



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA CLAUDIA APARECIDA MARIANO FERNANDEZ

Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações
das folhas de *Tetradenia riparia* Hochst. Codd (Lamiaceae)

CASCADEL - PR

2015

ANA CLAUDIA APARECIDA MARIANO FERNANDEZ

Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações
das folhas de *Tetradenia riparia* Hochst. Codd (Lamiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE) da
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná – UNIOESTE Campus Cascavel,
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Zilda Cristiani Gazim

CASCADEL - PR
2015

ANA CLAUDIA APARECIDA MARIANO FERNANDEZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO
EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* Hochst.
Codd (Lamiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Fármacos e Medicamentos.

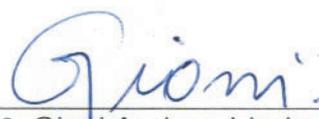
Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Zilda Cristiane Gazim

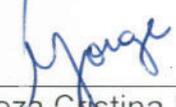
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr^a. Mauricio Ferreira da Rosa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE
Orientadora



Prof. Dr^a. Giani Andrea Linde Colauto
Universidade Paranaense - UNIPAR
Banca



Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE
Banca

BIOGRAFIA DA AUTORA



Ana Claudia Aparecida Mariano Fernandez filha de Venâncio Fernandez Martinez e Josefina F. Mariano Fernandez, nascida em Umuarama-PR em 14 de outubro de 1991. Graduada em Farmácia Generalista pela Universidade Paranaense – UNIPAR - Campus Umuarama – PR (2009–2013), durante a graduação participou dos projetos de Iniciação Científica (PIC e PIBIC), atuou como Farmacêutica Homeopata para produtos veterinários na Empresa Minerphós Saúde e Nutrição Animal - Umuarama-PR (2014). Atualmente Mestranda no Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE (2014-2015).

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo.

Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade!”

Walt Disney

Dedico este trabalho a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. Aos meus pais Venâncio e Josefina, as minhas irmãs Carla e Maria e ao meu amor Glauber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus todo-poderoso pelo dom de vida que me concedeu e por ter iluminado o meu caminho durante estes anos, por ter oferecido a oportunidade de viver, evoluir e conhecer as pessoas citadas abaixo.

À pessoa que ainda no ensino fundamental com elogios, sorrisos, dedicação e amor fez de mim uma apaixonada pelos estudos, minha mãe e professora Josefina e ao meu pai Venâncio pelo esforço, paciência e amor incondicional. Essa conquista também é de vocês!

A minhas irmãs Carla e Maria pela cumplicidade, parceria, paciência, incentivo e amor que me fizeram seguir em frente durante as dificuldades.

Em memória dos meus avós José, Jandira e Oliva exemplos de amor, simplicidade e honestidade. Figuras de grande importância em minha formação e de quem sinto muita saudade.

Ao meu avô Antônio que admiro por tamanha força e superação, me fazendo acreditar que a perseverança é capaz de superar as dificuldades.

Ao meu amor Glauber por ter me aturado nos momentos de estresse, pela paciência em minha ausência e por fazer parte da minha vida. Te amo

Ao Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa pela oportunidade, paciência, aprendizado, apoio e disponibilidade durante todo o desenvolvimento da dissertação.

A Prof^ª. Dr^ª. Zilda Cristiane Gazim pela co-orientação, suporte, paciência e dedicação.

Aos Prof. Giani Linde Colauto, Orlando S. Takemura, Vera L. D. Siqueira que me acompanharam e muito colaboraram na realização desse trabalho.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e Universidade Paranaense (UNIPAR) pela viabilização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A todos que direta e indiretamente fizeram parte da elaboração deste trabalho.

Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de *Tetradenia riparia* Hochst. Codd (Lamiaceae)

RESUMO

Desde os primórdios da humanidade as plantas são utilizadas para o tratamento de enfermidades devido as suas propriedades terapêuticas, pois constituem uma fonte de compostos biologicamente ativos com grande interesse científico para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Hoje, a busca por produtos benéficos ao homem e ao meio ambiente tem aumentado a pesquisa na área antioxidante e antimicrobiana, devido ao relato de toxicidade e resistência. Desta forma, este trabalho teve o intuito de avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto e das frações de *Tetradenia riparia*. A ação antioxidante foi avaliada pelos métodos sequestro do DPPH(2,2-difenil-1-picril-hidrazila), sistema β -caroteno/ ácido linoleico, método de redução do ferro (FRAP) e potencial antioxidante reativo total (TRAP). O fracionamento cromatográfico em coluna proporcionou a obtenção de 10 frações, que destas a fração obtida a partir da eluição com acetato de etila: metanol (8:2)(FR-IX) apresentou resultados promissores quanto ao potencial antioxidante com 181,67 μg de ácido gálico mg^{-1} , CI_{50} de 0,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 55,61% de proteção, 4,59 μM sulfato ferroso mg^{-1} e 4,15 μM de trolox em 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na FR-IX foram detectadas a presença da astragalina, luteolina e boronolida. A ação antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo (MIC) com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), as frações obtidas pelas fases móveis diclorometano: hexano 7:3 e 8:2 (FR-II); diclorometano: hexano 9:1 e diclorometano 100% (FR-III) apresentaram potencial antibacteriano sobre a cepa ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* com CIM de 1,95 e 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Deste modo, o fracionamento cromatográfico foi de suma importância para detectar a presença de frações com atividade antioxidante e antibacteriana superior ao extrato bruto de mirra.

Palavras-chave: plantas medicinais, antioxidante, antimicrobiana.

Evaluation of the antioxidant and antibacterial activity of the crude extract and fractions of the leaves of *Tetradenia riparia* Hochst. Codd (Lamiaceae)

ABSTRACT

Since human being earliest days, plants is used to diseases treatment due their therapeutic properties, once they are a source of biologically active compounds with great scientific interest for pharmaceutical, cosmetic and food industries. Nowadays, the pursuit for beneficial products to human and to environment has increased the research on antioxidant and antimicrobial areas due to the toxicity and resistance reports. This work aimed to evaluate antioxidant and antimicrobial activities of crude extract and fractions of *Tetradenia riparia*. Antioxidant action was evaluated through the DPPH scavenging (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), β -Carotene/ linoleic acid assay, ferric reducing (FRAP) and total reactive antioxidant potential (TRAP). Column chromatographic fractionation provided 10m fractions, where among them the fraction gotten by the elution with ethyl acetate: methanol (8:2) (FR-IX) present promising results in relation to its antioxidant potential with 181,67 μg of gallic acid mg^{-1} , CI_{50} of 0,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 55,61% of protection, 4,59 μM ferrous sulfate mg^{-1} and 4,15 μM trolox in 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. By nuclear magnetic resonance (NMR) in the FR-IX was detected the presence of astragalin, luteolon and boronolide. Antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution method with the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), fraction obtained by dichloromethane mobile phases: hexane 7:3 and 8:2 (FR-II); dichloromethane: hexane 9:1 and dichloromethane 100% (FR-III) presented an antibacterial potential on ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* strains with MIC of 1,95 and 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In this way, chromatographic fractioning was utmost important to detect the presence of fractions with superior antioxidant and antibacterial activities to the myrrh crude extract.

Keywords: Medicinal plants, antioxidante, antimicrobial

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Plantas Medicinais	19
3.2 Metabolismo secundário	20
3.3 Família lamiaceae	22
3.4 <i>Tetradenia riparia</i> (Hochst.) Codd	23
3.5 Antioxidantes	27
3.6 Antimicrobianos	30
4. REFERÊNCIAS	34
ARTIGO - Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de <i>Tetradenia riparia</i> Hochst. Codd (Lamiaceae)	
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
Material vegetal e coleta	45
Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto de <i>T. riparia</i>	46
Fracionamento do extrato bruto	46
Identificação química	47
Atividade antioxidante	47
Quantificação de fenóis totais	47
Sequestro dos radicais livres do DPPH	47
Método sistema beta-caroteno/ácido linoleico	48
Método de redução do ferro (FRAP)	49

Potencial antioxidante reativo (TRAP) por luminescência	49
Atividade antibacteriana	50
Amostras bacterianas	50
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	51
Análise estatística	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
Fracionamento do extrato bruto	52
Identificação química	53
Atividade antioxidante	61
Atividade antibacteriana	67
Agradecimentos	71
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	81

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIações

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50% da concentração inicial do DPPH

FR – Fração do extrato hidroalcoólico de *Tetradenia riparia*

UV – ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-visível

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

MeOH – Álcool metílico

EB – Extrato bruto de *Tetradenia riparia*

COSY –Correlated Spectroscopy

HSQC –Heteronuclear Single Quantum Correlation

DEPT –Distortionless Enhancement of Polarization Transfer

HMBC –Heteronuclear Multiple Bond Correlation

DMSO –Dimetilsulfóxido

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1 - Fatores que influenciam a composição química dos metabólitos secundários das plantas	21
Figura 2a - Exemplar de <i>T. riparia</i>	23
Figura 2b - Folhas de <i>T. riparia</i>	23
Figura 3-Fórmulas estruturais dos compostos isolados do extrato das folhas de <i>T. riparia</i>	25
Figura 4 -Reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} pela ação de um antioxidante	29
Figura 5 - Reação química entre DPPH com o antioxidante (BHT)	30
Figura 6 - Foto da microplaca utilizada no teste de microdiluição em caldo	33

ARTIGO

Figura 1 - Espectro de RMN ^{13}C da FR-IX em DMSO - d_6 , 75,46 MHz.	54
Figura 2 - Estrutura química elucidadas do Boronolide, Luteolina e Astragalina pelos dados de RMN 1H e ^{13}C , DEPT 135° e as correlações de COSY 1H - 1H , HSQC e HMBC e com a comparação de dados espectrais presentes na literatura	56
Figura 3 - Espectros de RMN 1H de FR- II e III em DMSO - d_6 , 300 MHz.	60
Figura 4 - Estrutura química do 8(14),15-sandaracopimaradieno-7 α ,18-diol	61

LISTA DE TABELAS

REVISÃO

Tabela 1 - Estudos farmacológicos da *T. riparia* 26

ARTIGO

Tabela 1 - Reagrupamento das frações 53

Tabela 2 - Dados de deslocamentos químicos (δ ppm) do RMN¹H e de ¹³C para as substâncias identificadas em FR- IX 55

Tabela 3-Teor de fenóis totais e atividade antioxidante do EB e das frações de *T. riparia* 62

Tabela 4-Atividade antioxidante do EB e das frações de *T. riparia* pelo método TRAP em μ M de Trolox 65

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (μ g mL⁻¹) do EB e das frações das folhas de *T. riparia* 68

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos as plantas foram utilizadas na medicina popular para o tratamento de uma variedade de enfermidades, pois elas são fontes naturais de compostos biologicamente ativos, aumentando o interesse científico no estudo fitoquímico de diferentes espécies vegetais (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BAKKALI *et al.*, 2008).

Existe uma crescente demanda na busca por compostos que tenham propriedades terapêuticas na área de produtos antioxidantes tanto para o lançamento de novos produtos quanto para substituir os antioxidantes sintéticos utilizados comercialmente. Como também na área de antibacterianos devido ao surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais ocasionando um enorme problema em nível de saúde pública em países desenvolvidos e que estão em desenvolvimento. Com isso os produtos naturais tornaram-se alvo de pesquisas por compostos que tenham maior eficácia, menor toxicidade à saúde e menor impacto ambiental (MELO *et al.*, 2006; SANTOS e NOVALES, 2012).

A *Tetradenia riparia* (Hochst) Cood popularmente conhecida como mirra, é um arbusto da família Lamiaceae tradicional da região da África Central, plantada ao redor das casas para afastar o mosquito *Anopheles* vetor da malária e é muito empregada na medicina popular. No Brasil essa espécie foi introduzida como planta ornamental exótica sendo cultivada em parques, jardins residenciais e hortos (ZELNIK *et al.*, 1978; MARTINS, MARTINS, CAVALHEIRO, 2008; GAIROLA *et al.*, 2009). Na medicina tradicional da África suas folhas são utilizadas no tratamento de doenças como malária, angina, doença tropical de pele, gastroenterites, gonorreia, diarreia, abscessos dentários, dores de cabeça, bronquite, tosse, úlceras, esterilidade feminina, doenças renais, febres e outras (VAN PUYVELDE *et al.*, 1981; VAN PUYVELDE *et al.*, 1986; GAZIM *et al.*, 2014).

Estudos com informações quanto à composição fitoquímica e a avaliação das atividades biológicas do extrato de *T. riparia*, ainda são escassos, mas de suma importância no meio científico e tecnológico, tornando-se necessária sua investigação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Tetradenia riparia*.

2.2 Objetivos específicos

Preparação do extrato hidro alcoólico das folhas de *T. riparia*.

Obtenção das frações por Cromatografia em Coluna Clássica.

Avaliação do potencial antioxidante e atividade antibacteriana do extrato e das frações.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é todo ou qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, diretamente na produção de extratos, pomadas, xaropes e compressas, como indiretamente, no fornecimento de precursores de fármacos sintéticos e semi-sintéticos (DAJOZ, 2005; VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2005; LAMEIRA e PINTO, 2008, KALLUF, 2008).

Muitas vezes, algumas plantas medicinais são consumidas sem comprovação científica de propriedades farmacológicas, assim tornando-se importante problema de saúde devido a não comprovação de sua eficácia e efeitos adversos (CARVALHO *et al.*, 2012).

O Brasil é um dos países com maiores perspectivas para exploração econômica da biodiversidade com a maior diversidade genética vegetal do mundo, em função do número expressivo de espécies nativas, das condições climáticas favoráveis e do grande potencial hídrico (SIMÕES *et al.*, 2007; GUILHERMINO, QUENTAL e BOMTEMPO, 2012).

Houve um grande crescimento no interesse mundial em medicamentos fitoterápicos, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. As empresas farmacêuticas vêm acompanhando o crescimento do mercado, estimulando o aparecimento de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos de bem-controlados e randomizados para comprovar a segurança e eficácia (CALIXTO, 2000).

Pesquisas de caracterização e quantificação de compostos bioativos auxiliam tanto no fortalecimento da fitoterapia popular, quanto à farmacologia moderna (TAIZ e ZEIGER, 2009). Assim, colaborações multidisciplinares e internacionais se fazem necessárias na exploração de produtos naturais, como fonte para o desenvolvimento de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2007).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos,

lignanais, cumarinas, saponinas e outras classes de metabólitos secundários, tem sido objeto de incessantes estudos, onde foram comprovadas suas ações farmacológicas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

3.2 METABOLISMO SECUNDÁRIO

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em cada célula, sendo direcionadas por enzimas específicas. Os compostos produzidos, degradados ou transformados por essas reações são denominados metabólitos e as reações enzimáticas são designadas como anabólicas, catabólicas ou biotransformação, respectivamente (SIMÕES *et al.*, 2007).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos vegetais que são classificados em dois grupos: os chamados metabólitos primários ou essenciais que são ligados diretamente ao crescimento e desenvolvimento do vegetal como processos anabólicos (biossíntese de proteínas, DNA, RNA, carboidratos e lipídeos) e processos catabólicos (degradação de macromoléculas) e apresentam distribuição em todos os grupos vegetais, e os chamados metabólitos secundários ou especiais, que atuam na defesa contra herbívoros e micro-organismos, e na atração de polinizadores ou dispersores de sementes (SIMÕES *et al.*, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2009). Alguns fatores externos (**Figura 1**), podem alterar a produção de metabólitos secundários como sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, proteção contra raios ultravioleta (UV), nutrientes (macronutrientes e micronutrientes), altitude e poluição atmosférica (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

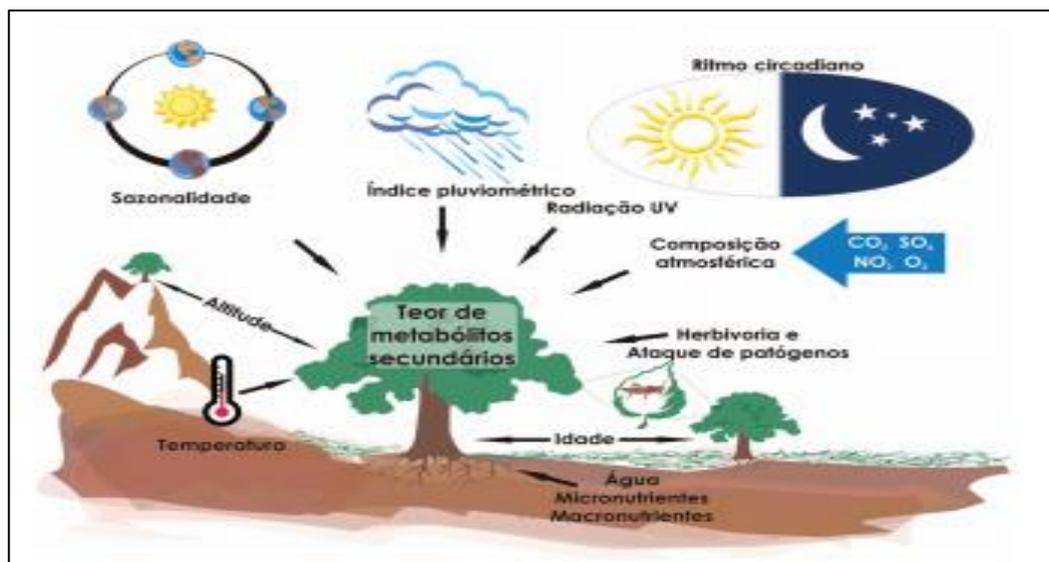


Figura1: Fatores que influenciam a composição química dos metabólitos secundários das plantas. Fonte: Goggo-Neto e Lopes, 2007.

