

FLÁVIA DE ANDRADE INOUE

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ESTUDO  
FITOQUÍMICO DE EXTRATOS DE FLORES DE *Senna  
macranthera***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

I58a  
2014

Inoue, Flávia Andrade, 1986-

Avaliação de atividades biológicas e estudo fitoquímico de  
extratos de flores de *Senna macranthera* / Flávia Andrade Inoue.  
– Viçosa, MG, 2014.

xiv, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. *Senna macranthera*. 3.  
Antibacteriano. 4. Antioxidante. 5. Crisofanol. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 581.634


FLÁVIA DE ANDRADE INOUE

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ESTUDO  
FITOQUÍMICO DE EXTRATOS DE FLORES DE *Senna  
macranthera***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica  
Agrícola, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2014.

  
João Paulo Viana Leite

  
Alvaro Vianna Novaes de C. Teixeira

  
Marisa Alves Nogueira Diaz  
(Orientadora)

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.*

(Roger Von Oech)

A Deus por me direcionar  
Aos meus pais por me incentivarem  
Ao Pablo, meu amor, por ser minha força  
A minha Sofia por ser meu estímulo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e Nossa Senhora por iluminar o meu caminho e guiar meus passos para realizar este meu sonho; além da força para concluir esta jornada.

Aos meus pais, por serem exemplo de força e coragem, por jamais medirem esforços para me mostrar a importância do conhecimento, além do apoio e ajuda nos momentos de realização deste mestrado. Obrigada pela educação que me foi dada e por sempre confiarem em mim.

Ao meu querido Pablo, por estar ao meu lado durante toda esta caminhada, com toda disposição e boa vontade em me ajudar. Obrigada pela paciência, compreensão e por toda palavra de carinho e incentivo.

A minha amada filha Sofia, que foi o estímulo para que a conclusão do meu mestrado fosse tão proveitosa quanto sua vida.

Ao Filipe Elias, que foi determinante na realização deste Mestrado. Meu agradecimento é pouco para alguém que proporcionou minha entrada, minhas boas notas, e todo conhecimento que obtive em bioquímica. Obrigada Filipe, por ser meu amigo dos momentos difíceis e ter sido solícito a todas minhas ligações e lágrimas. Obrigada pela companhia musical e pelo seu carinho incondicional.

Aos meus colegas de laboratório, agora amigos, Sâmia, Vitor, Raoni, Rafael, Mayara e Fernanda, meus agradecimentos por todo auxílio e ensinamento que vocês me deram, tornando os dias de trabalho em momentos de diversão, mesmo quando a música não agradava, o cruzeiro perdia ou Ubá chovia.

Ao Bruno BG e Paraíba, que foram amigos valiosos, indispensáveis e únicos, não só por rirem da minha cara a cada desespero, por me constranger na frente de outras pessoas, me irritar e me atrapalhar, mas por incrivelmente me acolher, dar bons conselhos e me divertir, tornando os meus estudos muito mais proveitosos.

À Laís e Gustavo Gabiru, pela companhia, carinho, amizade e disposição nos momentos de lazer, de trabalho e de comidas gostosas.

Ao Alisson, Douglas, Hugo, Leticia e Mateus, que me acolheram com todo o carinho, enriqueceram minha pesquisa e me ensinaram o valor dos detalhes envolvidos em uma técnica.

Aos professores João Paulo e Álvaro pelos ensinamentos e receptividade em seus laboratórios.

Ao Dudu que pacientemente tirou todas as minhas dúvidas e sempre foi muito solícito aos meus pedidos.

A Prof.<sup>a</sup> Virgínia, meu agradecimento por ter me apoiado com confiança no meu projeto de pesquisa na ausência física da minha orientadora. Agradeço, pois você

foi o meu porto seguro nos meus momentos de desesperos, dúvidas e incertezas, mesmo quando não havia uma resposta certa para minhas aflições.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Marisa, que esteve à frente deste Mestrado e, mesmo com a distância demonstrou sempre apoio às minhas ideias e me auxiliou em todas minhas necessidades e dúvidas. Agradeço também por sua demonstração de boa liderança, pois um bom líder não é o que segue as regras ou se guia pelos protocolos, mas é capaz de se adaptar a cada pessoa e situação, de forma a auxiliá-la de forma proveitosa e eficaz. Obrigada por sua compreensão, carinho e todos os conselhos de mãe que recebi.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela infra-estrutura que permitiu a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou meus estudos e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – pelo financiamento do projeto de pesquisa derivado dessa dissertação.

À Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora – MG que gentilmente cedeu os micro-organismos responsáveis pela mastite bovina.

## BIOGRAFIA

FLÁVIA DE ANDRADE INOUE, filha de Ademar Yukishigue Inoue e Maria da Consolação Lopes de Andrade, nasceu em Ipatinga – Minas Gerais, em 18 de outubro de 1986.

Em janeiro de 2006, iniciou o curso de Bacharelado em Farmácia Industrial na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) em Diamantina – Minas Gerais, concluindo-o em julho de 2010.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, defendendo a dissertação em fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xi
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	xii
<b>Resumo</b> .....	xiii
<b>Abstract</b> .....	xiv
<b>Introdução Geral</b> .....	1
<b>Objetivo Geral do Trabalho</b> .....	4
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	5
<b>Capítulo 1</b> .....	7
<b>1. Introdução</b> .....	8
1.1. Revisão de Literatura.....	8
1.1.1 Produtos Naturais.....	8
1.1.2. Gênero Senna.....	9
1.1.3. <i>Senna macranthera</i> .....	10
1.1.4. Produtos naturais e seu potencial antioxidante.....	12
1.1.5. Uso de extratos vegetais na terapêutica de micro-organismos patogênicos	13
1.1.6. Incidência do câncer e produtos naturais.....	14
1.1.7. Lipossomos.....	16
<b>2. Objetivos</b> .....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	19
3.1. Material Vegetal.....	19
3.2. Obtenção dos Extratos de <i>Senna macranthera</i> .....	19
3.3. Bioensaio para Atividade Antibacteriana.....	20
3.3.1. Micro-organismo Indicador.....	20
3.3.2. Preparo dos Micro-organismos Indicadores.....	20
3.3.3. Preparo das Soluções dos Extratos e do Controle Positivo.....	20
3.3.4. Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	20
3.3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	21
3.4. Bioensaio de Peroxidação em Lipossomos - TBA.....	21
3.5. Bioensaio para Atividade Antitumoral.....	22
3.5.1. Cultivo Celular.....	22
3.5.2. Teste de concentração de células por poço.....	23
3.5.3. Teste com DMSO.....	23
3.5.4. Atividade Citotóxica Medida pelo Ensaio do MTT.....	23
3.6. Obtenção dos Lipossomos do Extrato de Acetato de Etila.....	24
3.6.1. Preparo dos Lipossomos.....	24
3.6.2. Avaliação dos Lipossomos.....	24
3.6.2.1. Técnica de Espalhamento de Luz.....	24
3.7. Estudo Estatístico.....	25
<b>4. Resultados e Discussões</b> .....	26
4.1. Obtenção dos Extratos.....	26
4.2. Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	26
4.2.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
4.3. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	35
4.4. Avaliação da Atividade Antitumoral.....	38
4.5. Avaliação dos Lipossomos.....	39
4.5.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (Vesícula de Lecitina).....	39
4.5.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (Vesícula de Extrato Acetato de Etila).....	41
<b>5. Conclusões</b> .....	44
<b>6. Referências</b> .....	45

<b>Capítulo 2</b> .....	51
<b>1. Introdução</b> .....	52
1.1 Quínonas.....	53
1.2 Antraquinonas.....	55
<b>2. Objetivos</b> .....	56
2.1. Objetivo Geral.....	56
2.2. Objetivos Específicos.....	56
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	57
3.1. Prospecção fitoquímica.....	57
3.2. Purificação do Extrato Ativo de Acetato de Etila.....	58
3.3. Elucidação Estrutural.....	59
<b>4. Resultados e Discussões</b> .....	60
4.1. Prospecção fitoquímica.....	60
4.2. Purificação do Extrato de Acetato de Etila.....	61
4.3. Elucidação Estrutural.....	63
4.3.1. Fração F <sub>4.2</sub> .....	63
4.3.2. Amostras 4 e 5.....	67
<b>5. Conclusões Gerais</b> .....	68
<b>6. Referências</b> .....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 1</b> .....	7
<b>Figura 1.</b> Fotos de <i>Senna macranthera</i> .....	11
<b>Figura 2.</b> Fluxograma para obtenção dos extratos vegetais.....	19
<b>Figura 3.</b> Resultados do teste antibacteriano dos extratos <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico frente às cepas de <i>S. aureus</i> 582 (A), 680 (B), 681(C) e 2221 (D). O teste foi realizado em triplicata. <b>Nota: C+</b> : controle positivo (Ampicilina). <b>C-</b> : controle negativo (DMSO).....	27
<b>Figura 4.</b> Resultados do teste antibacteriano dos extratos <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico frente as cepas de <i>S. aureus</i> 3828 (A), 4006 (B), 4075 (C) e 4125 (D). O teste foi realizado em triplicata. <b>Nota: C+</b> : controle positivo (Ampicilina). <b>C-</b> : controle negativo (DMSO).....	27
<b>Figura 5.</b> Resultados do teste antibacteriano dos extratos <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico frente as cepas de <i>S. aureus</i> 4163 (A), 4182 (B), 4652 (C) e <i>S. agalactiae</i> 3849 (D). O teste foi realizado em triplicata. <b>Nota: C+</b> : controle positivo (Ampicilina). <b>C-</b> : controle negativo (DMSO).....	28
<b>Figura 6.</b> Percentagem da ação antibacteriana para ESE, ESA, ESC, ESD e ESH e os controles positivo (AMP) e negativo (DMSO). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$ . <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico.....	33
<b>Figura 7.</b> Percentagem da ação antibacteriana para ESE, ESA, ESC, ESD e ESH e os controles positivo (AMP) e negativo (DMSO). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$ . <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico.....	34
<b>Figura 8.</b> Percentagem da ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para BHT, ESE, ESA, ESC, ESD, ESH e o controle negativo usado no teste. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$ . DMSO – controle negativo Dimetilsulfóxido, BHT – padrão sintético butil-hidroxitolueno, <b>ESE</b> - Extrato Etanólico, <b>ESA</b> – Extrato Acetato de Etila, <b>ESD</b> – Extrato Diclorometânico, <b>ESC</b> – Extrato Clorofórmico, <b>ESH</b> – Extrato Hexânico.....	36
<b>Figura 9.</b> Atividade Citotóxica do DMSO.....	38
<b>Figura 10.</b> Resultado da análise de amostras contendo lipossomos após adição de SDS.....	40
<b>Figura 11.</b> Resultado do comportamento de uma amostra contendo lipossomos após adição de SDS.....	41

<b>Figura 12.</b> Decaimento G (função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada) com o tempo.....	42
<b>Figura 13.</b> Resultado da análise das estruturas dos lipossomos.....	43
<b>Capítulo 2</b> .....	51
<b>Figura 1.</b> Núcleo fundamental de uma quinona.....	53
<b>Figura 2.</b> Antraquinonas isoladas da raiz de <i>Senna macranthera</i> .....	55
<b>Figura 3.</b> Purificação do extrato de Acetato de Etila.....	58
<b>Figura 4.</b> Obtenção das frações do extrato de Acetato de Etila por cromatografia em camada preparativa.....	61
<b>Figura 5.</b> Purificação da Fração 4 do extrato de Acetato de Etila.....	62
<b>Figura 6.</b> Purificação da fração F <sub>4.1</sub> e F <sub>4.3</sub> do extrato de Acetato de Etila.....	63
<b>Figura 7.</b> Espectro de massas do composto F <sub>4.2</sub> .....	63
<b>Figura 8.</b> Possíveis fragmentações da fração F <sub>4.2</sub> .....	64
<b>Figura 9.</b> Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de <sup>1</sup> H da fração F <sub>4.2</sub> .....	65
<b>Figura 10.</b> Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de <sup>13</sup> C da fração F <sub>4.2</sub> .....	67
<b>Figura 11.</b> Estrutura do Crisofanol.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1</b> .....	7
<b>Tabela 1.</b> Rendimento em percentagem dos extratos de flores de <i>Senna macranthera</i> .....	26
<b>Tabela 2.</b> Resultado da atividade antibacteriana extratos de flores de <i>Senna macranthera</i> frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> 582, 680, 681, 2221, 3828, 4006 expressa pela média em milímetros do halo de inibição ± desvio padrão, percentagem de ação antibacteriana ± desvio padrão em relação ao controle positivo ampicilina (valor entre parênteses) e comparação entre as médias obtidas pela percentagem de inibição bacteriana pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	29
<b>Tabela 3.</b> Resultado da atividade antibacteriana extratos de flores de <i>Senna macranthera</i> frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> 4075, 4125, 4163, 4182, 4652 e <i>Streptococcus agalactiae</i> 3849 expressa pela média em milímetros do halo de inibição ± desvio padrão, percentagem de ação antibacteriana ± desvio padrão em relação ao controle positivo ampicilina (valor entre parênteses) e comparação entre as médias obtidas pela percentagem de inibição bacteriana pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	30
<b>Tabela 4.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos ativos acetato de etila (ESA) e extrato etanólico (ESE) frente às cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	35
<b>Tabela 5.</b> Resultado da ação antioxidante por peroxidação lipídica dos extratos vegetais de diferentes polaridades de flores de <i>Senna macranthera</i> .....	37
<b>Tabela 6.</b> Resultado da atividade antitumoral do extrato acetato de etila de flores de <i>Senna macranthera</i> .....	39
<b>Capítulo 2</b> .....	51
<b>Tabela 1.</b> Prospecção fitoquímica dos extratos de flores de <i>Senna macranthera</i> .....	58
<b>Tabela 2.</b> Resultados da prospecção fitoquímica, por CCD.....	60
<b>Tabela 3.</b> Relação entre Fração Eluída/Concentração do Eluente do Extrato de Acetato de Etila.....	62
<b>Tabela 4.</b> Relação entre fração/substância isolada de flores de <i>Senna macranthera</i> .....	63
<b>Tabela 5.</b> Deslocamentos químicos para H <sup>1</sup> e C <sup>13</sup> correspondente ao crisofanol em flores de <i>S. macranthera</i> .....	66

## LISTA DE SIGLAS

AAS	Ácido acetil salicílico
AcOEt	Acetato de etila
AMP	Ampicilina
B16F10	Linhagem de melanoma murino
BHI	Caldo infusão de cérebro-coração
BHT	Di-terc-butilmetilfenol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHO	Células de ovário de hamster
CIM	Concentração mínima inibitória
CRA	<i>Cratylia mollis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etileno Diamino tri-acetato
ESA	Extrato de flor de <i>Senna macranthera</i> em acetato de etila
ESC	Extrato de flor de <i>Senna macranthera</i> em clorofórmio
ESD	Extrato de flor de <i>Senna macranthera</i> em diclorometano
ESE	Extrato de flor de <i>Senna macranthera</i> em etanol
ESH	Extrato de flor de <i>Senna macranthera</i> em hexano
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and drug administration
IC50	Dose que inibe 50% do crescimento celular
LB	Lurian Bertani
MH	Müeller Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzido
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
ODS	Octadecilsilano
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Tampão fosfato salina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta

## RESUMO

INOUE, Flávia de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Avaliação da atividade biológica e obtenção de lipossomos contendo extrato de flores de *Senna macranthera*.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz e Virgínia Ramos Pizzolo.

As plantas e os produtos naturais de diversas origens vêm sendo utilizados com finalidades diversas. Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população, poucas têm ação comprovada. Dentre os gêneros de planta empregada na medicina popular e encontrada na farmacopéia brasileira, o gênero *Senna* tem grande importância, com diferentes atividades que vão desde o uso como laxante ao de atividade antibacteriana. Dentro deste gênero, a espécie *Senna macranthera* (fedegoso) é ornamental quando em flor e considerada própria para utilização em arborização urbana. O presente estudo teve como objetivo a avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antitumoral dos extratos obtidos da flor de *Senna macranthera*, a incorporação do extrato ativo em lipossomos, e o isolamento e identificação estrutural do mesmo. A atividade antibacteriana de isolados de mastite bovina foi positiva para os extratos polares, com formação de halo de inibição, sendo que o extrato de acetato de etila apresentou a menor concentração inibitória mínima para as cepas de *S. aureus* e *S. agalactiae*. Os extratos de acetato de etila e de etanol apresentaram atividade antioxidante significativa quando comparados ao padrão sintético BHT a 5% de probabilidade com valores de ação antioxidante acima de 88%. O teste antitumoral, por sua vez, não apresentou boa atividade devido à necessidade de se utilizar grandes concentrações do extrato para causar danos às células citotóxicas. Através da técnica de espalhamento dinâmico de luz verificou-se a formação de lipossomos, sugerindo a incorporação do extrato de acetato de etila devido uma pequena variação do diâmetro (452 nm sem o extrato e 543 nm com) e uma diminuição na intensidade de luz com extrato para um valor igual a 60% do valor sem extrato. A prospecção fitoquímica dos extratos polares sugeriu a presença de geninas e heterosídeos antraquinônicos, nos extratos mais polares. O isolamento e identificação do crisofanol no extrato de acetato de etila corroborou com a prospecção fitoquímica quanto à presença de quinonas.

## ABSTRACT

INOUE, Flavia de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April. 2014. **Evaluation of biological activity and acquisition of liposomes containing extract of flowers of *Senna macranthera*.** Advisor: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisors: Gaspar Muñoz Diaz and Virginia Ramos Pizziolo.

Plants and natural products of several different origins have been utilized for different goals. Among the most utilized medical plants, just a few have efficiency proved and tested. Among the plant types used in the popular medicine and found in the Brazilian pharmacopeia, the genus *Senna* is of great importance, with different activities that range from laxative to antibacterial activity. Within this genus, the species *Senna macranthera* (sicklepod) a tree frequently found in the woods but very used as ornamental tree in urban forestry. The flowering season are from April to June, when it becomes covered with large bright-yellow flowers. The present study aimed to evaluate the antimicrobial, antioxidant and antitumor activity from the crude extracts hexane, dichloromethane ethyl acetate and ethanol obtained of the flower *S. macranthera*, the incorporation of the active crude extract in liposomes, and the isolation and structural identification of anthraquinones. The antibacterial activity against strains isolated from animals with bovine mastitis manifestation was positive for polar crude extracts ethyl acetate and ethanol. The crude extract ethyl acetate showed the lowest minimum inhibitory concentration for *S. aureus* and *S. agalactiae* strains. The crude extracts ethyl acetate and ethanol showed significant antioxidant activity when compared to standard compound BHT a 5 % probability with antioxidant activity values above 88%. The antitumor test, in turn, did not show good activity due to the necessity of using high concentrations of the crude extract to cause damage to cytotoxic cells. Through the technique of dynamic light scattering, we verified the formation of liposomes, suggesting the incorporation of the crude extract ethyl acetate because of a small variation in diameter (452 nm without the extract and 543 nm with it) and a decrease in light intensity with extract in a value equal to 60% of the value without the extract. The phytochemical screening of the crude extracts suggested the presence of aglucones and anthraquinones glycosides, in the polar crude extracts. The isolation and identification of chrysophanol in crude extract ethyl acetate corroborated with the phytochemical screening for the presence of anthraquinones compounds.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A pesquisa etnobotânica, que consiste no estudo do papel tradicional de certas plantas na vida e folclore de determinada raça ou povo, cresceu visivelmente na última década em muitas partes do mundo, em especial na América Latina e, particularmente, em países como México, Colômbia e Brasil. O enfoque dos trabalhos etnobotânicos varia conforme a região onde são realizados. A realidade local de cada país, incluindo os tipos de ecossistemas que abrangem, apresenta forte influência no direcionamento das pesquisas (HAMILTON *et al.* 2003).

