

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**LUANA LOPES ALEXANDRE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA  
DAS FOLHAS E CAULE DE UM ESPÉCIME DE  
*Achyrocline alata* (Asteraceae) QUE OCORRE NA  
RESERVA INDÍGENA PORTO LINDO - JAPORÃ/MS**

Mundo Novo - MS

Novembro – 2012

**LUANA LOPES ALEXANDRE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA  
DAS FOLHAS E CAULE DE UM ESPÉCIME DE  
*Achyrocline alata* (Asteraceae) QUE OCORRE NA  
RESERVA INDÍGENA PORTO LINDO - JAPORÃ/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Francisca Gomes da Silva**

Mundo Novo - MS

Novembro – 2012

**LUANA LOPES ALEXANDRE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA  
DAS FOLHAS E CAULE DE UM ESPÉCIME DE  
*Achyrocline alata* (Asteraceae) QUE OCORRE NA  
RESERVA INDÍGENA PORTO LINDO - JAPORÃ/MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**APROVADO EM 20 de NOVEMBRO de 2012**

Profa. Dra. Ana Francisca Gomes da Silva – Orientador(UEMS)\_\_\_\_\_

Profa. MSc. Claudia U. N. B. Deinzer Duarte – (UEMS)\_\_\_\_\_

Prof. MSc. Wagner Lopes Klein – (UEMS)\_\_\_\_\_

Dedico este trabalho à minha família,  
por todo amor e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus acima de tudo...

A Profa. Dra. Ana Francisca Gomes da Silva pela orientação durante todo o trabalho de conclusão do curso, pela paciência e confiança.

A Profa. MSc. Claudia Universal Neves Batista Deinzer Duarte pela identificação da planta.

Aos meus queridos amigos, Viviane, Lucas, Tiago e Rafael pelo suporte e amizade durante os testes e grande companhia no laboratório.

A Sabrina e Daniele pela amizade e auxílio em vários momentos durante o curso, e onde encontrei verdadeiras irmãs.

Ao meu marido Ademir e filha Alanna, por serem tão importantes em minha vida, pelo amor e compreensão durante a minha ausência nas horas que estive trabalhando em meu projeto.

Ao meu pai Elizeo e os meus irmãos Elizeo, Kawane e Endrio, por ser parte essencial em minha vida.

Em especial a minha mãe Agripina, cujo sonho da conclusão de um curso superior se fez presente, sendo uma vitória conquistada por mérito também da dedicação dela, que é para mim uma grande inspiração.

Aos professores, pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha futura vida profissional.

A Elenir, Tatiana, Luana, Márcia, Rosalina, e aos demais funcionários da universidade.

Aos colegas de classe pelas horas de estudo e tantos momentos agradáveis.

Obrigada a todos que, mesmo não sendo citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa tão importante.

E finalmente a UEMS pela oportunidade oferecida com a bolsa de iniciação científica que me foi concedida durante o curso de graduação.

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

Leonardo da Vinci

## RESUMO

*Achyrocline alata* popularmente conhecida como jateí ka'a é muito utilizada pelos indígenas da aldeia Porto Lindo localizada no município de Japorã-MS para o tratamento de várias doenças, principalmente uterinas e doenças sexualmente transmissíveis. O presente projeto teve como objetivo realizar a análise química e a avaliação das atividades biológicas das folhas e caule de um espécime de *Achyrocline alata* que ocorre na aldeia Porto Lindo. Os extratos etanólicos brutos obtidos das folhas e caule foram submetidos a testes analíticos qualitativos, através de screening fitoquímico, com a finalidade de identificar as principais classes de metabólitos secundários. Os extratos foram ainda submetidos ao ensaio de toxicidade para *Artemia salina* e ao teste de atividade antioxidante com revelador  $\beta$ -caroteno. Os testes analíticos demonstraram a presença de triterpenos e/ou esteroides no extrato das folhas, alcaloides e taninos no extrato do caule, cumarinas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos em ambos os extratos. Os ensaios biológicos revelaram considerável toxicidade frente a *A. salina* e potencial antioxidante para ambos os extratos.

**Palavras-chave:** Jateí ka'a. Metabólitos secundários. Plantas medicinais.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	8
1.1. Família Asteraceae - <i>Achyrocline alata</i>	10
1.2. Ensaio biológicos	11
1.2.1. Toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	11
1.2.2. Teste de atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno	11
<b>2. OBJETIVOS</b>	12
2.1. Objetivos gerais	12
2.2. Objetivos específicos	12
<b>3. METODOLOGIA</b>	12
3.1. Coleta do material	12
3.2. Preparações dos extratos	13
3.3. Testes analíticos qualitativos - Screening fitoquímico	14
3.4. Ensaio biológicos	14
3.4.1. Ensaio de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	14
3.4.2. Teste de atividade antioxidante utilizando $\beta$ -caroteno	15
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	15
4.1. Testes analíticos qualitativos - Screening fitoquímico	15
4.2. Ensaio biológicos	21
4.2.1. Ensaio de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	21
4.2.2. Teste de atividade antioxidante utilizando $\beta$ -caroteno	21
<b>5. CONCLUSÕES</b>	22
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	22



## 1. INTRODUÇÃO

O interesse dos povos indígenas em relação ao meio ambiente, e em especial aos vegetais, data de milhares de anos. Registros históricos demonstram que na antiguidade, o homem já conhecia diversas propriedades das plantas, dentre estas, destaca-se as suas propriedades medicinais. O conhecimento sobre o valor terapêutico das espécies vegetais vem sendo transmitido, ao longo dos tempos, de geração a geração, formando, juntamente com outras práticas, um sistema médico, conhecido como tradicional (SIMÕES et al., 2003).