Do ponto de vista químico, os produtos do metabolismo secundário são originados a partir do metabolismo da glicose por duas rotas metabólicas principais a do ácido chiquímico e a do acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores de parte dos alcaloides, taninos hidrolisáveis, ligninas, lignanas e cumarinas. O acetato origina precursores responsáveis pela origem dos terpenos, dentre eles os óleos essenciais e outras classes de alcaloides. Antraquinonas, os flavonoides e taninos condensados são originados por ambas as vias (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Alguns compostos do metabolismo secundário apresentam propriedades farmacológicas descritas na literatura, entre eles estão os alcaloides, flavonoides, taninos efenilpropenos e terpenos (óleo essencial) que frequentemente apresentam ações biológicas como, por exemplo, calmante, cicatrizante, antimicrobiana, antiespasmódica, adstringentes, expectorante, vasodilatador, anti-inflamatória, sedativa, estimulante, anestésica, analgésica, alucinógena, podendo alguns ser cancerígenos, e outros, antitumorais (LORENZI e MATOS, 2008).

3.3 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae (Labiatae) pertence à ordem Tubiflora e Lamiales, inclui cerca de 300 gêneros e 7500 espécies que são nativas principalmente do Mediterrâneo, da Austrália, do sudoeste da Ásia e da África do Sul. No Brasil há ocorrência de 28 gêneros e cerca de 350 espécies. Geralmente são plantas herbáceas ou arbustivas e comumente aromáticas. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso condimentar, e muitas delas possuem atividades biológicas relatadas na literatura (LORENZI e SOUZA, 2008).

A maioria das espécies dessa família possui folhas opostas ou alternadas, em geral com odor intenso. As flores são vistosas, pequenas ou grandes, bissexuadas e zigomorfas, a inflorescência quase sempre axilar e o fruto geralmente baga ou esquizocarpo (JOLY, 2002; LORENZI e SOUZA, 2008).

Dentre os gêneros cultivados no Brasil, algumas espécies se destacam na medicina popular, na culinária, como condimento, e como plantas ornamentais, entre eles *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *H. mutabilis* e *H. atrorubens*; *Lavandula angustifolia* Mill (alfazema); *Leonotis nepetaefolia* L. (cordão-do-frade); *Leonurus sibiricus* L. (macaé), *L. cardiaca* e *L. sibiricus*; *Leucas martinicensis* (Jacq.) R. Br. (catinga-de-mulata); *Marrubim vulgare* L. (hortelã-grande); *Melissa officinalis* L. (cidreira); *Mentha avensis* (hortelã-do-Brasil), *M. piperita* L. (hortelã) e *M. pulegium* L. (poejo); *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *O. selloi* Benth. *O. vulgare* L. (orégano); *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim); *Salvia officinalis* L. (sálvia) (JOLY, 2002; LORENZI e MATOS, 2008).

Dentre os gêneros pertencentes à família Lamiaceae está o gênero *Tetradenia* que foi descrito primeiramente por Benth em 1830, quando localizou a espécie *T. fruticosa* no planalto central da ilha de Madagascar, na África. Foi descrito por Codd. (1983), sete espécies do gênero *Iboza* N.E.Br. na África continental entre elas a *T. Barberae* (África do Sul), *T. brevispicata* (Botsuana, no sudoeste do Zimbábue e partes vizinhas da África do Sul) e *T. riparia* (África do Sul, Etiópia, Angola e Namíbia). Atualmente são reconhecidas cinquenta e nove espécies. Com relação ao habitat, preferem locais rochosos,

entretanto a *T. riparia* prefere locais úmidos e altitudes mais baixas (PHILLIPSON e STEYN, 2008).

3.4 *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd

A *Tetradenia riparia* Hochsteter Codd (**Figura 2a**), pertencente à família Lamiaceae, tem como sinónimas *Iboza riparia* N. E. Br., *Moschosma riparium* N. E. Br., *Iboza bainesii* N. E. Br., *Iboza galpinii* N. E. Br. (VAN PUYVELDE *et al.*, 1986; VAN PUYVELDE *et al.*, 1987a; WEAVER *et al.*, 1994; CAMPBELL *et al.*, 1996).

É um arbusto com alcance médio de 1,20 a 1,60 metros de altura, com folhas largo-ovaladas, denteadas e espessas. Sua textura é facilmente identificada ao toque e possui odor característico pela presença de óleo essencial em suas folhas (**Figura 2b**), (LORENZI e SOUZA, 2008).



Figura 2a. Exemplar de *T. riparia*.



Figura 2b. Folhas de *T. riparia*.

Na África Central, é popularmente conhecida como umuravumba e na África do Sul, ao norte da Namíbia, Angola, Botswana e ao leste da África tropical com nome indígena de Iboza, que é derivado da palavra Zulu referindo-se as folhas de aromáticas (COOPOOSAMY e NAIDOO, 2011).

A espécie, na África, é cultivada ao redor das casas para repelir os mosquitos vetores de doenças, sendo utilizada popularmente como infusão ou decocção aquosa das folhas para gripes e resfriados, esterilidade feminina,

bronquite, abscessos dentários, problemas de estômago, doenças renais, flatulência, úlceras na boca, diarreia e febre (especialmente malária) é usado externamente, como inalação, para dores de cabeça (VAN PUYVELDE *et al.*, 1981; VAN PUYVELDE *et al.*, 1986; CAMPBELL *et al.*, 1997; COOPOOSAMY e NAIDOO, 2011).

No Brasil, essa espécie foi introduzida como planta ornamental exótica cultivada em parques, jardins residenciais e hortos, conhecida popularmente como incenso, lavândula, limonete, pluma-de-névoa e falsa-mirra (ZELNIK *et al.*, 1978; MARTINS, MARTINS, CAVALHEIRO, 2008).

Por ser muito utilizada pelos médicos tradicionais na África no tratamento de doenças, surgiu a necessidade de testar as propriedades curativas da planta, assim como a presença de metabólitos secundários com ação terapêutica comprovada, que venham a explicar tais propriedades associadas à planta (HARBONE, 1988; EDEOGA, OKWU, MBAEBIE *et al.*, 2005; MDLOLO, SHANDU, OYEDEJI, 2008).

Algumas substâncias foram isoladas do extrato das folhas de *T. riparia* (**Figura 3**), como os diterpenóides ibozol (I), 7- α -hidroxiroileanona (II) (ZELNIK *et al.*, 1978), 8 (14), 15-sandaracopimaradieno-7 α , 18-diol (V) (DE KIMPE *et al.*, 1982), 8 (14), 15-sandaracopimaradieno-2 α , 18-diol (VAN PUYVELDE *et al.*, 1987a); as α -pironas umuravumbolida (III), diacetilboronolida (IV) (VAN PUYVELDE *et al.*, 1979), 1',2'-diacetilboronolida (VAN PUYVELDE *et al.*, 1981), tetranolida (VAN PUYVELDE e DE KIMPE., 1998) e os esteróis sitosterol, stigmasterol e campesterol (ZELNIK *et al.*, 1978; VAN PUYVELDE *et al.*, 1986).

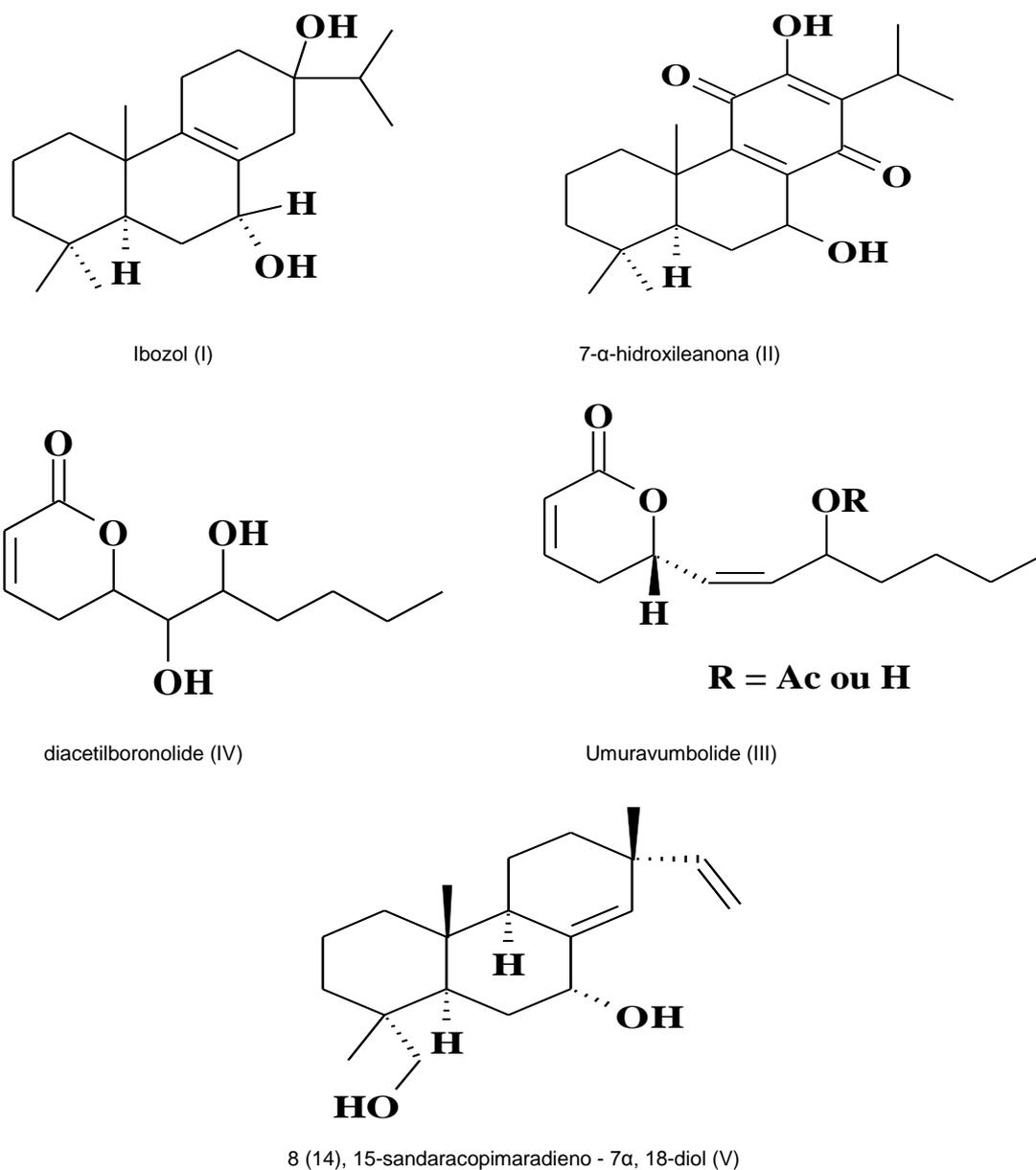


Figura 3: Fórmulas estruturais dos compostos isolados do extrato das folhas de *T. riparia*

Estudos relatam atividades biológicas dos extratos e compostos isolados das folhas de *T. riparia* como: antiespasmódica, antifúngica, antibacteriana, anti-helmíntica, anti-inflamatória, antiviral, anticolinesterásica, antioxidante, antimicobacteriana e antidiarreia, descritos na Tabela 1.

Tabela 1–Estudos farmacológicos da *T. riparia*.

Tipo de extrato	Atividades testadas	Referências
Aquoso, acetato de etila e etanólico	Antiespasmódica, antifúngica (<i>Candida albicans</i>), antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i>), anti-helmíntica (<i>Caenorhabditi selegans</i>), anti-inflamatória.	OKEM, FINNIE, VANSTADEN, 2012.
Etanólico	Antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Thichophyton menthagrophites</i>) e antiviral (poliomielite, herpes, coxsakie)	VLIETINCK <i>et al.</i> , 1995.
Aquoso	Antimicrobiana (<i>Bacilus cereus</i> , <i>Serratia liquefactions</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Salmonella thipy</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>).	NGULE <i>et al.</i> , 2014.
Metanólico	Anticolinesterásica e antioxidante (DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico)	AMOO <i>et al.</i> , 2012.
Etanólico e composto isolado 8 (14),15-sandaracopimaradieno- 7 α , 18-diol	Antimicobacteriana (<i>Micobacterium tuberculosis</i>).	VAN PUYVELDE <i>et al.</i> , 1987a.
Composto 8 (14), 15-sandaracopimaradieno - 7 α , 18-diol	Antiespasmódica.	VAN PUYVELDE <i>et al.</i> , 1987b.
Etanólico	Antiparasitária (<i>Ascaris suun</i>).	WASSWA e OLILA, 2006.
Metanólico	Antidiarreica (<i>Salmonella thipy</i> e <i>Escherichia coli</i>).	NGULE e NDIKU, 2014.
Etanólico	Antimicobacteriana (<i>Mycobacterium simiae</i> e <i>M. tuberculosis</i>)	VAN PUYVELDE, NTAWUKILYAYO, PORTALES, 1994

3.5 ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos que possuem um elétron livre ou desemparelhado se tornando espécies muito reativas, pois necessitam captar elétrons de outras moléculas a fim de buscar equilíbrio eletroquímico, na chamada reação de oxidação. Por sua vez, as moléculas que perdem elétrons tornam-se instáveis e reativas, e acabam por buscar equilíbrio captando elétrons de outras moléculas em efeito cascata (AVELLO e SUWALSKY, 2006; SOUSA *et al.*, 2007).

As reações de oxidação são controladas por antioxidantes que são substâncias que em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação do substrato, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos. Nas reações de neutralização os radicais livres se tornam não reativos, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009).

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, por isso, se encontram envolvidos em diversas patologias como o envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (RAMALHO e JORGE, 2006; ALVES *et al.*, 2010).

A presença de radicais livres além de ocasionar problemas à saúde, também afeta o setor industrial, pois causam alterações nos produtos (ALVES *et al.*, 2010).

