmente cerca de 27 bilhões de dólares por ano. Enquanto o mercado farmacêutico cresce de 3 a 4% ao ano no mundo, o fitoterápico cresce de 6 a 7% (BANDEIRA et al., 2011). Vários fatores estão relacionados ao crescimento da procura de produtos naturais como recurso terapêutico, entre eles estão a decepção com os resultados obtidos em tratamentos convencionais, efeitos colaterais e impossibilidade de cura, efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo ou incorreto de medicamentos sintéticos e o difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica (RATES, 2001; SILVEIRA et al., 2008). Além disso, o conceito de “natural” para algumas pessoas é sinônimo de saudável, seguro e benéfico, o que é extremamente equivocado, pois desde a antiguidade a toxicidade de plantas já é descrita (MENGUE, MENTZ e SCHENKEL, 2001).

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos utilizados atualmente não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (SILVEIRA et al., 2008). As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Além disso, é bastante comum a troca de espécies botânicas que apresentam a mesma sinonímia popular, podendo gerar uma série de problemas relacionados à segurança e qualidade dos produtos comercializados para fins medicinais (COUTINHO, 2009).

Nesse contexto, encontram-se diferentes espécies da família Solanaceae e gênero *Solanum* conhecidas popularmente como jurubebas, que são utilizadas indistintamente como se fossem a mesma planta. *Solanum paniculatum* L., espécie reconhecida pela Farmacopéia Brasileira como a “verdadeira jurubeba” e utilizada no tratamento de diversas doenças, mas principalmente como estimulante das funções digestivas e hepáticas, é frequentemente confundida com outra espécie, *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil., e utilizada na medicina popular para os mesmos fins devido às semelhanças existentes entre as duas (SOARES et al., 2008; COUTINHO, 2009; NURIT et al., 2007). Porém, poucas informações sobre esta “falsa jurubeba” estão disponíveis para que seu uso seja justificado.

As plantas contêm uma grande variedade de metabólitos secundários, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenoides, entre outros, que são responsáveis por suas atividades antioxidantes e antimicrobianas (PICCIRILLO et al., 2013; OH et al., 2013). Assim, diante da ausência de dados na literatura acerca destas atividades para *S. guaraniticum* e do desconhecimento da composição fitoquímica do extrato, motivou-se a realização deste trabalho, contribuindo para a compreensão do uso popular da planta e na busca de novas fontes naturais de compostos ativos de interesse.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Quantificar os principais metabólitos secundários, determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas de *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil.

### 2.2 Específicos

- Quantificar polifenóis, flavonoides, taninos e alcaloides no extrato bruto e frações;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações, pelo método do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl);
- Avaliar o efeito do extrato bruto e frações contra a peroxidação lipídica, através do método do TBARS;
- Avaliar o efeito do extrato bruto e frações contra a oxidação proteica, através do ensaio da proteína carbonil;
- Avaliar a capacidade do extrato bruto e frações de remover espécies reativas (ERs) produzidas pelas células através do metabolismo normal, utilizando o ensaio da oxidação da diclorofluoresceína (DCFH-DA);
- Identificar e quantificar compostos fenólicos no extrato bruto e frações, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações frente a bactérias, fungos e micobactérias, através de microdiluição em caldo, e determinar a concentração inibitória mínima (CIM).



## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente por praticamente todos os povos, desde os tempos mais remotos, na busca da solução de algum mal-estar ou cura de doenças, despertando assim interesses comerciais e científicos (MENGUE, MENTZ e SCHENKEL, 2001). No Brasil, o uso de plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena, sendo um país rico em diversidade, cujo território possui cinco principais biomas como a floresta Amazônica, cerrado, mata Atlântica, pantanal e caatinga. Porém este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pouco explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (SOUSA et al., 2008).

Na área farmacêutica, as plantas foram e continuam sendo de grande relevância, uma vez que suas substâncias ativas são utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matéria-prima (SIMÕES e SCHENKEL, 2002). O isolamento de substâncias ativas de plantas medicinais iniciou com a descoberta da morfina a partir do ópio, no início do século XIX. Posteriormente, outras substâncias foram detectadas em plantas, e se mostraram benéficas através de ensaios clínicos e análises laboratoriais, como por exemplo, a digoxina, extraída da dedaleira (*Digitalis lanata*) e utilizada no tratamento de problemas cardíacos, o ácido salicílico, extraído da casca do salgueiro (*Salix alba*), a quinina, anti-malárico extraído das cascas de *Cinchona officinalis*, vincristina e vimblastina, alcalóides com atividade antitumoral obtidos de *Catharanthus roseus*, a aloína, utilizada como laxante e também na dermatologia em medicamentos tópicos, obtida de plantas do gênero *Aloe*, entre outros (BALUNAS e KINGHORN, 2005, HALBERSTEIN, 2005; MCCURDY e SCULLY, 2005).

Ao longo dos anos, com os avanços que ocorreram nos processos de isolamento, purificação e elucidação estrutural de substâncias de origem natural, surgiu a necessidade de estabelecer estratégias apropriadas para a análise da qualidade e o processo de padronização de preparações à base de plantas, a fim de manter tanto quanto possível a homogeneidade do extrato. Entre outros, a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa (EM), espectrometria no infravermelho (IV), espectrometria UV/visível, etc, utilizados isoladamente ou em

combinação, podem ser utilizados com sucesso para a padronização e controle da qualidade de matérias-primas e medicamentos à base de plantas (CALIXTO, 2000).

### **3.2 Metabólitos secundários**

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. No primeiro grupo, estão incluídos os lipídeos, prótidos e glicídios, com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário originam, à custa de energia, os metabólitos secundários ou micromoléculas, que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e pronunciadas atividades biológicas (SIMÕES et al., 2010). Estes metabólitos secundários são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas, desempenhando um papel essencial para a sua sobrevivência, bem como na manutenção do equilíbrio ambiental. Também atuam na interação planta/planta e planta/inseto, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores e interação com micro-organismos simbiotes (VALLI et al., 2012).

Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenoides são a classe estruturalmente mais variada, e incluem os monoterpenos (óleos essenciais), sesquiterpenos, triterpenos (uma importante classe de saponinas), entre outros. Os compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos (como o resveratrol), lignanas e taninos, amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos. Já os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel, conhecidos por possuírem acentuado efeito no sistema nervoso (VIZZOTO; KROLOW e WEBER, 2010; SIMÕES et al., 2010).

A produção destes metabólitos é de grande interesse farmacológico, e pode ser influenciada por diversos fatores, como a época de coleta, uma vez que há variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, estímulos mecânicos, ataques de patógenos, entre outros. Desta forma, além da realização de estudos de adulterações e contaminações, se faz necessário um rigoroso controle de qualidade no preparo de fitoterápicos em escala industrial (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

### 3.3 Descrição da planta

#### 3.3.1 Família Solanaceae

A família Solanaceae é uma das maiores e mais complexas dentre as Angiospermas, compreende 92 gêneros e cerca de 2.300 espécies, tendo a América do Sul como um dos principais centros de diversidade e endemismo (SILVA e AGRA, 2005). Está representada, no Rio Grande do Sul, por 28 gêneros. Destes, 23 apresentam espécies nativas, enquanto cinco são representados exclusivamente por espécies introduzidas (SOARES, VIGNOLI-SILVA e MENTZ, 2011).

Muitas espécies desta família possuem uma grande importância econômica, agrícola e farmacêutica, sendo que várias delas se destacam por seu caráter alimentício, como *Solanum tuberosum* L. (batata-inglesa), *Solanum melongena* L. (berinjela), *Solanum muricatum* Ait. (pepino), *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) e *Capsicum annuum* L. (pimentão) (MIZ, 2006; COUTINHO, 2009). Além disso, é fonte de substâncias de interesse farmacológico, como atropina (*Atropa belladonna* L.), hiosciamina, (*Hyoscyamus niger* L.) e nicotina (*Nicotiana tabacum* L.) (SILVA e AGRA, 2005; GARCIA, 2007). Dentre as cultivadas como flores, destacam-se espécies de *Solanum*, *Cestrum*, *Petunia* e *Brunfelsia* (JOLY, 2002).

De um modo geral, formam compostos que apresentam ação tóxica para o homem, animais e alguns micro-organismos, com destaque para os alcaloides como a solanina, a nicotina e seus derivados, anabastina, solanocapsina, além de glicosídeos esteroidais e nitratos. Alguns compostos tóxicos possuem aplicações medicinais, e várias espécies são cultivadas para a extração destes metabólitos, cujas proporções e teores variam entre gêneros e espécies em função de diversos fatores, como fase de desenvolvimento, temperatura, umidade, entre outros (KISSMANN e GROTH, 2000).

#### 3.3.2 Gênero *Solanum*

O gênero *Solanum* é o maior e mais complexo da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies (MELO et al., 2011; VORONTSOVA e KNAPP, 2012). Na flora brasileira encontram-se mais de 100 espécies distribuídas por todo o território e que, apesar da diversidade existente, se apresentam como um grupo bem caracterizado (AGRA, SILVA e BERGER, 2009), consistindo de ervas, arbustos, arvoretas ou lianas, geralmente com pêlos de

diversos tipos, e flores alvas, violáceas, azuis, púrpuras ou amarelas. O nome *Solanum*, segundo alguns autores, é originado do latim *Solamen*, que significa consolo, alívio, referindo-se às propriedades sedativas atribuídas a algumas espécies (SACCO et al., 1985).

As plantas deste gênero destacam-se pela capacidade de biossintetizar esteroides e alcaloides, livres ou na forma de heterosídeos, metabólitos secundários estruturalmente diversificados e complexos. Estes compostos, em geral, são de interesse terapêutico, visto que apresentam diversas atividades, como citotóxica, anti-inflamatória e antiulcerogênica (PINTO et al., 2011). O alcaloide esteroidal solasodina (Figura 1), característico do gênero, é um importante precursor na síntese de anticoncepcionais e anti-inflamatórios, sendo que países como a antiga URSS e Hungria, durante anos, utilizaram a solasodina extraída de *Solanum laciniatum* como única fonte de progesterona e cortisona (MOLA, ARAUJO e MAGALHÃES, 1997; SILVA et al., 2007). Além disso, compostos fenólicos, principalmente flavonas e flavonóis incluindo seus heterosídeos, são também identificados com frequência (SILVA et al., 2003).

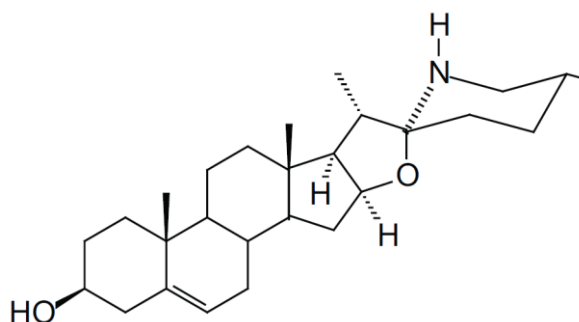


Figura 1. Estrutura química da solasodina (GONÇALVES et al., 2006)

Diversas espécies de *Solanum* são conhecidas pelo nome popular jurubeba e utilizadas como medicinais, entre elas pode-se citar *S. paniculatum* L., *S. lycocarpum* St.-Hil., *S. sisymbriifolium* Lam., *S. variabile* Mart., e *S. guaraniticum* A. St.-Hil. Entretanto, a Farmacopéia Brasileira 1ª e 2ª edições considera a espécie *Solanum paniculatum* como a verdadeira jurubeba, indicando o uso do caule e da raiz como tônico, antianêmico e hepatoprotetor (BRANDÃO et al., 2009; VALADARES, 2009; COUTINHO, 2009).

Alguns estudos fitoquímicos de *Solanum paniculatum* evidenciam a presença de diversos compostos esteroidais. Das raízes, foram isoladas a saponina nitrogenada paniculidina, a saponina jurubina e os alcalóides solamargina, solanina e solanidina. Nas folhas, foi verificada a presença de dois glicosídeos espirostânicos, denominados paniculoninas A e B, neoclorogenina e paniculogenina (SCHREIBER e RIPPERGER, 1966; RIPPERGER, SCHREIBER e BUDZIKIEWICZ, 1967; RIPPERGER e SCHREIBER, 1968).

Com relação à atividade farmacológica desta espécie, Mesia-Vela e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antiulcerogênica de diferentes partes da planta, e verificaram que os extratos aquosos de raízes e caules foram eficazes na redução da secreção ácida gástrica em camundongos, validando o uso popular de *Solanum paniculatum* no tratamento de distúrbios gástricos. Outras atividades descritas incluem a antioxidante (RIBEIRO et al., 2007), antibacteriana (LÔBO et al., 2010), mutagênica e citotóxica (VIEIRA, SANTOS e CHEN-CHEN, 2010).

### 3.3.3 *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil

*Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. é uma planta conhecida popularmente como jurubeba ou falsa jurubeba. É encontrada no Paraguai, Argentina e no Brasil, nos estados de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, onde é comum, especialmente na depressão central (SIMÕES et al., 1988). Como sinonímia botânica, encontra-se *Solanum fastigiatum* var. *acicularium* Dunal (MIZ, 2006; CHIARINI, BARBOZA e MARTICORENA, 2007; SOARES et al., 2008). É encontrada em beiras de estradas e matas, campos limpos e em capoeiras, sendo frequente em formações de cerrados. Também é citada como invasora de pastagens (SACCO et al., 1985; LOVATTO et al., 2010).

Esta espécie apresenta-se como arbusto ereto, de até 2 metros de altura, coberto por pêlos aculeiformes, em vários graus de densidade. As flores possuem corola branca e anteras amarelas. Floresce, principalmente, na primavera e verão, mas pode ser encontrada florida em outras épocas do ano. Os frutos são carnosos, globosos, amarelados a alaranjados quando maduros, e eretos na maturação, servindo de alimento para morcegos que podem ser dispersores das sementes (Figura 2) (SACCO et al., 1985; KISSMANN e GROTH, 2000; SOARES et al., 2008; MIZ, 2006).

Na medicina popular, suas folhas, raízes e frutos são utilizados na forma de chá, no tratamento de anemias, febre, erisipela, doenças hepáticas como hepatite e icterícia, úlceras, tumores do útero e abdome, e também como estimulante digestivo, carminativo, colagogo, antiinflamatório e diurético (CARIBÉ e CAMPOS, 1991; SABIR e ROCHA, 2008). Contudo, há poucos dados na literatura científica que comprovem estes usos populares, e seu mecanismo e constituição química permanecem desconhecidos.

Alguns estudos têm demonstrado que a ingestão desta planta pelo gado por um período prolongado é responsável por casos de neurotoxicidade, caracterizada por crises

epileptiformes com tremores musculares e perda de equilíbrio. O exame histológico revela vacuolização citoplasmática progressiva, degeneração e desaparecimento de células de Purkinje (RIET-CORREA, SCHILD e FERNANDES, 1998; RECH et al., 2006). Estes sinais clínicos são também observados em intoxicações de bovinos com outras espécies do gênero *Solanum* (PAULOVICH et al., 2002; VERDES et al., 2006; LUGT et al., 2010), sendo descritos recentemente inclusive para *Solanum paniculatum* (GUARANÁ et al., 2011).



Figura 2. *Solanum guaraniticum* – Aspecto geral. Disponível em:

<[https://www.fmcdireto.com.br/portal/manuais/infestantes\\_verao/files/assets/downloads/page0285.pdf](https://www.fmcdireto.com.br/portal/manuais/infestantes_verao/files/assets/downloads/page0285.pdf)>.

Acesso em 22/01/2013.