A sociedade indígena pode ser considerada a maior e mais confiável fonte do conhecimento empírico existente, e tem mostrado seu valor através dos tempos, pois ainda detêm uma grande quantidade de informações inexploradas pela ciência sobre formas de como lidar com ambientes biologicamente diversificados e que podem ser úteis para compreensão dos ecossistemas e para o desenvolvimento de atividades produtivas menos predatórias (SANTOS et al., 2010).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram e ainda constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área mostram-se impressionados com a diversidade de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos encontrados na natureza (WALL; WANI, 1996). Apesar do grande número de pesquisas nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996; SIMÕES et al., 2003).

No Brasil existe uma flora bastante diversificada, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características, no entanto, estima-se que apenas 8% foram estudadas quimicamente e que cerca de 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (REZENDE; COCCO, 2002).

Uma abordagem de bioprospecção bastante interessante e que têm encontrado muitos resultados é a que se baseia em estudos etnobotânicos. Essa abordagem direciona as pesquisas farmacológicas para plantas que já vêm sendo utilizadas popularmente em tratamentos medicinais (BASSO et al., 2005).

No estado de Mato Grosso do Sul, tem-se observado que há poucas referências etnobotânicas, particularmente para os povos indígenas da região sul deste estado, principalmente relacionadas a estudos químicos e biológicos das espécies medicinais

utilizadas por estes grupos indígenas. Em levantamentos anteriores foi relatado que os índios pertencentes à etnia guarani Ñandeva e Kaiowá da aldeia Porto Lindo localizada no extremo sul desse estado, no município de Japorã/MS utilizam diversas plantas medicinais como forma de tratamento para várias patologias e também em rituais relacionados à sua cultura (ROCHA et al., 2005), entretanto, nenhum estudo químico e biológico foi realizado com plantas que ocorrem nesta aldeia.

Neste contexto, pesquisas são desenvolvidas nos laboratórios das Unidades de Mundo Novo e Naviraí da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, incluindo-se a que consiste em estudar plantas medicinais selecionadas com base no conhecimento tradicional de populações indígenas, visando identificar as principais classes de compostos orgânicos, bem como, isolar e caracterizar metabólitos secundários bioativos e não ativos. Nesses estudos extratos brutos são submetidas à bioensaios simples e de baixo custo, tais como de toxicidade para *Artemia salina* e ao teste de atividade antioxidante utilizando-se como revelador  $\beta$ -caroteno.

Assim, foi selecionado para análise química e avaliação das atividades biológicas, um espécime de *Achyrocline alata* (Asteraceae) (Figura 1) que ocorre na aldeia Porto Lindo conhecida como jateí ka'a, utilizada no tratamento de doenças uterinas e doenças sexualmente transmissíveis pelos indígenas da aldeia. Desta forma pretendeu-se contribuir para o conhecimento da composição química, bem como, do potencial farmacológico das espécies usadas como medicamentos pela população indígena.



Figura 1- Folhas de *Achyrocline alata* (MERCADANTE, 2012).

## 1.1. Família Asteraceae - *Achyrocline alata*

A família Asteraceae compreende cerca de 1.600 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies, e de ampla distribuição geográfica, bem representada em regiões tropicais, subtropicais e temperada (BREMER, 1994; JOLY, 1998). No Brasil, estão representadas por aproximadamente 196 gêneros e 1900 espécies, sendo bastante representativa na flora do cerrado brasileiro, com cerca de 540 espécies registradas (BARROSO, 1991).

Essa família consiste na sua maior parte de ervas, mas também incluem algumas árvores de lenha e arbustos (MONDIN, 2006; HEYWOOD, 1993). Engloba espécies de relevância para cosmética, indústria farmacêutica e alimentícia (ZOMLEFER, 1994). Algumas espécies de Asteraceae são também utilizadas na medicina caseira, como por exemplo, *Artemisia absinthium*, uma erva de sabor amargo conhecida popularmente como losna, com benéficas funções digestivas (JOLY, 1998).

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, uma vez que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (ZOMLEFER, 1994). Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários, tais como, os flavonoides com reconhecida importância para a medicina no tratamento e prevenção de várias doenças (HARBORNE, 2000). Os constituintes químicos isolados de plantas da família Asteraceae, apresentam atividades variadas como antioxidante, alopática, espasmolítica, antibacteriana, antiviral, citotóxica, inseticida, gastroprotetora, antileucêmica, antibiótica, antifúngica, vasorelaxante, moluscicida e antimutagênica (VERDI et al., 2005).