A etnobotânica revela o uso histórico e presente da planta a fim de atender a uma ampla variedade de necessidades humanas. Conseqüentemente, as abordagens etnodirigidas têm recebido uma atenção significativa nos últimos anos. Vários estudos têm sido destinados a contribuir para o desenvolvimento desta ferramenta na busca de substâncias naturais com ação terapêutica (RIBEIRO *et al.*, 2005).

A probabilidade de encontrar compostos úteis em plantas por seleção aleatória é baixa (apenas 1 em cada 10.000 plantas exibem atividades promissoras de interesse para os pesquisadores), particularmente em áreas de alta biodiversidade, enquanto levantamentos etnobotânicos contribuíram na descoberta de 74% de todos os medicamentos derivados de plantas (CARVALHO *et al.*, 2008).

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e, estima-se que, cerca de 25% a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo. No contexto do uso de plantas medicinais, a prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos (SILVA *et al.*, 2006; MARLIÉRE *et al.*, 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado, principalmente, pela cultura indígena. É um país rico em biodiversidade, cujo território possui cinco principais biomas continentais, sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga, além de possuir inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (COUTINHO *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, 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 (CALIXTO, 2000; RATES, 2006; VEIGA-JUNIOR, 2008).

Nos anos 60, ocorreu um interesse maior pela fitoterapia nos países desenvolvidos iniciando na Alemanha, França e Reino Unido, e posteriormente difundindo-se para outros países da Europa e América do Norte, e, ao invés de utilizar a infusão, cozimento ou tintura dos fármacos vegetais, passou-se a usar formas farmacêuticas mais elaboradas, como os comprimidos, cápsulas e geléias (CUNHA *et al.*, 2003). Este interesse surgiu, principalmente, devido às populações acreditarem que os fitoterápicos são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados. O que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que avaliam a eficácia e a segurança, assim também como a garantia de qualidade na produção (CALIXTO, 2000; CARVALHO *et al.*, 2008).

Por outro lado, para alguns usuários dos serviços de saúde, as plantas medicinais são vistas, na maioria das vezes, apenas como uma alternativa aos elevados custos dos medicamentos convencionais e não como uma opção terapêutica devido às propriedades curativas das mesmas (NESS *et al.*, 1999). Na perspectiva dos profissionais de saúde, o desconhecimento sobre as indicações e cuidados no uso de plantas medicinais ainda é um problema (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A busca da população, de modo geral, por estas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos. Com o objetivo de minimizar a carência de informações sobre plantas medicinais, pesquisadores de vários campos de conhecimento se agruparam formando equipes multidisciplinares de pesquisadores e, com o apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS) que realiza diversas reuniões internacionais, investigam melhores condições para manter a qualidade, a eficácia e a segurança desses medicamentos (CUNHA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006). As principais ciências envolvidas são a botânica, a química e a farmacologia e, as que estão relacionadas aos costumes, cultura e utilização das plantas são, respectivamente, a antropologia, a agronomia e a biotecnologia (RATES, 2006; CUNHA *et al.*, 2003).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é um passo muito importante. A escolha pode ser feita de várias maneiras através do uso tradicional, dos componentes químicos, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A estratégia mais comum é o uso das fontes naturais na medicina popular, que é conhecida como etnofarmacologia (RATES, 2006; CARLINI, 2003; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). Atualmente, muitas plantas que estão sendo estudadas são capazes de atuar no comportamento, humor, pensamento e sensações, além de sua ação como agentes antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes e antitumorais e o entendimento de seus mecanismos de ação, segurança e a eficácia, é um desafio

para os pesquisadores para a produção de fitofármacos (CARLINI, 2003; CARLINI *et al.*, 2006).

A veiculação dos fármacos constitui a forma mais moderna de administração por proporcionarem proteção, liberação controlada e/ou direcionamento específico. Os fármacos veiculados representam novos medicamentos, por alterarem a farmacocinética em relação aos mesmos fármacos na forma livre ou em formulações convencionais (D'AQUINO *et al.*, 2006; RAWAT *et al.*, 2006).

Entre os sistemas inovadores para transporte de medicamentos atualmente estudados e disponíveis comercialmente, tais como micro e nanopartículas poliméricas e hidrogéis, encontram-se os lipossomos que apresentam como principal característica a mimetização da membrana celular (LASIC, 1993; FRÉZARD *et al.*, 2005).

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais devem-se a presença de substâncias ativas, que precisam ser investigadas e posteriormente isoladas a fim de se ter um conhecimento específico das mesmas (DIAS *et al.*, 2005). Os estudos sobre a constituição química são importantes para estabelecer a identificação das espécies e para estabelecer parâmetros de qualidade. Entretanto, muitas plantas não possuem monografias farmacopéicas (ALVES *et al.*, 2007).

Algumas espécies vegetais apresentam atividades biológicas comprovadas. Porém, para a maioria, inexitem informações quanto ao desenvolvimento de produtos medicamentosos. Um exemplo são as plantas do gênero *Senna*.

## **2. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo o estudo etnodirigido da espécie *Senna macranthera* afim de que fossem identificadas substâncias ativas com ação antibacteriana, antioxidante e/ou antitumoral, proporcionando a descoberta de novos agentes terapêuticos para complementar ou até substituir as formulações convencionais existentes. O estudo foi dividido em dois capítulos para melhor análise dos resultados, sendo eles: Capítulo 1. Avaliar a atividade biológica dos extratos de *Senna macranthera*; e, Capítulo 2. Realizar o estudo químico do extrato ativo.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.

ALVES, S. F. Prospecção fitoquímica e ensaios de pureza de sete plantas medicinais usadas na fitoterapia ayurvédica. **Anais Eletrônicos**, v.4, p.118-128, 2007.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medicinal Biology**, v.33, p.179-189, 2000.

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

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.75, p.501-512, 2003.

CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.690-695, 2006.

CARVALHO, A. C. B; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, v.5, p.77-85, 2004.

CUNHA, P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2003.

D'AQUINO, R.; HARPER, T.; VAS, C. R. Nanobiotechnology: fulfilling the promise of nanomedicine. **Chemical Engineering Progress**, v.102, p.35-37, 2006.

DIAS, A. K. C.; CARDOSO, M. G.; BARBIÉRI, R. S. Avaliação fitoquímica e análise de extratos de *Pellicourearigida* (douradinha) – Um estudo preliminar. **Revista Científica Faminas**, 1, jan-abr. 2005.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v.28, p.511-518, 2005.

HAMILTON, A. C.; SHENGJI, P.; KESSY, J.; KHAN, A. A.; LAGOS-WITTE, S.; SHINWARI, Z. K. The purposes and teaching of Applied Ethnobotany. Godalming, People and Plants working paper. WWF. v.11, 2003.

LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1993.

MARLIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.754-760, 2008.

NESS, J.; SHERMAN, F. T.; PAN, C. X. Alternative medicine: What the data say about common herbal therapies. **Geriatrics**, v.54, p.33-38, 1999.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.466-476, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2006.

RAWAT, M. ET AL. NANOCARRIERS: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.1790-1978, 2006.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.65-70, 2005.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.455-462, 2006.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.447-454, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.308-313, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.464-471, 2008.

## **CAPÍTULO 1**

### **ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Revisão de Literatura

#### 1.1.1 Produtos naturais

Em razão do desenvolvimento da química analítica, e da existência de uma sólida medicina tradicional fundamentada em farmacopéias estabelecidas ao longo de muito tempo, os fármacos são obtidos fundamentalmente, de plantas medicinais.

Neste sentido, podemos indicar os seguintes produtos naturais que foram isolados de plantas medicinais durante o século XIX: emetina (1817), colchicina (1820), quinina (1820), salicina (1827), atropina (1831), morfina (1832), quinidina (1833), codeína (1848), efedrina (1887) (YUNES & FILHO, 2007).

A *Salix alba* foi uma espécie cujas cascas eram usadas para combater a febre e a dor. Em 1828, J. A. Buchner isolou a salicina, que é o glicosídeo do álcool salicílico, como o principal princípio ativo desta planta. Posteriormente, em 1860, Kolbe e Lauteman sintetizaram o ácido salicílico a partir do fenol e seu sal sódico foi usado como fármaco durante muitos anos. Em 1898, Hofman, consegue acetilando o grupo hidroxila de ácido salicílico, um ácido mais fraco, o ácido acetil salicílico (AAS), comumente conhecido como aspirina, o qual se constitui no fármaco mais usado no mundo (BARREIRO, 1991; BARREIRO & FRAGA, 2001)

Toda essa nova forma de obtenção de fármacos foi possibilitada pelo desenvolvimento da química orgânica sintética, especialmente na Alemanha, onde a necessidade de fabricação de corantes para tecidos deu um grande impulso à química sintética. Podemos mencionar ainda a evolução e o desenvolvimento paralelo de técnicas de estudos farmacológicos (NIERO *et al.*, 2003).

Durante o período entre 1900 e 1940, os produtos naturais foram ignorados e até considerados sem muito valor para a química medicinal. No entanto, a partir de 1940, os produtos naturais reapareceram com grande força na produção dos antibióticos. Em 1939 é produzida a penicilina, em 1942 a actinomicina, em 1943 a estreptomicina, em 1947 o cloranfenicol, em 1949 a neomicina e a eritromicina A em 1950 (YUNES & FILHO, 2007).

Em todo este período (1940-1970), a química sintética conseguiu múltiplos fármacos para os mais diversos processos patológicos (CECHINEL *et al.*, 1998; YUNES, 2006). Posteriormente, muitos outros fármacos imprescindíveis foram produzidos, incluindo os importantes agentes anticâncer, como o taxol e alguns derivados (PINTO *et al.*, 2002).

Os fitoterápicos que estão no mercado, apresentariam, segundo evidências da medicina popular, interações sinérgicas de seu efeito terapêutico. Existe, no entanto, poucos estudos clínicos que comprovem este efeito. Mas a combinação de fármacos é

comum em muitos casos, como no tratamento da hipertensão arterial, de infecções, entre outras patologias. O mecanismo de ação de alguns fitoterápicos, que, muitas vezes, dão melhores resultados do que a dose similar de uma substância pura isolada desse é algo ainda não muito bem compreendido pela comunidade científica. Este fato pode ser causado por sinergia, por aumento da biodisponibilidade ou por efeitos somados de várias substâncias, através de interações químicas (YUNES & FILHO, 2007).

### 1.1.2. Gênero *Senna*

O gênero *Senna* pertence à subtribo Cassiinae, que inclui, ainda, os gêneros *Cassia* e *Chamaecrista*, sendo os três, anteriormente, reunidos no gênero *Cassia sensu* Bentham (IRWIN & BARNEY 1982). Nas Américas, o gênero *Senna* possui grande diversidade e ampla distribuição, com cerca de 350 espécies. Nas espécies da subtribo Cassiinae, de maneira geral, e no gênero *Senna* em particular, as flores apresentam anteras heteromorfas e de deiscência poricida. As flores não secretam néctar e a polinização, geralmente, ocorre por abelhas capazes de vibrar os estames para a liberação do pólen, o que caracteriza polinização vibrátil ou “buzz pollination” (BUCHMANN 1983, GOTTSBERGER & SILBERBAUER-GOTTSBERGER 1988). Estes polinizadores são abelhas grandes que conseguem “abraçar” as peças florais e realizar vibrações (GOTTSBERGER & SILBERBAUER-GOTTSBERGER 1988).

Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, o gênero *Senna* é muito frequente, sendo que na região sudeste algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais e na arborização como, por exemplo, *Senna macranthera*, *Casia leptophylla*, *Senna multijuga*. Algumas espécies como *Cassia acutifolia*, *Cassia angustifolia* e *Cassia fistula* são bastante usadas na medicina tradicional como purgativos; outras são usadas na recuperação de áreas degradadas, como é o caso da *S. macranthera* e *S. multijuga*, espécies que propiciam relações ecológicas interespecíficas importantes (LORENZI, 2002).

Segundo Gupta & Singh (1991), espécies do gênero *Senna* são ricas em flavonóides, antraquinonas e polissacarídeos. Também já foram relatados para esse gênero esteroides, alcaloides piperidínicos, isoquinolinas, cromonas, lactonas, estilbenos e triterpenos (ALEMAYEHU & ABEGAZ, 1996; ALEMAYEHU *et al.*, 1998; VALENCIA *et al.*, 2000).

### 1.1.3. *Senna macranthera*

Esta planta, nativa do Brasil (Figura 1), é muito utilizada na arborização de ruas da região sul, devido ao pequeno porte e suas características ornamentais, principalmente devido às flores amarelas.

Essa espécie é vulgarmente conhecida como "manduirana, bolão-de-ouro, chuva-de-ouro, fedegoso, pau-de-ovelha". Cultivada como ornamental e tem sua madeira empregada na carpintaria e como lenha (LORENZI 2002). Ocorre na Venezuela, Equador, Peru e no Brasil desde o Piauí até São Paulo (IRWIN & BARNEBY 1982), sendo cultivada de São Paulo até Rio Grande do Sul.

Após extensa revisão bibliográfica em busca de informações sobre seu potencial farmacológico e caracterização química, verificou-se que já foi isolado de seu endosperma, um polissacarídeo galactomanano constituído de manose e galactose, cujo derivado sulfatado apresentou atividade anticoagulante (PIRES *et al.*, 2001). Também já foi isolada a rubrofusarina, um policetídeo inibidor da topoisomerase II- $\alpha$  humana, importante enzima na replicação do DNA (BRANCO *et al.*, 2008).

A escassez de estudos de *Senna macranthera* instigou a busca de novas ações terapêuticas uma vez que o gênero *Senna* é conhecido pela presença de flavonóides, e antraquinonas, metabólitos secundários, que podem apresentar atividades biológicas.



A



B



C



D



E

**Figura 1.** Fotos de *Senna macranthera*. A: arbusto. B: folhas. C: flores. D: frutos. E: tronco. Fonte: (<http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2012/02/pau-fava-aleluia-senna-macranthera.html>)

#### 1.1.4. Uso de extratos vegetais na terapêutica de micro-organismos patogênicos

Os antibióticos se tornaram disponíveis há mais de meio século, e a sua popularidade rapidamente levou a excesso de uso. Durante a última década, tornou-se claro que os antibióticos estão perdendo sua eficácia com o desenvolvimento da resistência dos patógenos contra eles, um problema agravado pelo fato de que os novos medicamentos demoram a chegar no mercado. Além disso, as bactérias podem adquirir resistência aos medicamentos em uma infinidade de formas, de modo que ficar em torno do problema da resistência não é uma questão simples (AMABILE-CUEVAS, 2003).

Para resolver estas questões, as empresas farmacêuticas têm renovado os esforços para o desenvolvimento de novos antibióticos, que agora é uma questão de urgência, devido ao surgimento de cepas resistentes como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (AMABILE-CUEVAS, 2003).

Os produtos naturais são componentes integrais do compêndio farmacêutico de hoje e fontes fundamentais de diversidade química. Metabólitos secundários assemelham-se estruturalmente aos metabólitos endógenos, podendo ligar-se aos hormônios, moléculas de transdução de sinal ou neurotransmissores e, assim, produzir efeitos medicinais benéficos em seres humanos devido ao seu potencial reconhecimento de locais alvos (PAREKH *et al.*, 2005).

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos pode ser de grande importância em tratamentos terapêuticos e pode ajudar a reduzir o problema destes organismos multirresistentes aos medicamentos. Em um estudo feito com *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a vários antibióticos, o seu crescimento foi inibido em extratos de cravo (*Caryophyllus aromaticus*), jambolão (*Syzygium jambolanum*), romã (*Punica granatum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Além disso, os efeitos sinérgicos de extratos com atividade antimicrobiana, em associação com antibióticos, pode proporcionar uma terapia eficaz contra as bactérias resistentes a drogas. Estas combinações sinérgicas representam uma fonte, em grande parte inexplorada, de novos produtos farmacêuticos, com novos mecanismos de múltiplas ações que pode superar a resistência microbiana.

Dentre as patologias causadas por micro-organismos, a mastite é considerada economicamente a doença mais implacável do gado leiteiro por provocar redução na produção de leite e gastos com medicamentos, principalmente, os antibióticos (HEBERT *et al.*, 2000). Em medicina veterinária, o gênero *Staphylococcus* é o principal agente causador de mastites. Houve um grande emprego de antibióticos no tratamento da mastite, resultando em seleção de cepas resistentes aos mesmos, aumentando o número de casos provocados por outros germes não habitualmente

ligados a esses processos (COSTA *et al.*, 2006). O *Staphylococcus aureus* é comumente associado a infecções crônicas (HEBERT *et al.*, 2000), apresenta alta resistência às condições ambientais adversas, o que o torna um patógeno muito importante. Muitas infecções crônicas estão associadas com o crescimento bacteriano sob a forma de colônias aderentes envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeo, constituindo um biofilme (CUCARELLA *et al.*, 2004). Devido à sua forma agregada, os biofilmes não são susceptíveis à fagocitose e tornam-se resistentes a alguns antibióticos (MONZON *et al.*, 2002).

A terapêutica convencional da mastite bovina é geralmente baseada em antibióticos que não são sempre eficazes devido à resistência bacteriana e demandam investimentos de altos custos com o tratamento. Além disso, seus resíduos podem afetar a saúde humana e interferir nos processos de fermentação na indústria de leite o que tem motivado a busca de novos agentes antimicrobianos e o estudo de produtos naturais de plantas como substitutos de agentes químicos antimicrobianos (PANDIAN *et al.*, 2006).

Neste contexto, os recentes desenvolvimentos no campo da biotecnologia vegetal criaram as ferramentas para a produção de misturas botânicas a um nível de ação terapêutica comparável ao dos compostos da droga pura (GIBBONS, 2003), e por meio da biossíntese e bioengenharia a dependência de grande quantidade de material de planta é reduzida, limitando o esgotamento dos recursos biogenéticos, em florestas (IWU *et al.*, 1994).

#### **1.1.5. Produtos naturais e seu potencial antioxidante**

O mercado global de comércio relacionado com plantas medicinais é estimado em torno de 60 bilhões de dólares por ano e está crescendo a uma taxa de 7% ao ano com ações variadas de países desenvolvidos e em desenvolvimento (MUKHERJEE, 2006; QUETTIER-DELEU *et al.*, 2000;. BAO -NING *et al.*, 2004). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população que vive nos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para as suas necessidades básicas de saúde (WINSTON, 1999). Em quase todos os sistemas tradicionais da medicina, as plantas medicinais desempenham um papel importante. Recentemente, o potencial antioxidante de extratos vegetais tem sido relatado (KRISHNAIAH *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, evidências substanciais têm acumulado e indicado papéis essenciais para espécies reativas de oxigênio e de outros oxidantes que causam numerosas desordens e doenças. As evidências têm chamado a atenção de cientistas e do público, em geral, a uma valorização dos antioxidantes para a prevenção e

tratamento de doenças, como por exemplo, o câncer e a manutenção da saúde humana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes estabilizam ou desativam os radicais livres, inibindo ou retardando a oxidação de outras moléculas, limitando tanto o início ou a propagação de reações em cadeia de oxidação muitas vezes antes de atacar alvos em células biológicas. Embora quase todos os organismos possuam sistemas de defesa antioxidante e de reparo para proteger contra os danos oxidativos, eles não podem impedir completamente a lesão. O interesse em antioxidantes naturais aumentou consideravelmente seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, substituindo antioxidantes sintéticos que são muitas vezes limitados devido a efeitos carcinogênicos (DJERIDANE *et al.*, 2006).