A fim de avaliar a capacidade de repelência e efeito inseticida de extratos de plantas da família Solanaceae sobre a praga agrícola conhecida como pulgão da couve (*Brevicoryne brassicae* Linnaeus) em condições de laboratório, Lovatto, Goetze e Thomé (2004) utilizaram extratos de flores, folhas e frutos de nove espécies. *Solanum guaraniticum* foi considerada a espécie mais eficiente como repelente quando utilizados extratos frescos de frutos verdes e maduros a 2,5% e 5%, e também demonstrou efeito inseticida quando utilizados extratos frescos de folhas a 10%. Com base nestes resultados preliminares, foram realizados experimentos de campo na cultura da couve, pulverizando-se os extratos da planta no cultivo, e mais uma vez foi demonstrada a eficiência no controle da praga (LOVATTO et al., 2010).

Quanto à atividade farmacológica, Sabir e Rocha (2008) avaliaram as atividades hepatoprotetora e antioxidante do extrato aquoso das folhas *Solanum guaraniticum*, sob o nome de *Solanum fastigiatum*, diante do dano hepático induzido por paracetamol em camundongos, e concluíram, através de testes de TBARS, DPPH e atividade quelante de íons

metálicos *in vitro* que o extrato possui uma pronunciada atividade antioxidante. Também foi demonstrada atividade hepatoprotetora, por análise enzimática e reversão dos níveis alterados de TBARS, tióis não proteicos e ácido ascórbico aos níveis normais, de maneira dose-dependente. O estudo de toxicidade aguda mostrou que o extrato é relativamente não-tóxico quando administrado a camundongos por dois dias consecutivos, observando-se apenas pequenos aumentos na atividade de enzimas hepáticas quando administrada a maior dose testada (4g/kg).

### 3.4 Atividade antioxidante

#### 3.4.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares, com um alto grau de reatividade (VALKO et al., 2006a). Já a terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui espécies radicalares (hidroxila - OH•, superóxido - O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, peroxila - ROO•) e não radicalares (oxigênio - O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido hipocloroso - HOCl), que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, também são altamente reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além de EROs, os organismos também sofrem ação constante de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) (BARREIROS et al., 2006).

A produção de EROs e ERNs é proveniente do metabolismo celular normal, podendo desempenhar tanto um papel prejudicial quanto benéfico em sistemas vivos. Benefícios podem ser observados em baixas ou moderadas concentrações, e envolvem funções fisiológicas, como por exemplo na defesa contra agentes infecciosos e indução de resposta mitogênica. Porém, quando ocorre um grave desequilíbrio entre a geração de ERs e defesas antioxidantes em favor do primeiro, tem-se o estresse oxidativo (EO) (VALKO et al., 2006a, HALLIWELL, 2011). Em decorrência, efeitos prejudiciais tais como danos em macromoléculas são observados, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas como câncer (MATÉS et al., 2012), doenças cardiovasculares (HEINECKE, 2002; STROBEL et al., 2011), artrite reumatóide (VASANTHI; NALINI e RAJASEKHAR, 2009) e também desordens neurológicas como Parkinson (MYRTHRI, 2011) e Alzheimer (LI et al., 2010). Em

conjunto, estas doenças são responsáveis por uma grande morbidade e mortalidade, e a prevenção constitui uma prioridade crítica de saúde pública (BARREIROS et al., 2006; MAYNE, 2003; VALKO et al., 2006b).

Esforços têm sido realizados no sentido de se identificar marcadores para a avaliação do EO, com o objetivo de sistematizar sua utilização no diagnóstico e controle dos efeitos adversos. Tais marcadores se baseiam na análise do processo de oxidação de lipídios, proteínas e DNA, sendo que os relacionados aos lipídios são mais amplamente estudados (MAYNE, 2003; BARBOSA et al., 2008).

Nesse sentido, a peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídios insaturados de membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condições mais extremas, à morte celular (LIMA e ABDALLA, 2001). A reação inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno do ácido graxo poli-insaturado da membrana celular, com consequente formação de radicais livres, que se propagam em uma reação em cadeia. Uma vez que estes peróxidos lipídicos são compostos instáveis, tendem a degradar-se rapidamente em uma variedade de produtos secundários, destacando-se o malondialdeído (MDA), um dos produtos mais conhecidos, que pode ser utilizado como indicador de dano oxidativo em tecidos e células (GROTTO et al., 2009; SHIBAMOTO, 2006).

Com relação aos biomarcadores de dano oxidativo em proteínas, os grupos carbonila são os mais relevantes. Estes são gerados como resultado da ação direta das ERs sobre as cadeias laterais dos aminoácidos, ou indiretamente, mediante a ligação de glicose (processo de glico-oxidação) ou aldeídos (inclusive àqueles formados durante a peroxidação lipídica). Uma vez introduzidos à estrutura da proteína, resultam na perda de sua função biológica, muitas vezes irreversível. Os grupos carbonila podem ser aferidos em tecidos e fluidos biológicos, reagindo com um substrato específico, a 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), gerando compostos hidrazonas (2,4-dinitrofenilhidrazona), cuja absorbância pode ser medida em um comprimento de onda de 370 a 375nm (VASCONCELOS et al., 2007, BARBOSA et al., 2008).

Com a finalidade de contrabalançar o EO, inibindo ou reduzindo os danos causados pela ação deletéria das ERs, tem-se o sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando o processo de propagação e amplificação do processo



oxidativo. Já o sistema de defesa não-enzimático inclui substâncias diversas como a glutathiona (GSH), bilirrubina, ceruloplasmina, melatonina, coenzima Q e, especialmente, antioxidantes obtidos da dieta, como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e compostos fenólicos (GÜLÇİN, 2012; ZIECH et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

### 3.4.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2010). Podem ser classificados em compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos de parede celular). Estas substâncias são sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta, bem como em resposta a diferentes situações, como estresse e radiação UV, entre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004; HAMINIUK et al., 2012).

Os perfis e teores dos polifenóis em plantas e bebidas de origem vegetal são determinados, em grande parte, pelo tipo de espécie. Assim, algumas plantas ou alimentos podem ser particularmente ricos em um polifenol ou em uma classe específica de polifenóis, por exemplo, o café em ácidos fenólicos, o vinho tinto em estilbenos e antocianidinas, citros em flavanonas, o cacau e o chocolate em flavonoides, e produtos de soja em isoflavonoides. Além disso, há influências do tipo de cultivo, condições de crescimento, estágio de maturidade, armazenamento, manuseio e processamento (MITJAVILA e MORENO, 2012).

Estudos sugerem que uma dieta rica em compostos fenólicos poderia evitar o dano oxidativo, principalmente através de um mecanismo redox que permite que estes compostos atuem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestrantes de oxigênio singlete e quelantes de metais. Portanto, os compostos fenólicos podem impedir a formação de EROs e ERNs, que incluem radicais livres, tais como o ânion superóxido, radical hidroxil e óxido nítrico, bem como espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio e ácido nitroso (OH et al., 2013). Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático (SOUSA et al., 2007). Outros efeitos biológicos atribuídos a estes compostos incluem a atividade antiviral, antimicrobiana e antitumoral (HAMINIUK et al., 2012).

### 3.5 Atividade antimicrobiana

Recentemente, tem havido um crescente interesse no uso de substâncias naturais contra doenças infecciosas. Com o desenvolvimento de resistência a antibióticos e de efeitos colaterais indesejáveis devido ao uso excessivo de medicamentos sintéticos, surge a necessidade de buscar novos produtos vegetais para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. As plantas contêm abundante quantidade de compostos químicos que podem ser explorados para prevenir infecções microbianas (BALACHANDRAN et al., 2012).

A atividade antimicrobiana de polifenóis presentes em alimentos de origem vegetal e plantas medicinais tem sido extensivamente investigada contra uma ampla variedade de micro-organismos. Entre os polifenóis, destacam-se os flavan-3-óis, flavonóis e taninos, devido a seu largo espectro e maior atividade antimicrobiana em comparação com outros polifenóis, e ao fato de que a maioria destes são capazes de inibir fatores de virulência microbianos (tais como a inibição da formação de biofilme, redução da adesão e neutralização de toxinas bacterianas) e apresentam sinergismo com antibióticos (DAGLIA, 2012). Estas atividades se devem, provavelmente, à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares solúveis e com a parede celular bacteriana. Flavonoides mais lipofílicos também podem romper as membranas microbianas (COWAN, 1999).

Propriedades antimicrobianas também são atribuídas aos alcaloides, compostos nitrogenados farmacologicamente ativos. Na análise de extratos das cascas de *Aspidosperma ramiflorum*, foi verificada pronunciada atividade contra bactérias Gram-positivas, que foi atribuída à presença dos alcaloides indólicos ramiflorinas A e B isolados (TANAKA et al., 2006). Em outro estudo, solanopubamina, um alcaloide esteroidal isolado de *Solanum schimperianum*, apresentou boa atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida tenuis*, com valor de CIM de 12,5 µg/mL, para ambas (AL-REHAILY et al., 2013). Berberina, um alcaloide isoquinolínico presente nas raízes e cascas de espécies de *Berberis*, é um cátion hidrofóbico amplamente utilizado na medicina tradicional devido a sua atividade contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. Induzido pelo potencial de membrana, ele se acumula nas células e é um excelente intercalador de DNA (SAVOIA, 2012; COWAN, 1999).

Além disso, componentes de óleos essenciais derivados de terpenos, bem como seus derivados oxigenados (terpenoides), têm sido extensivamente avaliados, e estudos *in vitro* demonstraram inibição do crescimento bacteriano com resultados diversos. Combinações de óleos essenciais interagem entre si exercendo efeitos aditivos, sinérgicos, e, em alguns casos, antagônicos (BURT, 2004). O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), rico em timol e

carvacrol, quando combinado individualmente com os óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), manjerona (*Origanum majorana*) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*), na maioria dos casos, demonstrou efeitos aditivos contra as bactérias testadas (BASSOLÉ e JULIANI, 2012). Porém a combinação do óleo de orégano com o óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) produziu efeitos sinérgicos contra *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophilla* (AZEREDO et al., 2011). O mecanismo de ação é através do rompimento da membrana da célula bacteriana, provocando alterações na homeostase e resultando na inibição do crescimento e morte celular, uma vez que estas substâncias possuem alta hidrofobicidade (SOLORZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

Alguns critérios são geralmente seguidos na seleção de plantas medicinais com possível atividade antimicrobiana, como a avaliação de espécies utilizadas na medicina popular, óleos essenciais ou compostos isolados; investigação da flora natural de uma determinada região ou país; pesquisas acerca de plantas ou extratos que possam ser utilizados na indústria alimentícia como agentes antimicrobianos ou, ainda, a avaliação da atividade de uma planta contra um micro-organismo patológico específico (RÍOS e RECIO, 2005).

Nesse sentido, tem havido um grande interesse na descoberta de novas alternativas para o tratamento da tuberculose, doença infecciosa cujo principal agente etiológico é o micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis* (COPP, 2003). Esse interesse se deve, principalmente, ao surgimento de novos casos da doença, ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, aos efeitos adversos do tratamento convencional, e ao aumento da incidência de tuberculose associada a infecções virais (vírus da imunodeficiência humana) (GARCÍA et al., 2012; NEWTON, LAU e WRIGHT, 2000). Diversos estudos têm demonstrado atividade inibitória, frente à micobactérias, de extratos e substâncias isoladas de plantas com resultados promissores (TEKWU et al., 2012; RAMOS et al., 2008; CHEN et al., 2010; ELDEEN e STADEN, 2007).

Na literatura, são encontradas várias pesquisas acerca da atividade de extratos de plantas e compostos isolados do gênero *Solanum* contra uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e micobactérias (SINGH e SINGH, 2012; CHAH, MUKO e OBOEGBULEM, 2000; WANYONYI et al., 2003; ESSIEN et al. 2012; BALACHANDRAN et al., 2012). Diante disso, e da ausência destes dados sobre a espécie em estudo, além da avaliação da atividade antioxidante, motivou-se a realização da análise da atividade antimicrobiana de *Solanum guaraniticum*, de modo a avaliar seu possível potencial no tratamento de doenças infecciosas.

## APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação estão sob a forma de um artigo, publicado na revista **Molecules**, e de um manuscrito, que será submetido à revista científica.

Esta dissertação inclui ainda seções de considerações finais, onde os resultados são interpretados em conjunto, de conclusões e de referências que são relacionadas à introdução, revisão da literatura e considerações finais.

## 4 RESULTADOS

**ARTIGO CIENTÍFICO 1** – Publicado na revista **Molecules**, v. 17, p. 12460-12574, 2012.

**Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the Leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil.**

Marina Zadra, Mariana Piana, Thiele Faccim de Brum, Aline Augusti Boligon, Robson Borba de Freitas, Michel Mansur Machado, Sílvio Terra Stefanello, Félix Alexandre Antunes Soares, Margareth Linde Athayde.

Article

## Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of the Leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil

Marina Zadra <sup>1</sup>, Mariana Piana <sup>1</sup>, Thiele Faccim de Brum <sup>1</sup>, Aline Augusti Boligon <sup>1</sup>, Robson Borba de Freitas <sup>1</sup>, Michel Mansur Machado <sup>2</sup>, Sílvia Terra Stefanello <sup>3</sup>, Félix Alexandre Antunes Soares <sup>3</sup> and Margareth Linde Athayde <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiana, RS 97500-970, Brazil

<sup>3</sup> Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: margareth@smail.ufsm.br; Tel.: +55-55-3220-9618.

Received: 14 August 2012; in revised form: 13 October 2012 / Accepted: 16 October 2012 /

Published: 24 October 2012

---

**Abstract:** *Solanum guaraniticum* is a shrub belonging to the Solanaceae family popularly known in Brazil as jurubeba or false-jurubeba. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of crude extract and chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol fractions from its leaves, verifying the ability to remove reactive species and identify and quantify phenolic compounds. The ethyl acetate fraction showed the highest amount of total polyphenols ( $546.57 \pm 2.35$  mg gallic acid equivalent/g) and the lowest IC<sub>50</sub> ( $9.11 \pm 0.75$  µg/mL) by the DPPH method. Furthermore, the chloroform fraction presented the highest content of flavonoids ( $75.73 \pm 0.34$  mg rutin equivalents/g), tannins ( $56.03 \pm 0.68$  mg catechin equivalents/g) and alkaloids ( $10.79 \pm 0.06$  mg/g). This fraction was effective in the scavenging of reactive species by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay, in addition to completely reducing protein carbonyl content and reducing lipid peroxidation at basal levels even at low concentrations. Chlorogenic, caffeic and rosmarinic acids were identified and quantified by HPLC/DAD. These results show that *S. guaraniticum* is rich in phenolic compounds and has potential as an antioxidant.

**Keywords:** *Solanum guaraniticum*; antioxidant activity; polyphenols; HPLC/DAD

---

## 1. Introduction

Medicinal plants have been widely used for therapeutic purposes since ancient times. The beneficial effects of fruits and vegetables are generally attributed to the presence of phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids and tannins, nitrogen compounds such as alkaloids and amines, as well as vitamins, terpenoids and other metabolites, which have a high antioxidant activity [1–3]. This activity is due to the ability of these substances to reduce oxidative stress by neutralizing or scavenging of reactive species by hydrogen donation, before they attack cells and other biological components [4].

Reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species are products of normal cellular metabolism. However, at high concentrations, these species may be important mediators of damage to cellular structures, such as nucleic acids, lipids and proteins. The oxidation of any of these substrates, if uncontrolled, can contribute to the development of chronic diseases such as cancer, hypertension, diabetes mellitus, cardiovascular and neurodegenerative diseases [5,6]. In this sense, there is great interest in finding natural antioxidants from plant materials, and various extracts and isolated compounds have been investigated for their antioxidant activity, using different methods [7–10].