Devido à tendência da utilização de ingredientes naturais nos alimentos, há um crescente aumento nos estudos, visando à descoberta de produtos naturais, a fim de encontrar substâncias com maior eficácia e menor toxicidade à saúde (DEMO *et al.*, 1998). Os compostos fenólicos encontrados nas plantas são considerados compostos com um grande potencial antioxidante e têm sido

estudados devido à sua atuação na inibição da peroxidação lipídica e da lipooxigenase *in vitro* (SOARES, 2002).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, importante ferramenta que auxilia na busca por substâncias bioativas potencialmente interessantes, bem como na seleção de matéria-prima para o estudo. A escolha do método é importante para comprovar a presença de compostos antioxidantes que previnam o ataque de radicais livres, portanto, testes preliminares devem ser realizados a fim de adequar o ensaio a ser adotado de forma segura e precisa (SANCHEZ-MORENO, LARRAURI, SAURA-CALIXTO, 1998; ALVES *et al.*, 2010).

Algumas das metodologias mais utilizadas para determinar a capacidade antioxidante ocorrem por remoção de um radical peroxil (ORAC- capacidade de absorção do radical oxigênio e TRAP – potencial antioxidante reativo total); capacidade de redução de metal (FRAP– capacidade antioxidante por redução do ferro; CUPRAC – capacidade antioxidante por redução do cobre); capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS – 2,2'-azino-bis (ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); sequestro do radical DPPH); o método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico (SANCHEZ-MORENO, LARRAURI, SAURA-CALIXTO, 1998; ALVES *et al.*, 2010).

A espectroscopia por fluorescência é uma das técnicas que tem sido abundantemente utilizada para medir o poder antioxidante de compostos naturais, pois combina alta sensibilidade, especificidade e precisão, originando algumas metodologias como o ORAC e o TRAP. O TRAP foi descrito primeiramente por Wayner, (1985) onde é medida a quimioluminescência do luminol induzida pela presença de um azoiniciador como o 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano) conhecido como ABAP, que sofre decomposição térmica em uma velocidade controlada produzindo radicais peroxila. Quando há a presença de um antioxidante na reação ocorre a perda da quimioluminescência que é medida em luminômetro (λ 545 nm) por um período de 15-30 minutos. A capacidade antioxidante é expressa em equivalentes de $\mu\text{M}/\text{g}$ ou mg de amostra a partir de uma curva padrão de trolox e de um gráfico da diminuição da fluorescência da amostra em função do tempo (REPETTO *et al.*, 1996; ALVES *et al.*, 2010).

No método ORAC, o radical peroxila gerado a partir da reação do AAPH dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) com oxigênio atmosférico reage com um indicador fluorescente, formando um produto que não emite fluorescência podendo ser medido por espectrofluorimetria em comprimento de onda de 575-578 nm. Atualmente, utiliza-se como indicador a fluoresceína ou diclorofluoresceína sendo estes mais estáveis e não interagem com os antioxidantes. Porém, com a presença de um antioxidante o indicador não é oxidado pelo radical livre, não ocasionando a perda da fluorescência. A atividade antioxidante de uma substância é determinada, através de uma curva da intensidade da fluorescência em função do tempo e usando uma curva padrão de trolox. Os resultados são expressos em equivalentes de μM de trolox (ALVES *et al.*, 2010).

Alguns métodos eletroquímicos são baseados na capacidade de redução de metais, como é o caso da técnica FRAP, descrita por Pulido, Bravo, Saura-Calixto (2000), onde é medido o poder antioxidante de uma amostra pela sua capacidade em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (Figura 4). A reação ocorre pela formação de um complexo do Fe^{3+} com o TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina) formando um sal férrico o ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) em meio ácido (pH 3,6), com a presença de um agente antioxidante, que reduz o (Fe^{3+} -TPTZ) a ferroso- tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), que possui intensa coloração azul, que pode ser medida em espectrofotômetro em 593 nm. Uma das limitações da técnica é que nem todo antioxidante tem a capacidade em reduzir Fe^{3+} , como também pode haver compostos que não são antioxidantes que tem a capacidade de reduzir metais (PULIDO *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

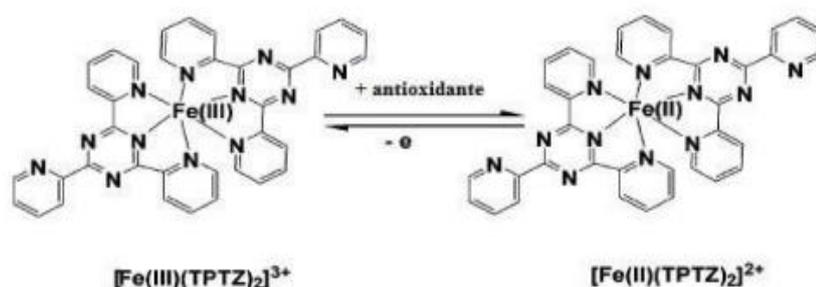


Figura 4: Reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} pela ação de um antioxidante. Fonte: HUANG; OU; PRIOR (2005).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico, originalmente descrito por Marco (1968), avalia a capacidade de uma amostra proteger o β -caroteno da oxidação que é causada pelos radicais livres formados pela peroxidação do ácido linoleico. O β -caroteno tem coloração alaranjada, porém quando sofre oxidação ocasiona a descoloração que é medida espectrofotometricamente em 470 nm, medida em intervalos de 15 em 15 minutos, por um tempo de 2 horas. É um teste simples e sensível que permite avaliar a atividade antioxidante (AA) de amostras termossensíveis sendo muito empregado para compostos oriundos de extratos vegetais, frutas e bebidas (VASCONCELOS *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2010).

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi descrito primeiramente por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Sánchez-Moreno *et al.* (1998). Este método é baseado na capacidade de um antioxidante de sequestrar o radical livre DPPH, que possui coloração violeta intensa caracterizado com absorção em 515 nm, reduzindo-o a hidrazina (Figura 5). Com a presença da hidrazina ocorre a mudança da cor violeta para amarelo pálido. Os resultados são expressos em EC_{50} que determinam a quantidade necessária do antioxidante para reduzir 50% da quantidade inicial de DPPH e por porcentagem da atividade antioxidante (AA).

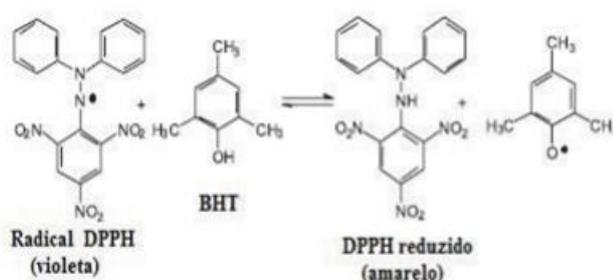


Figura 5: Reação química entre DPPH com o antioxidante (BHT). Fonte: Adaptado (OLIVEIRA, VALENTIM, GOULART, 2009).

Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais usados atualmente pela simples execução e confiabilidade dos resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA CALIXTO, 2006).

3.6 ANTIMICROBIANOS

A pesquisa por novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas doenças imunossupressoras como a AIDS, tratamentos invasivos como a quimioterapia antineoplásica e transplantes de órgãos onde os pacientes apresentam quadro de alteração no sistema imunológico (OSTROSKY *et al.*, 2007).

Um dos fatores que são considerados importantes no desenvolvimento dessas cepas resistentes a drogas é que muitos antibióticos são bacteriostáticos (inibem o crescimento) em vez de bactericidas (BLACK, 2002). Há dois tipos de resistência bacteriana, a natural, representada por grupos bacterianos que não são sensíveis a determinados antibióticos como, por exemplo, resistência à polimixina apresentada pela *Stenotrophomonas maltophilia*, ou adquirida, também chamada de secundária, que ocorre pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa, seja exposta a um agente indutor (mutação) ou na aquisição de genes de resistência (AMATO NETO *et al.*, 2000).

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo importante em vários setores industriais como o farmacêutico, cosmético e alimentício. Atualmente, vêm crescendo o número de estudos sobre o uso de produtos naturais, seja em forma de extratos, óleos essenciais e compostos isolados, como alternativa de controlar a presença de bactérias patogênicas. Tendo em vista a imensa biodiversidade do Brasil há a possibilidade da descoberta de novos agentes com atividade antimicrobiana (OSTROSKY *et al.*, 2007; VALERIANO, 2012).

A forma de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) que determina a menor quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo utilizado para o respectivo teste (PINTO *et al.*, 2003).

Diversas técnicas são utilizadas para definir se o extrato de uma planta possui atividade antimicrobiana. As metodologias padronizadas são recomendadas pelo manual da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e os métodos mais comumente usados para avaliar o potencial

antimicrobiano são os de difusão em ágar e o de diluição em caldo. (ALVES *et al.*, 2008).

O método de difusão em ágar é um método físico, onde o micro-organismo e a substância teste são adicionados em um meio de cultura sólido relacionando o halo de inibição, se limita a micro-organismos de crescimento rápido sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida em milímetros (mm) partindo-se da circunferência do disco, até a margem onde há crescimento de micro-organismos. A dimensão do halo classifica como: sensíveis à substância teste, moderadamente sensíveis e resistentes quando não inibe o crescimento do micro-organismo. O teste não fornece um resultado quantitativo, mas sim qualitativo (KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003; OSTROSKY *et al.*, 2007).

No método de diluição em caldo o micro-organismo é adicionado com a substância em teste em um meio de cultura líquido. Também é utilizado um padrão biológico de referência. O crescimento microbiano é detectado pela turbidez ou com a ajuda de reveladores químicos, sendo um teste que fornece resultados quantitativos (PINTO *et al.*, 2003; OSTROSKY *et al.*, 2007). Divide-se em duas metodologias: a macrodiluição, técnica pouco utilizada, onde se utilizam tubos de ensaio de 1 a 10 mL. Por ser um teste que exige um volume maior tem como desvantagens a quantidade de reagentes utilizada, o espaço necessário para o armazenamento dos tubos, a possibilidade da ocorrência de erros durante a preparação das concentrações antimicrobianas e, principalmente, o trabalho manual dispendioso na preparação do teste (OSTROSKY *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2008).

A microdiluição (Figura 6) corresponde à miniaturização da técnica de macrodiluição, onde se utilizam microplacas de 96 e 80 poços de fundo redondo ou chato, para permitir melhor visualização do crescimento bacteriano, com volume de 100-200 µL. Tem como vantagens a economia de espaço e de reagentes, a reprodutibilidade dos resultados devido à possibilidade de preparação de grande quantidade de placas a partir da mesma série de

diluições de antimicrobianos; a geração de um resultado quantitativo (CIM), a conveniência de poder utilizar placas pré-fabricadas e sistemas computadorizados e como desvantagem o custo das placas utilizadas (OSTROSKY *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2008).



Figura 6: Foto da microplaca utilizada no teste de microdiluição em caldo. Fonte: A Autora.

Alguns fatores interferem nos resultados da atividade antimicrobiana, tais como, o tipo de meio de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo, condições de incubação, entre outros. A escolha do método a ser utilizado é importante e depende do tipo e quantidade de amostra utilizada, disponibilidade de equipamentos e pessoal, entre outras. Entretanto o método de diluição em ágar por microdiluição é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e baixo custo (OSTROSKY *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2008).

4. REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

AMATO NETO. **Antibióticos na Prática Médica**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2007. 304p.

AMOO, S. O.; AREMU, A. O.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-9, 2012.

AVELLO, M.; SUWALSKY, M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. **Atenea**, v. 494, p. 161-172, 2006.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of Essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

CAMPBELL, W. E.; GAMMON, D. W.; SMITH, P.; ABRAHAMS, M. T. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Médica**, v. 63, p. 270–272, 1997.

CARVALHO, A. C. B.; BRANCO, P. F.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, R. F. O. M.; CUNHA, S. C.; PERFEITO, J. P. S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, p. 5-16, 2012.

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.

COOD, L. E. The genus *Tetradenia*. **Flora of Southern Africa**, v. 28, n. 4, p. 13-116, 1983.

COOPOOSAMY, R. M.; NAIDOO, K. K. Assessing the potencial of *Tetradenia riparia* in treatment of common skin conditions in rural communities of South Africa. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 19, p. 2942-2945, 2011.

DAJOZ, R. **Princípios de Ecologia**. 7. ed. Porto Alegre, RS. Editora Artmed, 2005. p. 398.

DE KIMPE, N.; SCHAMP, N.; VAN PUYVELD, L.; DUBÉ, S.; CHAGNON-DUBÉ, M.; BORREMANS, F.; ANTEUNIS, M. J. O.; DECLERCQ, J. P.; GERMAIN, G.; VAN MEERSSCHE, M. Isolation and structural identification of 8 (14), 15-sandaracopimaradieno - 7 α , 18-diol from *Iboza riparia*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 3628, 1982.

DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. **Food Research International**, v. 31, n. 5, p. 351-354, 1998.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 685-688, 2005.

GAIROLA, S.; NAIDOO, Y.; BHATT, A.; NICHOLAS, A. An investigation of the foliar trichomes of *Tetradenia riparia* (Hochst.)Codd [Lamiaceae]: An important medicinal plant of Southern Africa. **Flora (Jena)**, v. 204, n. 4, p. 325–330, 2009.

GAZIM, Z. C.; RODRIGUES, F.; AMORIN, A. C. L.; REZENDE, C. M.; SOKOVIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.; VUČKOVIĆ, I.; KRSTIĆ, G.; CORTEZ, L. E. R.;

COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; CORTEZ, D. A. C. New natural diterpenetypeabietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. **Molecules**, v. 19, p. 514-524, 2014.

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

GUILHERMINO, J. F. QUENTAL, C. BOMTEMPO, J. V. Sistema de Inovação em Fitomedicamentos: os Desafios Da Gestão para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos a partir da Biodiversidade Brasileira. **Revista Fitos**, v. 7, n. 3, p. 169-171, 2012.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. 1. ed. Chapman and Hall, 1988. 621 p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

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

KALLUF, L. J. H. **Fitoterapia funcional: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos**. 1. ed. São Paulo: VP Editora, 2008. p. 304.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and metanol extract of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Editora Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 512 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum., 2008. 617 p.

MARCO, G. A. Rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 45, p. 594- 598, 1968.

MARTINS, M. B. G.; MARTINS, R. G.; CAVALHEIRO, J. A. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*). **Revista Biociências**, v.14, p. 127–140, 2008.

MDLOLO, C. M.; SHANDU, J. S.; OYEDEJI, O. A. Phytochemical constituents and antimicrobial studies of two South African *Phyllanthus* species. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 16, p. 494-497, 2008.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 639-644, 2006.

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.

NGULE, M. C.; NDIKU, M. H.; RAMESH, F.; NGULE, M. E. Preliminary phytochemical and antibacterial screening of fresh *Tetradenia riparia* leaves water extract against selected pathogenic microorganisms. **International Journal of Bioassays**, v. 3, p. 3413-3418, 2014.

NGULE, M. C.; NDIKU, M. H. Antidiarrheal activity of *Tetradenia riparia* and *Wubergia ugandensis* ethnobotanical plants in Kenya. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p. 1180-1183, 2014.

OKEM, A.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Pharmacological, genotoxic and phytochemical properties of selected South African medicinal plants used in treating stomach-related ailments. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 712– 720, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R.

N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PHILLIPSON, P. B.; STEYN, C. F. *Tetradenia* (Lamiaceae) in Africa: new species and new combinations. **Adansonia**, v. 30, n. 1, p.177-196, 2008.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325p.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.755-760, 2006.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M. L. G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LIESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, p. 107-117, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of phenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76.p. 270-276, 1998.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed.. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2007. 1102 p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

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, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPRINGFIELD, E. P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, p. 434-439, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre – RS. Editora Artmed, 2009. 345-372p.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VAN PUYVELDE, L.; DUBÉ, S.; UWIMANA, E.; UWERA, C.; DOMMISE, R. A.; ESMAS, F. L.; VAN SCHOOR, O.; VLIETNICK, A. J. New α -pyrones from *Iboza riparia*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1215, 1979.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; DUBÉ, S.; CHANGNON-DUBLÉ, M.; BOILY, Y.; BOREEMANS, F.; SCHAMP, N.; ANTEUNIS, M.J. 1', 2' – Dideacetylboronolide and α -pyrone from *Iboza riparia*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2753-2755, 1981.