De um modo geral, os antioxidantes são substâncias presentes em concentrações baixas (em comparação com o substrato oxidável), que significativamente retardam ou inibem a oxidação.

Os radicais formados a partir de antioxidantes não propagam a reação oxidativa em cadeia, mas são neutralizados por reação com outros radicais, para formar produtos estáveis ou reciclados por outros antioxidantes.

Dentre os antioxidantes naturais mais conhecidos estão os compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides, ácidos fenólicos), compostos de azoto (alcalóides e derivados de clorofila, aminoácidos e aminas), carotenoides e o ácido ascórbico (WANNES *et al.*, 2010).

#### **1.1.6. Incidência do câncer e produtos naturais**

O câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos economicamente e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Nos últimos anos, o aumento no número de casos de câncer motivou o crescimento do número de pesquisas relacionadas a esse tema (LINDEQUIST *et al.*, 2005).

No Brasil, estima-se que houve mais de 489.270 novos casos de câncer no ano de 2011 (BRASIL, 2009). Também conhecidos como tumores neoplásicos, os tumores malignos são caracterizados pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA *et al.*, 2005), a qual pode romper a membrana basal, atacar e invadir os tecidos circundantes, podendo metastizar (SURESH, 2007). Há algumas limitações no tratamento do câncer com quimioterapia, que em geral provocam vários efeitos tóxicos (SANTOS & ELISABETSKY, 1999). Além disso, os tumores sólidos são geralmente resistentes à quimioterapia, devido à incapacidade de as drogas acessarem as células hipóxicas (OLIVEIRA & ALVES, 2002) e muitos agentes antineoplásicos não serem específicos para células cancerosas, podendo também danificar as células saudáveis,

especialmente aquelas com rotação rápida, tais como células do trato gastrointestinal e imunitário (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, os de mama feminina, próstata, pulmão e estômago, sendo o primeiro, o de maior incidência no Brasil e que representa menor letalidade com exceção do melanoma, enquanto os últimos quatro apresentam maiores taxas de letalidade na população brasileira (SIMPLÍCIO *et al.*, 2001).

Devido aos efeitos colaterais tóxicos e adversos de medicamentos sintéticos observados no mundo a fitoterapia ressurge para melhorar o atendimento das necessidades de saúde presentes e futuras (HARUN-UR-RASHID *et al.*, 2002). O potencial antitumoral de muitos produtos naturais tem sido recentemente investigado utilizando testes *in vitro* e *in vivo* (LINDEQUIST *et al.*, 2005) e vários compostos derivados de plantas já foram aprovados como drogas anticâncer como vinblastina, vincristina, etoposido, teniposido, taxol, taxotere, topotecano e irinotecano. Hoje, mais de 60% dos agentes anticancerígenos utilizados são derivados, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais (CRAGG *et al.*; 1997).

Dessa forma, muitos pacientes com câncer em todo o mundo têm recorrido a terapias alternativas e complementares como tratamento adjuvante em relação ao oficial (radioterapia, quimioterapia e cirurgia), como por exemplo o uso de plantas (CASSILETH & DENG, 2004).

Embora a indústria farmacêutica seja bem sucedida no descobrimento de novos fármacos citotóxicos que são candidatos em potencial para o tratamento do câncer, esta doença causa mais de seis milhões de mortes por ano em todo o mundo e este número continua crescendo (ANDRESEN *et al.*, 2005). A terapia com fármacos antineoplásicos causa toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais. Parte das células cancerígenas tem características muito comuns com as células normais, das quais foram originadas. Deste modo, torna-se difícil encontrar um alvo único contra o qual os fármacos possam ser direcionados. Os efeitos colaterais associados à quimioterapia limitam a dose ou doses cumulativas administradas aos pacientes que podem, entretanto, levar a metástases do tumor e, muitas vezes, o desenvolvimento de resistência contra os fármacos (SAPRA & ALLEN, 2003).

Uma estratégia alternativa para estes inconvenientes é o uso de lipossomos como carreadores de fármacos antineoplásicos, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido, onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Carreadores lipossômicos têm sido aceitos clinicamente no tratamento do câncer, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição dos fármacos antineoplásicos (MAMOT *et al.*, 2003).

### 1.1.7. Lipossomos

A micro e nanotecnologia vêm contribuindo a partir do fornecimento de vários tipos de partículas para a veiculação de fármacos e a promoção da penetração cutânea. Os lipossomos, uma classe de nanoferramenta utilizada para o encapsulamento de compostos ativos a serem utilizados como terapia antitumoral são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (PUISIEUX *et al.*, 1995; EDWARDS & BAEMNER, 2006). Os lipossomos são reconhecidos por terem habilidade facilitadora na permeação de compostos através da pele (KIM *et al.*, 2002).

Nas aplicações tópicas, os lipossomos são capazes de interagir com os lipídios da pele humana, liberando os compostos veiculados na sua estrutura. Em formulações cosméticas, os próprios lipossomos também propiciam o suprimento dos lipídios perdidos da pele e reduzem a perda transepidermal de água (CEVC & BLUME, 1992; KIM *et al.*, 2002). Para o desenvolvimento de formulações de fármacos mais eficazes e estáveis, é preciso que o carreador atravesse a barreira epitelial e seja permeado desde a camada mais superficial até as camadas mais profundas da pele. Dentre esses promotores estão os tensoativos, que interagindo com os lipídios da pele facilitam o transporte intercelular dos compostos através dos poros da pele (CEVEC *et al.*, 1996).

Andrade e colaboradores (2004) constataram que a encapsulação da lectina de *Cratylia mollis* em lipossomos produziu um aumento da atividade antitumoral *in vivo* contra Sarcoma 180 comparando-se com o tratamento com *C. mollis* em solução. Além disso, a análise histopatológica revelou que a encapsulação da *C. mollis* produziu uma redução no efeito hepatotóxico.

A tendência dos lipossomos de serem capturados pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) pode ser uma vantagem no tratamento de variedade de doenças infecciosas intracelulares. Labana e colaboradores (2002) avaliaram a eficácia de lipossomos contendo isoniazida e rifampicina contra a tuberculose com doses de 12 e 10 mg/kg, respectivamente, administrados uma vez por semana em camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados mostraram que a formulação exibiu liberação controlada dos fármacos no plasma durante 5 dias, sendo verificada a presença de fármacos no pulmão, fígado e baço 7 dias após administração. Os resultados mostraram ainda que a formulação diminuiu

significativamente a carga micobacteriana no pulmão, fígado e baço de ratos infectados, comparados com os animais não tratados.

A liberação local de fármacos em doenças cardiovasculares consiste em grande potencial terapêutico. Lestini e colaboradores (2002) modificaram a superfície de lipossomos com peptídeo de ácido aspártico-arginina-glicina para direcionamento para as integrinas GPIIb-IIIa de plaquetas ativadas envolvidas na doença cardiovascular restenose. Os resultados indicaram que os peptídeos foram capazes de direcionar os lipossomos para os receptores expressados nas plaquetas ativadas evitando a agregação plaquetária. Zhang e colaboradores (2010) investigaram a atividade da insulina encapsulada em lipossomos modificados com lectina conjugada na superfície e constataram um efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos após administração oral dos lipossomas contendo insulina (350 IU/kg).

A multidisciplinaridade associada à nanotecnologia farmacêutica (física, química, biologia e farmacologia) resultou no desenvolvimento de lipossomos como sistemas de liberação de fármacos eficazes na terapêutica do câncer e de infecções. A utilidade dos lipossomos foi melhorada seguindo pesquisas básicas que permitiram o aumento da estabilidade e a compreensão das características físicoquímicas e interação com fluídos biológicos.

Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, lipossomas se tornaram potentes carreadores de drogas para vários tipos de terapias, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos tóxicos dos fármacos. Inúmeros trabalhos de desenvolvimento de formulações com objetivo terapêutico para várias doenças relatam a eficácia e a segurança dos tratamentos realizados com formulações lipossômicas, constatando uma grande vantagem em relação aos tratamentos convencionais. Já são comercializadas formulações contendo lipossomos para o tratamento do câncer e infecções sistêmicas por fungos. O aprofundamento das pesquisas irá possibilitar a consolidação de seu uso na terapia gênica e em vacinas (MAMOT *et al.*, 2003).

Os lipossomos representam, também, uma alternativa à terapia convencional baseada no uso de antibióticos para o tratamento da mastite bovina e de drogas antineoplásicas para pacientes que contraíram o câncer do tipo melanoma. O encapsulamento das substâncias ativas presentes nos produtos naturais, neste caso, a *Senna macranthera*, possibilitaria o uso tópico da formulação no úbere do gado leiteiro infectado, bem como o experimento em murinos contendo melanomas. Dessa forma, fez-se necessário o estudo biológico e o estudo químico da espécie *Senna macranthera*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar o potencial antioxidante, antibacteriano e antitumoral de cinco extratos de flores de *Senna macranthera*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Obtenção de extratos de diferentes polaridades de flores de *S. Macranthera*;
- ✓ Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos vegetais pelo método da peroxidação em lipossomos (TBA);
- ✓ Avaliação da atividade antibacteriana pela técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*;
- ✓ Determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
- ✓ Avaliação da atividade antitumoral pelo ensaio do MTT;
- ✓ Obtenção e avaliação de lipossomos do extrato ativo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

O material botânico foi coletado no campus da Universidade Federal de Viçosa no mês de março de 2011 e identificado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Cristina Pinto Garcia, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, estando depositada uma exsicata de nº 39644 no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa.

#### 3.2. Obtenção dos extratos de *Senna macranthera*

As flores coletadas foram separadas e secas em estufa ventilada escura à temperatura de 37°C por 72 horas.

As flores secas (329,6284g) foram adicionadas a frascos de vidro âmbar de 1L sendo submetidas a uma série de maceração empregando-se solventes de polaridades crescentes: diclorometano, hexano, acetato de etila e etanol 98%. O solvente extrator foi mantido em contato com as flores por 72 horas sem agitação, após o qual foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob baixa pressão, obtendo-se, respectivamente, os extratos: ESD, ESH, ESA e ESE. Dessa forma, foi calculado o rendimento em percentagem do extrato seco em relação ao peso da amostra vegetal utilizada para obtenção do extrato. A metodologia de trabalho foi baseada segundo o fluxograma abaixo.



**Figura 2.** Fluxograma para obtenção dos extratos vegetais.

### **3.3. Bioensaio para atividade antibacteriana**

#### **3.3.1. Micro-organismo indicador**

Como micro-organismos indicadores para atividade antibacteriana, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* e uma cepa de *Streptococcus agalactiae*, gentilmente cedidas pela Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora – MG (ATCC 33591), sendo isoladas de mastite bovina

#### **3.3.2. Preparo dos micro-organismos indicadores**

As bactérias a serem testadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3-4 mL de meio LB líquido, previamente esterilizado, e cresceram em estufa *overnight* a 37°C. Simultaneamente, foi preparado o branco para leitura em espectrofotômetro. Após ativação das bactérias, verificou-se se a eficácia do crescimento com a turvação do meio quando comparado ao branco.

Foram transferidos 1 mL do inóculo de cada bactéria e 1 mL do branco para eppendorfs distintos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. O branco foi utilizado para calibrar o aparelho e prosseguir com a leitura da absorção dos meios contendo as bactérias. As amostras que não apresentaram absorvância entre 0,100 a 0,190 foram diluídas em série, até obter a leitura mencionada. Obtida a absorção desejada, realizaram-se duas diluições seriadas 1:10, afim de se obter a concentração de  $10^6$  bactérias/mL para o plaqueamento das bactérias.

#### **3.3.3. Preparo das soluções de extratos e do controle positivo**

Os extratos obtidos, conforme item 3.2, foram pesados com auxílio de uma espátula, em balança analítica e, transferidos para um eppendorf contendo DMSO a uma concentração final de 50 mg/mL. A amostra foi sonicada por 20 minutos para garantir melhor diluição do extrato. Para o controle positivo, soluções do antibiótico ampicilina foram preparadas a uma concentração de 5 mg/mL e armazenadas a -20 °C.

#### **3.3.4. Avaliação da atividade antibacteriana**

A atividade antibacteriana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*. O meio Müeller Hinton previamente autoclavado foi vertido nas placas até a formação de um filme contínuo sobre o fundo de cada placa. Após solidificação do meio foi adicionado o micro-organismo indicador (134 µL de bactérias para cada 20 mL de meio). Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar, e 8-10 µL de extrato vegetal, DMSO (controle negativo) e

ampicilina (5 mg/mL diluído em DMSO, controle positivo) foram adicionados em cada poço separadamente.

As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, *overnight*. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata.

A percentagem da ação antibacteriana dos extratos foi realizada usando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano das doses de extratos avaliadas e o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano do controle positivo (ampicilina), conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ Ação Antibacteriana} = \frac{\text{Halo de Inibição Dose Testada}}{\text{Halo de Inibição Controle Positivo}} \times 100$$

### 3.3.5. Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por diluição em microplaca de 96 poços. Os poços foram preenchidos com 87,5 µL de meio BHI, 10 µL da suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10<sup>6</sup> UFC/mL e 2,5 µL de extrato ESE e ESA que apresentaram atividade biológica a concentrações crescentes (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 2,0 e 3,0 µg/µL). Para controle positivo foram adicionados 2,5 µL de ampicilina e ao controle negativo foram adicionados 2,5 µL de DMSO. A microplaca foi mantida em estufa de crescimento a 37 °C por 24 h. Após incubação por 24 horas, foram adicionados 4 µL do sal MTT (3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium bromido) (2 mg/mL). As microplacas foram incubadas por mais 2 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.4. Bioensaio de Peroxidação em Lipossomos- TBA

A metodologia utilizada para avaliar o efeito antiperoxidativo das plantas foi descrita por Conforti e colaboradores (2002), com algumas modificações. A cada tubo de ensaio, contendo 0,5 mL da solução de lipossomos (10 mM), 2,5 mL de água destilada e 1 mL de ácido ascórbico foram adicionados separadamente: 100 µL dos extratos (0,2 mg/mL) dissolvidos em DMSO, 100 µL de BHT (di-terc-butilmetilfenol) como controle positivo, 100 µL de água como branco e 100 µL de DMSO como controle negativo. A peroxidação lipídica foi induzida adicionando-se 125 µL de cloreto férrico FeCl<sub>3</sub> (0,2 mM) em todos os tubos de ensaio, sendo posteriormente incubados em *shaker* durante 60 minutos a 40 °C. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de ácido tiobarbitúrico TBA (0,375%) em todos os tubos de ensaio sob aquecimento em banho termostático a 80 °C por 15 minutos. Após essa etapa, os tubos foram

centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos, e em seguida foi realizada a leitura do sobrenadante de todas as espécies em espectrofotômetro UV/visível a 532 nm, contra o branco (água, cloreto férrico, ácido ascórbico e TBA). O padrão antioxidante sintético BHT foi testado na mesma concentração das amostras vegetais a fim de ser utilizada como controle positivo para ação antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo utilizada a média das triplicatas para cálculo dos resultados. O índice de peroxidação em TBA foi expresso em termos da porcentagem de inibição de peroxidação de cada extrato.

A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada utilizando a absorvância do controle negativo e a absorvância da amostra de acordo com a expressão algébrica:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{abs. do controle negativo} - \text{abs. da amostra})}{\text{abs. do controle negativo}} \times 100$$

### **3.5. Bioensaio para Atividade Antitumoral**

Os teste para determinação da atividade antitumoral foi realizado com células de melanoma murino B16F10.

As seguintes concentrações de extrato foram utilizadas: 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 160 µg/mL, 320 µg/mL, 640 µg/mL, 1280 µg/mL, 2560 µg/mL. Os antitumorais sintéticos (Arac e VP16) foram usados como controle positivo nas seguintes concentrações: 0,0009 mMolar; 0,002 mMolar; 0,009 mMolar; 0,02 mMolar; 0,09 mMolar; 0,2 mMolar; 0,9 mMolar, para que também fosse determinado o IC<sub>50</sub> deles para este experimento. O controle positivo VP16 foi utilizado neste estudo por ele já ter sido utilizado por Munari e colaboradores (2014) no estudo da atividade antitumoral de um alcalóide de *Solanum lycocarpum* em B16F10. O agente 1-β-D-arabinofuranosilctosina (Arac) foi escolhido por apresentar boa atividade antitumoral contra várias células tumorais humanas (MATSUDA & SASAKI, 2003). Como controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura com as células. A leitura foi feita com MTT em aparelho de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

#### **3.5.1. Cultivo celular**

As linhagens celulares normais (CHO – ovário de hamster chinês) e tumorais (Mewo – melanoma humano) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em frascos de cultivo, a 37°C em estufa umidificada com injeção de CO<sub>2</sub> a 3%. Antes das culturas atingirem a confluência às células foram subcultivadas para ampliação da cultura, sendo lavadas com PBS/EDTA e

tripsinizadas, seguindo a adição de meio + 10% FBS. Logo após, alíquotas desta suspensão foram transferidas para novos frascos.

### **3.5.2. Teste de concentração de células por poço**

Foi determinada, primeiramente, a quantidade ideal de células por poço a ser utilizada no ensaio do MTT (item 3.4.4, pág. 22). Foram colocadas as seguintes concentrações celulares:  $3 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  com meio de cultura incompleto juntamente com 1% de soro fetal bovino. O microscópio invertido foi utilizado para a observação do crescimento celular de 24 a 112 horas. Os testes foram feitos com 4 repetições.

### **3.5.3. Teste com DMSO**

Foi utilizada uma placa de 96 poços preenchidos com células em uma concentração pré-estabelecida, conforme descrito no item 3.4.2 (pág. 21), com meio de cultura incompleto adicionado de 1% de soro fetal bovino. Foram testadas as seguintes concentrações de DMSO: 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2,0%. Todas as concentrações foram avaliadas em quadruplicata. A leitura foi realizada após adição do MTT nos seguintes intervalos de tempo 24, 48, 72 h.

### **3.5.4. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT**

As células em crescimento exponencial foram tripsinizadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços em uma concentração pré-estabelecida segundo o teste de concentração de células por poço (item 3.4.2, pág. 21). Após 48 h o meio foi substituído por meio incompleto e adicionado do extrato de acetato de etila dissolvido em DMSO a uma concentração estabelecida conforme item 3.4.3 (pág. 22), formando uma concentração mãe de 200 mg/mL, em concentrações crescentes de 0,01 mg/mL; 0,02 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,08 mg/mL ; 0,16 mg/mL; 0,32 mg/mL; 0,64 mg/mL; 1,28 mg/mL; 2,56 mg/mL sendo as células incubadas em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Como controle positivo foram utilizados VP16 e Arac, como controle negativo foi utilizado o meio de cultura com as células. A leitura foi feita com MTT em aparelho de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Após este procedimento 50 µL m de sal de tetrazolium (MTT, 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazolium bromido: 0,5mg/mL) foi adicionado às células por 4 h, após intervalos de cultivo de 24, 48 e 72 h. Após as 4h de exposição das células ao MTT, foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 2h. A leitura foi realizada em leitor ELISA a 570 nm e fornecendo os dados para o cálculo da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>).