The Solanaceae family is one of the largest and most complex of the Angiosperms, and its main center of diversity and endemism is South America. It has species rich in active secondary metabolites and very important from economic, agricultural, and pharmaceutical point of view, especially the *Solanum* genus, one of the largest in the plant kingdom. Plants of this genus exhibit a wide variety of steroidal saponins and glycoalkaloids, furthermore, flavonoids are also frequently found. Due its different biological activities, its species have been extensively studied [11,12].

*Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. (syn. *Solanum fastigiatum* var. *acicularium* Dunal) is a shrub popularly known as jurubeba or false-jurubeba, which occurs in Paraguay, Argentina and Brazil, and can be found on roadsides, forests and clear fields [13]. In popular medicine, its leaves, roots and fruits are used as tea in the treatment of anemia, fevers, erysipela, spleen and liver diseases such as hepatitis, ulcers, and uterine tumors, as tonic and as a digestive stimulant [14,15]. A previous study demonstrated that the infusion of the leaves has hepatoprotective and antioxidant activity *in vivo*, observed in male albino mice [16]. The Brazilian Pharmacopoeia only recognizes *Solanum paniculatum* as the true jurubeba, although in Brazil the general population uses both species as folklore medicines to treat liver diseases. Therefore, considering the interchangeable use of these two species and the scarce data available about *S. guaraniticum*, a deep evaluation of the antioxidant activity by different methods is required for a better understanding of its biological potential activities. Thus, the aim of this study was to quantify total polyphenols, flavonoids, tannins and alkaloids in the crude extract (CE) and chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (AcOEt) and *n*-butanol (*n*-BuOH) fractions from the leaves of *Solanum guaraniticum*, and to evaluate the antioxidant activity by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), inhibition of lipid peroxidation (TBARS) and protein oxidation (carbonyl groups) assays. In addition, the ROS scavenging capacity was evaluated by using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation test. Taking into account phytochemical analysis, polyphenols in the different

fractions were identified and quantified by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC/DAD).

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Phytochemical Composition

The contents of total polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids are shown in Table 1. The AcOEt fraction presented the highest content of total polyphenols ( $546.57 \pm 2.35$  mg/g gallic acid equivalents (GAE)). The chloroform fraction, despite presenting the lowest content of total polyphenols, demonstrated the highest content of flavonoids, tannins and alkaloids. Similar findings were related by Janovik *et al.* [17], analyzing different fractions of *Cariniana domestica*. Alkaloids were only found in the CE and  $\text{CHCl}_3$  fractions.

**Table 1.** Total polyphenols (TP), total flavonoids (TF), condensed tannins (CT) and total alkaloids (TA) in the CE and fractions from leaves of *S. guaraniticum*.

Extract or Fraction	TP (mg GAE/g)	TF (mg RE/g)	CT (mg CaE/g)	TA (mg/g)
CE	$259.95^b \pm 0.69$	$61.30^b \pm 0.53$	$23.16^b \pm 2.05$	$6.14^b \pm 0.01$
$\text{CHCl}_3$	$195.90^c \pm 1.24$	$75.73^a \pm 0.34$	$56.03^a \pm 0.68$	$10.79^a \pm 0.06$
AcOEt	$546.57^a \pm 2.35$	$57.17^c \pm 0.07$	$11.85^c \pm 0.91$	-
<i>n</i> -BuOH	$259.82^b \pm 2.17$	$60.17^b \pm 0.32$	$8.85^c \pm 1.01$	-

Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. GAE: gallic acid equivalents, RE: rutin equivalents, CaE: catechin equivalents, <sup>a-c</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ), by analysis of variance (One-way ANOVA) ( $n = 3$ ).

### 2.2. Radical Scavenging Capacity-DPPH Assay

The DPPH assay is based on the measurement of the ability of an antioxidant substance to scavenge the radical, reducing it to hydrazine, with a simultaneous change in color from violet to yellow, which is measured spectrophotometrically. The AcOEt fraction showed excellent antioxidant capacity, superior even to the standard ascorbic acid, with an  $\text{IC}_{50}$  of  $9.11 \pm 0.75$   $\mu\text{g/mL}$  while the standard had an  $\text{IC}_{50}$  of  $15.48 \pm 1.28$   $\mu\text{g/mL}$  (Figure 1 and Table 2). The CE and *n*-BuOH fractions showed very similar  $\text{IC}_{50}$  values, and finally, with higher  $\text{IC}_{50}$  but still a relatively low value, came the  $\text{CHCl}_3$  fraction ( $44.46 \pm 1.27$   $\mu\text{g/mL}$ ). These results are in agreement with the content of polyphenols found in the fractions (AcOEt > CE  $\approx$  *n*-BuOH >  $\text{CHCl}_3$ ), so is possible to attribute the antioxidant capacity seen in the DPPH assay to the presence of these compounds. This relationship is already well established and has been described by other authors, using similar assay systems [18,19].

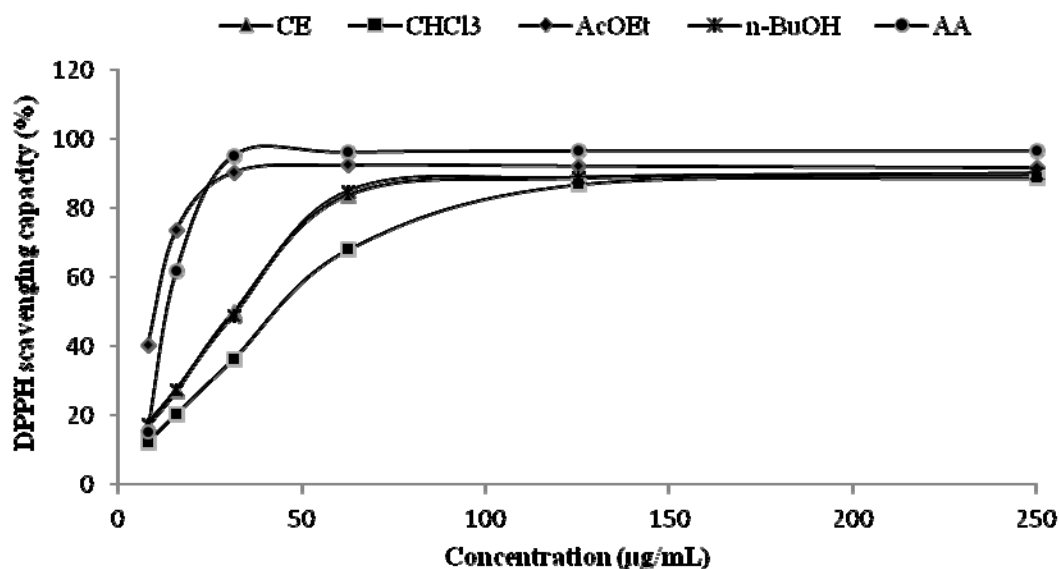
### 2.3. Scavenging of ROS-DCFH-DA Method

Dichlorofluorescein (DCFH) is widely used to determine oxidative stress in cells. When its diacetate form (DCFH-DA) is added to the cells, it diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterase to liberate DCFH, which reacts with oxidizing species (particularly



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical) forming the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) [20,21]. Thus, the principle of this assay is to evaluate the ability of antioxidant molecules in the extract to scavenge ROS produced by normal metabolism by cells, and then inhibit the oxidation of DCFH to DCF, observed by the decrease in fluorescence intensity.

**Figure 1.** Antioxidant capacity of CE and fractions from leaves of *S. guaraniticum* by DPPH assay (n = 3).



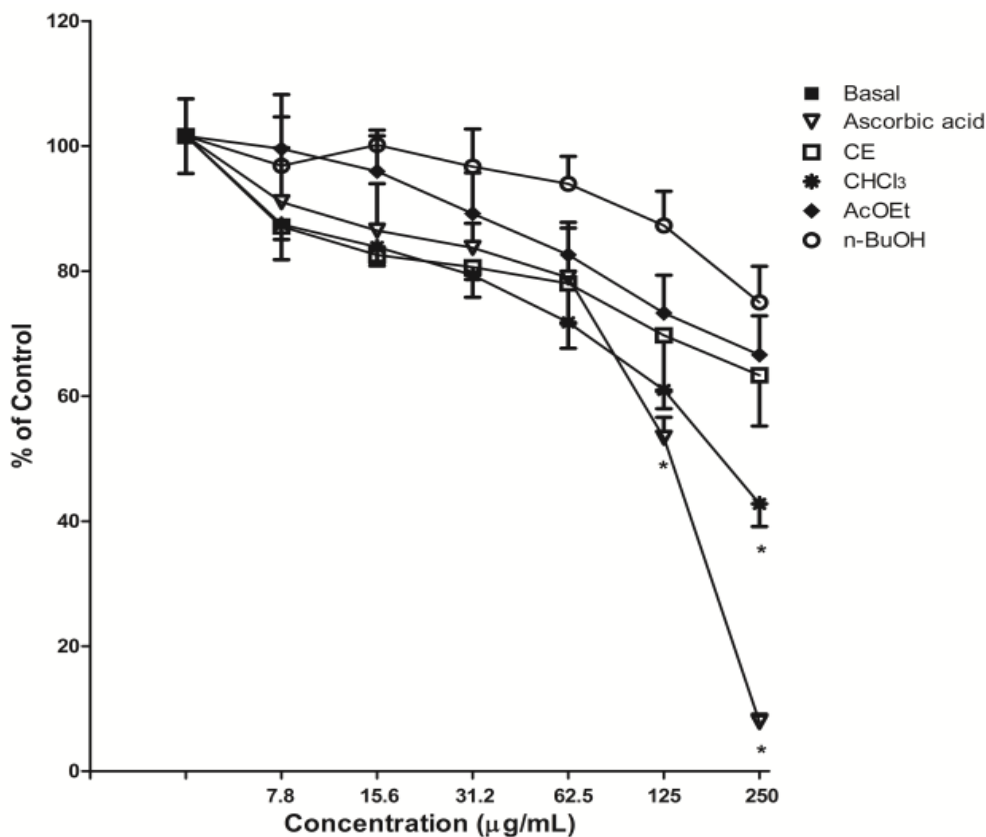
**Table 2.** IC<sub>50</sub> values for DPPH (1), TBARS (2) and Carbonyl (3) assays.

Extract or Fraction	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (µg/mL)
CE	31.43 <sup>c</sup> ± 1.02	54.23 <sup>c</sup> ± 1.58	82.98 <sup>b</sup> ± 0.31
CHCl <sub>3</sub>	44.46 <sup>d</sup> ± 1.27	3.85 <sup>a</sup> ± 0.93	67.65 <sup>a</sup> ± 0.82
AcOEt	9.11 <sup>a</sup> ± 0.75	12.24 <sup>b</sup> ± 1.76	179.59 <sup>c</sup> ± 1.14
n-BuOH	32.12 <sup>c</sup> ± 0.91	55.10 <sup>c</sup> ± 1.94	87.22 <sup>b</sup> ± 0.32
AA	15.48 <sup>b</sup> ± 1.28	117.81 <sup>d</sup> ± 1.23	61.80 <sup>a</sup> ± 0.54

AA: ascorbic acid. <sup>a-d</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ), by analysis of variance (One-way ANOVA) (n = 3).

The CHCl<sub>3</sub> fraction at a concentration of 250 µg/mL was able to significantly reduce the oxidation of DCFH and consequently reduce the oxidative stress observed in supernatant of rat brain homogenate, compared to the basal group ( $p < 0.05$ ), demonstrating pronounced antioxidant activity. Ascorbic acid reduced in a significant manner the oxidation of DCFH-DA, at 125 and 250 µg/mL ( $p < 0.05$ ). The CE and other fractions did not demonstrate this ability; no statistically significant difference compared to the basal group at the same concentrations tested was observed (Figure 2).

**Figure 2.** Effect of *S. guaraniticum* CE and fractions on scavenging of ROS in supernatant of rat brain homogenate, by DCFH-DA method.

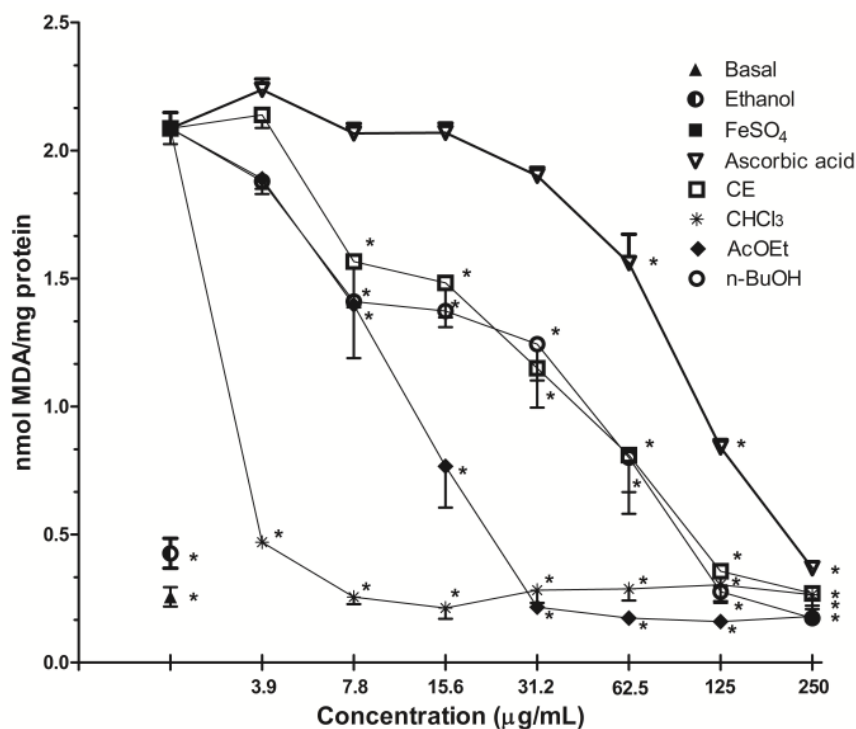


\* significant difference from the basal group ( $p < 0.05$ ), by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test ( $n = 3$ ).

#### 2.4. Inhibition of Lipid Peroxidation-TBARS Assay

The antioxidant potential of the CE and fractions were evaluated through the TBARS assay based on the formation of malondialdehyde (MDA), a subproduct of lipid peroxidation. The lipid peroxidation was stimulated with  $\text{FeSO}_4$  addition to brain supernatant, and the extracts were able to significantly decrease of MDA formation at all concentrations tested when compared with the induced control, as can be observed in Figure 3. Similarly, all the extracts reduced MDA formation at the basal levels (non-induced group), especially the  $\text{CHCl}_3$  fraction, which showed a very low  $\text{IC}_{50}$  (Table 2). It is suggested that this effect is due to the large amounts of flavonoids, tannins and alkaloids found in this fraction, contributing to the antioxidant activity, and also due to the demonstrated ability to scavenge ROS. In our study, ascorbic acid showed an  $\text{IC}_{50}$  value of  $117.81 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ , these results were in accordance with Liang *et al.*, [22] who found moderate inhibition of lipid peroxidation for ascorbic acid using a similar method. The vehicle (ethanol) in which all the extracts were dissolved had no effect when administered alone. Sini and Devi [23] observing the antioxidant activity of the chloroform extract of *Solanum trilobatum*, verified the capacity to inhibit lipid peroxidation in rat liver homogenate, and also the scavenging effect on superoxide and hydroxyl radicals whose results were higher than the standards butylated hydroxytoluene (BHT) and catechin.