VAN PUYVELDE, L.; NYIRANKULIZAS, S.; PANEMBICO, R.; BOILY, Y.; GEIZER, I.; SEBIRALI, B.; DE KIMPE, N.; SCHAMP N. Active principles of *Tetradenia riparia* I. Antimicrobial activity of 8 (14), 15- sandaracopimaradiene-7- α ,18-diol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p.269-275, 1986.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; BORREMANS F.; ZHANG, W.; SCHAMP, N. 8(14), 15-Sandaracopimaradiene-2 α ,18-diol, a minor constituent of the Rwandese medicinal plant *Tetradenia riparia*. **Phytochemistry**, v.26, n. 2, p. 493 - 495, 1987a.

VAN PUYVELDE, L.; LEFEBVRE R.; MUGABO P.; DE KIMPE, N.; SCHAMP N. Active principles of *Tetradenia riparia* II. Antispasmodic activity of 8 (14), 15- sandaracopimaradiene-7- α ,18-diol. **Planta Médica**, v. 52, p.156-158, 1987b.

VAN PUYVELDE, L.; NTAWUKILIYAYO, J. D.; PORTAELS, F. *In vitro* Inhibition of Mycobacteria by Rwandese Medicinal Plants. **Phytotherapy Research**, v.8, p. 65-69, 1994.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N. Tetradenolide, an α -pyrone from *Tetradenia riparia*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 41157–1158, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

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

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VLIETINCK A. J.; VAN HOOFF L.; TOTTE, J.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.; RWANGABO, P. C.; MVUKIYUMWAMI, J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 31–47, 1995.

WASSWA, P.; OLILA, D. The *in-vitro* ascaricidal activity of selected indigenous medicinal plants used in ethno veterinary practices in Uganda. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 3, n. 2, p. 94-103, 2006.

WAYNER, D. D.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **Febs Letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.

WEAVER, D. K.; DUNKEL, F.V.; VAN PUYVELDE, L.; RICHARDS, D. C.; FRIZGERALD, G.W. Toxicity and protectant potential of the essential oil of *Tetradenia riparia* (lamiales, lamiaceae) against *Zabrotes subfasciatus* (col, bruchidae) infesting dried pinto beans (fabales, leguminosae). **Journal of Applied Entomology**, v. 118, p. 179–196, 1994.

ZELNIK, R.; RABENHORST, E.; MATIDA, A. K.; GOTTLIEB, H. E.; LAVIE, D.; PANIZZA, S. Ibozol, a new diterpenoid from *Iboza riparia*. **Phytochemistry**, n. 17, p. 1795 - 1797, 1978.

Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de *Tetradenia riparia* Hochst. Codd (Lamiaceae)

RESUMO

Tetradenia riparia (Hochst) Cood é membro da família Lamiaceae, nativa da África Central, popularmente conhecida como mirra, onde é comumente utilizada no tratamento de diversas enfermidades. O extrato etanólico (extrato bruto) das folhas de *Tetradenia riparia* foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna. Tanto no extrato bruto, quanto nas frações foram mensuradas as quantidades de fenóis totais e a ação antioxidante pelos métodos de sequestro do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), sistema β -caroteno/ ácido linoleico, método de redução do ferro (FRAP) e potencial antioxidante reativo total (TRAP). A fração obtida a partir da eluição com acetato de etila: metanol (8:2) (FR-IX) apresentou resultados promissores quanto ao potencial antioxidante com 181,67 μg de ácido gálico mg^{-1} , CI_{50} de 0,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 55,61% de proteção, 4,59 μM sulfato ferroso mg^{-1} e 4,15 μM de trolox em 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato e as frações foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e na FR-IX foram detectadas a presença da astragalina, luteolina e boronolida. A atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo (MIC) foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM). As frações obtidas pelas fases móveis diclorometano: hexano 7:3 e 8:2 (FR-II); diclorometano: hexano 9:1 e diclorometano 100% (FR-III) apresentaram potencial antibacteriano sobre a cepa ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* com CIM de 1,95 e 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: *Tetradenia riparia*, fracionamento, antioxidante, antibacteriana.

ABSTRACT

Tetradenia riparia (Hochst) Cood is from Lamiaceae family, native from Central Africa, and is popularly known as myrrh, where is commonly used in the treatment of several diseases. Ethanolic extract (crude extract) from *Tetradenia riparia* leaves was submitted to the fractioning in chromatographic column. Crude extract as well the fractions was measured the amount of total phenol and antioxidant actions by DPPH scavenge method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), β -Carotene/ linoleic acid assay, ferric reducing (FRAP) and total reactive antioxidant potential (TRAP). The fraction obtained through the elution with ethyl acetate: methanol (8:2) (FR-IX) present promising results in relation to its antioxidant potential with 181,67 μg of gallic acid mg^{-1} , CI_{50} in 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The extract and fractions characterizes by nuclear magnetic resonance (NMR) and in FR- IX were detected the presence of astragalin, luteolon and boronolide. Antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution method with the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). Fraction obtained by dichloromethane mobile phases: hexane 7:3 and 8:2 (FR-II); dichloromethane: hexane 9: 1 and dichloromethane 100% (FR-III) presented an antibacterial potential on ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* strains with MIC 1,95 and 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: *Tetradenia riparia*, fractioning, antioxidante, antibacterial.

Introdução

Dentre as propriedades terapêuticas de suma importância no meio científico estão a ação antioxidante e antimicrobiana. Os radicais livres são espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) e o radical hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas, estão associados ao envelhecimento e algumas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais, não somente acarretando problemas à saúde, como também na conservação de produtos industrializados, pois são responsáveis pelas alterações das características organolépticas como cor e odor em produtos farmacêuticos e cosméticos, e sabor nos alimentos, acarretando também na perda da qualidade nutricional (Ramalho e Jorge, 2006; Alves et al., 2010).

O surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais têm aumentado drasticamente nos últimos anos ocasionando um enorme problema à saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Além de dificultarem o tratamento de infecções, a contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos, como é o caso da *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium*, geram a preocupação em criar estratégias que permitam o controle e que venham garantir a qualidade e a segurança dos produtos de consumo no mercado (Shinohara et al., 2008; Santos e Novales, 2012).

Os extratos vegetais contêm inúmeros constituintes químicos que podem apresentar efeitos sinérgicos entre os seus princípios ativos (Maciel et al., 2002; Simões e Spitzer, 2007). Os processos de fracionamento de extratos têm a finalidade de obter uma fração e posteriormente o isolamento do composto de interesse com atividade farmacológica estudada (Maciel et al., 2002; Brandão et al., 2010). As técnicas cromatográficas são comumente empregadas no fracionamento de extratos, visando o isolamento e a elucidação estrutural dos princípios ativos, permitindo prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (Filho e Yunes, 1998). Nesse sentido, a família Lamiaceae possui espécies com ações

farmacológicas comprovadas, entre elas a *Tetradenia riparia* (Hochst) Cood que é um tipo de arbusto nativo da região da África Central, conhecido popularmente como mirra, umuravumba, incenso, limonete e falsa-mirra (Martins et al., 2008; Gairola et al., 2009). É uma planta empregada na medicina popular no tratamento de doenças como malária, angina, dores de cabeça, doença tropical de pele, gastroenterites, doenças renais e febre (Van Puyvelde et al., 1981; Van Puyvelde et al., 1986; Campbell et al., 1997). No Brasil essa espécie foi introduzida como planta ornamental exótica cultivada em parques, jardins e hortos (Zelnik et al., 1978; Martins et al., 2008).

Há relatos na literatura de atividades biológicas do extrato *T. riparia*, como a atividade antioxidante (Amoo et al., 2012; Sadashiva et al., 2014), antibacteriana (Vlietinck et al., 1995; Ngule et al., 2014), antifúngica, anti-helmíntica (Okem et al., 2012) e antiparasitária (Wasswa e Olila, 2006). A partir do extrato foram isolados e identificados compostos como o ibozol, 7- α -hidroxiroileanona (Zelnik et al., 1978), do extrato clorofórmico o 8 (14), 15-sandaracopimaradieno - 7 α ,18-diol que são diterpenóides; (DeKimpe et al., 1982), as α -pironas umuravumbolida e diacetilboronolida (Van Puyvelde et al., 1981), 1',2'-dideacetilboronolida e deacetilumuravumbolida, e os esteróis sitosterol, stigmasterol e campesterol (Zelnik et al., 1978; Van Puyvelde et al., 1986).

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a composição fitoquímica, atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, β -caroteno-ácido linoleico, FRAP, TRAP e Fenóis Totais e atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo do extrato bruto (EB) e frações provenientes do fracionamento do EB de *Tetradenia riparia* por cromatografia clássica.

Materiais e métodos

Material vegetal e coleta

As folhas de *T. riparia* foram coletadas entre março e abril de 2014, no início da manhã. A espécie foi proveniente da cidade de Umuarama, região Noroeste do Estado do Paraná nas coordenadas (S23° 46,225' e WO 53° 16,730') e altitude de 391m. A exsicata foi depositada no Herbário Educacional da Universidade Paranaense – HEUP em Umuarama (PR), sob o nº 2502.

Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto de T. riparia

O material vegetal fresco (580g) foi secado à temperatura ambiente. Após, pulverizado em moinho de facas e martelos (Usiram) até obter granulometria de 0,5 mm. O pó obtido (230g) foi submetido ao processo de maceração dinâmica com renovação do solvente utilizando álcool etílico 70% v/v, até o esgotamento do material vegetal (Miranda et al., 2009). Em seguida, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Tecnal TE-211) a 40°C, até obtenção do extrato bruto (EB).

Fracionamento do extrato bruto

A técnica utilizada para obtenção das frações de *T. riparia* foi a cromatografia em coluna (CC) descrita por Gazim et al. (2014). Sílica gel 60 (Macherey-Nagel 0,01-0,02 mm) foi utilizada como fase estacionária na proporção de 25g de sílica por grama de extrato. O EB foi misturado a uma proporção de 1:1:1 com sílica e hexano, levou-se em banho-maria (Biopar) até evaporação do solvente e formação de pó. O empacotamento da coluna com a sílica o EB previamente preparado foi colocado na superfície da sílica e eluído com fases móveis de polaridades crescentes: hexano, hexano: diclorometano (9:1; 8:2; 7:3; 1:1; 3:7; 2:8; 1:9), diclorometano, diclorometano: acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3; 1:1. 3:7; 2:8; 1:9), acetato de etila, acetato de etila: metanol (9:1; 8:2; 7:3; 1:1; 3:7; 2:8; 1:9) e metanol. As frações coletadas foram concentradas com evaporador rotatório a 45°C.

Identificação química

Os espectros de RMN¹³C e ¹H, DEPT 135, COSY¹H-¹H, HSQC e HMBC foram obtidos em um aparelho Bruker, modelo BioSpinGmbH, com ressonância de 75,46 MHz para o carbono e 300,06 MHz para o hidrogênio. Foi utilizada a temperatura de 250°C e as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆).

Atividade antioxidante

Quantificação de fenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos do EB e das frações de *T. riparia* foi feita utilizando o reagente Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), modificado por Viuda-Martos et al. (2010). As amostras foram diluídas em metanol, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Uma fração de 0,3 mL da solução metanólica de cada amostra foi misturada com 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). A mistura foi mantida por 15 minutos em banho-maria (BIOPAR) a 50 °C. A absorbância foi lida em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu 1601PC) em 760 nm. O volume de amostra foi substituído por metanol para o branco.

A concentração de fenóis foi calculada a partir da curva padrão de ácido gálico (0 a 2000 µM). Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ mg de amostra.

Sequestro dos radicais livres do DPPH

Com o objetivo de determinar a capacidade de sequestro de radicais livres DPPH foi seguida a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995), modificado por Rufino et al. (2007). 100 μL de diferentes concentrações do EB e das frações de *T. riparia* (1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,625 mg mL^{-1}) foram misturados a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (60 μM), preparada imediatamente antes do uso. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. A redução da absorbância foi medida a 515 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu 1601PC) em cubeta de vidro. A partir de uma correlação entre absorbância *versus* concentração da amostra antioxidante, foi determinada a concentração da amostra antioxidante necessária para reduzir 50% dos radicais livres (CI_{50}).

Método sistema beta-caroteno/ácido linoleico

A capacidade antioxidante das amostras foi avaliada segundo descrito por Mattos et al. (2009), com modificações. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno em 470 nm, com leitura em intervalos de 15 minutos, por um tempo total de 2 horas. Para tanto em um balão de fundo redondo (protegido da luz com papel alumínio) foi adicionado 50 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40 e 1 mL de solução clorofórmica de beta-caroteno (1 mg mL^{-1}). O solvente foi removido em evaporador rotatório (Tecnal TE-211), a 50 °C, por aproximadamente 10 minutos. A mistura resultante foi dissolvida em 50 mL de água deionizada e oxigenada (por borbulhamento de oxigênio por 30 minutos) sob vigorosa agitação, para a formação de uma emulsão. A emulsão teve a absorbância ajustada para 0,7 a 470 nm. A atividade antioxidante das amostras foi determinada pela mistura de 5,0 mL da emulsão com 0,5 mL das amostras em diferentes concentrações (1,0; 0,75; 0,5 e 0,25 mg mL^{-1}). Após homogeneização a mistura foi mantida a 50°C com medida da redução da absorbância a 470 nm, em intervalos de 15 minutos, ao longo de 2 horas.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação, seguindo a Eq. 1, onde a redução da absorbância do sistema sem antioxidante foi considerado como 100% de oxidação. A partir das absorbâncias, seguindo a Eq. 2, foi calculada a porcentagem de oxidação correlacionando o decréscimo da absorbância das amostras com a absorbância do sistema, a porcentagem de oxidação de cada amostra foi subtraída de 100 (Eq. 3), para a porcentagem de inibição da oxidação (Rufino et al. 2006a).

$$\text{Redução da absorbância} = A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}} \quad (\text{Eq.1})$$

$$\% \text{ de oxidação} = [(\text{Redução } A)_{\text{amostra}} \times 100] / (\text{Redução } A)_{\text{sistema}} \quad (\text{Eq.2})$$

$$\% \text{ de proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação}) \quad (\text{Eq.3})$$

Método de redução do ferro (FRAP)

Seguindo a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), modificada por Rufino et al. (2006b). Para preparar o reagente FRAP foram combinados 25 mL de tampão acetato (0,3 M), 2,5 mL de uma solução aquosa de 2,4,6-*tris* (2-piridil)-triazina (TPTZ - 10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). A solução reagente foi composta de 90 µL de cada amostra antioxidante em diferentes concentrações (500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹), 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada e mantida a 37 °C por 30 minutos. A absorbância foi lida em 595 nm, empregando espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu 1601PC). Utilizando uma curva padrão de sulfato ferroso (0 a 2000 µM) a atividade antioxidante foi expressa em µM de sulfato ferroso mg de amostra⁻¹.