### 3.6. Obtenção dos Lipossomos do Extrato de Acetato de Etila

#### 3.6.1. Preparo dos lipossomos

O extrato de acetato de etila (ESA) (180 mg) foi solubilizado em 5 mL de clorofórmio P.A. e, em seguida, adicionado a um balão de fundo redondo de 50 mL que continha uma mistura de fosfatidilcolina (542,5 mg) e colesterol (77,5 mg). O balão foi agitado até completa solubilização dos componentes, sendo posteriormente levado ao rotaevaporador, a temperatura de aproximadamente 40 °C por 2 horas. O balão foi colocado no dessecador a vácuo por 24 horas para garantir a completa evaporação do solvente. Após a completa remoção do solvente foram adicionados 2,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5, constituindo assim a fase aquosa. Em seguida algumas pérolas de vidro foram adicionadas ao balão contendo a mistura, sendo levados ao vórtex até o completo desprendimento do filme lipídico aderido às paredes do balão. As pérolas de vidro foram retiradas com o auxílio de uma pinça e o balão foi colocado em repouso por 96 horas sob refrigeração (4°C).

#### 3.6.2. Avaliação dos lipossomos

A avaliação da formação das vesículas de lipossomo contendo o extrato ativo acetato de etila (ESA) foi realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV), utilizando-se o aparelho de Espalhamento de Luz Dinâmico e Estático (Brookhaven) com correlacionador Turbocorr de 522 canais.

A solução que continha os lipossomos, 10 µL, foram diluídos em cerca de 10 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, sendo posteriormente filtrados em filtro de 0,45 µm e submetidos ao aparelho de Espalhamento Dinâmico de Luz.

##### 3.6.2.1. Técnica de espalhamento de luz

Os resultados foram analisados segundo o modelo de cumulantes de 2ª ordem para ajustar a função de auto-correlação temporal da intensidade espalhada  $C(\tau) = \langle I(0).I(\tau) \rangle$ , onde  $I$  é o valor da intensidade espalhada e o símbolo  $\langle \dots \rangle$  é usado para indicar o valor médio. O modelo de cumulantes de 2ª ordem é dado por:

$$C(\tau) = e^{-2Dq^2.\tau + \delta\tau^2}$$

Onde:

$\tau$  = intervalo de tempo;

$q$  = módulo do vetor de espalhamento;

$D$  = coeficiente de difusão;

$\delta$  = termo de polidispersão, que mede o grau da dispersão de tamanhos.

Sendo que:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Onde:

$k_B$  = constante de Boltzmann ( $1,381 \times 10^{23}$  J/K);

$T$  = temperatura;

$\eta$  = viscosidade do meio;

$R_h$  = raio hidrodinâmico.

E:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \text{sen} \frac{\theta}{2}$$

Onde:

$n$  = índice de refração do solvente;

$\lambda$  = comprimento de onda da luz (632,8 nm)

$\theta$  = ângulo de espalhamento.

No presente estudo,  $n$  e  $\eta$  utilizados foram da água pura, o ângulo de espalhamento  $\theta$  foi fixado em  $90^\circ$  e temperatura foi de  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### 3.7. Estudo estatístico

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de médias (teste de Tukey)  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Obtenção dos extratos

Os rendimentos dos extratos obtidos estão contidos na tabela abaixo.

**Tabela 1:** Rendimento em porcentagem dos extratos de flores de *Senna macranthera*.

Solvente Orgânico	*Sigla	Rendimento (%)
Hexano	ESH	2,13
Clorofórmico	ESC	2,64
Diclorometano	ESD	2,14
Acetato de etila	ESA	2,53
Etanol	ESE	20,2

\*Nota: **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico.

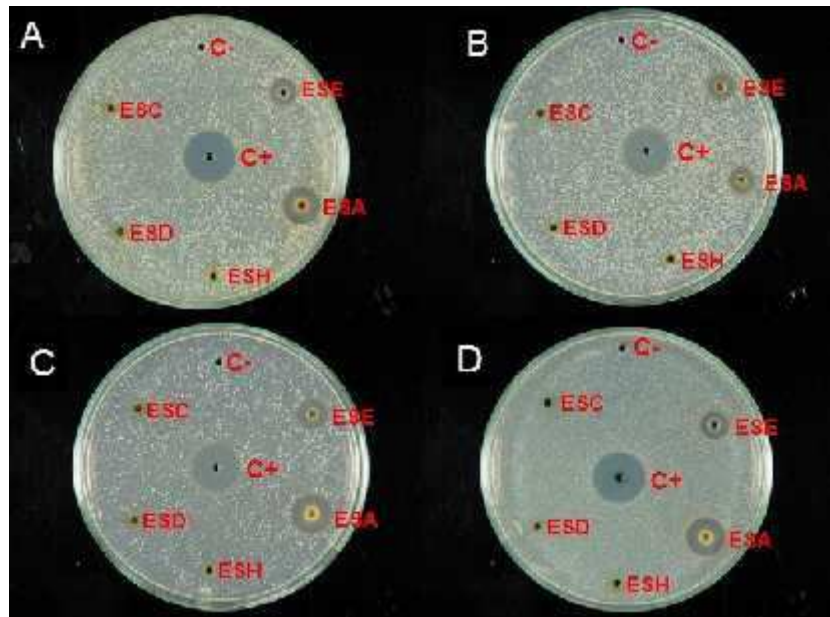
A técnica da maceração seguida pela filtração permite a separação dos componentes estruturais da planta e a extração dos compostos orgânicos presentes nas flores de *Senna macranthera* resultando em um baixo rendimento. Os compostos orgânicos de interesse no presente estudo são os metabólitos secundários, que conferem diversas funções no vegetal, tais como: odor, coloração, sabor, defesa de insetos, entre outros.

O extrato de etanol por apresentar alta polaridade permite a extração dos glicosídeos presentes nas flores, enquanto os solventes extratores de menor polaridade realizam a extração das geninas, resultando em um maior rendimento para o extrato etanólico quando comparado aos demais.

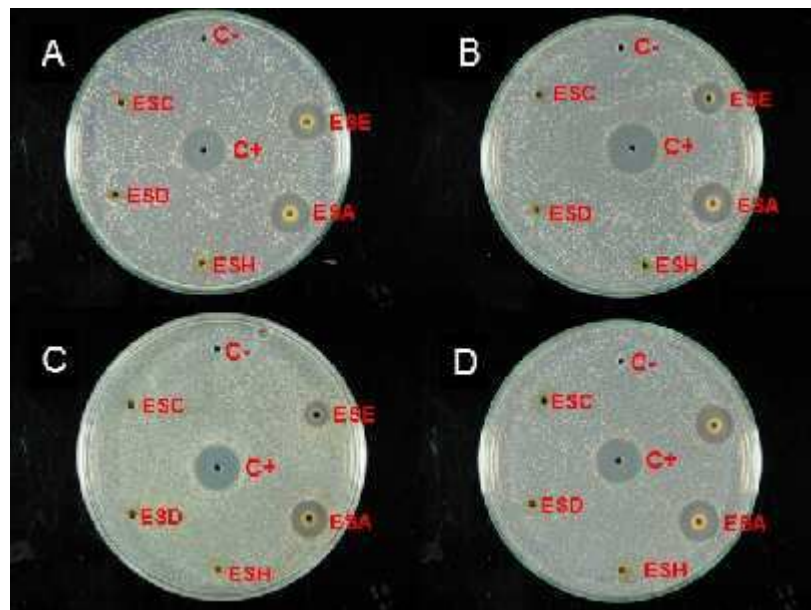
### 4.2. Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliar o potencial antibacteriano dos extratos vegetais, foi utilizado o método de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM), contra doze bactérias isoladas de mastite bovina.

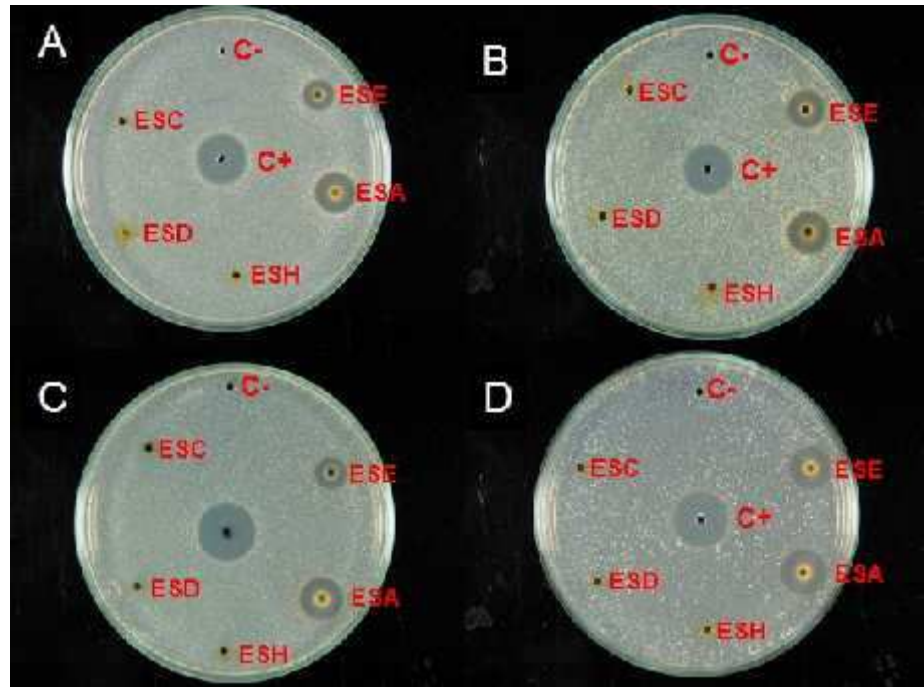
As Figuras 3, 4 e 5 apresentam os resultados dos testes antibacterianos por difusão em ágar para os extratos vegetais **ESE** - Extrato Etanólico; **ESA** – Extrato Acetato de Etila; **ESD** – Extrato Diclorometânico; **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico. Somente os extratos ESE e ESA mostraram atividade antibacteriana frente a todas as cepas de *Staphylococcus aureus* 582, 680, 681, 2221, 3828, 4006, 4075, 4125, 4163, 4182, 4652 e *Streptococcus agalactiae* 3849 utilizadas.



**Figura 3.** Resultados do teste antibacteriano dos extratos **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico frente as cepas de *S. aureus* 582 (A), 680 (B), 681(C) e 2221 (D). O teste foi realizado em triplicata. **Nota:** **C+**: controle positivo (Ampicilina). **C-**: controle negativo (DMSO).



**Figura 4.** Resultados do teste antibacteriano dos extratos **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico frente as cepas de *S. aureus* 3828 (A), 4006 (B), 4075 (C) e 4125 (D). O teste foi realizado em triplicata. **Nota:** **C+**: controle positivo (Ampicilina). **C-**: controle negativo (DMSO).



**Figura 5.** Resultados do teste antibacteriano dos extratos **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico frente as cepas de *S. aureus* 4163 (**A**), 4182 (**B**), 4652 (**C**) e *S. agalactiae* 3849 (**D**). O teste foi realizado em triplicata. **Nota:** **C+**: controle positivo (Ampicilina). **C-**: controle negativo (DMSO).

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados o diâmetro do halo de inibição bacteriana dos extratos ESA e ESE, uma vez que os demais extratos não apresentaram halo de inibição, os controles positivo (AMP) e negativo (DMSO) e, a percentagem de ação antibacteriana dos extratos comparada à ação antibacteriana do controle positivo (ampicilina) ao qual foi atribuído 100% de atividade. As tabelas 2 e 3 apresentam, também, a comparação entre as médias obtidas pela percentagem de inibição bacteriana pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Resultado da atividade antibacteriana extratos de flores de *Senna macranthera* frente às cepas de *Staphylococcus aureus* 582, 680, 681, 2221, 3828, 4006 expressa pela média em milímetros do halo de inibição  $\pm$  desvio padrão, percentagem de ação antibacteriana  $\pm$  desvio padrão em relação ao controle positivo ampicilina (valor entre parênteses) e comparação entre as médias obtidas pela percentagem de inibição bacteriana pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	<i>S. aureus</i> 582	<i>S. aureus</i> 680	<i>S. aureus</i> 681	<i>S. aureus</i> 2221	<i>S. aureus</i> 3828	<i>S. aureus</i> 4006
ESA	11,7 $\pm$ 0,6 (70,1 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup> )	8,7 $\pm$ 0,6 (56,84 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup> )	13,0 $\pm$ 1,0 (73,8 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup> )	11,3 $\pm$ 0,6 (84,4 $\pm$ 13,9 <sup>b</sup> )	11,7 $\pm$ 2,3 (86,8 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup> )	12,3 $\pm$ 1,1 (75,9 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup> )
ESE	9,0 $\pm$ 1,0 (54,2 $\pm$ 7,8 <sup>c</sup> )	8,7 $\pm$ 0,6 (56,84 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup> )	10,7 $\pm$ 1,1 (60,4 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup> )	8,0 $\pm$ 1,7 (58,2 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup> )	8,0 $\pm$ 0,5 (59,1 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup> )	10,0 $\pm$ 0,5 (61,6 $\pm$ 5,6 <sup>c</sup> )
AMP	16,7 $\pm$ 0,6 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )	15,3 $\pm$ 1,1 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )	17,7 $\pm$ 2,1 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )	13,7 $\pm$ 2,3 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )	13,7 $\pm$ 1,5 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )	16,3 $\pm$ 1,5 (100,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup> )
DMSO	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup> )	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup> )	0,0 $\pm$ 0,5 (0,0 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup> )

**Nota:** Letras minúsculas: Médias de percentagem de ação antibacteriana com letras iguais não diferem entre si pelo teste de tukey a  $p < 0,05$ . **AMP:** Ampicilina (controle positivo). **DMSO:** Dimetilsulfóxido (controle negativo). **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico. Cada medida individual tem um erro de 0,5 mm. Os erros apresentados na tabela estão considerando apenas o desvio padrão das três repetições.

**Tabela 3.** Resultado da atividade antibacteriana extratos de flores de *Senna macranthera* frente às cepas de *Staphylococcus aureus* 4075, 4125, 4163, 4182, 4652 e *Streptococcus agalactiae* 3849, expressa pela média em milímetros do halo de inibição ± desvio padrão, percentagem de ação antibacteriana ± desvio padrão em relação ao controle positivo ampicilina (valor entre parênteses) e comparação entre as médias obtidas pela percentagem de inibição bacteriana pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	<i>S.aureus</i> 4075	<i>S.aureus</i> 4125	<i>S.aureus</i> 4163	<i>S.aureus</i> 4182	<i>S.aureus</i> 4652	<i>S. agalactiae</i> 3849
ESA	11,7 ± 1,1 (69,97 ± 5,9 <sup>b</sup> )	14,0 ± 0,5 (91,4 ± 3,4 <sup>ab</sup> )	11,7 ± 0,6 (71,4 ± 13,9 <sup>b</sup> )	12,3 ± 0,6 (90,8 ± 7,9 <sup>a</sup> )	13,0 ± 0,5 (79,7 ± 2,8 <sup>b</sup> )	13,3 ± 0,6 (85,14 ± 3,4 <sup>b</sup> )
ESE	8,3 ± 0,6 (50,0 ± 2,9 <sup>c</sup> )	12,7 ± 1,5 (82,6 ± 10,1 <sup>b</sup> )	8,0 ± 1,0 (49,4 ± 13,9 <sup>c</sup> )	10,3 ± 0,6 (76,0 ± 6,4 <sup>b</sup> )	8,7 ± 0,6 (53,1 ± 3,1 <sup>c</sup> )	12,3 ± 0,6 (78,7 ± 3,3 <sup>c</sup> )
AMP	16,7 ± 0,6 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )	15,3 ± 0,6 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )	16,7 ± 2,5 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )	13,7 ± 1,5 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )	16,3 ± 0,6 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )	15,7 ± 0,6 (100,0 ± 0,0 <sup>a</sup> )
DMSO	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>c</sup> )	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>c</sup> )	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>d</sup> )	0,0 ± 0,5 (0,0 ± 0,0 <sup>d</sup> )

**Nota:** Letras minúsculas: Médias de percentagem de ação antibacteriana com letras iguais não diferem entre si pelo teste de tukey a  $p < 0,05$ . **AMP:** Ampicilina (controle positivo). **DMSO:** Dimetilsulfóxido (controle negativo). **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico. Cada medida individual tem um erro de 0,5 mm. Os erros apresentados na tabela estão considerando apenas o desvio padrão das três repetições.

Segundo Oliveira *et al.* (2008) zonas de inibição menores que 1 mm não apresentam atividade antibacteriana, zonas de inibição entre 2-3 mm apresentam atividade antibacteriana pequena, zona de inibição entre 4-5 mm apresentam atividade antibacteriana moderada, zona de inibição entre 6-9 mm apresentam atividade antimicrobiana alta e zonas de inibição maiores a 9 mm apresentam forte inibição antibacteriana. No presente estudo, os extratos que apresentaram halo de inibição maior que 9 mm foram considerados com potencial ação antibacteriana, sendo avaliada posteriormente a concentração inibitória mínima (CIM) para as cepas que apresentaram atividade.

Dos cinco extratos testados, apenas dois apresentaram halos de inibição de crescimento para as bactérias *S. aureus* e *S. agalactiae*. Nesse sentido, cabe salientar que o diâmetro do halo de inibição está primariamente relacionado à polaridade da substância inibidora. Compostos apolares tendem a difundir menos a partir do ponto de aplicação para o meio de cultura do que compostos polares. Assim, substâncias apolares com grande efeito antibacteriano podem originar halos de inibição pequenos em função da dificuldade encontrada na difusão das moléculas (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991). Esse fator pode ser reduzido pela diluição dos extratos em DMSO, pois é esperado que tanto o DMSO, quanto os produtos naturais se difundam para o ágar.