**Figure 3.** Effect of *S. guaraniticum* CE and fractions on TBARS production in supernatant of rat brain homogenate.



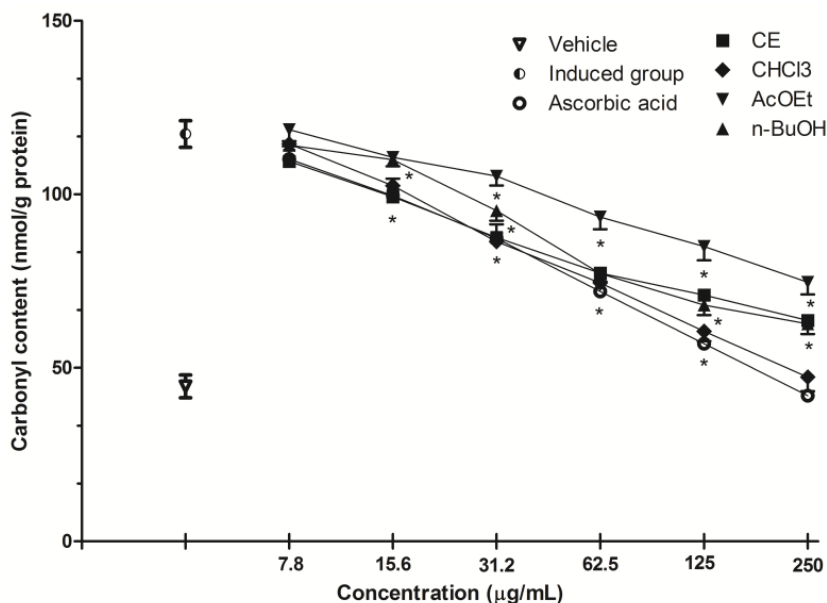
\* significant difference ( $p < 0.05$ ) from the induced control (FeSO<sub>4</sub>), by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test ( $n = 3$ ).

### 2.5. Inhibition of Protein Oxidation-Carbonyl Content

Protein carbonyl content is the most commonly used marker of protein oxidation, and its accumulation has been observed in several human diseases, including Alzheimer's disease, diabetes, arthritis and others [24]. All the fractions were able to reduce protein carbonyl content in serum compared to the induced group (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), in a dose-dependent way, but only the CHCl<sub>3</sub> fraction, at the concentration of 250 µg/mL completely inhibited the oxidative damage caused (Figure 4). This fraction showed the second lowest IC<sub>50</sub> for this assay ( $67.65 \pm 0.82$  µg/mL), slightly larger than the standard ascorbic acid ( $61.80 \pm 0.54$  µg/mL), however the difference between these two values was not significant ( $p < 0.05$ ) (Table 2, Figure 4). Similarly to what was observed in the lipid peroxidation assay, this protective effect may be attributed to the phytochemical composition of the fraction and also the ability of scavenging ROS observed by DCFH-DA method, reducing the oxidative stress.

In our study, the CHCl<sub>3</sub> fraction showed the best results by all antioxidant activity methods, except in the DPPH assay. The steric accessibility of DPPH radical is a major determinant of the reaction, since small molecules that have better access to the radical site have relatively higher antioxidant capacity. Moreover, many antioxidant compounds that react quickly with peroxy radicals may react slowly or may even be inert in this assay. The inexistence of DPPH or similar radicals in biological systems is also a shortcoming. Despite these limitations, the DPPH radical is a simple, stable and useful spectrophotometric method with regard to screening measuring the antioxidant capacity of both pure compounds and complex samples [25,26].

**Figure 4.** Effect of *S. guaraniticum* CE and fractions on protein carbonyl content in serum samples.

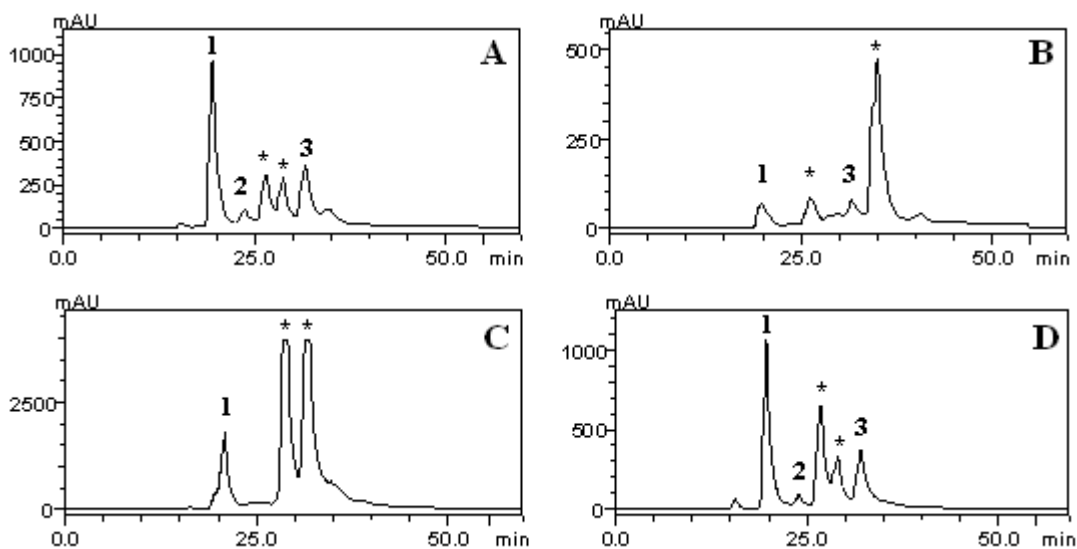


\* significant difference ( $p < 0.05$ ) from the not induced group (vehicle), by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test ( $n = 3$ ).

## 2.6. HPLC/DAD Analysis

To verify the presence of phenolic compounds in the CE and fractions of *S. guaraniticum*, the samples were subjected to HPLC/DAD analysis. The phenolic acids such as chlorogenic, caffeic and rosmarinic were identified by comparison of their retention's time and UV spectrum with those of the standards. The chromatograms and quantification of the compounds are shown in Figure 5 and Table 3, respectively.

**Figure 5.** HPLC/DAD phenolics profile of CE (A), CHCl<sub>3</sub> (B), AcOEt (C) and n-BuOH (D) fractions of *S. guaraniticum* leaves. (1) chlorogenic acid, (2) caffeic acid, (3) rosmarinic acid, (\*) unknown peaks.



**Table 3.** Quantification of polyphenols in CE and fractions of *S. guaraniticum* by HPLC/DAD.

Extract or fraction	CLA(mg/g)	CFA(mg/g)	RA(mg/g)
CE	11.15 <sup>b</sup> ± 0.14	1.80 <sup>a</sup> ± 0.15	51.92 <sup>a</sup> ± 5.58
CHCl <sub>3</sub>	3.23 <sup>c</sup> ± 1.04	-	2.01 <sup>b</sup> ± 0.1
AcOEt	21.55 <sup>a</sup> ± 0.73	-	-
<i>n</i> -BuOH	11.60 <sup>b</sup> ± 1.95	0.45 <sup>b</sup> ± 0.2	54.79 <sup>a</sup> ± 4.1

<sup>a-c</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ), by analysis of variance ( $n = 3$ ). CLA = chlorogenic acid; CFA = caffeic acid; RA = rosmarinic acid.

Phenolic compounds may have different antioxidant capacities, depending on their structural conformation, number of hydroxyl groups and their distribution in the structure. In general, phenolic acids are considered efficient hydrogen donors due to their characteristic carboxylic acid group, which is easily ionized [27]. In this study, chlorogenic acid was identified in all extracts. However, the AcOEt fraction presented the highest amount of this phenolic acid ( $21.55 \pm 0.73$  mg/g), followed by CE ( $11.15 \pm 0.14$  mg/g), *n*-BuOH ( $11.60 \pm 1.95$  mg/g) and CHCl<sub>3</sub> ( $3.23 \pm 1.04$  mg/g). These results follow the same trend of the antioxidant capacity by the DPPH assay, suggesting that this polyphenol was a significantly contributor to the low IC<sub>50</sub> value presented by the AcOEt fraction in this method.

Rosmarinic acid was present in high amounts in the CE and *n*-BuOH fractions. This phenolic acid is known to have many biological activities, including hepatoprotective activities in liver diseases [28] which could be related with the popular use of this plant. In fact, Sabir and Rocha [15] demonstrated the hepatoprotective activity of jurubeba in an experimental model using mice. Our findings corroborate the results obtained by those authors. Similarly, in a study of Lin *et al.* [29], flavonoids and phenolic acids in the ethanol extract from lemon balm leaves (*Melissa officinalis* L.) were evaluated, and rosmarinic acid, present in the amount of  $83.33 \pm 3.46$  mg/g of freeze dried sample extract and  $78.40 \pm 4.13$  mg/g of extract of hot air dried sample, was considered as the major component. In addition, caffeic acid has also been found in the CE and *n*-BuOH fractions, in small amounts, and may also have contributed to the activities shown.

Similar behaviors were found comparing the CE and *n*-BuOH fractions in relation to the content of polyphenols and flavonoids, antioxidant capacity by DPPH assay and lipid peroxidation. This fact can be explained, in part, by similarity of their chromatographic profiles and also by very similar amounts of the three phenolic acids as quantified by HPLC/DAD.

### 3. Experimental

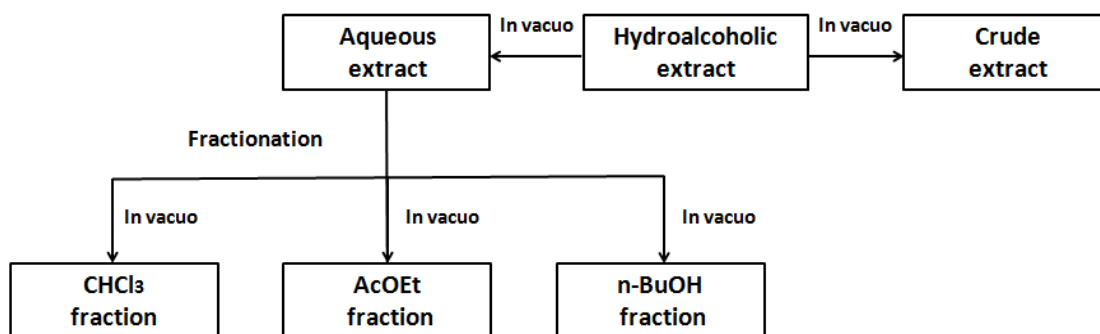
#### 3.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade. The solvents and reference compounds used for the extractions and analytical procedures such as chloroform, ethyl acetate, ethanol, *n*-butanol, gallic, chlorogenic and rosmarinic acids, and spectrophotometric grade methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu reagent 2N, DPPH radical, bismuth nitrate, rutin, catechin, thiobarbituric acid and DCFH-DA were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All others chemicals and reagents were purchased locally.

### 3.2. Plant Collection and Extractions

The leaves of *Solanum guaraniticum* were collected in December 2011, in the city of Guaporé (Rio Grande do Sul, Brazil). A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Biology Department of Federal University of Santa Maria, and cataloged under the registration number SMDB 13158. Plant material (645.58 g) was dried in a stove at controlled temperature (38 °C), triturated and subjected to the maceration with 70% ethanol (4.3 L) for seven days, with daily agitation. The material was filtered and concentrated under reduced pressure, in order to obtain an aqueous extract. Part of this was taken to complete dryness, yielding the crude extract (CE), and another part was successively partitioned with chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol, which also were dried to give each corresponding fraction. The fractionation method is illustrated below (Figure 6).

**Figure 6.** Method of fractionation of *S. guaraniticum* extract.



### 3.3. Phytochemical Analysis

#### 3.3.1. Total Polyphenols Content

The polyphenol content was evaluated by the colorimetric method described by Chandra and Mejia [30], using the Folin-Ciocalteu reagent. Samples were prepared at a concentration of 0.15 mg/mL. Absorbance was measured at 730 nm, in triplicate. Gallic acid was used to calculate the standard curve, and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents per g of extract (mg/g GAE).

#### 3.3.2. Total Flavonoid Content

The total flavonoid content was determined according to the colorimetric method described by Woisky and Salatino [31], using a 2% aluminum chloride solution. Samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL. Absorbance was measured at 420 nm, in triplicate. A standard curve of rutin was used for quantification, and the results were expressed as mg of rutin equivalents per g of extract (mg/g RE).

#### 3.3.3. Determination of Condensed Tannins

The determination of condensed tannins was performed according to the method described by Morrison *et al.* [32], using equal amounts of a 8% hydrochloric acid solution and a 1% vanillin

solution. The samples were prepared at a concentration of 25 mg/mL, and the absorbance was measured at 500 nm. The test was performed in triplicate, for quantification was used a standard curve of catechin, and the results were expressed as mg of catechin equivalents per g of extract (mg/g CaE).

#### 3.3.4. Determination of Total Alkaloids

Total alkaloids were determined by reaction of precipitated with Dragendorff's reagent, described by Sreevidya and Mehrotra [33]. The crude extract and fractions were prepared at a concentration of 50 mg/mL, absorbance was measured at 435 nm and the test was performed in triplicate. For calculating the total alkaloid content, a standard curve of bismuth nitrate was used, and the results were expressed as mg of total alkaloids per g of extract.

#### 3.3.5. HPLC/DAD Analysis

HPLC/DAD analysis was performed on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser, CBM 20A integrator, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm × 4.6 mm) packed with 5 µm diameter particles. The phenolic acids analysis was carried out using a gradient system using Solvent A (water containing 2% acetic acid) and Solvent B (methanol), according to Evaristo and Leitão [34] with minor modifications. All solutions and samples were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA), and the mobile phases were degassed by an ultrasonic bath prior to use. The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 40 µL. Identification of phenolics was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with those of standards. Stock solutions of chlorogenic, caffeic, and rosmarinic acids were prepared in the HPLC/DAD mobile phase at a concentration range of 0.00625–0.250 mg/mL. Samples of CE and fractions of *S. guaraniticum* were also dissolved in the mobile phase. Quantification was performed by integration of the peaks using the external standard method, and chromatographic operations were carried out in triplicate.

#### 3.4. Animals

Male Wistar rats (3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g) were maintained groups of 3–4 rats per cage. They had continuous access to food and water in a room with controlled temperature (22 ± 3 °C) and on a 12 h light/dark cycle. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA). The rats were killed by decapitation and the brain tissue was rapidly dissected, weighed and immediately homogenized in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4,000 rpm and the supernatant was used for tests of scavenging of ROS by DCFH-DA method and inhibition of lipid peroxidation.

### 3.5. Human Serum

For inhibition of protein oxidation (carbonyl content) assay, human blood samples were collected by venipuncture and separated by centrifugation to obtain the serum. The experiments were carried out according to the research ethics committee of the Federal University of Pampa (Rio Grande do Sul, Brazil), and approved under number 23,081.

### 3.6. Antioxidant activity Methods

#### 3.6.1. DPPH Radical Scavenging Capacity

The DPPH radical scavenging capacity of CE and fractions of *S. guaraniticum* were evaluated by the method described by Choi *et al.* [35]. Samples were diluted in ethanol at the following concentrations: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 µg/mL. An aliquot of each dilution (2.5 mL) was added to a solution of 0.3 mM DPPH (1 mL), and the absorbance was measured at 518 nm against a blank after 30 min of reaction, in the dark and at room temperature. DPPH solution (1.0 mL) plus ethanol (2.5 mL) was used as a negative control, and ascorbic acid in the same concentrations was used as positive control. The DPPH scavenging ability was expressed as IC<sub>50</sub> (the extract concentration required to inhibit 50% of the DPPH in the assay medium). The test was performed in triplicate, and the calculation of the antioxidant capacity followed the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \quad (1)$$

where Abs<sub>sample</sub> is absorbance of each fraction; Abs<sub>blank</sub> is absorbance of fractions without adding the DPPH; Abs<sub>control</sub> is absorbance the solution of negative control.

#### 3.6.2. DCFH-DA Method

Intracellular formation of ROS was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as the substrate, according to Myrhe *et al.* [36]. The supernatant of rat brain homogenate was incubating with different concentrations of CE and fractions of *S. guaraniticum*, at 37 °C. After 1 h, aliquots were removed and DCFH-DA (5 µM) was added to the medium and incubation continued for 1 h in the dark. Fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. ROS levels (expressed as percentage value in relation to the control group) were calculated by interpolation in a standard curve of oxidized DCF (constructed in parallel), corrected by the content of protein [37]. Ethanol was used as negative control and ascorbic acid as positive control. The assay was performed in triplicate and data were expressed as mean ± S.E.M.