Potencial antioxidante reativo total (TRAP) por luminescência

A TRAP foi avaliada por quimioluminescência, segundo a técnica descrita por Repetto et al. (1996). Essa técnica avalia os níveis de antioxidantes totais, especificamente os de baixa massa molar, por meio de uma reação contendo 200 μM de 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP) e 200 μM de luminol com adição da amostra ajustando o volume a 1 mL. Para a reação foram adicionados 50 μL de luminol, 70 μL de amostra e 50 μL de ABAP a 830 μL de tampão Glicina 0,1 M pH 8,6 a 37⁰ C e submetido à reação no luminômetro (GlomaxTM 20/ 20 Luminometer), com captação de resposta de leitura por segundo durante 15 minutos. A adição de 70 μL da amostra antioxidante diminui a luminescência produzida a níveis basais por um período (tempo de indução – T_{ind}) proporcional à quantidade de antioxidante presente na amostra, até que atinja o nível de geração de luz padrão. O sistema foi calibrado com trolox e a comparação entre o t_{ind} da reação com trolox e o t_{ind} da reação com amostra permitiu obter valores de TRAP em μM de trolox. O TRAP das amostras foi calculado usando a seguinte Equação 4:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M de trolox}) = T_{ind} \text{ amostra} / T_{ind} \text{ trolox (Eq. 4)}$$

onde T_{ind} = tempo de indução para que o antioxidante produzisse a formação de peróxidos por número de fótons em 1 min. de leitura.

Atividade antibacteriana

Amostras bacterianas

Foram testadas bactérias ATCC Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212 e *Bacillus cereus* ATCC[®] 11778) e Bacilos Gram negativos

(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella thymurium* ATCC® 14028 e *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966) incubadas por 24 horas a 37° C em meio de cultura *Tryptic Soya Agar* (Difco Laboratories).

Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do EB e das frações foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (MIC), usando *Muller Hinton Broth* (Difco Laboratories) com ajuste de cátions cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), segundo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa* e o antibacteriano Meropenem (lote 09405C-1, Astra Zeneca, Cotia, Brasil) como controles.

Foi preparada uma solução do EB e das frações de 10 mg mL⁻¹ diluída em CAMBH para as bactérias, em seguida distribuiu-se 100µL do meio de cultura em poços de uma placa de microdiluição (microplaca de microtitulação fundo em “U” 96 poços, KASVI); a seguir, acrescentando 100µL da solução das amostras ao primeiro poço e, após homogeneização, foi feita a diluição seriada até o penúltimo poço, obtendo-se concentrações finais de: 500; 120; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,98 e 0,49 µg mL⁻¹ respectivamente. Uma suspensão microbiana em salina foi preparada, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mc Farland (1 x 10⁸ UFC mL⁻¹), a seguir a suspensão foi diluída em salina na proporção de 1:20 (5 x 10⁶ UFC mL⁻¹). Desta suspensão, foram inoculados 10µL em cada poço já contendo as concentrações do EB e das frações. O controle de esterilidade e de crescimento foi realizado no último poço. Após as microplacas foram incubadas a 35°C por 18 horas em condições de aerobiose. A CIM foi determinada após revelação com o reagente cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Biotec), onde 10 µL do reagente foram adicionados aos poços das microplacas e as microplacas foram incubadas por um período de 10

minutos (Berridge et al., 1996). Onde houve crescimento microbiano foi observado o aparecimento da coloração rósea e a ausência de cor quando não houve crescimento determinando a menor concentração do EB e das frações de *T. riparia* capaz de causar inibição total do crescimento das espécies bacterianas (CLSI, 2015).

Análise estatística

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como médias e seu devido desvio padrão. Os dados foram processados e submetidos à análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo Teste de Tukey ou Scott-Knott com 5% nível de significância.

Resultados e discussão

Fracionamento do extrato bruto de T. riparia

A partir do fracionamento do extrato bruto foram obtidas 25 frações. Cada uma das frações foi submetida à análise de cromatografia em camada delgada (tolueno: acetato de etila: ácido acético 1:1:1) (CCD), e aquelas que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em um mesmo grupo, independente da mistura eluente empregada no fracionamento do extrato bruto. Deste reagrupamento resultaram 10 frações (Tabela 1), que foram submetidas à identificação química e aos testes de atividades biológicas.

Tabela 1

Reagrupamento das frações.

Fração (FR-x)	Frações agrupadas	Fases Móveis
I	1 a 5	Hexano (100%), Hexano: Diclorometano (9:1, 8:2, 7:3, 5:5)
II	6 e 7	Diclorometano: Hexano (7:3, 8:2)
III	8 e 9	Diclorometano: Hexano (9:1) Diclorometano 100%
IV	10	Diclorometano: Acetato de etila (9:1)
V	11	Diclorometano: Acetato de etila (8:2)
VI	12	Diclorometano: Acetato de etila (7:3)
VII	13 e 14	Diclorometano: Acetato de etila (5:5, 3:7)
VIII	15 a 18	Acetato de etila: Diclorometano (8:2, 9:1) Acetato de etila 100% e Acetato de etila: Metanol (9:1)
IX	19	Acetato de etila: Metanol (8:2)
X	20 a 25	Acetato de etila: Metanol (7:3, 5:5, 3:7, 2:3, 1:9) e Metanol 100%

Identificação química

As 10 frações foram submetidas a testes preliminares, com o intuito de avaliar as prováveis atividades antioxidantes e antimicrobianas. A fração que apresentou resultados mais expressivos para a atividade antioxidante foi a FR-IX. Já para atividade antimicrobiana, as frações mais interessantes foram FR-II e III. Desta forma, foram realizadas as elucidações estruturais por RMN das três frações de interesse neste estudo.

A identificação química das frações e do EB de *T. riparia* foi realizada pelos dados de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e as correlações de COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMC e com a comparação de dados espectrais presentes na literatura.

O espectro de RMN ^{13}C da fração FR-IX obtida a partir da eluição com acetato de etila: metanol (8:2) está apresentado abaixo, na Figura 1, e os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para as substâncias identificadas como demonstrado na Tabela 2. Três substâncias conhecidas foram identificadas como majoritárias, boronolida, uma α -pirona, luteolina, uma flavona e astragalina, um flavonol. A proporção da mistura é 1:2:3, tendo como majoritário a astragalina. A FR-IX apresentou compostos minoritários isômeros da α -pirona boronolida.

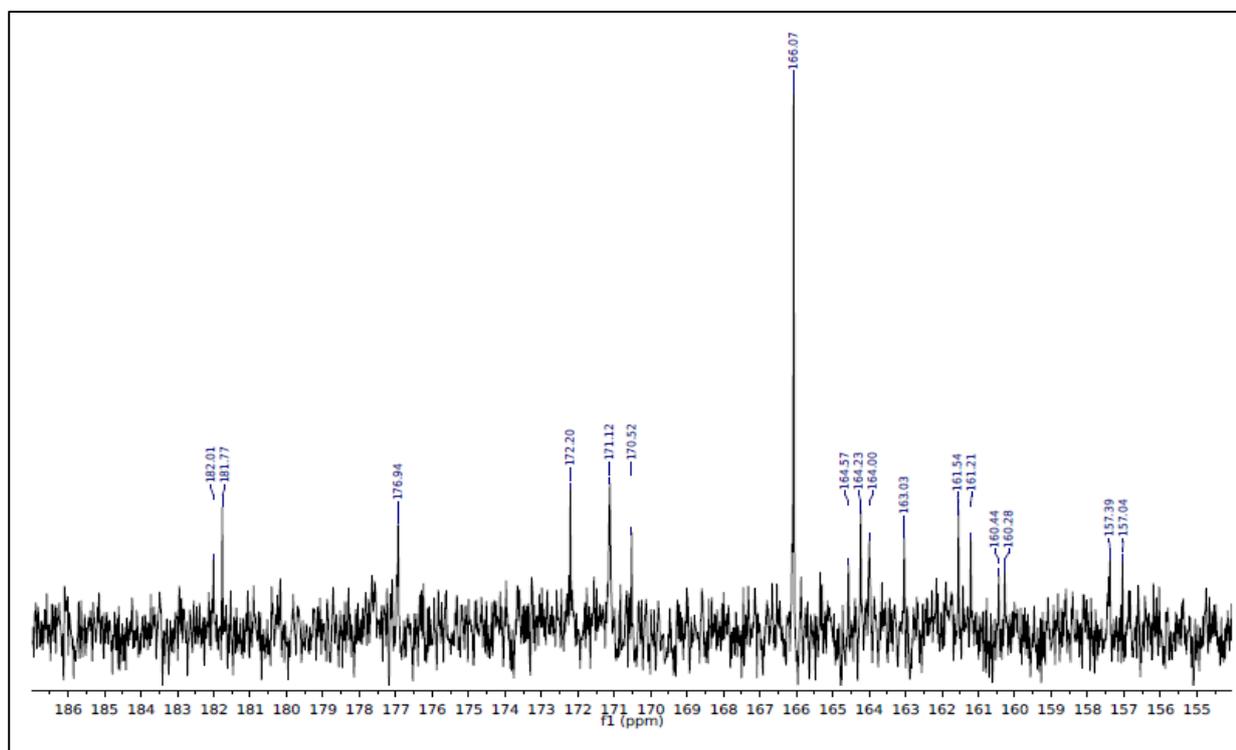


Fig. 1. Espectro de RMN ^{13}C da FR-IX em DMSO $-d_6$, 75,46 MHz.

Tabela 2

Dados de deslocamentos químicos (δ ppm) do RMN de ^1H e de ^{13}C para as substâncias identificadas na FR-IX.

	Boronolida(1)		Luteolina (2)		Astragalina (3)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)
2	163,03		164,23		157,39	
3	121,74	7,00; (dd , $J=6,0$ e $3,0$ Hz)	102,98	6,66; s	131,59	
4	145,94	7,37-7,47; m	182,20		176,94	
5	24,93	2,74-2,78; m	157,39		161,54	
6	75,23	3,73-3,77; m	98,76	6,19; d ($J=3,0$ Hz)	99,41	6,44;d($J=3,0$ Hz)
7			164,00		164,57	
8			95,46	6,11; d ($J=3,0$ Hz)	95,46	6,10;d($J=3,0$ Hz)
9			157,04		157,04	
10			104,94		104,15	
1'	73,31	2,84-2,92; m	119,09		121,74	
2'	70,02	2,96-3,05; m	113,34	6,21; (d ; $J=3,0$ Hz)	146,02	6,25;(d ; $J=15,0$ Hz)
3'	69,69	3,56; m	145,94		113,47	7,45;(d ; $J=15,0$ Hz)
4'	33,14	2,23-2,25; m	149,81		160,44	
5'	26,70	1,97-1,99; m	119,04	7,41;(d ; $J=6,0$ Hz)	98,59	4,64; (d ; $J=3,0$ Hz)
6'	21,83	0,86-0,88; m	121,71	6,70; (dd; $J=3,0$ e $6,0$ Hz)	113,47	7,45;(d ; $J=15,0$ Hz)
7'	13,98	1,17; s			-	-
1''					98,59	4,64; (d ; $J=3,0$ Hz)
2''					74,45	3,39-4,01; m
3''					78,86	3,39-4,01; m
4''					70,12	3,39-4,01; m
5''					77,23	3,39-4,01; m

6''			63,16	3,39-4,01; m
Ac	18,48	1,82; s		
(Me)				
	20,45	1,98; s		
	20,78	1,90; s		
Ac	172,2			
(C=O)				
	172,12			
	170,52			

As estruturas químicas dos compostos identificados na FR- IX estão demonstradas na Figura

2.

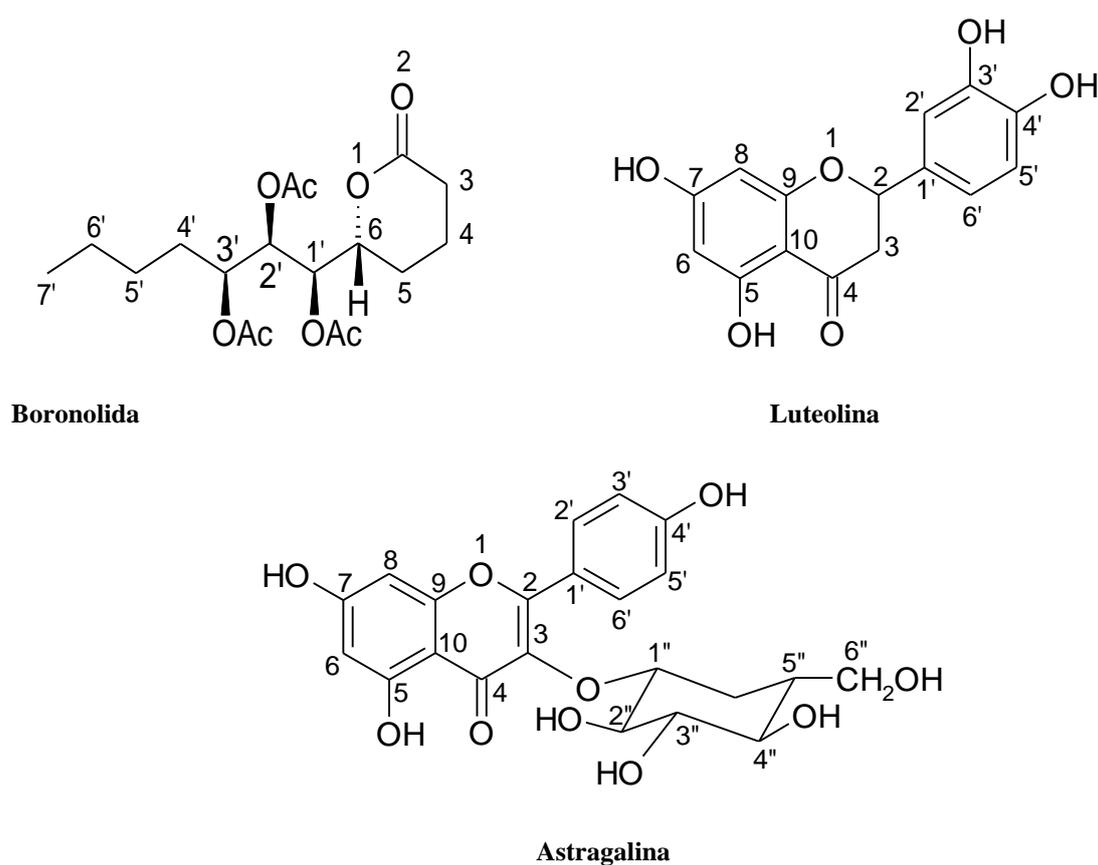


Fig.2. Estruturas químicas elucidadas da Boronolida, Luteolina e Astragalina pelos dados de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e as correlações de COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC e com a comparação de dados espectrais presentes na literatura.

No espectro de RMN¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) da boronolida observam-se os sinais característicos de três singletos em δ_H 1,82; 1,90 e 1,98 ppm evidenciando os hidrogênios metílicos dos grupos acetatos presentes na estrutura. Os carbonos metílicos destes mesmos grupos acetatos aparecem em δ_C 18,48; 20,45 e 20,78 ppm. Os carbonos carbonílicos (C=O) dos grupos acetatos ocorrem em δ_C 170,52; 172,12 e 172,20 ppm. O duplo dubleto em δ_H 7,00 ($J=6,0$ e $3,0$ Hz) pode ser assinalado a H₂, enquanto que o sinal em δ_C 121,74 ppm pode ser atribuído a C₃. Os multipletos na região δ_H 0,86-3,56 ppm são devidos aos hidrogênios presentes no anel da pirona. Os hidrogênios da cadeia lateral alifática geram os multipletos na região de δ_H 3,77-7,47 ppm devido aos acoplamentos de spin. Os dados de δ_H (ppm) para os hidrogênios presentes na estrutura da α -pirona estão de acordo com o descrito na literatura (Honda et al., 1996). A boronolida foi isolada das folhas de *T. fruticosa* e *T. barbera* (Franca e Polonsky, 1971; Davie-Coleman e Rivett, 1987). A *T. riparia* apresenta α -pironas em sua composição química, conforme relatado por Van Puyvelde et al. (1979), foram isolados das folhas umuravumbolida, deacetilumuravumbolida; diacetilboronolida, dideacetilboronolida e o tetradenolida (Zelnik et al., 1978; Van Puyelde et al., 1981; Van Puyelde et al., 1986).