Inserido na família Asteraceae, *Achyrocline* é um gênero que inclui mais de trinta espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, não só no Brasil como também nas Américas do Sul e Central e na África, incluindo Madagascar (BREMER et al., 1994). Na América do Sul são encontradas *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* e *A. satureioides* (SOUZA, 2002).

*Achyrocline alata* (Kunth) D. C. (Figura 1) espécie medicinal que ocorre no Brasil, principalmente no cerrado, é conhecida como macela, güira-güira ou jatei-kaá e é muito procurada para usos medicinais, sendo aproveitada tanto a planta como as inflorescências. Possui propriedades digestivas, colagoga, eupéptica, antiespasmódica, carminativa, antiinflamatória, emenagoga (SIMÕES et al., 1995; VOLPE et al., 2006), além de apresentar propriedades antioxidantes e antisépticas (ARREDONDO et al., 2004).

Investigações químicas de *A. alata* resultaram no isolamento de diferentes compostos fenólicos, flavonoides (BROUSSALIS et al., 1993), sesquiterpenos (BOHLMAN et al., 1980) e óleo volátil (LABUCKAS et al., 1999). No entanto, existem poucos relatos sob o ponto de vista farmacológico para essa espécie. Extratos obtidos da inflorescência de *A. alata* foram ativos como captadores de radicais livres e apresentaram potencial antioxidante (ZAMPIERON et al., 2009), num outro trabalho, o extrato acetato de etila de *A. alata* não apresentou atividade antimalárica quando testados em ratos infectados pelo *Plasmodium berghei* (MARIATH et al., 2009).

## **1.2. Ensaio biológicos**

### **1.2.1. Toxicidade frente *Artemia salina***

O método de análise com *Artemia salina* é proposto como um bioensaio para pesquisa preliminar de atividade de produtos naturais. O ensaio consiste numa abordagem inicial visando à seleção de extratos contendo substâncias com potencial atividade antitumoral, baseando-se na correlação observada entre a toxidez sobre o microcrustáceo *A. salina* e a citotoxicidade sobre células cancerosas do tipo P-388 (MCLAUGHLIN, 2008; MEYER et al., 1982). Trata-se de uma metodologia simples, rápida, barata e reprodutível, como um substituto para os ensaios citotóxicos com células e que pode ser empregada como ensaio biológico para a detecção de constituintes ativos de plantas em extratos brutos (LUNA et al., 2005). O ensaio permite ainda a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al.; 2000).

### **1.2.2. Teste de atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno**

A detecção de atividade antioxidante em extratos brutos de plantas se torna importante, pois a busca na prevenção de doenças degenerativas aumentou o interesse na descoberta de novos antioxidantes de origem natural visando à manutenção do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante corporal, evitando-se assim, o estresse oxidativo (RICE-EVANS, 1996). A análise por cromatografia em camada delgada utilizando  $\beta$ -caroteno (Figura 2) como revelador consiste numa abordagem preliminar para a determinação de atividade antioxidante em extratos brutos (PRATT; MILLER 1984) e tem sido amplamente empregada na detecção

de produtos naturais com propriedade antioxidante. Esta técnica apresenta muitas vantagens como fácil execução e compreensão, simplicidade, versatilidade e baixo custo. O  $\beta$ -caroteno é um pigmento natural encontrado em várias frutas e vegetal da classe dos carotenóides, que atua como antioxidante devido às suas ligações duplas conjugadas, que são suscetíveis à oxidação sob ação de luz ou oxigênio (ZERAIK; YARIWAKE, 2008).

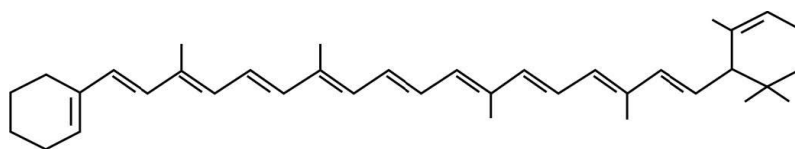


Figura 2 - Estrutura do  $\beta$ -caroteno

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos realizar análise química e avaliação das atividades biológicas de um espécime de *Achyrocline alata*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar testes analíticos qualitativos, através de screening fitoquímico dos extratos etanólicos brutos das folhas e caule para identificar os principais grupos orgânicos presentes.
- Submeter os extratos a ensaios de atividades biológicas, particularmente os de toxicidade para *Artemia salina* e de atividade antioxidante com revelador  $\beta$ -caroteno.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Coleta do material