#### 3.6.3. Measurement of Inhibition of Lipid Peroxidation (TBARS Assay)

To evaluate the inhibition of lipid peroxidation, an aliquot of 100 µL of rat brain homogenate supernatant was incubated for 1 h at 37 °C with the pro-oxidant ferrous sulphate (10 µM) in the presence or absence of CE and fractions. The production of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) was determined by the colorimetric method according to Ohkawa *et al.* [38].



Quantification was expressed in nmol of malondialdehyde (MDA)/g of tissue. Ascorbic acid was used as positive control, and the extract concentration required to reduce the lipid peroxidation in 50% was expressed as IC<sub>50</sub>.

#### 3.6.4. Measurement of Inhibition of Protein Oxidation (Carbonyl assay)

The CE and fractions were diluted in PBS buffer in the desired concentrations. In a test tube, was placed 1 mL of serum and 1 mL of extract diluted in PBS buffer. After 30 min at 37 °C was added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM (final concentration). After 60 min at 37 °C, were performed dosages of protein carbonyl, according to Morabito *et al.* [39]. Briefly, 100 µL of serum in the absence or presence of CE and fractions in different dilutions was incubated with 100 µL of a 20 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution for 60 min. The proteins were precipitated from the solution with the use of 20% trichloroacetate; the protein pellet was washed three times with ethanol and ethyl acetate and resuspended in 1 mL of 6 M guanidine at 37 °C for 15 min. The carbonyl content was determined from the absorbance at 366 nm (molar absorption coefficient, 22.000 M<sup>-1</sup>/cm). The determination of total protein in serum was conducted using a commercial Labtest<sup>®</sup> kit as recommended by the manufacturer. All tests were performed in triplicate, and the carbonyl content was expressed as nmol/g protein. Ascorbic acid was used as positive control. The extract concentration required to reduce the damage to proteins in 50% was expressed as IC<sub>50</sub>.

#### 3.7. Statistical Analysis

For phytochemical composition, antioxidant capacity by DPPH assay and HPLC/DAD analysis, was used a calibration curve, and the experimental values were statistically analyzed by analysis of variance. Data were expressed as mean ± S.D. (n = 3). For the data analysis of inhibition of lipid peroxidation, protein carbonyl content and scavenging of ROS by DCFH-DA method, was used analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test, and *p* < 0.05 were considered significant. Data were expressed as mean ± S.E.M.

### 4. Conclusions

This study showed the antioxidant activity of the leaves of *S. guaraniticum* and contributed to reveal some phytochemical characteristics of this species. The AcOEt fraction showed the better antioxidant activity by the DPPH assay, which can be attributed to its high content of total polyphenols. In addition, the CHCl<sub>3</sub> fraction that presented high values of flavonoids, tannins and alkaloids, was also shown to be able to remove reactive species by the DCFH-DA method, reducing oxidative stress, lipid peroxidation and damage to proteins. Chlorogenic, caffeic, and rosmarinic acids were identified and quantified for the first time in this species by HPLC/DAD and may be involved in the activities shown. Additionally, the presence of high contents of rosmarinic acid in the crude extract and *n*-butanol fraction may support, at least in part, the popular use of the plant to treat liver diseases. Taken together, our results indicate that this plant has antioxidant potential and can be a promising source of natural antioxidants.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Thais Scotti do Canto-Dorow (Biology Department of Federal University of Santa Maria) for providing the identification of *S. guaraniticum*, and CAPES and CNPq/Brazil for the financial support.

## References

1. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2157–2184.
2. Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* **2006**, *97*, 654–660.
3. Yang, J.; Martinson, T.E.; Liu, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* **2009**, *116*, 332–339.
4. Erkan, N. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. *Food Chem.* **2012**, *133*, 775–781.
5. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84.
6. Mayne, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 933–940.
7. Boligon, A.A.; Pereira, R.P.; Feltrin, A.C.; Machado, M.M.; Janovik, V.; Rocha, J.B.T.; Athayde, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivates from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technol.* **2009**, *100*, 6592–6598.
8. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774.
9. Costa, J.G.M.; Leite, G.O.; Dubois, A.F.; Seeger, R.L.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Campos, A.R.; Rocha, J.B.T. Antioxidant effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius extracts from Cariri-Ceará state (Brazil): Potential involvement in its therapeutic use. *Molecules* **2012**, *17*, 934–950.
10. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.
11. Oliveira, R.C.M.; Monteiro, F.S.; Silva, J.L.V.; Ribeiro, L.A.A.; Santos, R.F.; Nascimento, R.J.B.; Duarte, J.C.; Agra, M.F.; Silva, T.M.S.; Almeida, F.R.C.; *et al.* Methanol and ethyl acetate extracts from *Solanum megalonyx* Sendtn. (Solanaceae) present spasmolytic activity in guinea-pig ileum: A comparative study. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 146–151.
12. Silva, T.M.S.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.; Agra, M.F. Occurrence of flavones and flavonols aglycones and its glycosides in *Solanum* (Solanaceae). *Quim. Nova* **2003**, *26*, 517–522.
13. Soares, E.L.C.; Vignoli-Silva, M.; Vendruscolo, G.S.; Thode, V.A.; Silva, J.G.; Mentz, L.A. Solanaceae in the Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *R. Bras. Bioci.* **2008**, *6*, 177–188.

14. Costa, O.A. Jurubeba. *Rev. Bras. Farm.* **1940**, *21*, 404–416.
15. Simões, C.M.O.; Falkenberg, M.; Mentz, L.A.; Schenkel, E.P.; Amoros, M.; Girre, L. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 205–214.
16. Sabir, S.M.; Rocha, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 226–232.
17. Janovik, V.; Boligon, A.A.; Bandeira, R.V.; Athayde, M.L. HPLC/DAD analysis, determination of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity from the leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Res. J. Phytochem.* **2011**, *5*, 209–215.
18. Schubert, A.; Pereira, D.F.; Zanin, F.F.; Alves, S.H.; Beck, R.C.R.; Athayde, M.L. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* **2007**, *62*, 876–880.
19. Silva, D.A.; Silva, T.M.S.; Lins, A.C.S.; Costa, D.A.; Cavalcante, J.M.S.; Matias, W.N.; Souza, M.F.V.; Filho, B.R. Chemical constituents and antioxidant activity of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1250–1254.
20. Rota, C.; Chignell, C.F.; Mason, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 873–881.
21. He, K.; Li, X.; Ye, X.; Yuan, L.; Li, X.; Chen, X.; Deng, Y. A mitochondria-based method for the determination of antioxidant activities using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 454–461.
22. Liang, C.H.; Chan, L.P.; Ding, H.Y.; So, E.C.; Lin, R.J.; Wang, H.M.; Chen, Y.G.; Chou, T.H. Free radical scavenging activity of 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O-β-D-glucopyranoside from *Origanum vulgare* and its protection against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7690–7696.
23. Sini, H.; Devi, K.S. Antioxidant activities of the chloroform extract of *Solanum trilobatum*. *Pharm. Biol.* **2004**, *42*, 462–466.
24. Dalle-Done, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *329*, 23–38.
25. Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 89–96.
26. Ndhala, A.R.; Moyo, M.; Staden, J.V. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* **2010**, *15*, 6905–6930.
27. Palafox-Carlos, H.; Yahia, E.M.; Gonzáles-Aguilar, G.A. Identification and quantification of major phenolic compounds (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chem.* **2012**, *135*, 105–111.
28. Li, G.S.; Jiang, W.L.; Tian, J.W.; Qu, G.W.; Zhu, H.B.; Fu, F.H. *In vitro* and *in vivo* effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 282–288.
29. Lin, J.Y.; Chen, Y.C.; Lee, Y.C.; Hou, C.W.R.; Chen, F.L.; Yang, D.J. Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 1–7.

30. Chandra, S.; Mejia, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3583–3589.
31. Woisky, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* **1998**, *37*, 99–105.
32. Morrison, I.M.; Asiedu, E.A.; Stuchbury, T.; Powell, A.A. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Ann. Bot. Lond.* **1995**, *76*, 287–290.
33. Sreevidya, N.; Mehrotra, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 1124–1127.
34. Evaristo, I.M.; Leitão, M.C. Identification and quantification by HPLC-DAD, of the phenolic fraction contained in leaves of *Quercus suber* L. *Silva Lusitana* **2001**, *9*, 135–141.
35. Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161–1168.
36. Myrhe, O.; Andersen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1575–1582.
37. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
38. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358.
39. Morabito, F.; Cristani, M.; Saija, A.; Stelitano, C.; Callea, V.; Tomaino, A.; Minciullo, P.L.; Gangemi, S. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediat. Inflamm.* **2004**, *13*, 381–383.

*Sample Availability:* Samples of the compounds are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**MANUSCRITO 1*****In Vitro* Evaluation of the Antimicrobial and Antimycobacterial Activities of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. Leaves**

Marina Zadra, Mariana Piana, Aline Augusti Boligon, Thiele Faccim de Brum, Luana Rossato, Tanise Dalmolin, Sydney Hartz Alves, Marli Matiko Anraku de Campos, Margareth Linde Athayde.

## ***In Vitro* Evaluation of the Antimicrobial and Antimycobacterial Activities of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. Leaves**

<sup>1</sup>Marina Zadra, <sup>1</sup>Mariana Piana, <sup>1</sup>Aline Augusti Boligon, <sup>1</sup>Thiele Faccim de Brum, <sup>2</sup>Luana Rossato, <sup>2</sup>Sydney Hartz Alves, <sup>3</sup>Tanise Vendruscolo Dalmolin, <sup>3</sup>Marli Matiko Anraku de Campos, <sup>1\*</sup>Margareth Linde Athayde

<sup>1</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Correspondence: Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: margareth@smail.ufsm.br

### **ABSTRACT**

With the emergence of antimicrobial resistance, it becomes necessary to search for new alternatives for the treatment of infectious diseases, and medicinal plants have shown promising results. *Solanum guaraniticum* is a shrub known as jurubeba or false jurubeba that has hepatoprotective and antioxidant activities, used in popular medicine for the treatment of various diseases. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antimycobacterial activities of crude extract, chloroform, ethyl acetate and butanol fractions from its leaves, by broth microdilution method. Good activities were observed for the ethyl acetate fraction against *Staphylococcus intermedius* and *Listeria monocytogenes* (MIC = 64 µg/mL) and for the crude extract against *Micrococcus luteus* (MIC = 32 µg/mL). In general, the extracts showed moderate activity against Gram-positive bacteria, and were inactive against Gram-negative bacteria and fungi. It was also verified considerable activity against *Mycobacterium smegmatis*, mainly by chloroform fraction (MIC = 156 µg/mL). These results are probably due to the good antioxidant activity and to the presence of high contents of polyphenols, tannins and alkaloids, metabolites known to possess antimicrobial activity. Studies aiming the isolation of compounds are necessary in order to know the main component involved in these activities, since the plant has an antimicrobial potential and may prove to be used in the treatment of infectious diseases.

**Keywords:** Antimicrobial, antimycobacterial, jurubeba, polyphenols, *S. guaraniticum*

## 1 INTRODUCTION

Before the advent of modern medicine, people depended essentially of the plants for the treatment of various diseases, and they still have been an important source for the development of new drugs (KUETE et al., 2009). Plants contain large amounts of chemical compounds which can be explored for preventing microbial infections, through different mechanisms (COWAN, 1999; SAVOIA, 2012). Therefore, natural products can be new promising alternatives for the treatment of infectious diseases, taking into account the emergence of antibiotic resistance, and undesirable side effects due to use of synthetic drugs (CUSHNIE and LAMB, 2011).

Tuberculosis (TB) is considered a serious public health problem, taking place among the main infectious diseases (ARRUDA et al., 2012). *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for more human mortality than any other single microbial species (TEKWU et al., 2012). Currently, the treatment of TB involve along course of combination of antibiotics, leading to poor patient compliance, moreover, the multidrug resistance is also a problem. Thus, the discovery of new antituberculosis agents is urgent and, in this sense, various extracts and isolated compounds from plants have been tested with great results (GAUTAM, SAKLANI and JACHAK, 2007; TAWDE, GACCHE and PUND., 2012; MACABEO et al., 2012).

*Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. (syn. *Solanum fastigiatum* var. *acicularium* Dunal) is a shrub popularly known as jurubeba or false jurubeba, occurring in Paraguay, Argentina and Brazil (SOARES et al., 2008). According to the Brazilian Pharmacopoeia, the species *Solanum paniculatum* L. is recognized as the true jurubeba, and used in folk medicine as a tonic for fevers, anemia, erysipelas, cholagogue, bitter, and eupeptic to treat gastric and liver dysfunctions (MESIA-VELA et al., 2002, SABIR and ROCHA, 2008). Due to the similarities, these two species are used interchangeably by the population. *S. guaraniticum* has hepatoprotective (SABIR and ROCHA, 2008) and antioxidant properties, being detected in the extract of its leaves the presence of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids, very active phenolic compounds (ZADRA et al., 2012).

Several *Solanum* species are cited in the literature to possess antimicrobial activity against fungi, bacteria and mycobacteria (BONTEMPO et al., 2013; BALACHANDRAN et al., 2012, DAS, LAHAN and SRIVASTAVA, 2010; LOZOYA et al., 1992). *S. paniculatum* had activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (LÔBO et al., 2010) but, to the best of our knowledge, no studies concerning the

antimicrobial activity of *S. guaraniticum* have been reported. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antimycobacterial activities of the crude extract (CE), chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (AcOEt) and butanol (BuOH) fractions of the *S. guaraniticum* leaves, against Gram-positive, Gram-negative bacteria, fungi and mycobacteria, by broth microdilution method to achieve the minimum inhibitory concentration (MIC), in order to verify their possible potential in the treatment of infectious diseases.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant material and extractions

*S. guaraniticum* leaves were collected in Guaporé (Rio Grande do Sul, Brazil), on December 2011. A voucher specimen was identified and archived in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria, under the registration number SMDB 13158. The plant material was dried in a stove with controlled temperature, powdered in a knife mill and extracted with ethanol (70%) for 7 days with daily agitation. After filtration, the material was concentrated on rotary evaporator to remove the ethanol and obtaining the aqueous extract, which was successively fractionated with solvents of increasing polarity, chloroform, ethyl acetate and n-butanol. The solvent was evaporated to obtain the dried fractions (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt and BuOH, respectively). Part of the aqueous extract was separated and taken to dryness, yielding the crude extract (CE).

### 2.2 Microorganisms tested

CE and fractions were individually tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus intermedius* (clinical isolate), *Streptococcus agalactiae* (clinical isolate), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Listeria monocytogenes* (clinical isolate), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 44373, *Cryptococcus neoformans* (clinical isolate) and *Aspergillus fumigatus* (clinical isolate). For the antimycobacterial assay, was used standard strains of *Mycobacterium avium* LR541CDC, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 and *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 ATCC 700084.