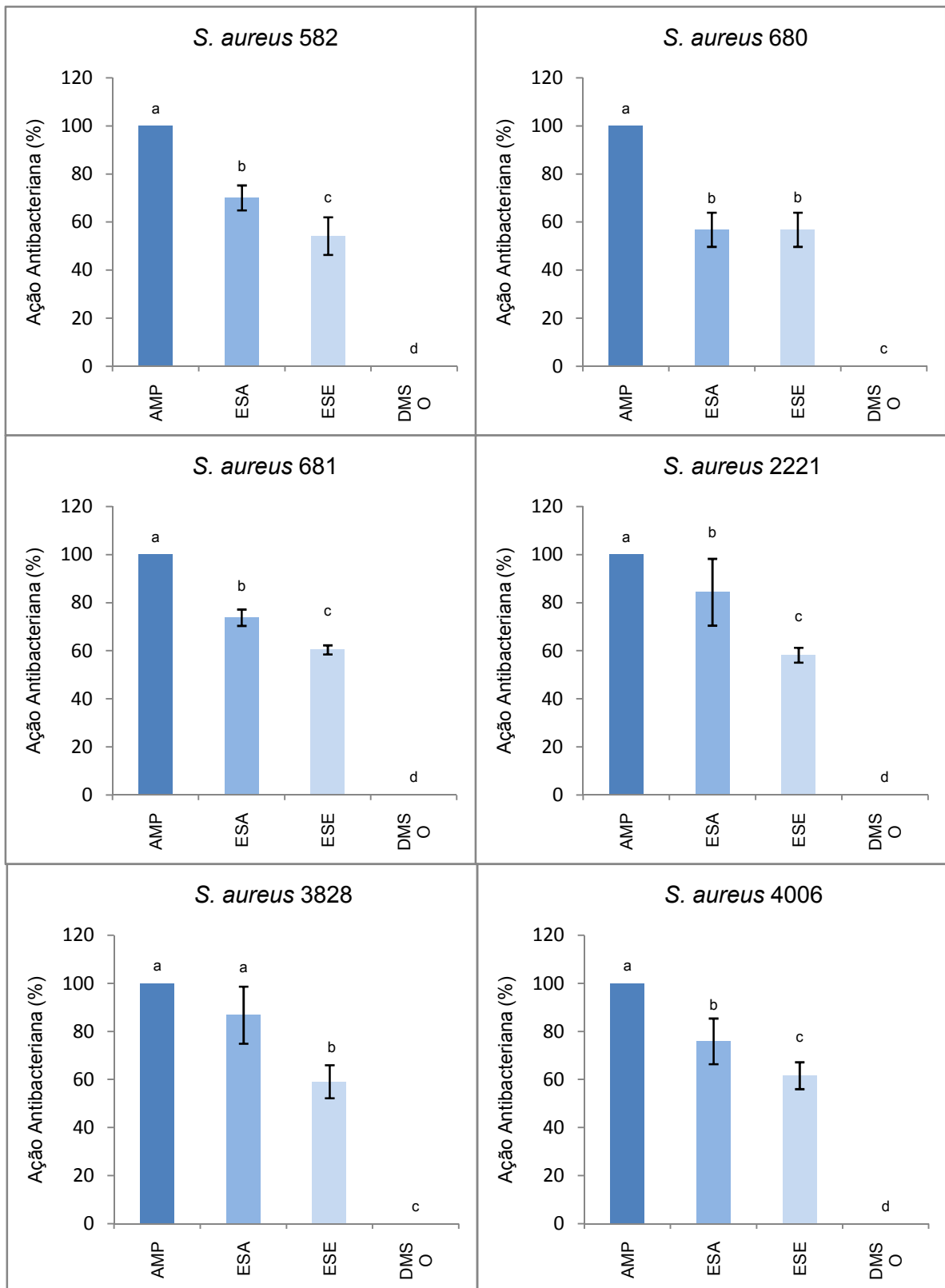
Outro fator importante que deve ser sempre lembrado quando se trabalha com extratos brutos é a concentração da substância ativa. Sabe-se que os extratos e as frações são misturas complexas de vários compostos, sendo a concentração de cada um dos compostos presentes nessa mistura variável. O composto que apresenta atividade antibacteriana pode ser aquele presente em altas concentrações no extrato, ou, pode ser aquele presente em concentração muito pequena. Assim sendo, uma grande zona de inibição pode ser causado por uma substância altamente ativa presente em pequena quantidade ou por uma substância com baixa atividade, mas presente em alta concentração no extrato (VANDEN BERGHE E VLIETINCK, 1991). Conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, das 12 bactérias testadas pelo método de difusão em ágar empregado neste trabalho, onze (91,7%) tiveram seu crescimento inibido pelo extrato ESA (Extrato Acetato de Etila) com halos de inibição de crescimento das bactérias maiores que 9 mm, enquanto o extrato ESE (Extrato Etanólico) apresentou halo de inibição superior a 9 mm contra seis (50%) bactérias.

Podemos afirmar que os resultados encontrados sugerem que o teste apresentou uma boa precisão. Em quase todos os extratos testados os valores obtidos para o halo de inibição, das doze bactérias, foi similar nas três repetições realizadas. O desvio padrão da média dos halos de inibição calculado para cada extrato vegetal

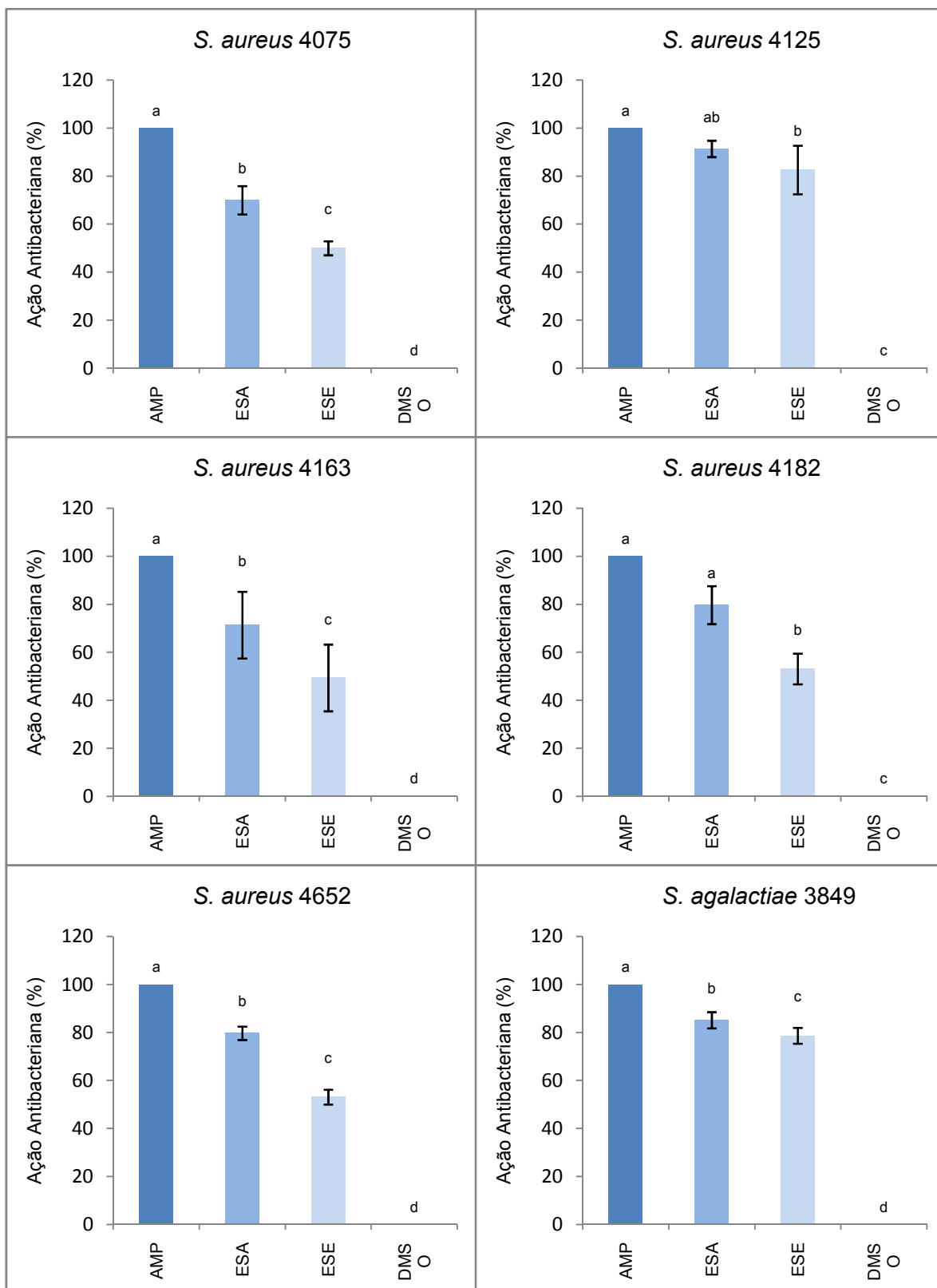
individualmente, na maior concentração empregada, atingiu o valor máximo de 2,5, mostrando que os testes geram valores que são reprodutíveis.

No estudo estatístico foram usados os resultados obtidos com o cálculo da percentagem de inibição, considerando o halo de inibição do controle positivo como 100% a 5% de significância. Dos cinco extratos testados, três (ESC, ESH, ESD) não apresentaram diferenças significativas entre o controle negativo para o grau de significância adotado. Da mesma forma, dois extratos (ESA e ESE) dos cinco testados, demonstraram diferenças significativas entre si e entre o controle positivo nas medidas dos halos de inibição das bactérias utilizadas.

Nas Figuras 6 e 7 estão apresentadas as diferenças encontradas entre as percentagens das médias dos diâmetros dos halos de inibição dos isolados de mastite bovina para os extratos testados.



**Figura 6.** Percentagem da ação antibacteriana para ESE, ESA, ESC, ESD e ESH e os controles positivo (**AMP**) e negativo (**DMSO**). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico.



**Figura 7.** Percentagem da ação antibacteriana para ESE, ESA, ESC, ESD e ESH e os controles positivo (**AMP**) e negativo (**DMSO**). Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico.

Os resultados obtidos mostram maior atividade antibacteriana para os extratos etanólico (ESE) e de acetato de etila (ESA), sendo que, em algumas cepas, o extrato de acetato de etila apresentou resultados estatisticamente semelhantes ao controle positivo. Vários estudos apontam os compostos fenólicos como importantes metabólitos promotores de atividade antibacteriana (SCALBERT, 1991, DIDRY *et al.*, 1996, HELANDER *et al.*, 1998)

#### 4.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados somente com os extratos que apresentaram potencial ação antibacteriana pelo teste de difusão em ágar. Esse teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul-escura. Essa conversão indica a atividade mitocondrial que somente as células viáveis possuem.

De acordo com Aligiannis *et al.* (2001) são considerados como de forte atividade antimicrobiana extratos que apresentaram CIM em concentrações até 0,5 mg/mL; de atividade moderada, os que apresentaram CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL; e de fraca atividade os que apresentaram CIM acima de 1,6 mg/mL. Os resultados mostraram que os extratos ESE e ESA (Extrato Acetato de Etila e Extrato Etanólico) foram eficiente no controle de *S. aureus* e *S. agalactiae*, com CIM de 0,1 mg/mL para o extrato acetato de etila e 0,3 mg/mL para o extrato etanólico e 0,1 mg/mL para o extatro ESA e 0,4 mg/mL para o extrato ESE, respectivamente. De acordo com os valores encontrados e com os dados de Aligiannis e colaboradores (2001) os extratos podem ser considerados como tendo forte atividade antimicrobiana. (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos ativos acetato de etila (ESA) e extrato etanólico (ESE) frente às cepas de *Staphilococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (mg/mL).

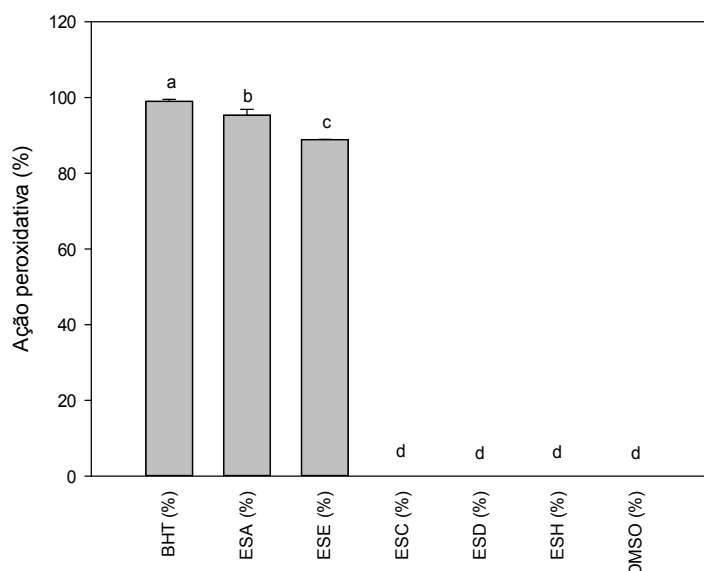
	Extrato de acetato de etila (ESA)	Extrato de etanol (ESE)	Controle positivo (Ampicilina)
<i>S. aureus</i> 4125	0,1	0,3	0,05
<i>S. agalactiae</i> 3849	0,1	0,4	0,05

#### 4.3. Ação antioxidante na peroxidação lipídica

O uso de lipossomos é mais um método promissor para avaliar propriedades antioxidantes de amostras, uma vez que este sistema permite a investigação da proteção de um substrato por um antioxidante em um modelo de membrana biológica

ou uma lipoproteína. A avaliação dos antioxidantes pela sua capacidade de inibir a oxidação de lipídeos é relevante para analisar os efeitos fisiológicos de extratos vegetais (HUNT, 2001).

Neste experimento, o dano peroxidativo induzido na matriz lipídica pelos extratos vegetais foi medido através da quantificação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, em comprimento de onda de 535 nm (RIEMERSMA *et al.*, 2000). Com a metodologia adotada, o dano do controle negativo foi claramente diferenciado da condição do tratamento do controle positivo, possibilitando a adequada avaliação do comportamento protetor das amostras frente à peroxidação. A Figura 8 apresenta o gráfico com os resultados das percentagens de ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para ESE, ESA, ESC, ESD, ESH, o padrão BHT (controle positivo) e DMSO (controle negativo) após análise da Variância e aplicação do Teste de Tukey.



**Figura 8.** Resultado da percentagem da ação antioxidante pelo método de peroxidação lipídica para ESE, ESA, ESC, ESD, ESH, BHT (controle positivo), e DMSO (controle negativo) usado no teste. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de tukey a  $p < 0,05$ . **DMSO** – Dimetilsulfóxido (controle negativo), **BHT** – butil hidroxitolueno (controle positivo), **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico.

Ao utilizar esse método, verificou-se que os extratos ESE e ESA foram efetivos em inibir a oxidação dos lipídeos presentes nos lipossomos, com exceção dos extratos apolares ESH, ESD e ESC, que não apresentaram atividade antioxidante, exibindo perfil estatisticamente semelhante ao controle negativo a uma probabilidade de 5 % (Figura 8).

O teste peroxidativo não pode ser dado como conclusivo para a ausência de atividade antioxidante dos extratos ESC, ESD e ESH, devido à complexidade dos processos de ação antioxidante, sendo importante o emprego de diferentes metodologias para avaliar essa atividade, não sendo rara a obtenção de resultados distintos na avaliação de antioxidantes utilizando diferentes sistemas *in vitro* (CARPES *et al.*, 2008).

A Tabela 5 apresenta os valores das médias da percentagem de inibição antioxidante dos extratos ESE e ESA comparados ao controle negativo e o controle positivo BHT, pelo ensaio da peroxidação lipídica.

**Tabela 5.** Resultado da ação antioxidante por peroxidação lipídica dos extratos vegetais de diferentes polaridades de flores de *Senna macranthera*.

Amostras	Peroxidação Lipídica (% Ação Antioxidante)
BHT	99,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
ESA	95,3 ± 1,5 <sup>b</sup>
ESSE	88,9 ± 0,05 <sup>c</sup>
DMSO	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>

**\*Nota:** Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . **DMSO** – controle negativo, **BHT** – controle positivo, **ESE** - Extrato Etanólico, **ESA** – Extrato Acetato de Etila, **ESD** – Extrato Diclorometânico, **ESC** – Extrato Clorofórmico, **ESH** – Extrato Hexânico.

Apenas dois extratos, ESE e ESA, foram capazes de reduzir em aproximadamente 95,3 e 88,9 %, respectivamente, o dano induzido aos lipossomos. A análise dos resultados mostrou, como esperado, maior atividade antioxidante para o padrão BHT utilizado como controle positivo (99 %), e embora ESE e ESA tenham apresentado alta ação antioxidante tais extratos não foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo. O desvio padrão da média da percentagem de inibição calculado para cada extrato vegetal individualmente atingiu o valor máximo de 1,5 mostrando que o teste pode ser considerado reprodutível.

Dessa forma, os extratos ESE e ESA se mostraram efetivos, sendo possivelmente as substâncias mais polares responsáveis pela atividade antioxidante, particularmente as substâncias fenólicas. Os fenóis interferem na oxidação dos lipídeos e de outras moléculas por uma rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres. Os radicais fenóxidos formados são intermediários estáveis e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia em função da falta de sítios ativos para o ataque do oxigênio molecular. Estes radicais intermediários fenóxidos atuam reagindo com outros radicais livres, culminando com a terminação das reações de

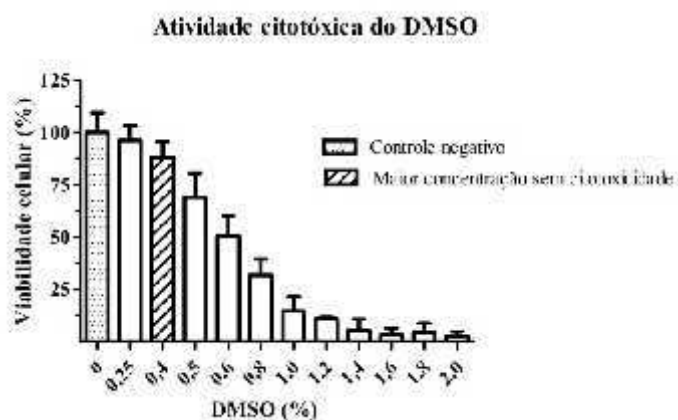
oxidação (SANCHEZ-MORENO, 2002). Além dessa atuação, os flavonoides podem atuar como agentes redutores, estabilizadores de elétrons desemparelhados ou quelantes de íons metálicos (RICE-EVANS, *et al.*, 1997).

#### 4.4. Avaliação da atividade antitumoral

Para realizar a avaliação da atividade antitumoral verificou-se, primeiramente, a concentração ideal de células, por poço, a ser utilizada e a concentração máxima de DMSO presente no meio reacional sem alterar a viabilidade celular.

De acordo com o teste de concentração de células por poço, a melhor concentração encontrada foi a de  $3 \times 10^3$  células /poço, pois nesta concentração o crescimento celular ao final das 112 horas não foi suficiente para se ter uma super população celular em que ocorresse a morte celular.

O teste com DMSO foi realizado com o intuito de determinar qual a concentração máxima de DMSO que as células suportariam Após as primeiras 48 horas de adaptação das células ao ambiente e verificou-se que a máxima concentração suportada foi 0,4% de DMSO no poço. A partir deste ensaio as concentrações dos extratos no poço foram calculadas para conterem no máximo 0,4% de DMSO no poço. Na Figura 9 pode-se observar a viabilidade celular em diferentes concentrações de DMSO.



**Figura 9.** Atividade citotóxica do DMSO

A Tabela 6 apresenta o resultado da atividade antitumoral para células BF16 de melanoma murino para o extrato acetato de etila após 48 h de crescimento. De acordo com a literatura (ITHARAT *et al.*, 2004), admite-se como droga neoplásica efetiva aquelas que apresentaram  $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ , o que não foi o caso do extrato acetato de etila cujo  $IC_{50}$  184  $\mu\text{g/mL}$  e não se encaixa com os parâmetros utilizados.