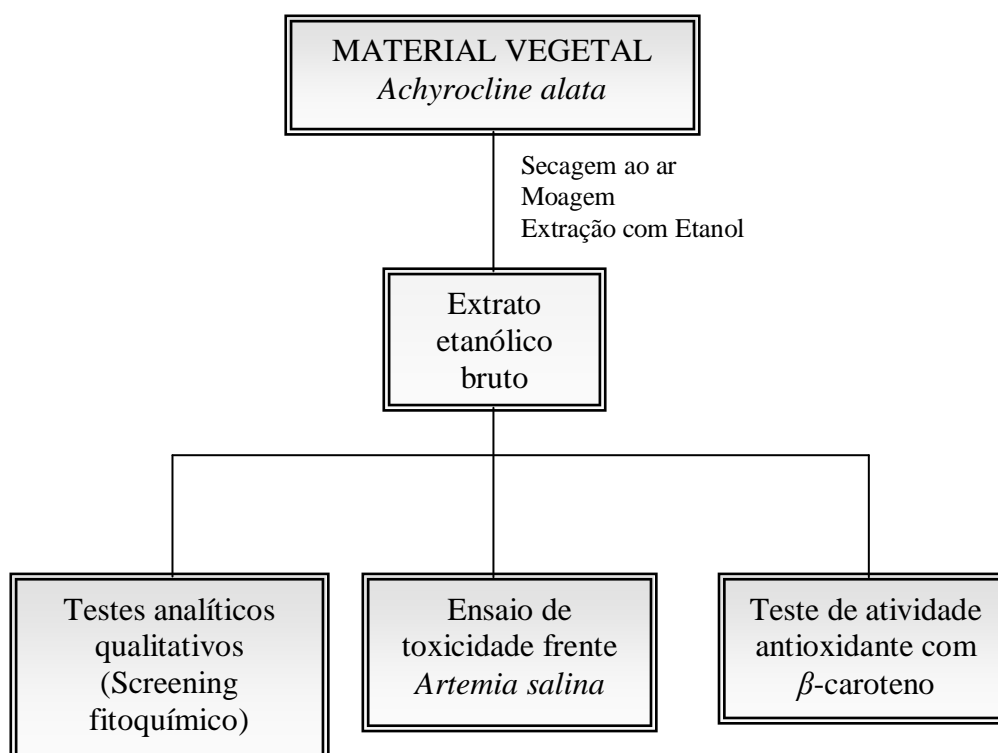
O material vegetal (folhas 200 g; caule 200 g) foi coletado na reserva indígena Porto Lindo em Japorã/MS, em fevereiro de 2011. A confirmação da identificação em nível de

espécie foi realizada pela professora da área de botânica MSc. Claudia Universal Neves Batista Deinzer Duarte na Unidade Universitária de Mundo Novo-UEMS.

### 3.2. Preparações dos extratos

As folhas e caule foram submetidos à secagem ao ar, posteriormente moídos e extraídos exaustivamente com etanol, a frio. Cada extrato obtido foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa, sendo submetidos então, aos testes analíticos qualitativos (screening fitoquímico) e ao ensaio de toxicidade frente *A. salina* e ao teste de atividade antioxidante (Esquema 1).

Esquema 1 - Obtenção e ensaios biológicos dos extratos etanólicos brutos (folhas e caule) de *Achyrocline alata*.



### 3.3. Testes analíticos qualitativos - Screening fitoquímico

Os extratos etanólicos brutos das folhas e do caule foram submetidos à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (SIMÕES et al., 2004).

Realizaram-se testes para alcaloides com os reativos de Bouchardat, Dragendorff, Wagner e Mayer, cumarinas voláteis usando hidróxido de sódio, taninos e depsídeos e depsídonas usando cloreto férrico. Triterpenos e/ou esteroides através da reação de Lieberman-Burchard, proteínas e aminoácidos por meio de reações de Molish e de Ninhidrina ácidos orgânicos com reativo de Páscová, flavonoides por meio da reação Shinoda, sesquiterperlactonas e outras lactonas utilizando os reagentes cloridrato de hidroxilamina e cloreto férrico. Antraquinonas por meio da reação de Bornträger, purinas usando peróxido de hidrogênio, catequinas usando vanilina, açúcares redutores com reativo de Fehling, polissacarídeos usando o reagente Lugol e ainda teste para saponina espumídica.

### 3.4. Ensaio biológicos

#### 3.4.1. Ensaio de toxicidade frente *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade para *A. salina* com os extratos etanólicos brutos das folhas e caule foi realizado de acordo com a técnica descrita na literatura (MCLAUGHLIN, 2008; MEYER et al., 1982).

Inicialmente foi preparado 1 litro de solução de sal marinho (38g/L) para incubação dos ovos de *A. salina*, que foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 100 watts) durante 48 horas para a eclosão das larvas. Para efetuar o ensaio, foram colocados, em duplicata, dez exemplares de náuplios em poços contendo 5 mL de solução salina com os extratos nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 µg/mL. Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições sem a presença dos extratos. Os poços foram mantidos sob luz artificial e temperatura ambiente por um período de 24 horas (Figura 3). Após esse período, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes do grupo controle e dos grupos expostos aos extratos. Com base nos dados obtidos, estimou-se para cada extrato a dose letal de 50% para os microcrustáceos (DL<sub>50</sub>) através do método de Análise de Probitos (FINNEY, 1971), com 95% de intervalo de confiança, usando software BioStat 2009.