### 2.3 Antibacterial and antifungal assays

The evaluation of antibacterial and antifungal activities was performed by the broth microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M07-A8 (2009) for bacteria, CLSI M27-A3 (2008) for yeasts, and CLSI M38-A2 (2008) for filamentous fungus. Sterile 96-well microdilution plates were used and the tests were conducted in duplicate. Eight concentrations of crude extract and fractions were assessed (1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 and 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Simultaneously, a negative control (without the presence of a microorganism) and a positive control (no antimicrobial agent) were carried out. Inoculate for yeasts were prepared from cultures in Sabouraud agar for 48 h at 30°C. A suspension in sterile saline 0.85% was performed, adjusting turbidity until it was equivalent to the 0.5 McFarland, confirmed by spectrophotometrical reading at 530 nm. The final suspension was obtained by dilution 1:50 in sterile saline, followed by further dilution of 1:20 in RPMI culture medium. For bacterial species, inoculate were obtained from cultures in Mueller-Hinton agar for 24 h at 35°C. Similarly, a suspension whose turbidity was adjusted in the spectrophotometer, at 630 nm, was prepared and diluted 1:10 in Mueller-Hinton broth. The filamentous fungus evaluated in this assay was initially incubated on potato dextrose agar for 7 days at 30°C. The colonies were covered with sterile saline, and the resulting conidial suspension was transferred to a sterile tube, where the density was adjusted. Then, the suspension was diluted 1:50 in RPMI. To the wells of microdilution plates, 200  $\mu\text{L}$  of crude extract or fractions were added, which were diluted in the plate resulting in the different concentrations. For yeasts and filamentous fungus were inoculated 100  $\mu\text{L}$  of suspension, followed by incubation at 30°C for 48 h. For bacteria, 10  $\mu\text{L}$  of suspension were inoculated, and incubated at 35°C for 24 h. Finally was performed the visual reading of microbial growth, and the wells with the lowest extract concentration which there was no microbial growth was considered the minimum inhibitory concentration (MIC).

### 2.4 Antimycobacterial assay

The strains of mycobacteria were grown onto Löwenstein-Jensen medium and incubated for 3-5 days. Suspensions of these cultures were standardized using the scale 0.5 to Mac Farland, diluted in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (Difco Laboratories, Detriod, Mich) and 0.2% glycerol (MD7H9) until the concentration of  $10^5$  CFU/mL. The CE and fractions tested were dissolved in

dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 50 mg/mL and diluted in MD7H9 until the desired concentrations, beginning the series with 2500 µg/mL. Susceptibility tests were performed by the broth microdilution method, according to CLSI M7-A7 (2006). Mycobacterial inoculums (100 µL) were placed in each well of a microdilution plate, as well as the extracts at corresponding concentrations. The test was performed in triplicate. The plates of *M. smegmatis* were incubated for 2 days, *M. avium* for 5 days and *M. tuberculosis* for 7 days at 37°C. In order to verify the growth of microorganisms, the dye 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT- Sigma, USA) was added to each plate well. Then, the lowest extract concentration can produce inhibition of visible growth of microorganisms was considered as MIC.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The activities of the CE and fractions from the *S. guaraniticum* leaves against bacteria and fungi are shown in Table 1. It was considered that if the extracts displayed a MIC less than 100 µg/mL, the antimicrobial activity was good; from 100 to 500 µg/mL the antimicrobial activity was moderate; from 500 to 1000 µg/mL the antimicrobial activity was weak; over 1000 µg/mL the extract was considered inactive (HOLETZ et al., 2002; MORALES et al., 2008). In view of these criteria, it was possible to observe that the extracts were active against Gram-positive bacteria, with variables MICs from 32 to 1024 µg/mL. The AcOEt fraction showed good activity against *Staphylococcus intermedius* and *Listeria monocytogenes*. *Staphylococcus intermedius* is a member of the normal flora of dogs and is also a major opportunistic pathogen responsible for the common canine skin condition pyoderma, and can occasionally cause severe infections of humans (BANNOEHR et al., 2007). The facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes* is associated with serious human and animal infections, including abortion and septicemia. It is considered a pathogen of major concern due to high occurrence in foods and high mortality rate associated with listeriosis (WANG et al., 2013). Probably, these activities are due to highest content of polyphenols found in this fraction, as these metabolites have antimicrobial activity recognized (DAGLIA, 2012), and also by good antioxidant capacity by the DPPH method described previously (ZADRA et al., 2012). Xiong et al. (2013) when performing a screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* leaves found that the phenolic compounds present in the plant extract were responsible for the antibacterial activity shown.

**Table 1.** Minimum inhibitory concentrations (MIC) for CE and fractions of *S. guaraniticum* against bacteria and fungi.

Microorganisms	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	CE	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	BuOH
<b>Gram-positive bacteria</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	256	256	1024	>1024
<i>Staphylococcus intermedius</i>	256	128	64	256
<i>Streptococcus agalactiae</i>	256	128	256	256
<i>Enterococcus faecalis</i>	256	256	256	128
<i>Micrococcus luteus</i>	32	128	512	128
<i>Listeria monocytogenes</i>	128	128	64	512
<b>Gram-negative bacteria</b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	512	>1024	>1024	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	>1024	>1024	>1024
<i>Escherichia coli</i>	>1024	>1024	>1024	>1024
<b>Yeasts</b>				
<i>Candida albicans</i>	1024	>1024	>1024	>1024
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>1024	>1024	>1024	>1024
<b>Filamentous fungi</b>				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>1024	>1024	>1024	>1024

The best activity was found for the CE against *Micrococcus luteus* (MIC = 32  $\mu\text{g/mL}$ ), bacteria that causes minor infections especially in patients with suppressed immune system (BONJAR, 2004), and can be attributed to an interaction between the different components of the extract, such as polyphenols, tannins and alkaloids presented (ZADRA et al., 2012), whose nature is very complex. In general, the CE and fractions showed moderate activity against other Gram-positive strains, including *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus faecalis*, pathogens associated with important diseases of clinical importance.

Concerning the Gram-negative bacteria, only the CE showed a weak activity against *Pseudomonas aeruginosa*, the other extracts were inactive against *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. These results can be explained, at least in part, because beside the efflux pumps, Gram-negative bacteria presents some other characteristic particularities in their outer membrane like the polysaccharides that contributes to cell surface properties, such as membrane permeability and antibiotic susceptibility (MAHLKE et al., 2009). All the extracts were inactive against fungi, both as yeasts *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* and for the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus*.

Mycobacteria are Gram-positive, non-motile and obligate aerobic bacteria. Due to the slow growth rate and pathogenicity of *M. tuberculosis*, many groups utilize faster growing and/or non-pathogenic mycobacteria as the test organism, including *M. smegmatis* and *M. avium* (COPP, 2003; KUETE et al., 2012; BOLIGON et al., 2012). In this study, the antimicrobial activity of the CE and fractions of *S. guaraniticum* was evaluated (Table 2), observing moderate activity for the CE, CHCl<sub>3</sub> and BuOH fractions against *M. smegmatis*, especially the CHCl<sub>3</sub> fraction, which showed the lowest MIC value (156 µg/mL). This activity is probably due to the highest contents of tannins and flavonoids present in the fraction, which also showed the best antioxidant activity assessed by inhibition of lipid and protein oxidation, demonstrating radical scavenging properties (ZADRA et al., 2012). It is well established that the antioxidant activity and phenolic compounds of plant extracts is related to its antimicrobial activity (KATALINIC et al., 2013; KOYSOMBOON et al., 2006; ALVES-SILVA et al., 2013). No significant activity was observed against *M. tuberculosis* and *M. avium*. Similar results were described by Cruz et al. (2012) regarding the activity of *Ficus luschnathiana*, whose butanolic fraction showed MIC value of 156.25 µg/mL for *M. smegmatis*, and was considered a promising antimycobacterial activity.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentrations (MIC) for CE and fractions of *S. guaraniticum* against mycobacteria.

Microorganisms	MIC (µg/mL)			
	CE	CHCl <sub>3</sub>	AcOEt	BuOH
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	>2500	>2500	>2500	>2500
<i>Mycobacterium avium</i>	1250	1250	2500	>2500
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	312	156	2500	312

The solubility property of plant metabolites extracted with solvents of different polarity appears to contribute to the outcome of the antimicrobial assays employed (OTHMAN et al., 2011). Higuchi et al. (2011) carried a bioassay-guided fractionation of the chloroform fraction from *Byrsonima fagifolia* leaves, resulting in the isolation of terpenoids with promising activity against *M. tuberculosis*. In another similar study, the compound methyl caffeate, isolated from the methanolic extract of *Solanum torvum* fruits, presented prominent antimycobacterial activity (BALACHANDRAN et al., 2012).

#### 4 CONCLUSIONS

The results show that the CE and fractions from *S. guaraniticum* leaves possess good activity against *Staphylococcus intermedius*, *Listeria monocytogenes* (AcOEt fraction) and *Micrococcus luteus* (CE), and in most cases, moderate activity against Gram-positive bacteria. Although the CE has shown weak activity against *Pseudomonas aeruginosa*, it can be considered that the extracts were practically inactive against Gram-negative bacteria and inactive for fungi. Moderate activity against *Mycobacterium smegmatis* were observed for CE, BuOH, and especially for the CHCl<sub>3</sub> fraction, which can be attributed to its good antioxidant activity and the highest content of flavonoids, tannins and alkaloids previously described. These findings suggest that *S. guaraniticum* leaves have antimicrobial and antimycobacterial potential and may come to be used primarily to treat diseases associated with Gram-positive bacteria, requiring further studies regarding the isolation of compounds in order to better understand which substances are responsible for these activities.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Thais Scotti do Canto-Dorow (Biology Department of Federal University of Santa Maria) for providing the identification of *S. guaraniticum*, and CAPES and CNPq/Brazil for the financial support.

#### REFERENCES

ALVES-SILVA, J.M. et al. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 371-378, 2013.

ARRUDA, A.L.A. et al. Phytochemical analysis and antimycobacterial activity of methanol extracts from *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 2, p. 276-281, 2012.

BALACHANDRAN, C. et al. Antimicrobial and antimycobacterial activities of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. fruit. **Indian J. Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 676-681, 2012.

BANNOEHR, J. et al. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 23, p. 8685-8692. 2007.

BOLIGON, A.A. et al. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 1, p. 45-52, 2012.

BONJAR, G.H.S. Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. **Asian J. Plant Sci.**, v. 3, n. 1, p. 82-86, 2004.

BONTEMPO, P. et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of *Solanum tuberosum* L. var. Vitelotte. **Food Chem. Toxicol.**, v. 55, p. 304-312. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Seventh edition. CLSI document M7-A7.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Third edition. CLSI document M27-A3.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – Second edition. CLSI document M38-A2.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Eighth edition. CLSI document M07-A8.

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 20, p. 535-557, 2003.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRUZ, R.C. et al. *In vitro* antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves. **Nat. Prod. Res.**, DOI: 10.1080/14786419.2011.650637, 2012.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J., Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 23, p. 174-181, 2012.
- DAS, J.; LAHAN, J.P.; SRIVASTAVA, R.B. *Solanum melongena*: A potential source of antifungal agent. **Indian J. Microbiol.**, v. 50, p. 62-69, 2010.
- GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S.M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, n. 2, p. 100-234, 2007.
- HIGUCHI, C.T. et al. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2011, p. 128349-128353, 2011.
- HOLETZ, F.B., et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- KATALINIC, V. et al. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. **Int. J. Food Prop.**, v. 16, n. 1, p. 45-60, 2013.
- KOYSOMBOON, S. et al. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 1034-1040, 2006.
- KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, n. 3, p. 551-555, 2009.
- KUETE, V. et al. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*. **BMC Complem. Altern. M.**, v. 12, p. 228-235, 2012.
- LÔBO, K.M.S. et al. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical prospection of *Solanum paniculatum* Lam. and *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples from the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.
- LOZOYA, X. et al. *Solanum chrysotrichum* (Schldl.) a plant used in Mexico for the treatment of skin mycosis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 127-132, 1992.
- MACABEO, A.P.G. et al. Antitubercular activity of the semi-polar extractives of *Uvaria rufa*. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, p. 777-780, 2012.
- MAHLKE, J.D. et al. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 277-281, 2009.
- MESIA-VELA, S. et al. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 508-514, 2002.
- MORALES, G. et al. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 790-794, 2008.
- OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **J. Microbiol. Methods**, v. 84, n. 2, p. 161-166, 2011.

SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false “Jurubeba”) against paracetamol-induced liver damage in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 2, p. 226-232, 2008.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SOARES, E.L.C. et al. Solanaceae in the Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil. **R. Bras. Biosci.**, v. 6, p. 177-188, 2008.

TAWDE, K.V.; GACCHE, R.N.; PUND, M.M. Evaluation of selected Indian traditional folk medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis* with antioxidant and cytotoxicity study. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 2, p. 685-691, 2012.

TEKWU, E.M. et al. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethnomedically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 374-382, 2012.

WANG, X.M. et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, v. 32, p. 153-158, 2013.

XIONG, J. et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves. **Food Chem.**, v. 138, n. 1, p. 327-333, 2013.

ZADRA, M. et al. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. **Molecules**, v. 17, p. 12560-12574, 2012.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento e a pesquisa dos benefícios de espécies vegetais foram realizados por várias civilizações em todo o mundo. Embora de modo empírico ou intuitivo, com base em descobertas ao acaso, as sociedades antigas utilizavam as plantas para fins terapêuticos e, posteriormente, elas serviram de base para a Botânica, Química e Medicina. Atualmente, observa-se uma tendência de retorno à fitoterapia, atitude recomendada pela OMS, órgão que apóia o estudo e o uso de plantas medicinais regionais como forma de baixar os custos dos programas de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (MENDES et al., 2011).

As potencialidades do uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas, afirmação endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão soluções no reino vegetal, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência (BRASIL, 2009).

A escassez de estudos acerca da falsa jurubeba, *Solanum guaraniticum*, aliado ao fato de que esta espécie é comumente confundida com a verdadeira jurubeba (*S. paniculatum*), tradicionalmente utilizada na medicina popular com finalidades terapêuticas, motivou a realização deste estudo, relacionado à avaliação da atividade antioxidante através de diferentes métodos, como o do sequestro do radical DPPH e de ERs através da oxidação da diclorofluoresceína, da inibição da peroxidação lipídica, e também da inibição da carbonilação de proteínas. A quantificação de certas classes de metabólitos, tais como compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos e alcaloides, e a identificação e quantificação de ácidos fenólicos nas diferentes frações, com polaridades distintas, torna possível relacionar as atividades observadas com a composição fitoquímica. Além disso, o potencial antimicrobiano da planta foi avaliado neste estudo, de modo a investigar a capacidade dos diferentes extratos de inibir o crescimento de bactérias, fungos e micobactérias causadores de infecções relevantes.

A quantificação de polifenóis totais no extrato bruto (EB) e frações clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH) seguiu o método descrito por Chandra e Mejia (2004), utilizando como reagente o Folin-Ciocalteu, e ácido gálico (AG) como padrão.

A maior concentração de polifenóis foi encontrada na fração AcOEt, com  $546,54 \pm 2,35$  mg de equivalentes de AG por grama de fração. Este resultado está de acordo com o esquema proposto por Cechinel Filho e Yunes (1998), que afirmam que os compostos fenólicos em geral, quando se trabalha com frações de diferentes polaridades, costumam se concentrar na fração AcOEt. Quanto aos teores de flavonoides, avaliado pelo método do cloreto de alumínio, e utilizando rutina como padrão (WOISKY e SALATINO, 1998) e de taninos, através do método da vanilina, com o padrão catequina (MORRISON et al., 1995), a fração que se destacou, com os maiores teores em ambos os casos, foi a  $\text{CHCl}_3$ , com  $75,73 \pm 0,34$  mg de equivalentes de rutina por grama de fração, e  $56,03 \pm 0,68$  mg de equivalentes de catequina por grama de fração, respectivamente. A presença de alcaloides também foi analisada em todas as frações, seguindo metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003), porém estes apenas foram detectados no EB ( $6,14 \pm 0,06$  mg/g) e fração  $\text{CHCl}_3$  ( $10,79 \pm 0,06$  mg/g), o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela alta frequência de ocorrência de alcaloides esteroidais em plantas do gênero *Solanum*, metabólitos de baixa polaridade.