**Tabela 6.** Resultado da atividade antitumoral do extrato acetato de etila de flores de *Senna macranthera*.

<b>Amostra</b>	<b>IC50 µg/mL</b>
Extrato de Acetato de Etila	184,0 ± 2,0
1-β-D arabinofuranosylcytosine (AraC)	2,1 ± 1,28
VP16	1,55 ± 1,55

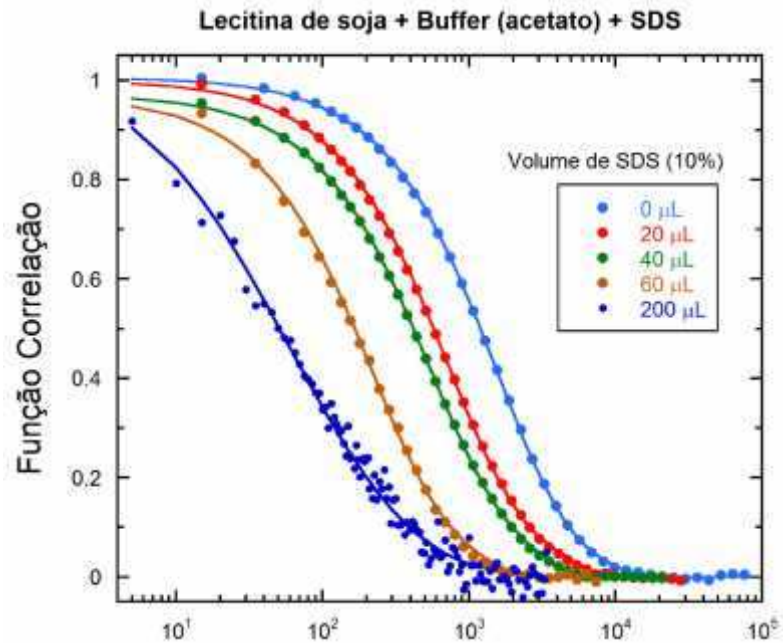
Portanto o extrato testado neste estudo não apresenta atividade antitumoral pois, substâncias que apresentam IC<sub>50</sub> elevados indicam pouca especificidade contra as células testadas. Isso indica também que serão necessárias elevadas doses para que sua atividade antitumoral aconteça. Além disso, devem ser levados em conta que a dose para estudos *in vivo* pode conter no máximo 300 vezes a dose utilizada em *in vitro*. (LOTZE *et al.*, 2001).

#### **4.5. Avaliação dos Lipossomos**

##### **4.5.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (Vesícula de Lecitina)**

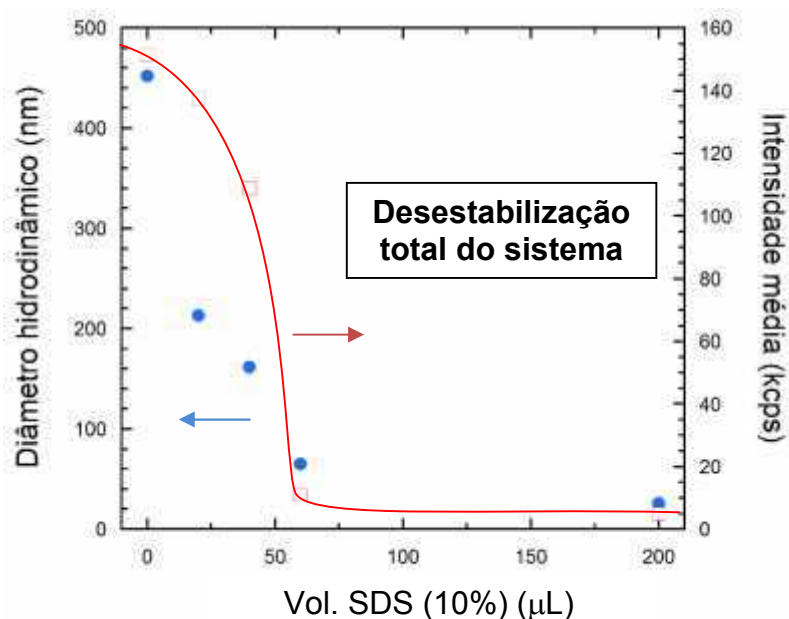
De acordo com a análise do aparelho de Espalhamento Dinâmico de Luz, verificou-se a existência de um sistema formado por estruturas não interagentes e de baixa dispersão de tamanhos (Figura 10), sendo ajustada satisfatoriamente ao modelo de cumulantes de segunda ordem (linha contínua em azul na Figura 10). Foi testado o efeito da adição do surfactante SDS (dodecil-sulfato de sódio) que tem o efeito de desestabilizar (destruir) as vesículas dos lipossomos.

Para a solução sem SDS (curva azul-clara) no gráfico, o ajuste com o modelo teórico mostrou que existem uma distribuição de estruturas cujo valor do diâmetro médio foi de 452 nm. A intensidade espalhada foi de 152 kcps (quilo contagens por segundo).



**Figura 10.** Resultado da análise de amostras contendo lipossomos após adição de SDS

Adicionando-se SDS (20  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$  de uma solução 10%) observaram-se dois efeitos: o tamanho diminui demonstrado pelo deslocamento horizontal do gráfico (Figura 10) para tempos menores (a esquerda do gráfico), e também por uma diminuição na intensidade de luz espalhada (brilho do laser ao passar pelas soluções). Essa diminuição de intensidade tem o efeito de aumentar a dispersão dos pontos no gráfico (Figura 10). Analisando os valores de diâmetro e intensidade vs concentração de SDS temos a Figura 11. Os dados parecem indicar uma diminuição abrupta perto de 60  $\mu\text{L}$  de SDS, podendo indicar uma transição de fase (vesículas  $\leftrightarrow$  lecitina não-agregada).

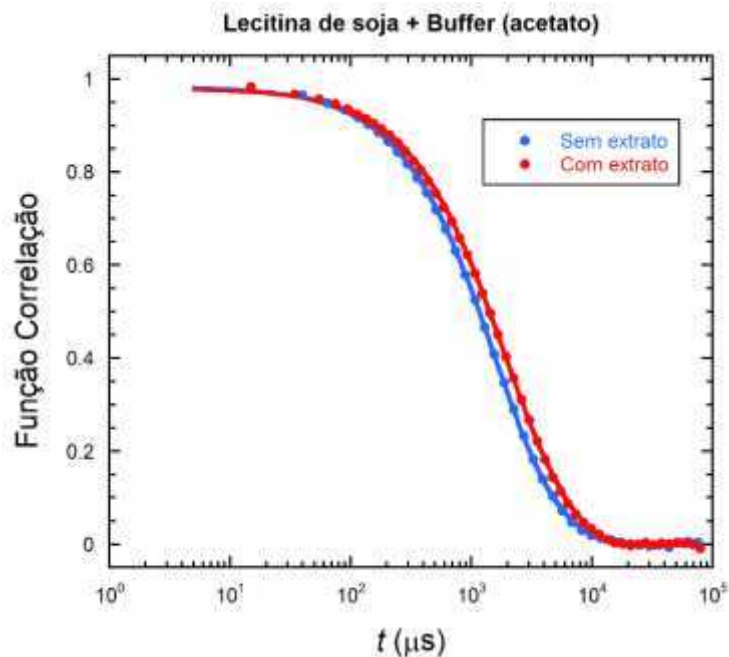


**Figura 11.** Resultado do comportamento de uma amostra contendo lipossomos após adição de SDS.

A Figura 11 demonstra desestabilização total do sistema a partir de cerca de 60  $\mu\text{L}$  de solução de SDS a 10%. A linha vermelha representa a intensidade média espalhada e a linha azul representa o diâmetro dos lipossomos. Apesar do diâmetro hidrodinâmico diminuir gradativamente, a intensidade média espalhada apresenta uma queda abrupta até 60  $\mu\text{L}$  de solução de SDS adicionada, não variando consideravelmente para volumes maiores.

#### 4.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (Vesícula do Extrato Acetato de Etila)

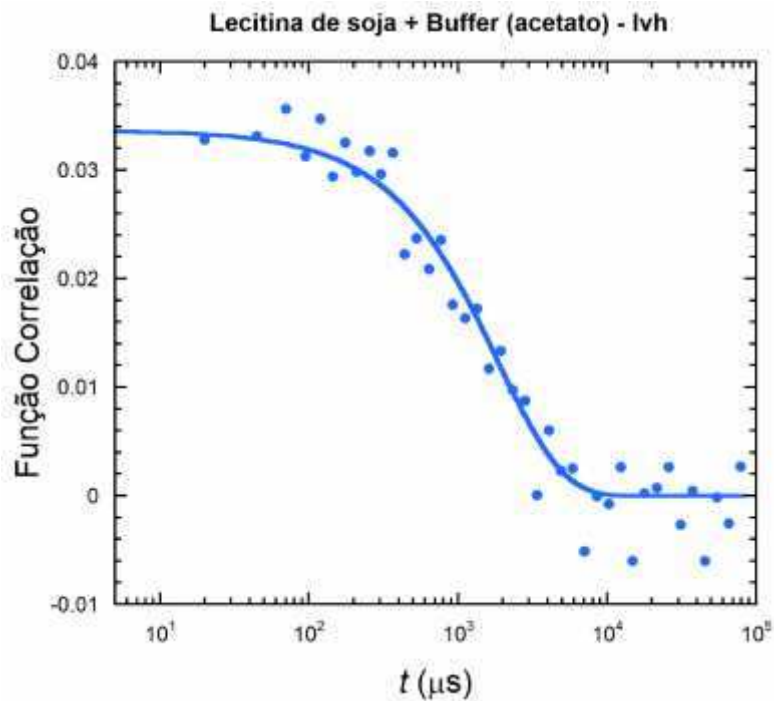
Repetindo o mesmo experimento para verificação da existência do sistema contendo o extrato observou-se uma variação considerável do diâmetro (452 nm sem o extrato e 543 nm com – Figura 11) e uma variação na intensidade de 151 kcps (sem extrato) para 93,4 kcps (com extrato). Uma vez que a intensidade da luz está relacionada ao tamanho, número e contraste ótico da partícula, acredita-se que a diminuição da intensidade da luz observada para as vesículas com extrato tenha ocorrido devido à solubilidade do extrato Acetato de Etila no meio contendo os lipossomos, diminuindo o contraste ótico entre as vesículas e o solvente e, conseqüentemente, diminuindo a intensidade de luz espalhada. O tamanho aproximado dos dois sistemas é evidenciado pela proximidade das curvas de correlação na Figura 12.



**Figura 12.** Resultado da análise de amostras contendo lipossomos.

Através do espalhamento dinâmico da luz pode-se medir o tamanho médio das partículas. Neste caso, o diâmetro médio foi de 543 nm ocorrendo uma variação de 91 nm em relação à vesícula sem o extrato. Dessa forma supõe-se que o extrato esteja encapsulado na vesícula de.

Analisando a depolarização da luz espalhada (componente horizontal da luz espalhada) é possível obter informações sobre a anisotropia das estruturas, ou seja, se elas são esféricas ou alongadas em uma direção preferencial. Normalmente estruturas esféricas, ou de simetria esférica, não mostra nenhum sinal nessa condição. As vesículas mostraram um sinal estável mostrando o contrário: que as estruturas são alongadas, ou elipsoidais (Figura 13). Devido à pequena amplitude, por outro lado, os resultados sugerem que as vesículas têm formato ligeiramente alongado.



**Figura 13.** Resultado da análise das estruturas dos lipossomos.

De acordo com o observado pode-se dizer que o lipossomo contendo o extrato ativo Acetato de Etila foi formado e que este apresenta vesículas ligeiramente alongadas.

Dessa forma, os lipossomos representam uma estratégia alternativa para o tratamento da mastite bovina para o gado leiteiro, uma vez que o tratamento vigente envolve o uso de antibióticos. Os antibióticos além de serem dispendiosos promovem a contaminação dos seres humanos através da bioacumulação e magnificação trófica.

O uso dos lipossomos na forma de géis seria adequado, uma vez que, o tratamento ocorreria de forma intramamária, aumentando a biodisponibilidade do princípio ativo no local da infecção e reduzindo sua ação sistêmica.

## 5. CONCLUSÕES

- Os extratos Acetato de Etila (ESA) e Etanólico (ESE) de flores de *Senna macranthera* apresentaram atividade antioxidante porém, não significativa quando comparados ao padrão sintético BHT a 5% de probabilidade, enquanto os extratos de Diclorometano (ESD), Hexânico (ESH) não apresentaram atividade antioxidante.
- Os extratos Acetato de Etila (ESA) e Etanólico (ESE) apresentaram ação antibacteriana sobre os isolados de mastite bovina. ESA apresentou a menor concentração inibitória mínima para ação antibacteriana para as cepas de *S. aureus* e *S. agalactiae*. Neste sentido, foi demonstrado que os extratos ESE e ESA apresentam potencial para serem testados para o tratamento de mastite bovina.
- O extrato de acetato de etila não apresenta atividade antitumoral por apresentar  $IC_{50}$  elevado indicando pouca especificidade contra as células testadas.
- Foi possível evidenciar a formação dos lipossomos, através do espalhamento dinâmico de luz, bem como caracterizar as vesículas como alongadas, ou elipsoidais, de diâmetro hidrodinâmico de 452 nm. Os resultados ainda sugerem a incorporação do Extrato de Acetato de Etila (ESA) às vesículas formadas provocando o aumento das vesículas para 543 nm, sendo necessários testes adicionais para comprovar essa incorporação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B. M. Bianthraquinones from the seeds of *Senna multiglandulosa*. **Phytochemistry**, v.41, p.919-921, 1996.

ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B.; KRAUS, W. A. 1-4, anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera*. **Phytochemistry**, v.48, p.699-702, 1998.

ALIGIANNIS N.; KALPOTZAKIS E.; MITAKU S.; CHINOI I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos específicos e ciclo-celular não específicos que interagem como DNA: uma introdução, **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

AMABILE-CUEVAS C. F. New antibiotics and new resistance. **American Science**, v.91, p.138-149. 2003.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmacy**, v.278, p.435-445, 2004.

ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JORGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. **Progress in Lipid Research**, v.44, p.68-97, 2005.

BAO-NING, S.; ALISON, D.; HYUN-AH, J.P.; WILLIAM, J.K.; MCLAUGHLIN, J.L.; DOUGLAS, K.; Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* L. (Noni) and their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, v.68, p.592-595. 2004.

BARREIRO, E. J. Molecular modeling: a tool for rational drug design in medicinal chemistry. **Química Nova**, v.14, p.179, 1991.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BRANCO, A.; PINTO, A. C.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, E.F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.. Rubrofusarina, um policetideo natural inibidor da topoisomerase II- $\alpha$  humana. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.703-708. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

BUCHMANN, S.L.; Buzz pollination in Angiosperms. In Handbook of experimental pollination biology (C.E. Jones & R.J. Little, eds.). Van Nostrand Scientific and Academic Editions, New York, 73-113, 1983.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Screening of the antioxidant potential of bee pollen produced in the Southern region of Brazil. **Química Nova**, v.31, p.1660-1664. 2008.

CASSILETH B. R.; DENG, G. Complementary and alternative therapies for cancer, **Oncologist**, v.9, p.80-89, 2004.

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, p.99-105, 1998.

CEVEC, G.; BLUME, G.; SCHATZLEIN, A.; GEBAUER, D.; PAUL, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. **Advanced Drug Delivery**, v.18, p.349-378, 1996.

CEVEC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact owing to the transdermal osmotic gradient and hydration force. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1104, p.226-232, 1992.

COSTA, S.S.; SOUZA M. L. M.; IBRAHIM T.; MELO, G. O.; ALMEIDA A. P.; GUETTE C.; FÉREZOU, J. P.; KOATZ V. L.G. Kalanchosinedimalate, an anti-inflammatory salt from *Kalanchoe brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.815-818, 2006.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* turra aerial part. **Fitoterapia**, v.73, p.479-83, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v.60, p.52-60, 1997.

CUCARELLA C, TORMO M.A, UBEDA C, TROTONDA MP, MONZON M, PERIS C, AMORENA B, LASA I, PENADE JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Journal of infectious**, v.5, p.2177-2185, 2004.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. **Die Pharmazie**, v.48, p.301-304, 1996

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.97, p.654-660, 2006.

EDWARDS, K. A.; Baeumner, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v.68, p.1421-1431, 2006.

GIBBONS S. An overview of plant extracts as potential therapeutics. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.13, p.489-497. 2003.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of Flower Structures and Pollination in Neotropical *Cassiinae* (*Caesalpinaceae*) species. **Phyton** v.28, p.293-320, 1988.

GUPTA, D.; SINGH, J. Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. **Phytochemistry**, v.30, p.2761- 2763, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition. 2007.

HARUN-UR-RASHID, M.; GAFUR, M. A.; SADIK, G. M.; RAHMAN, M. A. A. Biological activities of a new acrylamide derivative from *Ipomoea turpithum*. **Journal of Biological Science**, v.5, p.968-969, 2002.

HEBERT, A.; SAYASITH, K.; SENECHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACE J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **Microbiol Letter**, v.193, p.57-62, 2000.

HELANDER I. M.; ALAKOMI H. L.; LATVA-KALA K.; MATTILA-SANDHOLM T.; WRIGHT A. V. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HUNT, E. J.; LESTER, C. E.; LESTER, E. A.; TACKETT, R. L. Effect of St. John's wort on free radical production. **Life Science**, v.69, p.181, 2001.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R.C. The American Cassiinae. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.35, p.1-918, 1982.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, .P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.33-38, 2004.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, v.10, p.65-8, 1994.

KIM, C.; SHIM, J.; HAN, S.; CHANG, I. The skin -permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. **Journal Cosmetic Science**, p.374, 2002.

KRISHNAIAH, D.; ROSALAM, S.; RAJESH, N.; A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.

LABANA, S.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. **Internatiol Journal Antimicrobiology Agents**, v.20, p.301-304, 2002.

LESTINI, B. J.; SAGNELLA, S. M.; XU, Z; SHIVE, M. S.; RICHTER, N. J.; JAYASEHARAN, J.; CASE, A. J.; KOTTKE-MARCHANT, K.; ANDERSON, J. M.; MARCHANT, R. E. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery. **Journal Controlled Release**, v.78, p.235-247, 2002.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JULICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.285-299, 2005.

LORENZI, H., Ed. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. São Paulo: Contexto. 2002. 176.

LOTZE, M. T.; DALLAL, R. M.; KIRKWOOD, J. M.; FLICKINGER, J. C. Melanoma: Cutaneous melanoma.(editors: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A) In: Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6ed., Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins ; 2001.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Research Update**, v.6, p.271-279, 2003.

- MATSUDA, A.; SASAKI, T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. **Cancer Science**, v.95, p.105–111, 2004.
- MONZON MC, OTEIZA J, LEIVA M, LAMATA, AMORENA B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. **Diagnosis Microbiol Infect Disease**, v.44, p.319-324, 2002.
- MUKHERJEE, P.K., Integrated approach towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. **Journal Ethnopharmacology**, v.103, p.25-35, 2006.
- MUNARI, C. C.; OLIVEIRA, P. F.; CAMPOS J. C. L.; MARTINS, S. P. L.; COSTA, J. C.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Antiproliferative activity of Solanum lycocarpum alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Journal of Natural Medicine**, v.68, p.236–241, 2014.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA G.L.. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, v.31, p.247-256. 2000.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. **Univali**, p.9-53, 2003.
- OLIVEIRA, B. M.; WALKER, C.; CARTIER, G. E.; HOOPER, D.; SANTOS, A.D; SCHOENFELD, R.; SHETTY, R.; WATKINS, M.; BANDYOPADHYAY, P.; HILLYARD, D. R. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides potential – evolutionary significance of introns. **New York Academy Science**, v.770, p.223-237, 2008
- OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v.25, p.976–984, 2002.
- PANDIAN M. R., BANU G. S., KUMAR G. A study of antimicrobial activity of *Alangium salviifolium*. **Indian Journal Pharmacology**, v.38, p.203-204, 2006.
- PAREKH, J.; JADEJA, D.; CHANDA, S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. **Turk. Journal Biology**, v.29, p.203-210, 2005.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.
- PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. An active heparinoid by sulphation of a galactomannan extracted from endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate polymers**, v.46, p.165-169, 2001.
- PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; DELATTRE, J.; DEVISSAGNET, J.P. Liposomes, new systems and new trends in their applications. **International Journal of Pharmaceutics**. 1995.

QUETTIER-DELEU, A.C.; GRESSIER, C.B.; VASSEUR, A.J.; DINE, C.T.; BRUNET, C.C.; LUYCKX, C.M.; CAZIN, C.M.; CAZIN, C.J.; BAILLEUL, B.C.; TROTIN, B.F. Phenolic compounds and antioxidant activities of becwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **Journal Ethnopharmacology**, v.72, p.35-42, 2000.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, p.304-309, 1997.