Figura 3 - Ensaio de toxicidade para *A. salina* (Foto: Alexandre, 2012).

### 3.4.2. Teste de atividade antioxidante utilizando $\beta$ -caroteno

O ensaio de atividade antioxidante com os extratos etanólicos brutos das folhas e caule, utilizando  $\beta$ -caroteno como revelador foi executado de acordo com a metodologia descrita na literatura (PRATT; MILLER, 1984).

Inicialmente foi preparado o revelador  $\beta$ -caroteno conforme a técnica descrita na literatura (ZERAIK; YARIWAKE, 2008). Os extratos foram então depositados em placa de cromatografia em camada delgada de sílica gel. Após a secagem, o cromatograma foi vaporizado com a solução de  $\beta$ -caroteno. Em seguida a placa foi colocada sob luz ultravioleta (254 nm) e iluminação natural até o fundo tornar-se descolorido para observação do aparecimento de manchas alaranjadas, característico da presença de substâncias com atividade antioxidante.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Testes analíticos qualitativos - Screening fitoquímico

A composição química de extratos revelada através de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo possibilita identificar as possíveis classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico que estão presentes nos extratos, para que se possa delinear o



melhor método para isolamento e identificação das substâncias e os bioensaios a que devem ser submetidas (COSTA et al., 2009).

Assim, o resultado da triagem fitoquímica preliminar dos extratos brutos etanólicos das folhas e caule de *A. alata* revelou classes de metabólitos secundários com conhecida propriedade farmacológica. Os testes analíticos preliminares indicaram no extrato etanólico bruto das folhas de *A. alata* a presença de cumarinas voláteis, triterpenos e/ou esteroides, proteínas e aminoácidos e ácidos orgânicos, enquanto que, no extrato etanólico bruto do caule a presença de alcaloides, taninos e também cumarinas, proteínas e aminoácidos e ácidos orgânicos, tal como nas folhas. Os compostos orgânicos depsídeos e depsídonas, flavonoides, sesquiterperlactonas e outras lactonas, saponinas, antraquinonas, purinas, catequinas, açúcares redutores e polissacarídeos não tiveram sua presença constatada nos testes (Tabela 1).

Tabela 1. Classe dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos brutos das folhas e do caule de *A. alata* e os respectivos valores de DL<sub>50</sub> com 95% de confiança.

<b>Classe de metabólitos secundários</b>	<b>Folhas</b>	<b>Caule</b>
Alcaloides	-	+
Cumarinas voláteis	+++	+++
Triterpenos e/ou esteroides	+++	-
Taninos condensados	-	+++
Proteínas e aminoácidos	++	++
Ácidos orgânicos	++	++
Depsídeos e depsídonas	-	-
Flavonoides	-	-
Sesquiterperlactonas e outras lactonas	-	-
Saponinas	-	-
Antraquinonas	-	-
Purinas	-	-
Catequinas	-	-
Açúcares redutores	-	-
Polissacarídeos	-	-
DL <sub>50</sub> (µg/mL)	503,22	332,50

Legenda: +++ fortemente positivo, ++ moderadamente positivo, + fracamente positivo, - negativo.

O resultado positivo para alcaloides no extrato etanólico bruto do caule foi constatado por reações específicas. Nos testes fitoquímicos realizados, houve formação de precipitado laranja avermelhado com o reativo de Bouchardat, precipitado creme com o reativo de Mayer e precipitado marrom para o reativo de Wagner evidenciando, portanto, a presença desse tipo de substância (Figura 4).



Figura 4 - Resultado do teste analítico para alcaloides em extrato etanólico bruto do caule de *A. alata*.  
(Foto: Alexandre, 2012).

Metabólitos secundários pertencentes à classe dos alcaloides são compostos nitrogenados estruturalmente bastante diversificados (Figura 5) e caracterizam-se por apresentar uma ampla gama de atividades biológicas como anticolinérgica, emética, antimalárica, anti-hipertensiva, hipnoanalgésica, amebicida, estimulante do SNC, antiviral, miorelaxante, anestésica, antitumoral, antitussígeno, colinérgica, dentre outras (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

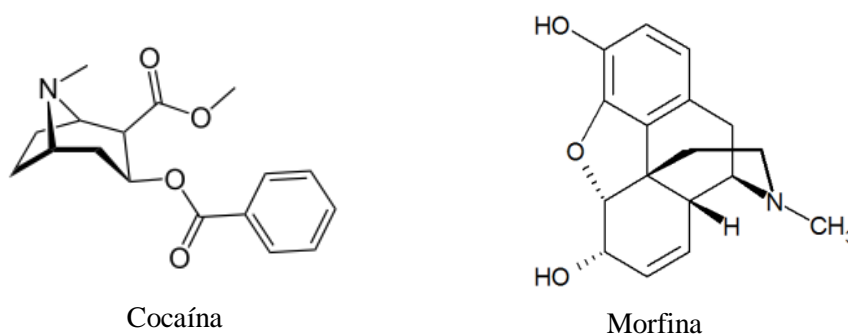


Figura 5 - Exemplo de moléculas de alcaloides

Esses compostos são aplicados principalmente na produção de fármacos naturais devido sua semelhança com proteínas e ácidos nucleicos (GARCEZ et al., 2011). No entanto, apesar de todas essas propriedades curativas atribuída a esse grupo de metabólitos secundários, suas concentrações são muito variáveis e por esse motivo as plantas contendo alcaloides devem ser consideradas potencialmente tóxicas (ROBBERS et al., 1997).