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e de suas diferentes formas de atuação em organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010). Isso se deve ao fato de que vários oxidantes com diferentes reatividades e seletividades com os substratos estão envolvidos no EO *in vivo*. Por exemplo, a vitamina E é um potente sequestrador de radicais, mas um fraco antioxidante contra a peroxidação lipídica. Carotenoides são fracos sequestradores de radicais, mas podem ser potentes inibidores da oxidação induzida pelo oxigênio singleto. Assim, o dano oxidativo pode ser atenuado não somente por sequestradores de radicais, mas também por remoção de íons metálicos, decomposição do peróxido de hidrogênio e/ou hidroperóxidos, inativando prooxidantes e reparando danos (NIKI e NOGUCHI, 2000).

A capacidade antioxidante *in vitro*, através do método do DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazil) foi realizada para o EB e frações de *S. guaraniticum*, de acordo com o método descrito por Choi e colaboradores (2002). Este é considerado um método fácil, preciso e reprodutivo na avaliação da capacidade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e

substâncias puras. O DPPH é um radical livre estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula, conferindo à solução uma coloração violeta. Este ensaio é baseado na medida da capacidade de uma substância antioxidante em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina e com mudança simultânea da coloração a amarela, medida espectrofotometricamente a 517 nm (VILLANO et al., 2007; ALVES et al., 2010).

A fração AcOEt foi a que apresentou a melhor capacidade antioxidante através deste método, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir o radical DPPH em 50%) de  $9,11 \pm 0,75$  µg/mL, valor significativamente menor do que o IC<sub>50</sub> do padrão ácido ascórbico, que foi de  $15,48 \pm 1,28$  µg/mL. Os valores de IC<sub>50</sub>, neste teste, seguiram a mesma tendência dos teores de polifenóis totais, ou seja, AcOEt > Extrato Bruto > BuOH > CHCl<sub>3</sub>, sugerindo que estes metabólitos tenham sido os maiores responsáveis pela pronunciada capacidade antioxidante da fração AcOEt. De fato, alguns autores têm descrito a existência de uma correlação positiva entre o teor de polifenóis e atividade antioxidante (LU et al., 2011, GONÇALVES et al., 2013; KCHAOU et al., 2013).

De um modo geral, plantas do gênero *Solanum* demonstram boas capacidades antioxidantes. Al-Fatimi e colaboradores (2007) testaram dez espécies de diferentes gêneros frente ao radical DPPH, e verificaram que o extrato de *Solanum nigrum* apresentou a melhor capacidade antioxidante, comparável ao padrão ácido ascórbico. Além disso, a capacidade antioxidante de *S. paniculatum* foi avaliada por Ribeiro e colaboradores (2007), sendo que os extratos etanólico e aquoso apresentaram capacidades equivalentes ao padrão BHT (butilhidroxitolueno), fato que foi atribuído à presença de polifenóis e flavonoides. Em outro estudo, foi avaliada a atividade antioxidante das folhas de *S. surattense* através de testes *in vitro*, como o sequestro de radicais hidroxil e ânion superóxido, de peróxido de hidrogênio e do radical DPPH. Os resultados mostraram remoção de radicais livres eficaz e de maneira dose-dependente em todos os testes, superiores inclusive quando comparados aos padrões analisados, sendo considerada uma atividade antioxidante potente (MURUHAN, SELVARAJ e VISWANATHAN, 2013).

Um método muito utilizado para determinar o estresse oxidativo em células, devido à alta sensibilidade, é o da diclorofluoresceína (DCFH), utilizando sua forma diacetato (DCFH-DA). Quando adicionada às células, DCFH-DA é hidrolisada liberando DCFH que, ao reagir com ERs produzidas pelo metabolismo celular normal, forma o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), cuja intensidade é medida (ROTA, CHIGNELL e MASON, 1999; BONINI et al., 2006). Assim, na presença de substâncias antioxidantes, estas reagem preferencialmente com as ERs neutralizando-as, resultando em menor formação

de DCF e conseqüentemente uma menor intensidade da fluorescência é observada.

O EB e frações de *S. guaraniticum* foram testados em diferentes concentrações, utilizando o sobrenadante do homogeneizado de cérebro de ratos como meio e o ácido ascórbico como padrão. Apenas a fração CHCl<sub>3</sub>, na maior concentração testada (250 µg/mL), foi capaz de reduzir a oxidação da DCFH de modo significativo, o que pode explicar, pelo menos em parte, os excelentes resultados apresentados pela fração na inibição da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas. De modo semelhante, Seo (2010) avaliou a capacidade de remoção de EROs de extratos das flores de *Magnolia denudata* por meio do ensaio da DCFH-DA, utilizando a linhagem celular HT1080 (fibrosarcoma humano). Os extratos metanólico, diclorometânico, hexânico e butanólico inibiram a geração de EROs no sistema celular de maneira dose-dependente, sendo considerado um antioxidante potencial.

O dano oxidativo a macromoléculas biológicas é reconhecido como um importante desencadeante de doenças inflamatórias. Lipídios poli-insaturados são suscetíveis a uma ampla variedade de oxidantes, e há um grande interesse na capacidade de detectar e medir as concentrações de produtos que atuam como marcadores de estresse oxidativo (SPICKETT et al., 2010). De modo a avaliar o efeito de inibição da peroxidação lipídica pelo EB e frações, foi realizado o teste do TBARS, que se baseia na medida espectrofotométrica de um subproduto da peroxidação lipídica, o MDA. O dano oxidativo é estimulado por adição de FeSO<sub>4</sub> às amostras de cérebro de ratos, de acordo com metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), e a atividade protetora exercida pode ser então mensurada. Apesar de todos os extratos terem reduzido a formação de MDA de modo significativo, a fração CHCl<sub>3</sub> exerceu este efeito mesmo na menor concentração testada. Provavelmente, esta atividade se deve as maiores quantidades de flavonoides, taninos e alcaloides encontrados na fração, embora na análise por CLAE tenha sido possível identificar apenas pequenas quantidades de ácidos fenólicos específicos, o que não impede que outros polifenóis que não foram investigados tenham sido os responsáveis pela atividade.

A inibição da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas são propriedades fundamentais de compostos antioxidantes, uma vez que estes poderão inibir e/ou impedir a progressão de uma série de doenças relacionadas ao EO. Reações de radicais livres com as cadeias laterais de lisina, arginina, prolina, treonina e ácido glutâmico levam à formação de derivados carbonílicos, resultando em dano muitas vezes irreversível, com perda da função da proteína. Além disso, aldeídos como o 4-hidroxi-2-nonenal ou MDA produzidos durante a peroxidação lipídica podem ser incorporados em proteínas originando os mesmos derivados. Estas proteínas carboniladas podem então ser degradadas ou recuperadas, não ocasionando

danos ou, ainda, podem ser acumuladas conduzindo à morte celular por necrose ou apoptose, originando processos patológicos (MAHESHWARI et al., 2011; DALLE-DONE et al., 2006).

A capacidade de inibição da oxidação de proteínas pelo EB e frações foi avaliada através da quantificação de grupamentos carbonil em proteínas, pelo método descrito por Morabito e colaboradores (2004), utilizando soro humano e dano induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tanto o EB quanto as frações foram capazes de reduzir o conteúdo de proteína carbonil significativamente em relação ao controle induzido, de maneira dose-dependente. Contudo, mais uma vez a fração CHCl<sub>3</sub> demonstrou a melhor atividade, revertendo completamente o dano causado, não apresentando diferença significativa com relação ao ácido ascórbico, um antioxidante tradicionalmente reconhecido.

A fim de identificar e quantificar os prováveis compostos fenólicos envolvidos na atividade antioxidante da planta foi realizado a análise de perfil cromatográfico por CLAE, através de metodologia descrita por Evaristo e Leitão (2001). A presença dos compostos fenólicos ácido cafeico (AC), ácido clorogênico (ACG) e ácido rosmarínico (AR) foi investigada, através de comparação do tempo de retenção dos compostos, e também por comparação do espectro de absorção apresentado com o dos respectivos padrões. Já a quantificação das substâncias encontradas se deu através do método do padrão externo, com a confecção de curvas padrão.

O perfil cromatográfico de *S. guaraniticum* revelou a presença dos três ácidos fenólicos (AC, ACG e AR), cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 3. AR e ACG são ésteres do AC amplamente encontrados no reino vegetal, provavelmente acumulados como compostos de defesa (PETERSEN et al., 2009). O composto majoritário determinado neste estudo foi o AR, encontrado principalmente no EB ( $51.92 \pm 5,58$  mg/g) e fração BuOH ( $54.79 \pm 4,1$  mg/g), em quantidades bastante significativas.

Numerosas atividades farmacológicas e biológicas são descritas para o AR, tais como ação antioxidante (WU, HWANG e CHO, 2011), antimicrobiana (PETERSEN, 2013, SOVA, 2012), anticarcinogênica (YESIL-CELIK TAS et al., 2010), neuroprotetora em modelo animal de doença de Parkinson (WANG et al., 2012). Estudo recente mostra que o AR é capaz atravessar membranas espontaneamente e inibir a peroxidação lipídica *in situ* (FADEL, KIRAT e MORANDAT, 2011), e sua presença nas folhas de *S. guaraniticum* pode justificar os excelentes resultados obtidos no teste de TBARS. Além disso, em outro estudo foi demonstrado que a combinação de AR com AC apresenta efeito protetor aditivo contra dano hepático em ratos, induzido por hidroperóxido (YANG et al., 2013). Estes dois compostos estão presentes em *S. guaraniticum*, fato que pode auxiliar na compreensão da atividade

hepatoprotetora já comprovada para o extrato, seu principal uso popular (SABIR e ROCHA, 2008).

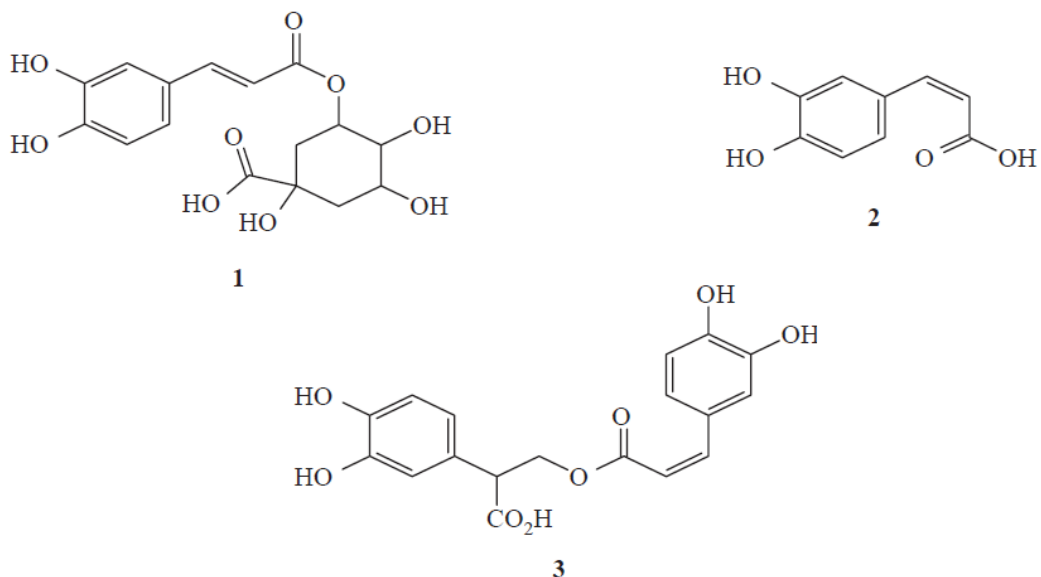


Figura 3. Estruturas químicas dos ácidos fenólicos identificados e quantificados por CLAE-DAD nas folhas de *S. guaraniticum*. (1) ácido clorogênico, (2) ácido cafeico e (3) ácido rosmarínico.

Embora tenha sido encontrado em pequenas quantidades no EB ( $1,80 \pm 0,15$  mg/g) e fração BuOH ( $0,45 \pm 0,2$  mg/g), AC provavelmente contribuiu para a atividade antioxidante apresentada, pois é eficaz na remoção de radicais livres, na inibição da peroxidação lipídica e na quelatação de metais (GÜLÇIN, 2006). Entre outras diversas atividades biológicas descritas, pode-se destacar a antimicrobiana (FU et al., 2010; LEE e LEE, 2010).

ACG foi identificado no EB e em todas as frações, porém em maior quantidade na fração AcOEt ( $21,55 \pm 0,73$  mg/g). Este importante ácido fenólico demonstrou ter uma série de efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*, tais como a capacidade antioxidante (PCHELKIN, 2003), eliminação de EROs (SOVA, 2012), atividade antimicrobiana (LOU et al., 2011, KARUNANIDHI et al., 2013), efeitos antimutagênico e anticarcinogênico (LI e CHANG, 2005), anti-inflamatório (HEBEDA et al., 2011), possui propriedades protetoras endoteliais, exercendo efeito hipotensor (SUZUKI et al., 2006), também auxilia no metabolismo da glicose e de lipídios, atuando como antidiabético e antilipêmico (ONG, HSU e TAN, 2013, LI et al., 2009). Assim, pode contribuir para a promoção da saúde e proporcionar novas alternativas para a prevenção de doenças crônicas.

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas ainda são uma grande ameaça à saúde pública, apesar dos enormes avanços da medicina. Pesquisas de novas substâncias antimicrobianas devem ser realizadas, e todas as estratégias possíveis devem ser exploradas. Produtos naturais ainda são as principais fontes de novos agentes terapêuticos, inclusive para doenças infecciosas (COS et al., 2006). Assim, tendo em vista que espécies do gênero *Solanum* possuem atividade antimicrobiana, que não há dados disponíveis na literatura a respeito de *S. guaraniticum*, e que os três ácidos fenólicos identificados e quantificados nas folhas da planta possuem atividades antimicrobianas descritas, motivou-se a avaliação da atividade de seus extratos em estudo frente a bactérias, fungos e micobactérias. Para isso, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, que considera a relação entre a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano no meio de cultura e a concentração do extrato analisado, fornecendo resultados quantitativos, ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY et al., 2008).

Neste estudo, os valores de CIM para o EB e frações variaram de 32-1024 µg/mL para bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Listeria monocytogenes*. No geral, os extratos demonstraram moderadas atividades contra estas bactérias, destacando-se as melhores atividades apresentadas pelo EB contra *M. luteus* (CIM = 32 µg/mL) e a fração AcOEt contra *S. intermedius* e *L. monocytogenes* (CIM = 64 µg/mL, para ambas). Este efeito pode ser atribuído, no caso do EB, a uma interação entre os diferentes metabólitos presentes em sua composição, que é bastante complexa. Já a boa atividade encontrada para a fração AcOEt deve-se provavelmente ao alto conteúdo de polifenóis presentes, e principalmente ao ACG, encontrado em maior quantidade na fração por análise cromatográfica. As bactérias utilizadas neste ensaio muitas vezes estão associadas a doenças de importância clínica, como por exemplo, *S. aureus* pode causar desde uma infecção cutânea simples, como foliculite e furúnculo ou, em casos mais graves, pneumonia, meningite, artrite e septicemia (SANTOS et al., 2007), *S. agalactiae*, apesar de colonizar os tratos intestinal e genitourinário, é reconhecido por contaminação de neonatos, podendo levar a quadros graves de septicemia, pneumonia, meningite, e sequelas neurológicas, visuais ou auditivas (BORGER et al., 2005, FIOLO et al., 2012). A espécie *E. faecalis* está geralmente associada a infecções nosocomiais, e pode ocasionar infecções urinárias e endocardites (PARADELLA, KOGA-ITO e JORGE, 2007). Assim, tem-se a importância de investigar novas alternativas para o tratamento das doenças associadas a estes patógenos, uma vez que a resistência aos antimicrobianos vem se desenvolvendo de forma alarmante.