RIEMERSMA, R. A.; CARRUTHERS, K. F.; ELTON K. A.; FOX, K. A. Vitamin C and the risk of acute myocardial infraction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1181-1186, 2000.

SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenolicos:efectos fisiologicos: actividad antioxidante. **Alimentaria**, v.329, p.29-40, 2002.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology as a tool for the selection of medicinal plants for screening antitumour activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, p.7-17, 1999.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, v.42, p.439-462, 2003.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica : aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes do desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, p.801-807, 2001.

SURESH, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. **Acta Materialia**, v.55, p.3989-4014, 2007.

VALENCIA, E. *et al.* Estudio fitoquímico y actividad antialimentaria de *Senna stipulaceae*. **Boletín de la Sociedad Chilena Química**, v.5, p.297-301, 2000.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In DEY, P. M.; HARBONE, J. B.(eds) *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1991. p. 47-69

WANNES, W. A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMD AOUI, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.1362-1370, 2010.

WINSTON, J.C., 1999. Health- promoting properties of common herbs. **American Journal Clinical Nutrition**, v.70, p.491-499, 1999.

YUNES, R. A.; DOMENEGHINI, C. L.; LEAL, P. C.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; FALCÃO, C.; ROSSIBERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Trends Medicinal Chemistry**, v.4, p.47, 2006.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. **Univali**, p.11-32, 2007.

ZHANG, F.; BRUSCHWEILER-LI, L.; BRUSCHWEILER, R. Simultaneous of new identification of molecules in chemical mixtures by doubly indirect covariance NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, p.16922-16927, 2010.

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ATIVO**

## 1. INTRODUÇÃO

Ao se trabalhar com extratos vegetais, uma fonte promissora de novas moléculas bioativas, o grande objetivo é a separação e a identificação de seus constituintes (WOLFENDER *et al.*, 1997). O interesse nestes extratos se baseia na diversidade e variabilidade estrutural de seus componentes, contudo estas características tornam as amostras complexas e de difícil elucidação (EXARCHOU *et al.*, 2005). Visando diminuir essas limitações, o avanço da pesquisa na área de produtos naturais está intimamente ligado com o desenvolvimento de técnicas aprimoradas de separação, análise e identificação destas moléculas (PHILLIPSON, 2003). A elucidação estrutural de substância é uma atividade muito antiga e tem sua origem registrada no século XVIII, época em que o homem ainda nem possuía o devido conhecimento teórico sobre estrutura molecular (DUNN *et al.*, 2005). Dentre elas, a elucidação estrutural de substâncias naturais diretamente em extratos vegetais apresenta uma série de desafios, e difere da elucidação estrutural de substâncias sintéticas, entre outros, porque não há material de partida que possibilite a dedução de uma estrutura natural (STEINBECK, 2003). As substâncias naturais, presentes em um extrato ou fração, dotados de certa atividade biológica, são inesperadas, principalmente se forem oriundas de uma espécie ou gênero pouco investigado quimicamente. Nesse caso há apenas informação sobre algumas propriedades físico-químicas verificadas durante o processo cromatográfico, como polaridade, absorção de radiação UV, entre outras (BROS-WALSH *et al.*, 2005).

É premente a necessidade econômica, científica e técnica de acelerar o processo de descoberta e desenvolvimento de fitofármacos, bem como da caracterização de componentes de extratos bioativos, por meio da identificação de substância em mistura (PAVIA *et al.*, 2010). Adquirir a capacidade de identificar, de forma rápida e segura, as substâncias presentes em matrizes complexas, como extratos e frações semipurificadas é um grande diferencial para a descoberta e o desenvolvimento de fitofármacos e também para a padronização de extratos bioativos (REYNOLDS *et al.*, 2002). Mesmo porque, há vastas evidências apontando para as propriedades farmacológicas emergentes, exibidas por uma dada fração ou extrato em detrimento da atividade das substâncias isoladas (ZHANG *et al.*, 2010).

Desde então, as estratégias empregadas por um especialista para elucidar a estrutura de uma substância desconhecida pouco mudaram, pois elas envolvem fundamentos básicos em que são geradas e testadas hipóteses com o intuito de se chegar à solução de um problema (KOOY *et al.*, 2009). Entretanto, de lá pra cá houve um enorme avanço nas etapas de aquisição, processamento e manipulação de dados espectrais, incluindo o desenvolvimento de espectrômetros e *softwares* (STEFANI *et al.*, 2007).

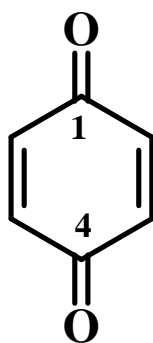
Diversas técnicas já estão consolidadas e são amplamente utilizadas no processo de caracterização de extratos vegetais (CROTTI *et al.*, 2008). Inúmeras publicações podem ser encontradas na literatura a respeito das técnicas tradicionais de fracionamento dos extratos, em que os constituintes são separados e isolados e, posteriormente, caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (EXARCHOU *et al.*, 2003).

Dentre as técnicas espectroscópicas que possibilitam a elucidação estrutural completa de moléculas, a ressonância magnética nuclear (RMN) é a mais importante, principalmente para identificação de substâncias desconhecidas (HICKS, 2001; HARVEY, 2005), por fornecer um grande número de informações estruturais, tais como diferenças entre substâncias com mesma massa ou fórmula molecular, deslocamentos químicos característicos, multiplicidade (a interação entre os núcleos vizinhos) e integrais, além de ser uma técnica não destrutiva (CORCORAN *et al.*, 2003). A análise clássica por RNM exige prévia separação de seus componentes, normalmente realizada pela demorada técnica de coluna cromatográfica clássica (CCC) (ALBERT, 2002).

A Espectrometria de massas é também uma técnica analítica poderosa utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais de moléculas, podendo ser realizada com quantidades bem pequenas de amostras (ao nível do picograma) e a concentrações bem baixas em misturas quimicamente complexas (ppt) (STAERK *et al.*, 2009).

### 1.1. Quinonas

As quinonas (Figura 1) são compostos orgânicos naturais que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis. Caracteriza-se pela presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C (FALKENBERG, 1999).



1,4 benzoquinona

**Figura 1.** Núcleo fundamental de uma quinona

A classificação dos derivados dessa classe de produtos naturais é definida pelo esqueleto do anel aromático, estabelecendo-se dois grupos carbonílicos na molécula. Têm-se três grupos principais de quinonas, nos quais se enquadra a maioria dos compostos conhecidos atualmente: *benzo-*, *nafto-*, *antraquinonas*. Também são encontradas na natureza quinonas terpênicas e policíclicas de estruturas mais complexas (FALKENBERG, 1999).

Esses produtos do metabolismo secundário são sintetizados em plantas superiores através de várias rotas metabólicas. Os derivados antracênicos podem ser formados a partir de unidades provenientes de acetil - ou malonilcoenzima A ou a partir do ácido *o*-succinilbenzóico, como são sintetizadas algumas naftoquinonas. Enquanto que outras naftoquinonas são formadas a partir do ácido *p*-hidroxibenzóico (FALKENBERG, 1999).

Desde a antiguidade, as plantas contendo quinonas são utilizadas por suas atividades biológicas ou como fontes de corantes naturais e, mais recentemente, substâncias com potencial atividade biológica (FALKENBERG, 1999), que levaram ao isolamento e identificação estrutural de moléculas com essas atividades, resultando em patentes (KOYAMA, 2005).

A estrutura quinóide condiciona alta reatividade química e as quinonas são agentes fortemente oxidantes. Essas reações de oxirredução são responsáveis pelo papel importante das quinonas como carreadores de elétrons nos processos metabólicos das células. Assim, as atividades e propriedades das quinonas baseiam-se primariamente na capacidade de interagirem com sistemas redox ou de transferir elétrons em ambientes físico ou biológico (FALKENBERG, 1999).

São conhecidas mais de 1500 quinonas e derivados, encontradas em diversos tipos de organismos, como bactérias, fungos, líquens, plantas superiores e até mesmo em animais (THOMSON, 1987).

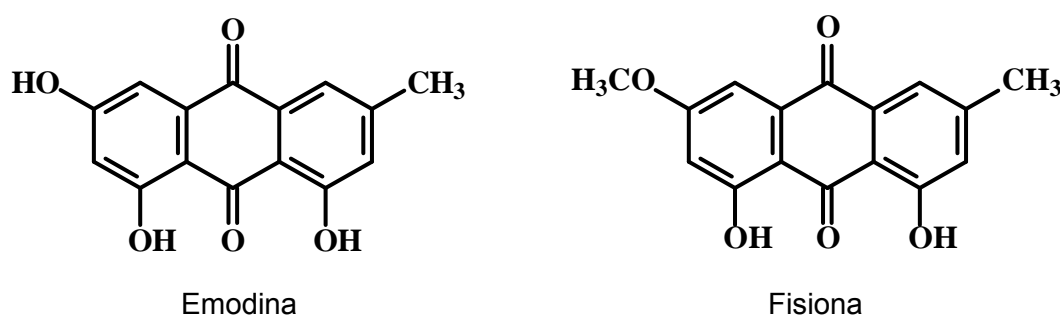
Quinonas formam a segunda maior classe de agentes antitumoral aprovado para uso clínico nos E.U.A. Vários medicamentos antitumorais derivados de quinonas estão em diferentes estágios de análise pré-clínica e clínica. A atividade farmacológica antitumoral das quinonas é acreditada pela capacidade dessas de redução a semiquinona (ALEGRÍA *et al.*, 2009).

Outra atividade importante é a atividade anti-HIV da naftoquinona trimérica conocurvona, isolada de plantas do gênero *Conospermum* que apresenta atividade inibitória da replicação do vírus HIV (KOYAMA, 2005).

## 1.2. Antraquinonas

Compostos antraquinônicos estão presentes em diversas drogas vegetais utilizadas na fitoterapia e suas estruturas são exemplos de derivados da rota do acetato. Ésteres de enxofre de poli- $\beta$ -cetometilenos, formados após uma série de condensações intramoleculares, são intermediários de vários compostos aromáticos oxigenados, como as antraquinonas (Figura 02).

Glicosídeos antraquinônicos, também chamados de antracênicos, são compostos quinônicos presentes nas plantas frequentemente na forma de mistura. Nos vegetais, grande parte das estruturas antraquinônicas encontra-se glicosilada. As antraquinonas são formas oxidadas, ocorrendo, também, formas reduzidas, como as antronas, antranóis e outras (LEITE, 2009).



**Figura 2:** Antraquinonas isoladas da raiz de *Senna macranthera*.

Várias espécies vegetais como *Cassia spp.*, *Rhamnus purshiana* e *Rheum palmatum* apresentam uma mistura de antraquinonas com importante ação laxativa (LEITE, 2009).

A absorção de antraquinonas no organismo humano ocorre no trato gastrointestinal, sendo as agliconas liberadas durante o metabolismo e liberadas para o interior do cólon estimulando, dessa forma, o aumento do peristaltismo. Após a hidrólise dos heterosídeos antraquinônicos, as geninas liberadas se difundem para o interior das células epiteliais que recobrem a superfície intestinal, chegando ao sistema linfático, de onde passam para a corrente sanguínea. Estudos têm indicado que a ação laxativa das plantas contendo esse grupo de metabólitos se deva à ação da microbiota intestinal sobre os heterosídeos, liberando as formas ativas (LEITE, 2009).

Dessa forma, o capítulo 2 pretende identificar as classes fitoquímicas e elucidar a estrutura ativa contida no extrato de flor de *Senna macranthera*, permitindo a padronização do extrato bioativo e posterior desenvolvimento de uma formulação contendo o fitofármaco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar, através do isolamento, a substância ativa do extrato de flor de *Senna macranthera*, responsável pela ação antibacteriana e antioxidante, e identificar sua estrutura química.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Identificação das classes fitoquímicas dos extratos através da prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD);
- ✓ Fracionamento biomonitorado do extrato bruto visando frações com atividade antibacteriana;
- ✓ Purificação dos extratos em cromatografia preparativa;
- ✓ Identificação das substâncias ativas pela técnica espectroscópica de ressonância nuclear magnética (RNM) e espectrometria de massas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espectros de massas foram obtidos por cromatografia gasosa em um instrumento de série GC-17A (Shimadzu, Japão) equipado com um detector de ionização de chama (FID). Condições cromatográficas foram: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,22 mm), com uma fase ligada DB-5 (0,25 µm de espessura de filme); gás de arraste, N<sub>2</sub> com um fluxo de 1,8 mL/min, a temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT, foram obtidos em espectrômetros Mercury-300. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN <sup>1</sup>H.

As colunas de cromatografia (CC) foram recheadas com sílica-gel 60 (70-230 mesh) Merck.

As cromatografias em camada preparativa (CCP) (20 x 20 cm) foram feitas em sílica-gel G e sílica-gel GF<sub>254</sub> Merck na proporção de 2:1, sobre suporte de vidro (espessura de 0,25 mm).

As cromatografias em camada delgada foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílica-gel G F<sub>254</sub> 0,2 nm Art. 1.05554 Merck

Os reveladores foram lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e solução de ácido fosfomolibídico (Reativos Merck, 1971), por nebulização em placa seguida de aquecimento.

#### 3.1. Prospecção fitoquímica

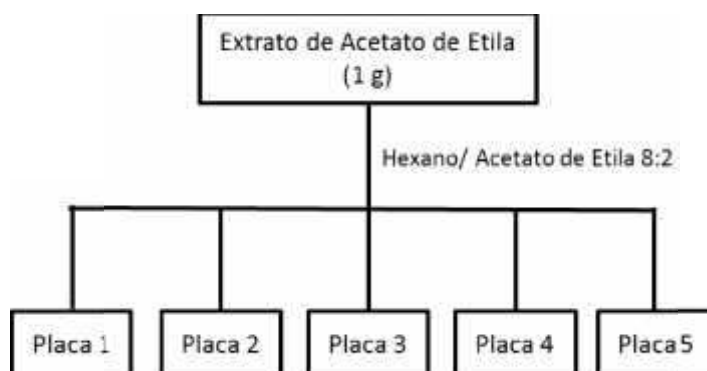
Foi investigada a presença de metabólitos secundários das seguintes classes: cumarinas, alcalóides, triterpenos/esteróides, polifenóis, geninas e heterosídeos flavonônicos e antraquinônicos, para os extratos vegetais obtidos. As cromatografias em camada delgada foram realizadas seguindo as metodologias descritas por Wagner (1996) e Harbone (1984) com adaptações, utilizando cromatofolhas com fase estacionária sílica-gel F<sub>254</sub>, diferentes fases móveis, empregando reveladores específicos para cada grupo de metabólito secundário. Para visualização da formação de bandas na cromatograma foram empregado luzes de comprimento de onda nas regiões de 254 e 365 nm. Os resultados obtidos pela cromatografia foram confrontados com padrões de referência específicos para cada classe fitoquímica analisada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica dos extratos de *Senna macranthera*.

Metabólitos Secundários	Mistura Eluente	Revelador	Amostra de Referência
Alcalóides	Acetato de etila/Metanol/Água (100/14/10)	Reagente de Drangendorff	Quinina
Cumarinas	Tolueno/Éter (1:2)	Hidróxido de potássio 5% em etanol	Psoraleno
Geninas Flavônicas	Clorofórmio/Acetato de etila/Ácido fórmico (60:40:1)	Solução de Cloreto de alumínio a 5% em etanol	Quercetina
Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas	Tolueno/Acetona/Clorofórmio (60:20:20)	Hidróxido de potássio 5% em etanol	1,8-diidroxiantraquinona
Heterosídeos Antraquinônicos	Acetato de etila/Metanol/Água (81/11/8)	Hidróxido de potássio 5% em etanol	Aloína
Heterosídeos Flavônicos	Acetato de etila/Ácido fórmico/Ácido acético/Água (100/11/11/27)	Solução de Cloreto de alumínio a 5% em etanol	Rutina
Polifenóis (Taninos)	Tolueno/Butanol/Água (50:25:5)	Solução de $K_3Fe(CN)_6$ 1% e $FeCl_3$ 2% (1:1)	Ácido gálico
Triterpenos e esteroides	Hexano/Acetato de etila (1:1)	Reagente de Liebermann-Burchard	$\beta$ -sistosterol

### 3.2. Purificação do extrato de Acetato de Etila

Após a evaporação do solvente, o extrato (1g) foi cromatografado em cinco placas preparativas de 200 mg de sílica-gel cada. As frações obtidas foram analisadas e reagrupadas de acordo com a quantidade de material contido e complexidade da mistura (Figura 3).



**Figura 3.** Purificação do extrato de Acetato de Etila.

### **3.3. Elucidação estrutural do composto ativo**

A elucidação estrutural foi realizada através da Ressonância Nuclear Magnética e Espectrometria de Massas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica teve como objetivo o conhecimento dos constituintes químicos presentes em extratos vegetais de *S. macranthera*. Os resultados da prospecção fitoquímica realizada para os extratos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Resultados da prospecção fitoquímica por CCD.

<b>Metabólitos Secundários</b>	<b>ESE</b>	<b>ESA</b>	<b>ESD</b>	<b>ESH</b>
Alcalóides	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	-	-
Geninas Flavônicas	+	+	-	-
<b>Geninas Antraquinônicas e Naftoquinônicas</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-
<b>Heterosídeos Antraquinônicos</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-
Heterosídeos Flavônicos	+	+	-	-
Polifenóis (Taninos)	+	+	-	-
Triterpenos e esteróides	+	+	-	-

**Nota:** +: presença, -: ausência. **ESE** – Extrato Etanólico de *Senna*, **ESA** – Extrato em Acetato de etila de *Senna*, **ESD** – Extrato Diclorometânico de *Senna*, **ESH** – Extrato Hexânico de *Senna*.

A prospecção fitoquímica tem como objetivo o conhecimento dos constituintes químicos presentes em extratos vegetais e se torna bastante importante quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse.

O gênero *Senna* possui espécies com perfil químico bastante diversificado, apresentam flavonoides, antraquinonas, estilbenoides, dentre outros, como constituintes químicos de maior ocorrência, associados às atividades antibacteriana, citotóxica, antifúngica, antioxidante e hepatoprotetora relatadas (VIEGAS *et al.*, 2006)

No estudo fitoquímico dos extratos em acetato de etila e etanol, que apresentam maior polaridade, pode-se verificar a presença de polifenóis, geninas e heterosídeos flavônicos, geninas e heterosídeos antraquinônicos, cumarinas, triterpenos e esteroides.

As espécies do gênero *Senna* são notoriamente conhecidas por possuírem compostos antracênicos, como antraquinonas, antronas, antranóis, diantronas e outros. As antraquinonas constituem o grupo mais numeroso das quinonas naturais,

apresentam significativas atividades biológicas e sua ocorrência tem sido relatada em quase todas as espécies de *Senna* estudadas. Apresentam-se geralmente como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão distribuídas largamente no reino vegetal, desde as plantas superiores até os fungos e líquens (VAN GORDON *et al.*, 1999).