O espectro de RMN¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) da luteolina mostrou sinais característicos de hidrogênio do carbono carbinólico do grupamento carbonílico α , β insaturado (δ_H 6,66 ppm; s), corroborado pela presença de um sinal em δ_C 102,98 ppm no espectro de RMN¹³C do anel pirano (C), que é compatível com a presença da luteolina (Figura 2).

O espectro de RMN¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) da luteolina (Figura 2B), é caracterizado pelo singleto em 6,66 ppm, associado a H₃, característico de um sistema carbonílico α , β insaturado. Este sistema é confirmado pelo sinal em 102,98 ppm no espectro de RMN¹³C atribuído ao carbono olefínico C₃. Os sinais de H₆ e H₈ aparecem como dois dubletos em δ_H : 6,19 e 6,11 ppm ($J=3,0$ Hz), respectivamente. Os de C₆ e C₈ aparecem em δ_C 98,76 e 95,46 ppm, respectivamente. A presença do acoplamento orto e meta de H₆' (6,70 ppm; dd ($J=3,0$ e $6,0$ Hz)) com o H₅' (7,41 ppm; d ($J=6,0$ Hz)) e H₂' (6,21 ppm; d ($J=3,0$ Hz)) é observado no espectro. Não é observado

desdobramento do sinal devido ao acoplamento H2' e H5', sendo então provavelmente seu $J=0$ Hz ou próximo a este valor. Os sinais dos carbonos quaternários oxigenados presentes na estrutura da flavona, C5, C7 e C9, apresentam deslocamento químico respectivamente de 157,39; 164,00 e 157,04 ppm, estando de acordo com o descrito na literatura (Oliveira e Carvalho, 1999). A luteolina foi identificada em outras espécies da família Lamiacea e como, por exemplo, no extrato metanólico das folhas de *Ajuga ciliata* (Inomata et al., 2013), *Melittis melissophyllum* (Skrzypczak-Pietraszek e Pietraszek, 2014), no extrato metanólico das partes áreas de *P. nissolii* (Bucar et al., 1998) e de *Thymus sipyleus* (Ozgen et al., 2011).

A astragalina, identificada pelo espectro de RMN¹H (DMSO-d₆, 300 MHz), mostra sinais de seis hidrogênios aromáticos na região entre δ_H 6,10-7,45 ppm, e sete hidrogênios alifáticos, entre δ_H 3,39-4,64 ppm. Os hidrogênios H6 e H8 acoplam entre si em uma relação meta ($J = 3,0$ Hz) formando dubletos em δ_H 6,44 e 6,10 ppm, respectivamente. Este sistema é corroborado pelos sinais de RMN¹³C em 99,14 e 94,11 ppm para C6 e C8, respectivamente. Os demais quatro hidrogênios aromáticos estão no outro anel benzênico, e, devido a simetria da estrutura apresentam a equivalência magnética entre H2' e H6' e entre H3' e H5'. Assim, ocorre acoplamento orto ($J = 15,0$ Hz), e os sinais são dois a dois. A presença de sinais na região do espectro entre δ_H 3,39-4,64 ppm formando um multipletto, sugere uma unidade glicosídica na estrutura observando cinco hidrogênios metínicos carbinólicos e dois metilênicos e os sinais δ_C 63,16-98,59 ppm para os carbonos. O hidrogênio anomérico da unidade glicosídica absorve em δ_H 4,64 ppm, na forma de um dubleto ($J=3,0$ Hz). Os dados de δ_C (ppm) para os carbonos presentes na estrutura do flavonol estão de acordo com o descrito na literatura (Wei et al., 2011). A astragalina foi identificada em outras espécies da família Lamiaceae, como por exemplo, no extrato etanólico das partes áreas de *Leonurus cardiaca* (Bernatoniene et al., 2014), do extrato metanólico das partes áreas de *Phlomis spinidens* (Takeda et al., 2001) e na espécie *Salvia cavaleriei* (Zhao et al., 1997).

Os espectros de RMN¹H das FR- II e III apresentaram um dubleto e um triplete na região compreendida entre δ_H 5,20- 5,50 ppm, demonstrados na Figura 4, característicos da presença do

diterpenóide 8(14),15-sandaracopimaradieno-7 α ,18-diol, que em sua estrutura apresenta os carbonos olefínicos C15 com um hidrogênio e C16 com dois hidrogênios (Figura3), que acoplam entre si formando os sinais típicos. Este composto foi previamente identificado no extrato clorofórmico das folhas de *T. riparia* por DeKimpe et al. (1982), reforçando a possibilidade da presença deste constituinte nas frações. Os demais espectros de ^{13}C , DEPT 135, COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC destas frações estão em andamento para a confirmação da composição química.

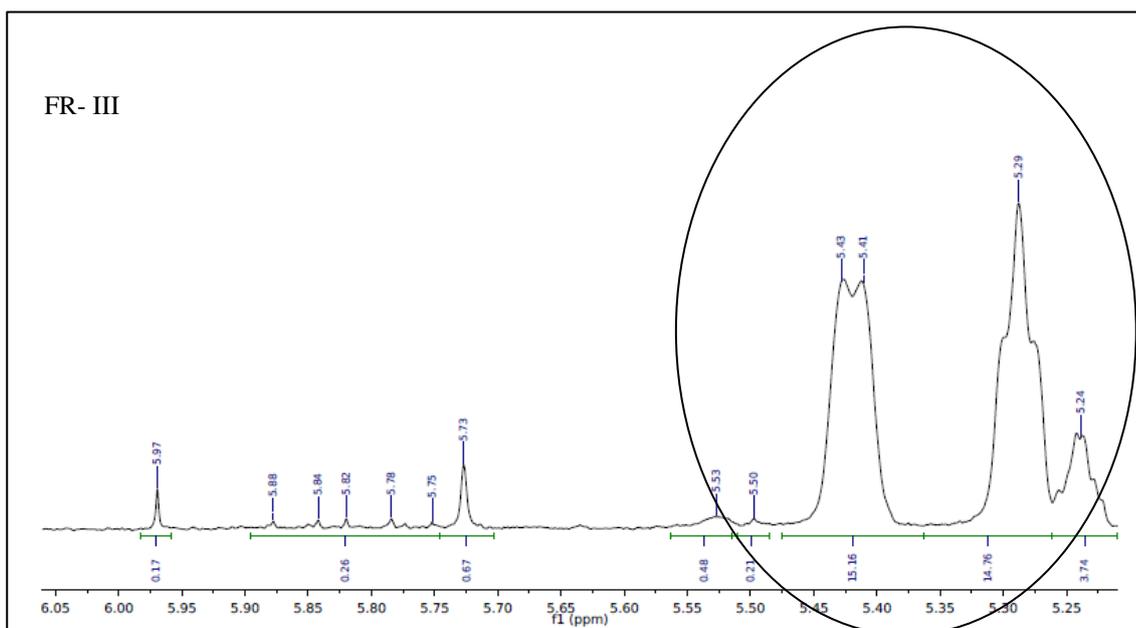
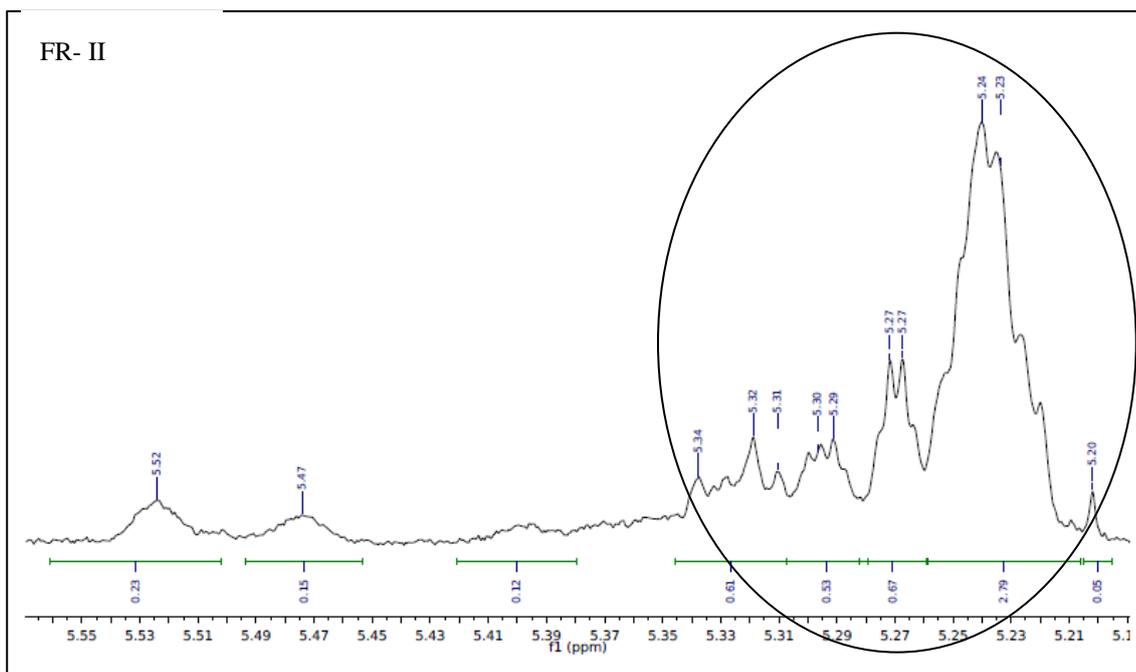


Fig. 3. Espectro de RMN ^1H das FR- II e III em DMSO $-d_6$, 300 MHz.

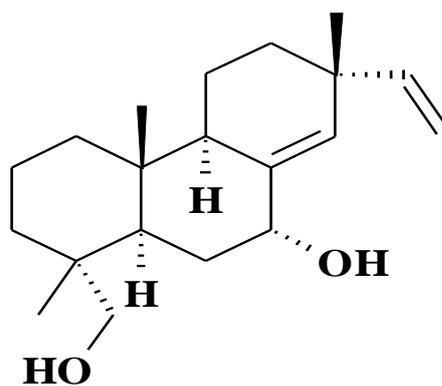


Fig. 4. Estrutura química do 8 (14),15-sandaracopimaradieno-7 α ,18-diol.

Atividade antioxidante

Os resultados obtidos da quantificação de fenóis totais para a atividade antioxidante do EB e das frações da mirra pelos métodos DPPH, β -caroteno / ácido linoleico, FRAP estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3Teor de fenóis e atividade antioxidante do EB e das frações de *Tetradenia riparia*.

	FENÓIS	DPPH	Sistema β - Caroteno/ácido linoleico	FRAP
	μg ácido gálico mg^{-1} amostra	CI_{50} (mg mL^{-1})	% inibição da oxidação 1mg mL^{-1}	μM Sulfato Ferroso mg Amostra $^{-1}$
EB	94,31 \pm 2,75 ^c	0,91 \pm 0,01 ^f	51,52 \pm 0,64 ^d	2,04 \pm 0,06 ^d
FR- I	17,46 \pm 0,70 ⁱ	54,97 \pm 14,13 ^a	10,50 \pm 3,59 ^g	0,16 \pm 0,06 ^j
FR- II	34,27 \pm 0,43 ^h	10,41 \pm 1,32 ^c	80,15 \pm 2,92 ^a	0,34 \pm 0,01 ⁱ
FR- III	47,60 \pm 2,08 ^f	7,36 \pm 0,23 ^d	68,80 \pm 1,99 ^b	0,66 \pm 0,02 ^g
FR- IV	57,69 \pm 0,80 ^e	14,59 \pm 2,17 ^b	55,73 \pm 1,64 ^c	0,33 \pm 0,01 ⁱ
FR- V	45,35 \pm 1,22 ^g	53,63 \pm 20,64 ^a	58,97 \pm 0,36 ^c	0,33 \pm 0,02 ⁱ
FR- VI	52,86 \pm 1,30 ^g	8,35 \pm 1,72 ^d	42,03 \pm 0,86 ^e	0,49 \pm 0,03 ^h
FR- VII	119,85 \pm 0,56 ^b	0,88 \pm 0,01 ^g	39,57 \pm 4,68 ^e	2,23 \pm 0,25 ^c
FR- VIII	76,94 \pm 0,16 ^d	1,75 \pm 0,01 ^e	15,76 \pm 1,53 ^f	1,89 \pm 0,04 ^e
FR- IX	181,97 \pm 1,01 ^a	0,61 \pm 0,02 ^h	55,61 \pm 3,44 ^c	4,59 \pm 0,15 ^b
FR- X	46,33 \pm 3,66 ^g	1,70 \pm 0,10 ^e	7,71 \pm 1,23 ^g	1,44 \pm 0,20 ^f
Quercetina	-	0,02 \pm 0,01 ⁱ	-	-
Trolox	-	-	-	8,22 \pm 0,19 ^a

- : não testado; Os valores são médias \pm desvio padrão em triplicata e a análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA). Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O EB e frações analisadas apresentaram altos teores de fenóis totais destacando a FR-IX (181,97); FR-VII (119,85); o EB (94,31) e FR-VIII (76,9 μg ácido gálico mg de amostra $^{-1}$). Diante da ausência de estudos de dosagem de fenóis totais do EB de *T. riparia*, os resultados encontrados no presente experimento foram confrontados com estudos realizados com outras espécies da família Lamiaceae. Pitaro *et al.* (2012), encontraram valores de 147,96 μg ácido gálico mg^{-1} extrato etanólico de *Ocimum basilicum* e 12,46 μg ácido gálico mg^{-1} para o *Origanum vulgare*. Pohv *et al.*

2012, investigaram a quantidade de fenóis totais para os extratos etanólicos de *Hyptis marrubioides*, *H. lantanifolia*, *H. microphylla* e *H. suaveolens* com valores de 37,33; 28,81; 27,84 e 24,99 μg ácido gálico mg de amostra⁻¹ respectivamente. Tawaha *et al.* (2007), avaliaram extratos metanólicos de *Salvia ceralophyla* L. (21,9), *Salvia fruticosa* (24,1) e *Teucrium polium* L. 22,1 μg ácido gálico mg^{-1} de amostra. Quando comparados os valores de fenóis totais descritos pelos autores com os resultados encontrados no presente experimento, pôde-se observar que as frações apresentaram maior teor de fenóis totais que o EB de *T. riparia* e os extratos utilizados pelos autores acima citados, demonstrando que o EB e frações da mirra apresentaram maior concentração de fenóis que as plantas da mesma família Lamiaceae.

Devido ao alto teor de fenóis totais (94,31 μg ácido gálico mg de amostra) presente no EB e frações de mirra tornou-se relevante a investigação por outros métodos antioxidantes.

Pelo teste do DPPH, o EB de *T. riparia* apresentou CI_{50} de 0,913 mg mL^{-1} , sendo que as frações FR-VII e FR-IX demonstraram maior potencial antioxidante que o EB e as demais frações com CI_{50} 0,885 e 0,619 mg mL^{-1} , respectivamente. Sadashiva *et al.* (2014) estudaram a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *T. riparia*, pelo método do DPPH, obtendo CI_{50} 0,142 mg mL^{-1} . Outro estudo, realizado por Amoo *et al.* (2012), prepararam o extrato metanólico por sonicação de folhas estocadas por 16 anos de *T. riparia* e avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH, obtendo o CI_{50} 0,041 mg mL^{-1} .

Pelo método da co-oxidação do β -caroteno / ácido linoleico, o EB de *T. riparia* a uma concentração 1 mg mL^{-1} no tempo de 120 minutos apresentou 51,52% ou em 0,2 mg mL^{-1} apresentou 16% de inibição da oxidação, destacando as frações FR-II e FR-III que apresentaram valores maiores que o EB e as demais frações de 80,15 e 68,80 % de inibição da oxidação. O expressivo potencial antioxidante pelo método da co-oxidação do β -caroteno / ácido linoleico destas duas frações quando comparadas com o EB e as demais frações provavelmente deve-se a polaridade que estas apresentam, pois foram separadas por um sistema apolar (Tabela1), apresentando este método maior seletividade para compostos apolares (Alves *et al.*, 2010). Estudos conduzidos por

Amoo et al. (2012), investigaram a porcentagem de inibição da oxidação a uma concentração de 0,2 mg mL⁻¹ durante o tempo de 120 minutos do extrato metanólico das folhas frescas e estocadas por 16 anos de *T. riparia*, usando como solvente o metanol 50% (v v⁻¹) e tiveram como resultados 64,5% e 67,2% de inibição da oxidação, respectivamente.