Quanto à atividade frente a bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, foi possível observar apenas uma fraca atividade do EB contra *P. aeruginosa* (CIM = 512 µg/mL). Os demais extratos não apresentaram atividade significativa (CIM > 1024 µg/mL). De modo semelhante, Martins e colaboradores (2013) ao avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico e frações das folhas de *Larrea tridentata*, observaram que todas as amostras testadas foram visivelmente mais eficazes contra bactérias Gram-positivas comparado a Gram-negativas, e atribuíram este resultado ao fato de que as Gram-negativas são tipicamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos, o que pode ser explicado pela presença de uma barreira de permeabilidade na membrana externa, que limita o acesso destes agentes aos seus alvos na célula bacteriana. Já segundo Loguercio e colaboradores (2005), estas diferenças referentes às atividades de extratos vegetais parecem derivar da constituição da parede celular bacteriana, quimicamente menos complexa em Gram-positivas, e dos constituintes do extrato.

A atividade antifúngica do EB e frações também foi avaliada frente aos fungos leveduriformes *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e frente ao fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*. Contudo, não foi possível observar atividades consideráveis em nenhum caso (CIM > 1024 µg/mL).

Ao longo dos anos, a introdução de medicamentos eficazes revolucionou o tratamento da tuberculose. Mais recentemente, no entanto, a resistência a múltiplas drogas tornou-se uma grande ameaça e, assim, exige uma busca urgente de novos tratamentos para esta doença mortal. Sob este ponto de vista, as plantas podem ser alternativas viáveis, uma vez que possuem compostos tais como alcaloides, flavonas, cumarinas, terpenoides, esteroides, saponinas, polifenóis, entre outros com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies de micobactérias (OKUNADE, ELVIN-LEWIS e LEWIS, 2004). Neste estudo, a atividade antimicobacteriana do EB e frações de *S. guaraniticum* foi testada, frente a *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. smegmatis*, sendo possível observar atividade apenas contra esta última espécie, para o EB e fração BuOH (CIM = 312 µg/mL) e principalmente para a fração CHCl<sub>3</sub> (CIM = 156 µg/mL), que mais uma vez se destaca, como visto para a atividade antioxidante, o que pode ser atribuído à sua composição fitoquímica.

Similarmente, Leite e colaboradores (2008), ao avaliar a atividade antimicobacteriana de diferentes extratos das folhas de *Byrsonima crassa*, verificaram melhor atividade para a fração CHCl<sub>3</sub>, com CIM de 62,5 µg/mL, e sugerem que isto se deva à presença dos triterpenos lupeol, α-amirina e β-amirina identificados. Em outro estudo, Arruda e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos das cascas e folhas do



jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia*), encontrando CIM de 250 µg/mL para ambos os extratos, e esta atividade foi atribuída à presença de compostos fenólicos derivados do verbascosídeo, identificados por CLAE.

Por fim, este estudo mostrou que a fração CHCl<sub>3</sub> foi a que demonstrou os melhores resultados, e deve ser priorizada em estudos referentes a atividades biológicas e isolamento de compostos ativos, uma vez que possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas promissoras.

## 6 CONCLUSÕES

- Na análise das principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *S. guaraniticum*, verificou-se que a fração AcOEt possui as maiores quantidades de polifenóis, enquanto que a fração CHCl<sub>3</sub> apresentou os maiores teores de flavonoides, taninos e alcaloides. Alcaloides foram encontrados apenas no EB e fração CHCl<sub>3</sub>.
- Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH, a fração AcOEt se destacou com o menor IC<sub>50</sub>, demonstrando a melhor capacidade de inibição do radical.
- O EB e frações foram capazes de inibir a peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS, sendo que a fração CHCl<sub>3</sub> apresentou o melhor resultado.
- A oxidação de proteínas no soro, através do ensaio da proteína carbonil, foi reduzida por ação do EB e frações de maneira dose-dependente, porém apenas a fração CHCl<sub>3</sub> reverteu completamente o dano oxidativo.
- Apenas a fração CHCl<sub>3</sub> foi capaz de remover ERs de modo significativo, através do ensaio da DCFH-DA, o que pode explicar, em parte, os bons resultados encontrados para a fração na inibição da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas.
- A análise por CLAE do EB e frações revelou a presença de AC, ACG e AR, ácidos fenólicos bastante ativos, sendo o AR encontrado em maior quantidade, principalmente no EB e fração BuOH.
- Na avaliação da atividade antimicrobiana através de microdiluição em caldo, o EB e frações demonstraram boas atividades contra bactérias Gram-positivas, foram praticamente inativos contra Gram-negativas, e inativos contra fungos. Promissora atividade frente à micobactéria *M. smegmatis* foi encontrada para a fração CHCl<sub>3</sub>.
- As folhas de *S. guaraniticum* possuem pronunciada atividade antioxidante, avaliada por diferentes métodos, bem como apresentam uma atividade antimicrobiana interessante, que merece atenção. Estes resultados incentivam a realização de novos estudos, visando o isolamento dos compostos ativos responsáveis pelas atividades descritas.

## REFERÊNCIAS

- AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.
- AL-REHAILY, A.J. et al. Solanopubamine, a rare steroidal alkaloid from *Solanum schimperianum*: synthesis of some new alkyl and acyl derivatives, their anticancer and antimicrobial evaluation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 67-76, 2013.
- ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BERGER, L.R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 23, p. 826-842, 2009.
- ARRUDA, A.L.A et al. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 276-281, 2012.
- AZEREDO, G.A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.
- BALACHANDRAN, C. et al. Antimicrobial and antimycobacterial activities of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. Fruit. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 676-681, 2012.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BANDEIRA, J.M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BONINI, M.G. et al. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.

BORGER, I.L. et al. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 10, p. 575-579, 2005.

BRANDÃO, M.G.L et al. Traditional uses of American plant species from the 1<sup>st</sup> edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 478-487, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – Série C**, 140p. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicinal (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J.M. **Plantas que ajudam o homem: Guia prático para a época atual**. 5. ed, São Paulo: Cultrix/Pensamento, 1991.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAH, K.F.; MUKO, K.N.; OBOEGBULEM, S.I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. **Fitoterapia**, v. 71, p. 187-189, 2000.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHEN, L.W. et al. Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 1814-1821, 2010.

CHIARINI, F; BARBOZA, G.E.; MARTICORENA, A. Novedades en *Solanum* y *Salpichroa* (Solanaceae) para Sudamerica austral. **Gayana Botanica**, v. 64, n. 1, p. 46-59, 2007.

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

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 6, p. 535-557, 2003.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a strong *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COUTINHO, E.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum* (Solanaceae)**. 2009. 172f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DALLE-DONE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

ELDEEN, I.M.S.; STADEN, J.V. Antimycobacterial activity of some trees used in south African traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 248-254, 2007.

ESSIEN, E.E. et al. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxicity studies on *S. erianthum* and *S. macranthum* essential oils. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p. 474-480, 2012.

EVARISTO, M.A.; LEITÃO, M.C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus súber* L. **Silva Lusitana**, v. 2, n. 9, p. 135-141, 2001.

FADEL, O.; KIRAT, K.E.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2973-2980, 2011.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A.C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIOLO, K. et al. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 12, p. 544-549, 2012.

FU, J. et al. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2638-2643, 2010.

GARCÍA, A. et al. Recent advances in antitubercular natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 1-23, 2012.

GARCIA, F.M. **Monitoração da atividade espasmolítica de produtos obtidos de *Solanum asperum* RICH (Solanaceae)**. 2007. 105f. Dissertação (Programa de pós-graduação de produtos naturais e sintéticos bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, M.C.R. et al. Berinjela (*Solanum melongena* L.): Mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p.252-257, 2006.

GONÇALVES, S. et al. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 465-471, 2013.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 169-174, 2009.

GUARANÁ, E.L.S. et al. Intoxicação por *Solanum paniculatum* (Solanaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 59-64, 2011.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213-220, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HAMINIUK, C.I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023-2044, 2012.

HEBEDA, C.B. et al. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 261-269, 2011.

HEINECKE, J.W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1090-1101, 2002.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

KARUNANIDHI, A. et al. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. **BioMed Research International**, art. n.º. 392058, p. 1-7, 2013.

KCHAOU, W. et al. Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 262-269, 2013.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo III. 2. ed. São Paulo: BASF, 2000.

LEE, O.H.; LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3751-3754, 2010.

LEITE, C.Q.F. et al. Antimycobacterial activity of *Byrsonima crassa* Nied leaf extracts. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 63-66, 2008.

LI, S.Y. CHANG, C.Q. Biological effects of chlorogenic acid and body health. **Journal of Hygiene Research**, v. 34, n. 6, p. 762-764, 2005.

LI, S.Y. et al. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  in Golden hamsters fed on high fat diet. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, p. 122-129, 2009.

LI, J. et al. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. **Brain Research**, v. 1328, p. 152-161, 2010.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LÔBO, K.M.S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.

LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LOU, Z. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 398-403, 2011.



LOVATTO, P.; GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família *Solanaceae* sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 971-978, 2004.

LOVATTO, P. et al. Desempenho de extratos aquosos de *Solanum fastigiatum* var. *acicularium* Dunal.(*Solanaceae*) no manejo de *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (Hemiptera: Aphididae). **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 5, n. 1, p. 54-60, 2010.

LU, M. et al. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. **Food Research International**, v. 44, p. 530-536, 2011.

LUGT, J.J. et al. Cerebellar cortical degeneration in cattle caused by *Solanum kwebense*. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 225-227, 2010.

MAHESHWARI, D.T. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2422-2428, 2011.

MARTINS, S. et al. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 306-311, 2013.

MATÉS, J.M. et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 11, p. 1649-1665, 2012.

MAYNE, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 933-940, 2003.

MCCURDY, C.R.; SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MELO, C.A.F. et al. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. **Plant Systematics and Evolution**, v. 293, p. 227-235, 2011.

MENDES, L.P.M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 1, p. 21-35, 2001.

MESIA-VELA, S. et al. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 508-514, 2002.

MITJAVILA, M.T.; MORENO, J.J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1113–1122, 2012.

MIZ, R.B. **Estudo filogenético das espécies da seção Torva do gênero *Solanum* L. (Solanaceae) na região sul do Brasil**. 2006. 168f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MOLA, J.L.; ARAUJO, E.R.; MAGALHÃES, G.C. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 460-462, 1997.

MORABITO, F. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. **Mediators of Inflammation**, v. 13, p. 381-383, 2004.

MORRISON, I.M. et al. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. **Annals of Botany**, v. 76, p. 287-290, 1995.

MURUHAN, S.; SELVARAJ, S.; VISWANATHAN, P.K. *In vitro* antioxidant activities of *Solanum surattense* leaf extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 28-34, 2013.

MYRTHRI, R.B. et al. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1452-1463, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NEWTON, A.M.; LAU, C.; WRIGHT, C;W. A review of antimycobacterial natural products. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 303-322, 2000.

NIKI, E.; NOGUCHI, N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? **IUBMB Life**, v.50, p. 323-329, 2000.

NURIT, K. et al. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Solanum paniculatum* L. e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 243-245, 2007.

OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, p. 403-409, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, M.P.F.; LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

ONG, K.W.; HSU, A.; TAN, B.K.H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 1341-1351, 2013.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2007.

PAULOVICH, F.B. et al. Lectin Histochemical Study of Lipopigments Present in the Cerebellum of *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* Intoxicated Cattle. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 49, p. 473-477, 2002.

PCHELKIN, V.P. Natural phenolic and lipophilic complexes of chlorogenic acid. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 34, n. 1, p. 25-27, 2003.

PETERSEN, M. et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1663-1679, 2009.

PETERSEN, M. Rosmarinic acid: new aspects. **Phytochemistry Reviews**, DOI: 10.1007/s11101-013-9282-8, 2013.

PICCIRILLO, C. et al. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from *Ginja cherry* plant. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 562-569, 2013.

PINTO, F.C.L. et al. Glicoalcalóides antifúngicos, flavonóides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

RAMOS, D.F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RECH, R.R. et al. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 183-189, 2006.

RIBEIRO, S.R. et al. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (Solanaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 3, p. 179-183, 2007.

RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A.L.; FERNANDES, C.G. Enfermidades do sistema nervoso dos ruminantes do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 341-348, 1998.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K. Structure of paniculonin A and B, two new spirostane glycosides from *Solanum paniculatum* L. **Chemische Berichte**, v. 101, p. 2450-8, 1968.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Isolation of neochlorogenin and paniculogenin from *Solanum paniculatum* L.: concerning the structure of paniculidin. **Chemische Berichte**, v. 100, p. 1741-52, 1967.

ROTA, C.; CHIGNELL, C.F.; MASON, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 7/8, p. 873-881, 1999.

SABIR, S.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "Jurubeba") against paracetamol-induced liver damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 120, p. 226-232, 2008.

SACCO, J.C. et al. Ministério da Agricultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Departamento de Difusão de Tecnologia. **Ervas daninhas do Brasil. Solanaceae I. Gênero *Solanum* L.** 58p. Jaguariúna, SP, 1985.

SANTOS, A.L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternative to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Jurubine, a novel type of steroidal saponin with (25S)-3b-amino-5a-furostane-22a,26-diol O(26)-b-D-glucopyranoside structure from *Solanum paniculatum* L. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 5997-6002, 1966.

SEO, Y. Antioxidant activity of the chemical constituents from the flower buds of *Magnolia denudata*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 400-406, 2010.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 12-25, 2006.

SILVA, T.M.S. et al. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

SILVA, K.N.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 344-351, 2005.

SILVA, T.M.S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p.35-38, 2007.

SILVEIRA, P.F. et al. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, 1988.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC; 2010.

SINGH, D.D.; SINGH, V. Antimicrobial potential of two *Solanum* species used in folkloric medicine. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 899-902, 2012.

SOARES, E.L.C. et al. A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 177-188, 2008.

SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; MENTZ, L.A. Sinopse taxonômica e chave ilustrada dos gêneros de Solanaceae ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 2, n. 25, p. 346-362, 2011.

SOLORZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, F.C.F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 749-767, 2012.

SPICKETT, C.M. et al. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1172-1202, 2010.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 6, p. 1124-1127, 2003.

STROBEL, N.A. et al. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**, v. 147, p. 191-201, 2011.

SUZUKI, A. et al. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 6, p. 1075-1082, 2006.

TANAKA, J.C.A. et al. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 387-391, 2006.

TEKWU, E.M. et al. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethnomedically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 374-382, 2012.

VALADARES, Y.M. *Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e *Solanum paniculatum* L.: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico. 2009. 324f. Tese (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

VALLI, M. et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2006a.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006b.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 29-33, 2009.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDES, J.M. et al. Cerebellar degeneration in cattle grazing *Solanum bonariense* ("Naranjillo") in Western Uruguay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 299-304, 2006.

VIEIRA, P.M.; SANTOS, S.C.; CHEN-CHEN, L. Assessment of mutagenicity and cytotoxicity of *Solanum paniculatum* L. extracts using in vivo micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 601-606, 2010.

VILLAÑO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. 16p. Embrapa clima temperado. Documento 316. Pelotas, RS, 2010.

VORONTSOVA, M.S.; KNAPP, S. A new species of *Solanum* (Solanaceae) from South Africa related to the cultivated eggplant. **PhytoKeys**, v. 8, p. 1–11, 2012.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid in 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 47, p. 113-119, 2012.

WANYONYI, A.W. et al. Molluscicidal and antimicrobial activity of *Solanum aculeastrum*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 298-301, 2003.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WU, T.T.; HWANG, B.R.; CHO, E.J. Scavenging effect of extract from *Perilla frutescens* and rosmarinic acid from free radical and lipid peroxidation. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 16, p. 224-229, 2011.

YANG, S.Y. et al. The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 92-99, 2013.

YESIL-CELIK TAS, O. et al. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 158-163, 2010.

ZIECH, D. et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334-339, 2010.