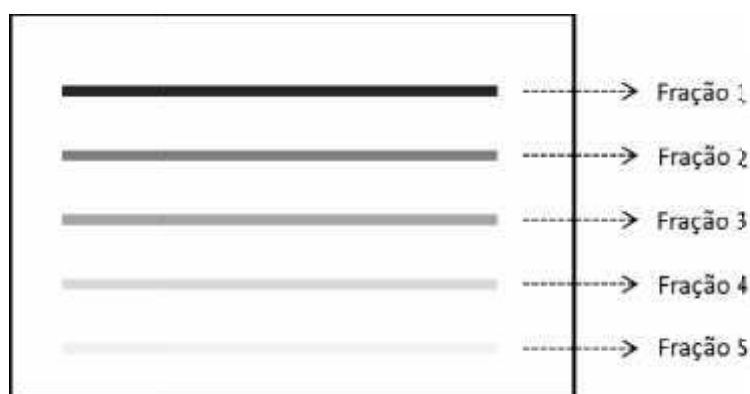
Das raízes de *S. macranthera* já foram isolados as antraquinonas emodina e fisiona (Figura 2, pág. 57).

O gênero *Senna* também se diferencia quimicamente pela ocorrência de alcaloides piperidínicos tipo alcaloides 2,6-dialquil-piperidin-3-óis, raros na natureza (VIEGAS *et al.*, 2006). No estudo realizado porem, não foi identificado presença de alcalóides embora isso não signifique a ausência desse grupo de metabólito nas demais partes da planta.

#### 4.2. Purificação do extrato de Acetato de Etila

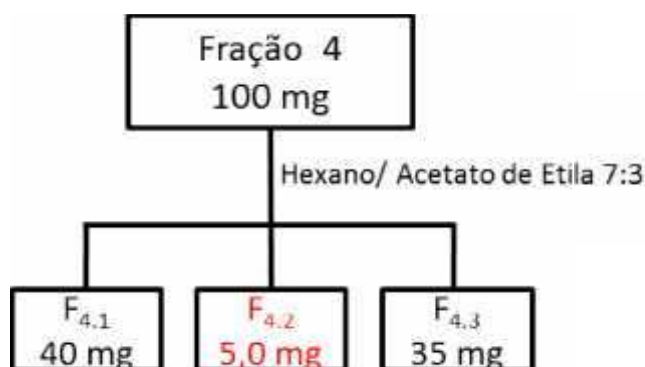
O extrato acetato de etila foi escolhido para isolamento, pois foi ligeiramente mais ativo que o extrato etanólico.

Foram obtidas cinco frações das cinco placas preparativas analisadas, conforme representado na Figura 4.



**Figura 4.** Obtenção das frações do extrato de Acetato de Etila por cromatografia em camada preparativa.

As frações de complexidade semelhante, de cada placa, foram coletadas e reunidas em béqueres distintos. A Fração 4 por apresentar menor complexidade foi recromatografada em placa preparativa usando-se como eluente hexano/acetato de etila 7:3 (Figura 5).



**Figura 5.** Purificação da Fração 4 do extrato de acetato de etila

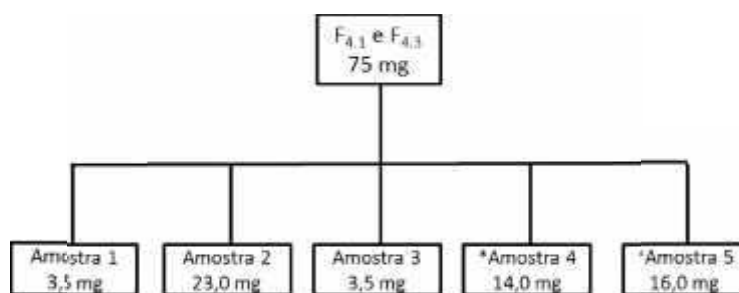
A fração  $F_{4.2}$  devido sua baixa complexidade foi analisada por análise espectral de RMN de  $^1\text{H}$ .

As frações  $F_{4.1}$  e  $F_{4.3}$  foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica-gel de 70-230 mesh (50 g), coletando-se 100 frações de 10 mL, utilizando-se como eluentes hexano, clorofórmio e metanol em polaridade crescente conforme mostrado na Tabela 2.

**Tabela 3.** Relação entre fração eluída/concentração do eluente do Extrato de Acetato de Etila

Frações	Eluentes
1 a 10	Hexano
11 a 20	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (95:5,0 v/v)
21 a 30	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (90:10 v/v)
31 a 40	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (80:20 v/v)
41 a 50	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (70:30 v/v)
51 a 60	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50 v/v)
61 a 70	Hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10:90 v/v)
71 a 80	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100)
81 a 90	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95: 5 v/v)
91 a 100	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95: 5 v/v)

As frações coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada e reunidas em 5 amostras de acordo com a complexidade da mistura (Figura 6).



**Figura 6.** Purificação da fração F<sub>4,1</sub> e F<sub>4,3</sub> do extrato de Acetato de Etila

### 4.3. Elucidação estrutural

Analisando a prospecção fitoquímica verificamos a provável presença de antraquinonas na forma de genina e heterosídeo fato que corrobora com as antraquinonas já isoladas desse extrato.

A Tabela 4 mostra o resultado do isolamento das frações obtidas do extrato de acetato de etila.

**Tabela 4.** Relação entre fração/substância isolada de flores de *Senna macranthera*.

Fração	Quantidade usada (mg)	Substância Isoladas	Quantidade (mg)	Classe
F <sub>4,2</sub>	50 mg	1	5,0	quinona
Amostra 4	75 mg	1	14	degradou
Amostra 5	75 mg	1	16	degradou

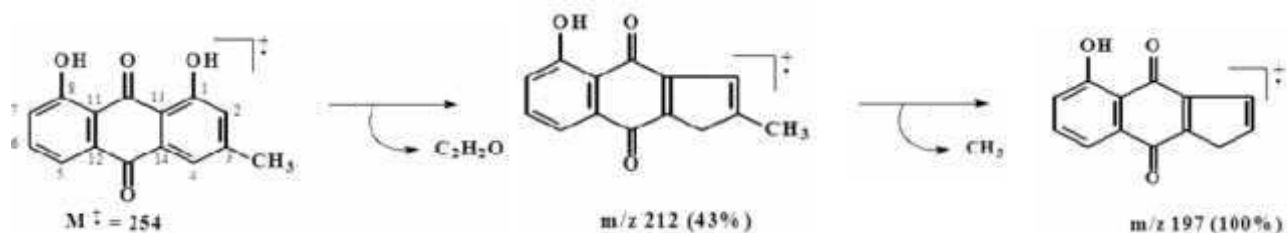
#### 4.3.1. Fração F<sub>4,2</sub>

A estrutura da fração F<sub>4,2</sub> foi elucidada pela espectrometria de massas e análise espectral de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.



**Figura 7.** Espectro de massas do composto F<sub>4,2</sub>.

No espectro de massas (Figura 7) o íon molecular é  $M^+$  254 e os principais fragmentos são  $m/z$  197 (100%) pico base,  $m/z$  212 (43%),  $m/z$  155 (30%) e  $m/z$  43 (70%). As possíveis fragmentações estão representadas na Figura 8.



**Figura 8.** Possíveis fragmentações da fração F<sub>4.2</sub>.

A análise espectral de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 9) mostra sinais de hidrogênios ácidos  $\delta$  12,03 (1H, s) e 12,14 (1H, s) relativos aos hidrogênios H-1 e H-8 respectivamente, hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,10 (1H, d, *J* 1,1Hz) e  $\delta$  7,67 (1H, d, *J* 1,1Hz) indicando acoplamento *meta* e com integração para um hidrogênio, relativos aos hidrogênios H-2 e H-4 respectivamente. Dois outros duplos dubletos centrados em  $\delta$  7,85 (1H, dd, *J* 7,52Hz e 1,4Hz) e 7,31 (1H, dd, *J* 7,62Hz e 1,4Hz) indicando acoplamento *meta* relativo aos hidrogênios H-5 e H-7.  $\delta$  7,70 (1H, t *J* 8,0Hz) indicando acoplamento orto entre o hidrogênio H-6 e os hidrogênios H-5 e H-2 respectivamente. Por outro lado, podemos observar um sinal singleto intenso em 2,47 ppm integrando para três hidrogênios referentes a metila na posição 3.

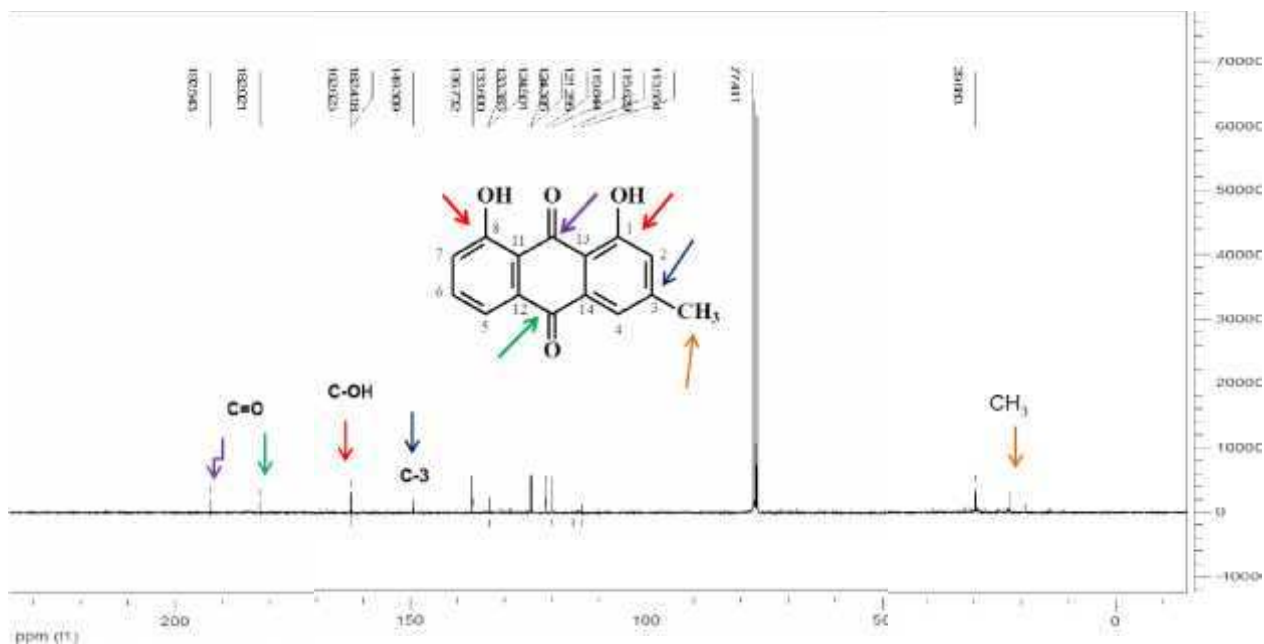


**Tabela 5.** Deslocamentos químicos para H<sup>1</sup> e C<sup>13</sup> correspondente ao crisofanol presente em flores de *S. macranthera*.

Posição	Deslocamento Químico (ppm)			
	<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C	
	Exp	Lit <sup>1</sup>	Exp	Lit <sup>1</sup>
<b>1 C-OH</b>	162,4	167,2	12,03 (s)	12,03
<b>2 C-H</b>	124,5	124,3	7,10 (1H, d, J 1,1 Hz)	7,21 (m)
<b>3 C</b>	149,3	149,8	-	-
<b>4 C-H</b>	121,4	120,9	7,67 (1H, d, J 1,1 Hz)	7,65 (m)
<b>5 C-H</b>	119,9	119,6	7,85 (1H, dd, J 7,52 Hz e 1,4 Hz)	7,85 (1H, dd, J 8,0Hz e 1,5Hz)
<b>6 C-H</b>	136,9	137,5	7,70 (1 H, t J 8,0Hz)	7,83
<b>7 C-H</b>	124,4	124,6	7,31 (1H, dd, J 7,62 Hz e 1,4 Hz)	7,37 (1H, dd, J 8,0 Hz e 1,5Hz)
<b>8 C-OH</b>	162,7	162,7	12,14 (s)	12,14 (s)
<b>9 C=O</b>	192,5	192,9		
<b>10 C=O</b>	182,0	181,9		
<b>11 C</b>	133,6	134,1		
<b>12 C</b>	115,9	116,2		
<b>13 C</b>	113,7	114,2		
<b>14 C</b>	133,3	133,8		
<b>CH<sub>3</sub></b>	22,4	21,4	2,47 (s)	2,42 (s)

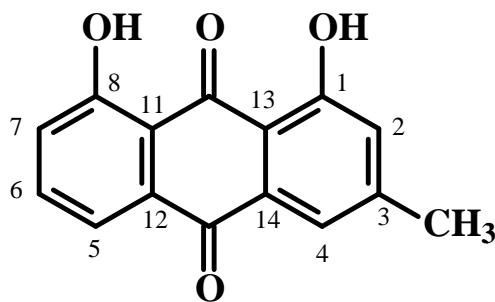
<sup>1</sup> CHOI *et al.*, 2005

No espectro de carbono 13 (Figura 10), obtido conforme análise espectral de RMN foi possível observar sinais característicos relativos aos carbonos referentes às carbonilas C-9 e C-10 em  $\delta$  192,5 e 182,0 respectivamente, os carbonos ligados à hidroxila, C-1 e C-8, em  $\delta$  162,4 e 162,7, respectivamente, e o carbono quaternário referente à C-3 em  $\delta$  149,3.



**Figura 10.** Espectral de Ressonância Nuclear Magnética de  $^{13}\text{C}$  da fração  $\text{F}_{4.2}$ .

De acordo com os dados espectrais (RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  e massas) obtidos e após uma análise minuciosa a partir de dados da literatura (MEHTA, 2011) podemos inferir que a substância  $\text{F}_{4.2}$  trata-se do 1,8-diidroxi-3-metilantraquinona também conhecido como crisofanol (Figura 11).



**Figura 11.** Estrutura do crisofanol.

O crisofanol é um derivado de antraquinona conhecido por possuir atividade antifúngica e antibacteriana (SURESH *et al.*, 2003) o que, em parte, pode justificar a atividade antimicrobiana observada no extrato de acetato de etila..

#### 4.3.2. Amostras 4 e 5

As amostras 4 e 5 não puderam ser identificadas devido à degradação dessas substâncias pelo aparelho durante sua análise.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo cromatográfico respaldado pela prospecção fitoquímica evidenciou a presença de quinonas no extrato ativo de Acetato de Etila (ESA), identificado como o crisofanol. Novas análises são necessárias para isolar os demais compostos desse extrato.
- De acordo com os dados da literatura, o crisofanol apresenta atividade antimicrobiana, o que poderia justificar a atividade desse extrato.
- A identificação do crisofanol no extrato de Acetato de Etila permite que estudos adicionais padronizem a quantidade desse princípio ativo no extrato, afim de que, sejam desenvolvidas formulações fitoterápicas com atividade antimicrobiana na prevenção da mastite bovina do gado leiteiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, K. Supercritical fluid chromatography-proton nuclear magnetic resonance spectroscopy coupling. **Journal of Chromatography**, v.785, p.65-83, 2002

ALEGRÍA, A. E.; DEJESÚS-ANDINO, F. J.; SANCHEZ-CRUZ, P. Quinone-enhanced sonochemical production of nitric oxide from s-nitrosoglutathione. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.16, p.190-196, 2009

BROSS-WALSH, N.; KÜHNT, T.; MOSKAU, D.; ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. **Chemistry & Biodiversity**, v.2, p.147-177, 2005.

CORCORAN, O.; SPRAUL, M. LC-NMR-MS in drug discovery. **Drug Discovery**, v.8, p.624-631, 2003.

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBB-NETO, L.; SANTOS, M. D.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques : uses in the structural elucidation of low-and high-molecular weight compounds. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Kerala: **Research Signpost**. 2008. p.99-142

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JHONSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **The Analyst**, v.130, p.606-625, 2005

EXARCHOU, V.; GODEJOHANN, M.; BEEK, T. A. V.; GEROTHANASSIS, I. P.; VERVOOR T., J. LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Oregano. **Analytical Chemistry**, v.75, p.6288-8294, 2003.

EXARCHOU,V.;KRUCKER, M.; BEEK, T. A. V.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I.P.; ALBERT, K. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance Chemistry**, v.43, p.681-687, 2005.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, *et al* (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 1999. p.545-571

Harborne, J.B.; Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2ª ed., Chapman and Hall, London and New York. 1984.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Biotechnology**, v.11, p.747-754, 2005.

HICKS, R. P. Recent Advances in NMR: Expanding its Role in Rational Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.627-650, 2001.

KOORY, V. C., MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; VERPOORT, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Médica**, v.75, p.763-775, 2009.

KOYAMA, J. Anti-Infective quinone derivatives of recent patents. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.1, p.113-125. 2005.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: uma abordagem biossintética. In: J. P. V. Leite (Ed.). Fitoterapia : Bases Científicas e Tecnológicas. São Paulo: Atheneu, v.Único, 2009. p.47-98

MEHTA, J. P.; Separation and characterization of anthraquinone derivatives from *Cassia fistula* using chromatographic and spectral techniques. **International Journal of Chemical Science**, v.10, p.306-16, 2012

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. Cengage.4ª Ed., 2010. 699p.

PHILLIPSON, J. D. 50 YEARS OF MEDICINAL PLANT RESEARCH – Every Progress in Methodology is a Progress in Science. **Planta Medica**, v.69, p.491-495, 2003.

REYNOLDS, W. F.; ENRYQUEZ, R. G. Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, postacquisition processing strategies, and probes for natural products structure elucidation by NMR spectroscopy. **Journal of Natural Products**, v.65, p.221-244, 2002

STAERK, D.; KESTING, J. R.; SAIRAFIANPOUR, M.; WITT, M.; ASILI, J.; EMAMI, S. A.; JAROSZEWSKY, J. W. Accelerates dereplication of crude extracts using HPLC-PDA-MS-SPE-NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*. **Phytochemistry**, v.70, p.1055-1061, 2009.

STEFANI, R. NASCIMENTO, P. G. B. D.; DA COSTA, F. B. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas utilizando computador: evoluções recentes. **Química Nova**, v.30, p.1347-1356, 2007.

STEINBECK, C. Correlations between chemical structures and NMR data. In: Gasteiger, J. Handbook of Chemoinformatics: From Data To Knowledge. Weinheim: Wiley: Wiley-VCH, 2003. p.1368-1377.

SURESH, B. K.; SRINIVAS, P. V.; PRAVEEN, B.; HARA, K., K.; SURYNARAYANA, M. U.; MADHUSUDANA, R. J. **Phytochemistry**, v.62, p.203-207, 2003.

THOMSON, R. H. Ed. Naturally occurring quinones III: recent advances. London: Chapman & Hall, Second Edition ed. 1987.

VAN GORDON, B. A. P.; VRIES, E. G. E.; KARRENBELDÀ, A.; KLEIBEUKER, J. H. Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Aliment and pharmacology Therapeutic**, v.13, p.443-452, 1999.

VIEGAS, J. R. C. A.; REZENDE, D. H. S.; SILVA, I. C.; GAMBÔA V. S.; BOLZANI, A. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cássia*. **Química Nova**, v.29, p.1279-1286, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas. 2ªed. Berlim: Spinger-Verlag. 384, 1996.

WOLFENDER, J-L.; RODRIGUEZ, S. HOSTETTMANN, K.; HILLER, W. Liquid Chromatography/Ultra Violet/ Mass Spectrometric and Liquid Chromatography/Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Crude Extracts of Gentianaceae Species. **Phytochemical Analysis**, v.8, p.97-104, 1997.

ZHANG, F.; BRUSCHWEILER-LI, L.; BRUSCHWEILER, R. Simultaneous of new identification of molecules in chemical mixtures by doubly indirect covariance NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, p.16922-16927, 2010.