Para taninos condensados também presente apenas no extrato etanólico bruto do caule observou-se nos testes a cor verde escuro usando o reagente cloreto férrico (Figura 6), enquanto que, o resultado positivo para cumarinas voláteis em ambos os extratos foi obtido através da observação de fluorescência sob luz UV.



Figura 6 - Resultado do teste analítico para flavonoides e taninos em extratos etanólicos brutos de *A. alata* (Foto: Alexandre, 2012).

Quimicamente, os fenólicos tais como cumarinas (Figura 7) e taninos (Figura 8) são definidos como substâncias de estrutura variável que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005).

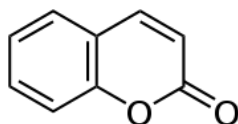


Figura 7 - Estrutura básica de uma molécula de cumarina

Compostos de natureza fenólica são incluídos na categoria de bloqueadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto-oxidação (SHAHIDI et al., 1992). Para cumarinas atribui-se ainda propriedades antibióticas, bronco dilatadora, anticoagulante,

antimicrobiana e antitumoral (RODRIGUES, 2005). As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico e por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Uma série de bactérias é sensível aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (MONTEIRO et al., 2005).

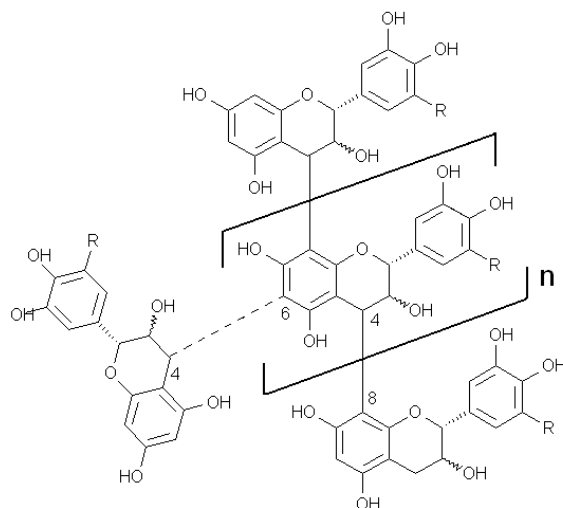
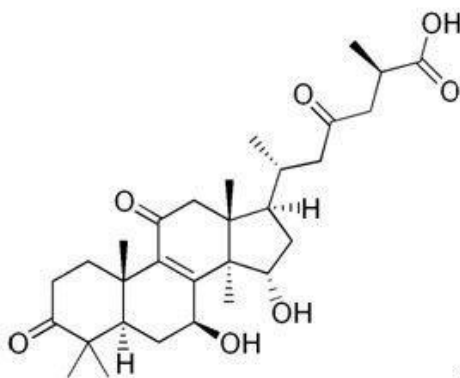


Figura 8 - Estrutura básica de uma molécula de tanino condensado

A presença de triterpenos e/ou esteroides no extrato etanólico das folhas foi constatada pela observação, na reação de Liebermann-Burchard, de uma sucessão de cores, do azul evanescente seguido de verde persistente. Os triterpenos e/ou esteroides são produtos naturais pertencentes à classe dos terpenos (Figura 9) e apresenta atividade antimicrobiana, antileishmanicida, candidacida, antiinflamatória e analgésica (SILVA, 2005).



Acido ganodérico

Figura 9 - Exemplo de uma molécula de triterpeno

Plantas ricas em esteroides podem também ser empregadas pelas indústrias farmacêuticas como moléculas de partida para a obtenção de fármacos esteroidais semi-sintéticos, como os anticoncepcionais, antiinflamatórios esteroidais e anabolizantes (OLIVEIRA, 2007).

As proteínas e aminoácidos tiveram sua presença confirmada através do teste de Molish, observando-se um anel violáceo entre as duas fases em cada um dos extratos. As macromoléculas de proteínas são formadas por centenas de aminoácidos, ligados em seqüência. Esta característica confere às proteínas uma enorme complexidade e possibilidade de variação, apresentando diferentes propriedades medicinais de interesse farmacológico (HARVEY & CHAMPE, 1996; PINTO et al., 2002).

Quanto aos ácidos orgânicos sua presença foi comprovada por descolorarem o reativo de Páscová. Na planta estes compostos são usados para regular o pH das células e produzir, a partir deles, várias substâncias complexas, sendo então comum a presença desta classe de compostos nas plantas, assim como a ocorrência de proteínas e aminoácidos. A presença de ácidos orgânicos em *A. alata* foi descrita anteriormente por Lopez et al., 2007. Nesses estudos das partes aéreas da planta foram isolados os ácidos caféico, clorogênico e isoclorogênico, os quais apresentam atividade antioxidante comprovada (SOARES, 2002).