As diferenças nos perfis de potencial antioxidante dos extratos de *T. riparia* podem ser atribuídas às diferenças na composição química dos extratos, que são influenciados pela origem da planta, época de coleta, processo de secagem, condições climáticas, solo, estado vegetativo e processo de obtenção do extrato (Simões et al., 2007).

Já na metodologia do FRAP, o EB de *T. riparia* apresentou 2,04 µM sulfato ferroso mg⁻¹, sendo que as FR-IX, 4,59 e FR-VII e 2,23 µM sulfato ferroso mg⁻¹ demonstraram maior potencial antioxidante que o EB e as demais frações. Diante da escassez de estudos de atividade antioxidante do extrato de *T. riparia*, os resultados encontrados no presente experimento foram confrontados com estudos realizados com outras espécies da família Lamiaceae, como o extrato metanólico das folhas de *Scutella tornefortii*, *Stachys byzanthina* e *Salvia hypoleuca* que apresentaram 0,22; 0,39 e 0,64 µM sulfato ferroso mg⁻¹, respectivamente (Gohari et al., 2011). Dudonné et al. (2009), investigaram o extrato aquoso das folhas de *Lavandula hybrida*, que apresentou resultado de 4,54 µM sulfato ferroso mg⁻¹. Os resultados do EB e das frações FR-IX e FR-VII quando confrontados com os dados descritos na literatura dos extratos da família Lamiaceae apresentam maior potencial antioxidante pelo método da redução do ferro (FRAP). O alto potencial antioxidante do EB e das frações de mirra encontrados pelo método FRAP, quando comparado com as outras metodologias investigadas nesse estudo, pode ser explicado pela presença de compostos que possuem a capacidade específica de reduzir Fe³⁺ em Fe²⁺ (Vasconcelos, 2010).

Na metodologia de TRAP, foram avaliados o EB e as frações FR-VII, FR-VIII, FR-IX e FR-X, pois a metodologia apresenta a limitação de não analisar compostos sem ou com pouca atividade antioxidante. Os resultados obtidos para a atividade antioxidante pelo método do TRAP estão

demonstrados na Tabela 4. O EB mostrou em $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalência a $1,45 \mu\text{M}$ de trolox e a FR- IX com $4,15 \mu\text{M}$ de trolox na mesma concentração, portanto foi a fração com maior potencial antioxidante quando comparado ao EB e as demais frações testadas.

Tabela 4.

Atividade antioxidante do EB e das frações de *T. riparia* pelo método TRAP em μM de Trolox.

Concentração	$62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$
EB	$1,45 \pm 0,06^{\text{d}}$
FR-VII	$2,81 \pm 0,08^{\text{b}}$
FR-VIII	$2,74 \pm 0,01^{\text{c}}$
FR-IX	$4,15 \pm 0,06^{\text{a}}$
FR-X	$1,14 \pm 0,02^{\text{e}}$

Os valores são médias \pm desvio padrão em triplicata e a análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA). Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Diante da escassez de estudos de atividade antioxidante do extrato de *T. riparia* e com espécies da mesma família, os resultados encontrados no presente experimento foram confrontados com estudos realizados com outras espécies. Siraichi et al. (2013), investigaram o extrato etanólico de *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), que na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrou equivalência a $6,87 \mu\text{M}$ de trolox. Desmarchelier et al. (1998) encontraram valores de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalência a $80,06 \mu\text{M}$ de trolox para o extrato metanólico de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) popularmente conhecida como macela.

Comparando-se os valores de atividade antioxidante pelo ensaio de TRAP utilizados na comparação com os descritos em nosso trabalho, pode-se observar que o EB e as frações da mirra possuem menor capacidade antioxidante pela metodologia do que as plantas citadas.

Foi observada uma variação da ação antioxidante pelos valores obtidos nos diferentes métodos para o EB e as frações, isto se deu pelo fato de que cada metodologia possui um mecanismo gerador de radical livre e de ação sobre o radical, como também seletividade de acordo com a polaridade dos compostos, sendo para compostos apolares (sistema β -caroteno/ácido linoleico) e polares (FRAP e DPPH), já o TRAP é específico para substâncias de baixo peso molecular. Assim, foi possível analisar o comportamento das amostras em cada técnica (Alves et al., 2010).

De modo geral, a FR-IX apresentou maior quantidade de fenóis totais e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e TRAP, correlacionando capacidade antioxidante com a presença da astragalina e luteolina, que são polifenóis em sua composição.

A astragalina (kaempferol-3-O- β -glucopiranosídeo) é um flavonol pertencente à classe dos flavonoides, possui atividade antioxidante relatada por Tai et al. (2012), que isolaram a astragalina de *Pseudodrynaria coranans* e determinaram a ação antioxidante pelo método do DPPH com CI_{50} 115,4 μmolL^{-1} . Delvanazi et al. (2015), isolaram a astragalina da fração metanólica das partes aéreas de *Dorema glabrum* e analisaram a ação antioxidante pelo ensaio do DPPH e mostraram CI_{50} 43,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a astragalina. Vongsak et al. (2015) avaliaram também a ação antioxidante da astragalina pelo método do DPPH com CI_{50} 14,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, FRAP com 68,33 mmol de sulfato ferroso equivalente /100g de extrato e pelo ABTS com 16,87 mmol de trolox equivalente/100g de extrato. Também avaliaram a capacidade antioxidante pela metodologia do β -caroteno/ ácido linoleico para a astragalina isolada das partes aéreas de *Rulus rigidus*, que em 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ teve uma capacidade antioxidante de 110,17% e pelo DPPH com CI_{50} 9,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Nguelefack et al., 2011). Han et al. (2004) isolou a astragalina das partes aéreas de *Aceriphyllum rossii* e determinou a ação antioxidante pelo método do ABTS com 0,402 mg L^{-1} de vitamina C equivalente. A astragalina também apresenta ação anti-inflamatória (Lee et al., 2011; Liu et al., 2015), antitumoral (Kim et al., 2012) e antialérgica (Cho et al., 2015).

A luteolina é um tipo de flavona que apresenta forte capacidade antioxidante de sequestro de radical livre, conforme demonstrado por Pan et al. (2010), que isolaram de *Buddleia officinalis* e determinaram o potencial antioxidante da luteolina pelos testes de DPPH e ABTS com CI_{50} de 3,09 e 2,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Zampini et al. (2009) também isolaram das partes aéreas de *Baccharis incarum* a luteolina e determinaram o CI_{50} 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no método ABTS. Roy et al. (2015) avaliaram a ação de redução do ferro da luteolina e em 40 μM foi equivalente a 0,60 mmol de sulfato ferroso L^{-1} , Hsu et al. (2005) também avaliaram a atividade antioxidante da luteolina isolada de *Glossogyne tenuifolia* (Asteraceae) e pelo método do DPPH mostraram CI_{50} 12,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e pelo método do sequestro do ânion superóxido apresentou CI_{50} 24,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Choi et al. (2014) determinaram a ação antioxidante da luteolina pelos métodos de sequestro do DPPH, Peroxinitrito, óxido nítrico e pela inibição total de espécies reativas de oxigênio que apresentou CI_{50} de 6,69; 0,56; 1,74 e 1,16 $\mu\text{M mL}^{-1}$. A luteolina também apresenta ação anticolinesterásica, anti-diabética, anti-inflamatória (Choi et al., 2014) e antimicrobiana (Zampini et al., 2009).

Diante da escassez de estudos para o composto isolado Boronolida, não foi possível concluir se este age em sinergismo com a astragalina e luteolina na atividade antioxidante da FR-IX onde estão presentes.

Atividade antibacteriana

Os resultados encontrados para a atividade antibacteriana do EB e frações de *T. riparia* pelo método de microdiluição em caldo (Tabela 5), mostraram que FR-III apresentou maior atividade frente aos micro-organismos Gram-positivos testados, com CIM 0,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S.aureus* e 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. faecalis* e *B. cereus*, quando comparado com o EB e as demais frações, porém a FR- II também apresentou alta atividade sobre a cepa utilizada de *S.aureus* (1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Quando

comparado com o controle positivo Meropenem, todas as amostras apresentaram resultados inferiores.

Tabela 5

Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do EB e das frações das folhas de *T. riparia*.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>S. thymurium</i>
EB	62,5 ^d	500 ^b	125 ^c	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- I	>500	250 ^c	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- II	1,95 ^e	>500 ^a	>500 ^a	125 ^c	>500 ^a	>500 ^a	62,5 ^c
FR- III	0,98 ^f	31,2 ^e	31,2 ^e	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b	>500 ^b
FR- IV	125 ^c	31,2 ^e	62,5 ^d	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- V	62,5 ^d	15,6 ^f	31,2 ^e	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- VI	125 ^c	>500 ^a	62,5 ^d	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- VII	125 ^c	125 ^d	62,5 ^d	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- VIII	500 ^b	125 ^d	250 ^b	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- IX	500 ^b	250 ^c	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
FR- X	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a	>500 ^a
Meropenem	0,03 ^g	-	-	-	0,25 ^c	-	-

- : não testado; Os valores são médias \pm desvio padrão em triplicata e a análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA). Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De modo geral, o EB e as frações apresentaram maior ação sobre as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *B. cereus*) do que os bacilos Gram-negativos (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. thymurium* e *A. hydrophila*). Somente a FR- II apresentou ação sobre as cepas de *E. coli* e *S.*

thyphimurium com CIM de 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O meropenem (controle positivo) mostrou CIM de 0,03 e 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente, estando de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), que determina que o grau de confiabilidade do teste por meio do ponto de corte do meropenem deve estar entre 0,03 a 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e para *P. aeruginosa* de 0,25 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando portanto que a técnica foi realizada adequadamente e os valores encontrados são confiáveis.

O EB neste estudo apresentou ação sobre os micro-organismos *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. cereus*. McGaw et al. (2000) testou o extrato de *T. riparia* coletada em KwaZulu (África do Sul), que não mostrou ação sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Ngule e Ndiku (2014) avaliaram a ação antibacteriana pelo método de difusão em disco do extrato aquoso das folhas coletadas em Baraton (África), que demonstrou atividade sobre as bactérias *E. coli* (22,67 mm), *B. cereus* (13,33 mm) e *S. typhi* (13,33 mm). Ndamane et al. (2013), determinaram a ação antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo (MIC) em vários tipos de extratos: acetato de etila, diclorometano, hexano, metanol e aquoso. As folhas foram coletadas na Província de Cape (África do Sul), o extrato diclorometano não foi efetivo contra as cepas avaliadas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. aureus*), já o extrato metanólico foi o mais ativo com CIM de 1,0 mg mL^{-1} para *S. aureus* e *B. cereus* e 10 mg mL^{-1} para *E. coli* e *P. aeruginosa*. O extrato hexano apresentou CIM de 10 mg mL^{-1} para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os extratos aquoso e acetato de etila apresentaram CIM de 5,0 mg mL^{-1} para *S. aureus*, *B. cereus* 5,0 e 1,0 mg mL^{-1} e 10 mg mL^{-1} para *E. coli*. E o extrato acetato de etila mostrou CIM de 10 mg mL^{-1} para *P. aeruginosa*. Van Puyvelde et al. (1994), avaliaram a atividade antimicobacteriana do extrato etanólico das folhas da mirra, que apresentou CIM de 1000 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Mycobacterium simiae* e *M. tuberculosis*, respectivamente. Hakizamungu et al. (1992) investigaram a ação antiprotozoária do extrato metanólico das folhas de mirra sobre *Trichomonas vaginalis* e tiveram como resultado 100% de inibição em 50 mg mL^{-1} .

As FR-II e FR-III foram as mais ativas sobre a cepa de *S. aureus*, conforme análise parcial por RMN ^1H , que talvez sugere a presença do composto diterpenóide 8(14),15-sandaracopimaradieno-7 α ,18-diol, que foi previamente isolado do extrato clorofórmico das folhas de *T. riparia* por De Kimpe et al. (1982), apresenta ação antimicrobiana, relatada conforme descrito por Van Puyvelde et al. (1986), que avaliaram a concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição em caldo (MIC) sobre as bactérias Gram-positivas [*S. aureus* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. epidermidis* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. pyogenes* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *B. subtilis* (6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *M. smegmatis* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$)] e sobre as bactérias Gram-negativas *P. vulgaris* (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *P. solanacearum* (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. dysenteriae* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*. Determinaram também a ação antifúngica sobre a *A. boydii* (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *A. flavus* (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *C. albicans* (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *M. breuseghenii* (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *M. canis* (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *M. gypseum* (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Paecilomyces* (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Van Puyvelde et al. (1994) estudaram a ação antimicrobiana do composto sobre a cepa de *M. tuberculosis* tendo como resultado o CIM de 25-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este composto também apresenta ação antiespasmódica (Van Puyvelde et al. 1987).

A FR-IX apresentou CIM de 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as cepas de *S. aureus* e *E. faecalis*. O flavonoide luteolina, que está presente nesta fração, mostra potencial antibacteriano conforme relatado por Zampini et al. (2009), com CIM de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as cepas de *S. aureus* e *E. faecalis*. Esta também possui atividade sobre as bactérias *E. coli* (Lee et al., 2010). Wen et al. (2014) avaliaram a atividade antibacteriana e determinaram o CIM de 14,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de luteolina isolada das folhas de *L. chinensis* para as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *Salmonella* e *B. thuringiensis*. Desta forma, pode-se associar a ação à presença da luteolina na FR-IX. Não existem relatos na literatura da ação antimicrobiana da astragalina e boronolida presentes nesta fração.

Nosso trabalho demonstrou que o fracionamento do extrato foi de suma importância para detectar a presença de frações com atividade antioxidante e antibacteriana superior ao EB de mirra. O EB e a FR-IX apresentaram resultados promissores em relação ao potencial antioxidante e a FR-

II e FR-III na ação antibacteriana sobre as cepas de bactérias Gram-positivas. Desta forma, são necessárias investigações em relação ao mecanismo de ação e ação *in vivo*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação Araucária.

Referências

Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M., 2010. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. *Química Nova* 33, 2202-2210.

Amoo, S. O., Aremu, A. O., Moyo, M., van Staden, J., 2012. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. *Complementary and Alternative Medicine* 12, 1-9.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.

Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Majiene, D., Baniene, R., Kursvietiene, L., Mastteikowa, R., Savickas, A., Toleikis, A., Trumbeckaite, S., 2014. The effect of *Leonurus cardiaca* Herb Extract and some of its flavoids on mitochondrial oxidative phosphorylation in the herat. *Planta Medica* 80, 525-532.

Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., Wang, R., 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4, 14-19.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology* 28, 125–130.

Brandão, H. N., David, J. P., Couto, R. D., Nascimento, J. A. P., David, J. M., 2010. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova* 33, 1359-1369.

Bucar, F., Ninov, S., Ionkova, I., Karting, T., Schubert-Zsilavecz, M., Asenov, I., Konuklugil, B., 1998. Flavonoids from *Phlomis nissolii*. *Phytochemistry* 48, 573-575.

Campbell, W. E., Gammon, D. W., Smith, P., Abrahams, M. T., 1997. Composition and antimalarial activity *in vitro* of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Medica* 63, 270–272.