Em relação à presença de alcaloides no extrato etanólico bruto do caule, este e o primeiro relato dessa classe de compostos nessa espécie, porém os alcaloides foram detectados no extrato, com reação fracamente positiva, indicada na tabela 1 por apenas um sinal positivo. A constatação dos grupos triterpenos, cumarinas e taninos na espécie em estudo estão de acordo com investigações prévias, que relatam essas classes de compostos para outra espécie do gênero, *Achyrocline satureioides* (SILVA et al., 2007).

A resposta negativa para flavonoide foi um resultado inesperado (Figura 6), uma vez que outros estudos relatam a presença de inúmeros flavonoides em diferentes partes da planta (LOPEZ et al., 2007; BROUSSALIS et al., 1993; MUSSURY et al., 2007; ZAMPIERON et al., 2009). No entanto, esse resultado pode ser atribuído a alguns fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas, como sazonalidade, diferenças geográficas dos locais de coleta, desenvolvimento vegetal, disponibilidade hídrica e de nutrientes entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os resultados obtidos nos testes analíticos qualitativos no presente estudo proporcionam evidências de que *A. alata* apresenta em suas folhas e caule compostos orgânicos que possuem aplicações medicinais e podem ser os responsáveis pelo uso dessa planta como medicamento pela comunidade indígena da aldeia Porto Lindo. Mesmo assim,

esses resultados não sugerem o consumo terapêutico da espécie sem continuidade de novos estudos químicos e biológicos a fim de identificar as substâncias presentes nos extratos que realmente contribuem para a sua atividade biológica.

## **4.2. Ensaio biológicos**

### **4.2.1. Ensaio de toxicidade para *Artemia salina***

Meyer *et al.* (1982), estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL<sub>50</sub>, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 µg/mL, estes, são considerados atóxicos. Sendo assim, os extratos de *A. alata* podem ser considerados tóxicos, uma vez que apresentaram valores de DL<sub>50</sub> da ordem de 503,22 µg/mL para o extrato etanólico bruto das folhas e DL<sub>50</sub> 332,5 µg/mL para o extrato etanólico bruto do caule (Tabela 1). Portanto pode-se observar por meio do bioensaio com *A. salina* a presença de compostos tóxicos tanto no extrato das folhas, como no extrato do caule de *A. alata*.

Dentre as classes de metabólitos secundários detectadas, a classe dos alcaloides é considerada potencialmente tóxica (ROBBERS *et al.*, 1997). Desta forma a presença de alcaloides, tal como a presença de taninos, apenas no extrato etanólico bruto do caule parece influenciar na toxicidade da planta (LIMA *et al.*, 2009), uma vez que, foi observado valor de DL<sub>50</sub> mais significativo que o observado para o extrato etanólico bruto das folhas evidenciando que o extrato etanólico bruto do caule foi mais ativo que o extrato etanólico bruto das folhas.

### **4.2.2. Teste de atividade antioxidante utilizando β-caroteno**

A propriedade antioxidante de cada extrato foi avaliada por autografia com β-caroteno. Tanto o extrato etanólico bruto das folhas como do caule de *A. alata* apresentaram uma coloração caracteristicamente alaranjada sobre a placa de cromatografia, mostrando ação protetora sobre o β-caroteno, e sugerindo potencial antioxidante para os extratos, o que corrobora com os resultados obtidos com extratos da inflorescência de *A. alata* avaliado em estudos prévios (ZAMPIERON *et al.*, 2009).

Como já descrito anteriormente compostos fenólicos tais como cumarinas e taninos identificados nos extratos de *A. alata* são incluídos na categoria de bloqueadores de radicais

livres, sendo muito eficientes na prevenção da auto-oxidação (SOARES, 2002; SOUSA et al., 2007). Assim esses grupos de compostos orgânicos podem ser os responsáveis pela ação antioxidante observada para os extratos etanólicos brutos das folhas e caule de *A. alata*.

O teste de atividade antioxidante utilizado neste trabalho apresenta boa reprodutibilidade para a pesquisa de novos compostos captadores de radicais livres e sugerem a necessidade de outros estudos visando à constatação do potencial antioxidante da planta (NUNES et al., 2008; MORAIS et al., 2009).

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, os testes analíticos qualitativos realizados indicaram a presença de triterpenos e/ou esteroides no extrato etanólico bruto das folhas de *A. alata*, a presença de alcaloides e taninos no extrato etanólico bruto do caule e de cumarinas voláteis, proteínas e aminoácidos e ácidos orgânicos em ambos os extratos. Nos ensaios biológicos os extratos mostraram toxicidade frente às larvas de *A. salina*, sendo o extrato etanólico bruto do caule de *A. alata* mais tóxico em relação ao extrato das folhas, e ação antioxidante no teste com  $\beta$ -caroteno.

Os resultados encontrados podem explicar o uso, com frequência de *A. alata* como medicamento pelos indígenas da reserva Porto Lindo, uma vez que, os grupos orgânicos identificados nos extratos das folhas e caule da planta apresentam inúmeras atividades farmacológicas. Porém estudos posteriores são necessários, a fim de isolar e identificar as substâncias presentes na planta responsáveis pela sua ação tóxica frente a *A. salina* e antioxidante observado neste estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 13-20, 2004.

BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Antiinflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 109-134, 2006.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 3 ed. Editora UFV: Viçosa, MG. 377 p. 1991.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A. G.; JUNIOR, W. F. A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 575-606, 2005.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W. R.; ROBINSON, H.; KING, R. M. A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2475-2477, 1980.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and classification**. Timber Press, Portland, 429 p. 1994.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of *Achyrocline alata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, p. 306-306, 1993.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, p. 20-22, 2000.

COSTA, E. S. S.; DOLABELA, M. F.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, D. J.; MÜLLER, A. H.. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 834-838, 2009.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press. 3. ed. Cambridge: 76-80p, 1971.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, F. M. C.; SANTOS, E. C.; QUEIROZ, L. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, p. 383-387, 2011.

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

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARVEY, R.; CHAMPE, P. C. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. Artes Médicas, 1996.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 1993. 336p.

JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. Ed. Nacional: São Paulo, 1998. 777p.



LABUCKAS, D. O.; MAESTRI, D. M.; GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A. Essential oils of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. **Planta Medica**, v. 65, p. 184-186, 1999.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T., LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.

LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, T. G.; SILVA, M. B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, p. 7-11, 2009.

LOPEZ, P.; BROUSSALIS, A. M; RODRIGUEZ, M.; COUSSIO, J. D.; FERRARO, G. E. Análises de amostras comerciais de marcela (*Achyrocline satureioides*). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 15, p. 243-249, 2007.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 199-206, 2005.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F, TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 158-192, 2009.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 1311, 2008.

MERCADANTE, M. 2012. Largura: 375 pixels. Altura: 500 pixels. 322 Kb. 300 dpi. Formato JPG. Disponível em: <<http://www.flickr.com/groups/1581217@N25/pool/random/>>. Acesso em: 20 de Outubro de 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp – a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONDIN, C. A. **Os avanços da Botânica no início do século XXI- morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética: Riqueza genérica e dados biogeográficos das Asteráceas brasileiras**. 1. ed. Porto Alegre: Pallotti, 2006.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; VIEIRA, M. C.; SCALON, S. D. P. Q.; BARROS, S. S. U. Morfo-anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Achyrocline alata* (Kunth) D. C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 94-101, 2007.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OLIVEIRA, B. H. **Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais**. In: YUNES, R. A.; CHECHINEL FILHO, V (Org.). Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 1. ed. Itajaí: UNIVALI, 303p, 2007.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61. 2002.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. J. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, p. 1064-1068, 1984.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, p. 282-288, 2002.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLAEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia Farmacobiotechnologia**. São Paulo, Ed. Premier, 1997. 372p.

ROCHA, L. S.; VALENTE, F. R.; LANDA, B. S.; CASTRO, S. L. R. As plantas medicinais encontradas em maior abundância na terra indígena Porto Lindo/Jakarey, Japorã/MS. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza**, 2005.

RODRIGUES, R. F. **Extração da cumarina a partir das sementes da emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico**. (Dissertação de Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, 2005.

SANTOS, M. L.; ARAUJO, E. M.; BATISTA, A. R. Plantas medicinais usadas pelos índios Kambiwá ibimirim-PE. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, v. 1, p. 78-85, 2010.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SILVA, M. M. C. **Transformações químico-enzimáticas em esteroides**. (Dissertação de Mestrado em Farmácia). Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal, 2005.

SILVA, R. E.; MACHADO, R.; RITTER, M. R. Espécies de “macela” utilizadas como medicinais no Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica**, v. 58, p. 395-406, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E. STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 173p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5. ed Ed. UFRGS: Florianópolis, 2004. 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed Ed. UFRGS: Florianópolis, 2003. 1120p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15. 1996.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p.351-355, 2007.

SOUZA, K. C. B. **Avaliação biológica de preparações obtidas das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (macela)**. (Tese de Doutorado em Farmácia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2002.

VERDI, L. G; BRIGHENTE, I. M. C; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v 28, p 85-94. 2005.

VOLPE, A. V. T.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Farmacobotânica das partes aéreas de *Achyrocline alata* D. C. (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p. 505-511, 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

ZAMPIERON, R. F.; VIEIRA, M. C. SIQUEIRA, J. M. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *Achyrocline alata* (Kunth.) D. C. em comparação com extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.572-576, 2009.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. Y. Extração de  $\beta$ -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de Química. **Química Nova**, v. 31, p. 1259-1262, 2008.

ZOMLEFER, W. B. **Guide to flowering plant families**. 1. ed. Carolina, USA: Chapel Hill London, 1994. 424p.