Cho, I-H., Choi, Y-J., Gong, J-H., Shin, D., Kang, M-K., Kang., Y-H., 2015 Astragalin inhibits autophagy-associated airway epithelial fibrosis. *Respiratory Research* 16, 2-13.

Choi, J. S., Islam, M. N., Ali, M. Y., Kim, Y. M., Park, H. J., Sohn, H. S., Jung, H.A., 2014. The effects of C-glycosylation of luteolin on its antioxidant, anti-Alzheimer's disease, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities. *Archives of Pharmacological Research* 37, 1354-1363.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute., 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard, tenth edition – CLSI document M07-A10. CLSI, Wayne, Pennsylvania.

Cood, L.E., 1985. The genus *Tetradenia*. *Flora of Southern Africa* 28, 13-116.

Davie-Coleman, M., Rivett, D. E. A., 1987. Stereochemical studies on boronolide, an a-pyrone from *Tetradenia barberae*. *Phytochemistry* 26, 3047-3050.

de Kimpe, N., Schamp, N., van Puyvelde, L., Dubé, S., Chagnon-Dubé, M., Borremans, F., Anteunis, M.J.O., Declercq, J. P., Germain, G., van Meerssche, M., 1982. Isolation and structural identification of 8 (14), 15-sandaracopimaradieno - 7 α , 18-diol from *Iboza riparia*. *Journal of organic chemistry* 47, 3628.

Delvanazi, M-R., Hadjiakhoondi, A., Delazar, A., Ajani, Y., Tavakoli, S., Yassa, A., 2015. Phytochemical and antioxidant investigation of the aerial parts of *Dorema glabrum* Fisch. & C. A. Mey. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 14, 925-931.

Desmarchelier, C., Coussio, J., Ciccio, G., 1998. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. (“marcela”). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31, 1163-1170.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Merillon, J-M., 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 1768–1774.

Farmacopéia Brasileira 2015. São Paulo: Atheneu.

Filho, V. C., Yunes, R. A., 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova 21, 99-105.

Franca, N. C., Polonsky, J., 1971. Sur la structure du boronolide, isole du *Tetradenia fruticosa* Benth. Comptes Rendus de Académie des Sciences 273, 439-441.

Gairola, S., Naidoo, Y., Bhatt, A., Nicholas, A., 2009. An investigation of the foliar trichomes of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd [Lamiaceae]: An important medicinal plant of Southern Africa. Flora (Jena) 204, 325–330.

Gazim, Z. C., Rodrigues, F., Amorin, A. C. L., Rezende, C. M., Soković, M., Tešević, V., Vučković, I., Krstić, G., Cortez, L. E. R., Colauto, N. B.; Linde, G. A., Cortez, D. A. C., 2014. New natural diterpenetype abietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. Molecules 19, 514-524.

- Gohari, A. R., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A., 2011. Antioxidant Activity of some Medicinal Species using FRAP Assay. *Journal of Medicinal Plants*. 10, 54-60.
- Hakizamungu, E., van Puyvelde, L., Wéry, M., 1992. Screening of Rwandese medicinal plants for anti-trichomonas activity. *Journal of Ethnopharmacology* 36, 143-146.
- Han, J-T., Bang, M-H., Chun, O-K., Kim, D-O., Lee, C-Y., Baek, N-I., 2004. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossi* and their antioxidant activities. *Archives of Pharmacal Reserch* 27, 390-395.
- Honda, T., Horiuchi S., Mizutani, H., Kanai, K., 1996. Enantiocontrolled Synthesis of (+)-Boronolide. *The Journal of Organic Chemistry* 61, 4944-4948.
- Hsu, H-F., Houng, J-Y., Chang, C-L., Wu, C-C., Chang, F-R., Wu, Y-C., 2005. Antioxidant activity, cytotoxicity, and DNA information of *Glossogyne tenuifolia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6117-6125.
- Inomata, Y., Norihiko, T., Kitajima, J., Kokubugata, G., Iwashina, T., 2013. Flavones and anthocyanins from the leaves and flowers of Japanese *Ajuga* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 51, 123-129.
- Kim, G-E., Kang, H-K., Seo, E-S., Jung, S-H., Park, J-S., Kim, D-H., Kim, D-W., Ahn, S-A., Sunwoo, C., Kim, B., 2012. Glucosylation of the flavonoid, astragalín by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase acceptor reactions and characterization of the products. *Enzyme and Microbial Technology* 50, 50-56.
- Lee, H-B., Kim, E-K., Park, S-J., Bang, S-G., Kim, T. G., Chung, D-W., 2011. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalín synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2315–2321.

- Lee, K-A., Moon, S. H., Kim, K-T., Mendonca, A. F., Paik, H-D., 2010. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157:H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Science of Biotechnology* 19, 257-262.
- Liu, J., Cheng, Y., Zhang, X., Zhang, X., Chen, S., Hu, Z., Zhou, C., Zhang, E., Ma, S., 2015. Astragalin attenuates allergic inflammation in a murine asthma model. *Inflammation* 38, 2007-2016.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, U. F., Grynberg, N. F., Echevarria, A., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25, 429-438.
- Marco, G. J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *The Journal of the American Oil Chemist's Society* 45, 594-598.
- Martins, M. B. G., Martins, R. G., Cavalheiro, J. A., 2008. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*). *Revista Biociências* 14, 127-140.
- Mattos, L. M., Moretti, C.L., Muniz, L. B., Silva, E.Y.Y., 2009. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema β -caroteno/ ácido linoléico. *Comunicado Técnico Embrapa* 68, 1-5.
- McGaw, L. J., Jager, A. K., van Staden, J., 2000. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 247-263.
- Miranda, C. G., Arantes, M. D. C. B., Rezende, M. H., Oliveira, L. M. G., Freitas, M. R. F., Nogueira, J. C. M., Paula, J. R., Bara, M. T. F., 2009. Caracterização farmacognóstica das folhas e sementes de *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 539-544.
- Ndamane, Y., Kambizi, L., Songca, S. P., Oluwafemi, O. S., 2013. Antibacterial effectiveness of *Tetradenia riparia* extract, a plant traditionally used in the Eastern Cape Province to treat diseases of the respiratory system. *Journal of Medicinal Plants Reserch* 7, 2755-2760.

- Nguelefack, T. B., Mbakam, F. H. K., Tapondjou, L. A., Watcho, Pierre., Nguelefack-Mbuyo, E. P., Ponou, B. K., Kamanyi, A., Park, H-J., 2011. A dimeric triterpenoid glycoside and flavonoid glycosides with free radical-scavenging activity isolated from *Rubus rigidus* var. *camerunensis*. Archives of Pharmacal Reserch 34, 543-550.
- Ngule, M. C., Ndiku, M. H., 2014. Antidiarrheal activity of *Tetradenia riparia* and *Wubergia ugandensis* ethnobotanical plants in Kenya. World Journal of Pharmaceutical Sciences 2, 1180-1183.
- Ngule, M. C., Ndiku, M. H., Ramesh, F., Ngule, M. E., 2014. Preliminary phytochemical and antibacterial screening of fresh *Tetradenia riparia* leaves water extract against selected pathogenic microorganisms. International Journal of Bioassays, 3, 3413-3418.
- Oliveira, M. C. C., Carvalho, M. G., 1999. Flavonoides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. Química Nova 22, 182-184.
- Okem, A., Finnie, J. F., van Staden, J., 2012. Pharmacological, genotoxic and phytochemical properties of selected South African medicinal plants used in treating stomach-related ailments. Journal of Ethnopharmacology 139, 712– 720.
- Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Kazaz, C., Asçi, A., Kaya, Y., Seçen, H., 2011. Relationship between chemical structure and antioxidante activity and its glycosides isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*. Records of Natural Produits 5, 12-21.
- Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K., Liu, P., 2010. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. Food Chemistry 121, 497–502.
- Pitaro, S. P., Fiorani, L.V., Jorge, N., 2012. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriçao (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. Revista Brasileira Plantas Mediciniais 14, 686-691.

- Pohv, J. A., Santos, F. B., Silva, K. R., 2012. Teor de fenóis totais e flavonóides em quatro espécies do gênero *Hyptis* Jacq. ocorrentes no cerrado stricto sensu. *Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium* 3, 520-528.
- Ramalho, V. C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova* 29, 755-760.
- Repetto, M., Reides, C., Carretero, M. L. G., Costa, M., Griemberg, G., Liesuy, S., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta* 255, 107-117.
- Roy, S., Mallick, S., Chakraborty, t., Ghosh, N., Singh, A. K., Manna, S., Majumdar, S., 2015. Synthesis, characterization and antioxidant activity of luteolin-vanadium (II) complex. *Food Chemistry* 173, 1172-1178.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E.S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D., 2007. Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa* 127, 1-4.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Filho, J. M.; Moreira, A. V. B., 2006a. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico,. *Comunicado Técnico Embrapa*, 126, 1-4.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D., 2006b. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico Embrapa* 125, p. 1-4.
- Sadashiva, C. T., Naidoo, J. R., Kalicharan, B., Naidoo, G., 2014. Antioxidant and acetylcholinesterase activities of three species of the family Lamiaceae. *Bangladesh Journal of Botany* 43, 331-335.

- Santos, F. S., Novales, M. G. M., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 136-141.
- Shinohara, N. K. S., Viviane, B. B., Jimenez, S. M. C., Machado, E. C. L., Dutra, Fireman A. F., Lima-Filho, J. L. L., 2008. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva* 13, 1669-1674.
- Simões, C. M. O., Schenkel. E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R., 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC.
- Singleton V. L., Rossi, Joseph A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Siraichi, J. T., Felipe, D. F., Brambilla, L. Z. S., Gatto, M. J., Terra, V. A., Cecchini, A. L., Cortez, L. E. R., Rodrigues-Filho, E., Cortez, D. A. G., 2013. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in southern Brazil. 8, 1-9.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Pietraszek, J., 2014. Seasonal changes os flavonoid contente in *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Chemistry & Biodiversity* 11, 562-570.
- Tai, Z., Zhang, F., Cai, L., Shi, J., Cao, Q., Ding, Z., 2012. Flavonol glycosides of *Pseudodrynaria coronans* and their antioxidant activity. 48, 221-224.
- Takeda, Y., Isai, N., Masuda, T., Honda, G., Takaishi, Y., Ito, M., Otsuka., Ashurmetov, O. A., Khodzhimatov., 2001. Phlomisflavosides A and B, New flavonol bisglycosides from *Phlomis spinidens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49, 1039-1041.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 104, 1372–1378.
- Van Puyvelde, L., Dubé, S., Uwimana, E., Uwera, C., Dommise, R. A., Esmas, F. L., Van Schoor, O., Vlietnick, A. J., 1979. New α -pyrones from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* 18, 1215.

- Van Puyvelde, L., de Kimpe, N., Dubé, S., Changnon-Dublé, M., Boily, Y., Boremans, F., Schamp, N., Anteunis, M. J., 1981. 1', 2' -Dideacetylboronolide and α -pyrone from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* 20, 2753-2755.
- Van Puyvelde, L., Nyirankuliza, S., Panebianco, R., Boily, Y., Geizer, I., Sebikali, B., de Kimpe, N., Schamp, N., 1986. Active principles of *Tetradenia riparia*. I. Antimicrobial activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7 α ,18-diol. *Journal of Ethnopharmacology* 17, 269-275.
- Van Puyvelde, L., Lefebvre, R., Mugabo, P., de Kimpe, N., Schamp, N., 1987. Active principles of *Tetradenia riparia* II. Antispasmodic activity of 8 (14), 15- sandaracopimaradiene-7- α ,18-diol. *Planta Medica* 52, 156-158.
- Van Puyvelde, L., Ntawukiliyayo, J. D., Portaels, F., 1994. *In vitro* inhibition of mycobacteria by rwandese medicinal plants. *Phytotherapy Research* 8, 65-69.
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. F., Manfredini, V., Benfato, M. S., Kubota, L. T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. *Química Nova* 30, 1323-1338.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y. R., Zapata, E. S., Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 13-19.
- Vlietinck, A. J., van Hoof L., Totté, J., Lasure, A., vanden Berghe, D., Rwangabo, P. C., 1995. Mvukiyumwami, J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties, *Journal of Ethnopharmacology* 46, 31-47.
- Vongsak, B., Mangmool, S., Gritsanatna, W., 2015. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract. *Planta Medica* 81, 1084-1089.

Wasswa, P., Olila, D., 2006. The *in-vitro* ascaricidal activity of selected indigenous medicinal plants used in ethno veterinary practices in Uganda. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 3, 94-103.

Wei, Y.; Xie, Q.; Fischer, D.; Sutherland, I. A., 2011. Separation of patuletin-3-O-glucoside, astragalin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by elution-pump-out high-performance counter-current chromatography. Journal of Chromatography 36, 6206-6211.

Wen, L., Wu, D., Jiang, Y., Prasad, K. N., Lin, S., Jiang, G., He, J., Zhao, M., Luo, W., Yang, B., 2014. Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. Journal of Functional Foods 6, 555-563.

Zampini, I. C., ISLA, M. I., Schmeda-Hirschmann, G., 2009. Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins. Journal of the Chilean Chemical Society 54, 477-481.

Zelnik, R., Rabenhorst, E., Matida, A. K., Gottlieb, H. E., Lavie, D., Panizza, S., 1978. Ibozol, a new diterpenoid from *Iboza riparia*. Phytochemistry 17, 1795 - 1797.

Zhao, L-M., Liang, X-T, Li, L-M., 1997. Two minor phenolic glycosides from *Salvia cavaleriei*. Journal Chinese Pharmaceutical Sciences 6, 111-112.

ANEXOS

1. Espectros de RMN da FR-IX.

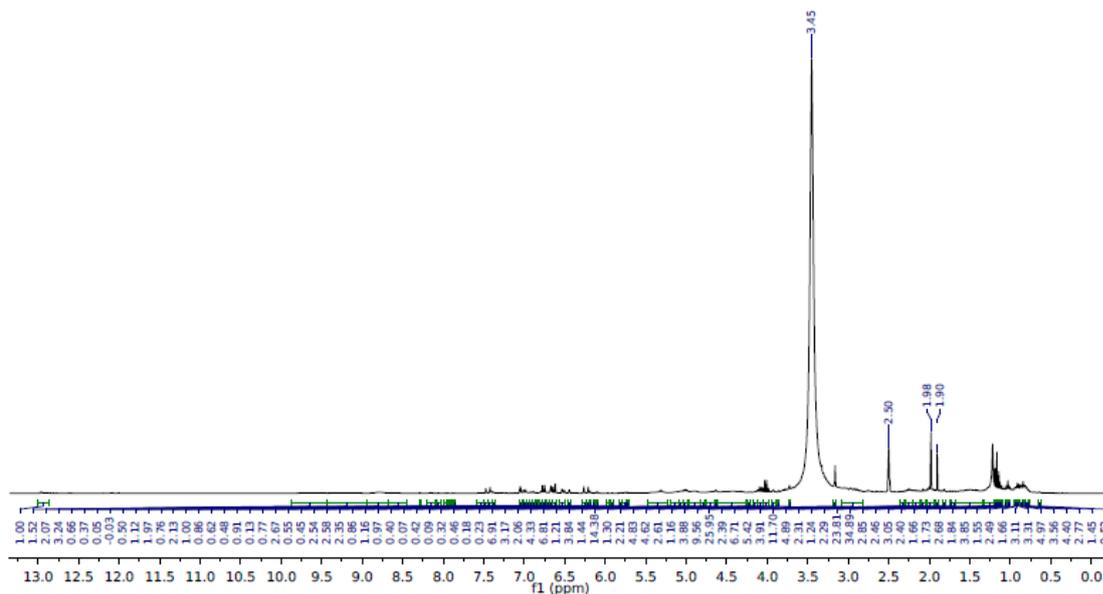


Fig. 1. Espectro de RMN ^1H da fração IX em DMSO $-d_6$, 300 MHz.

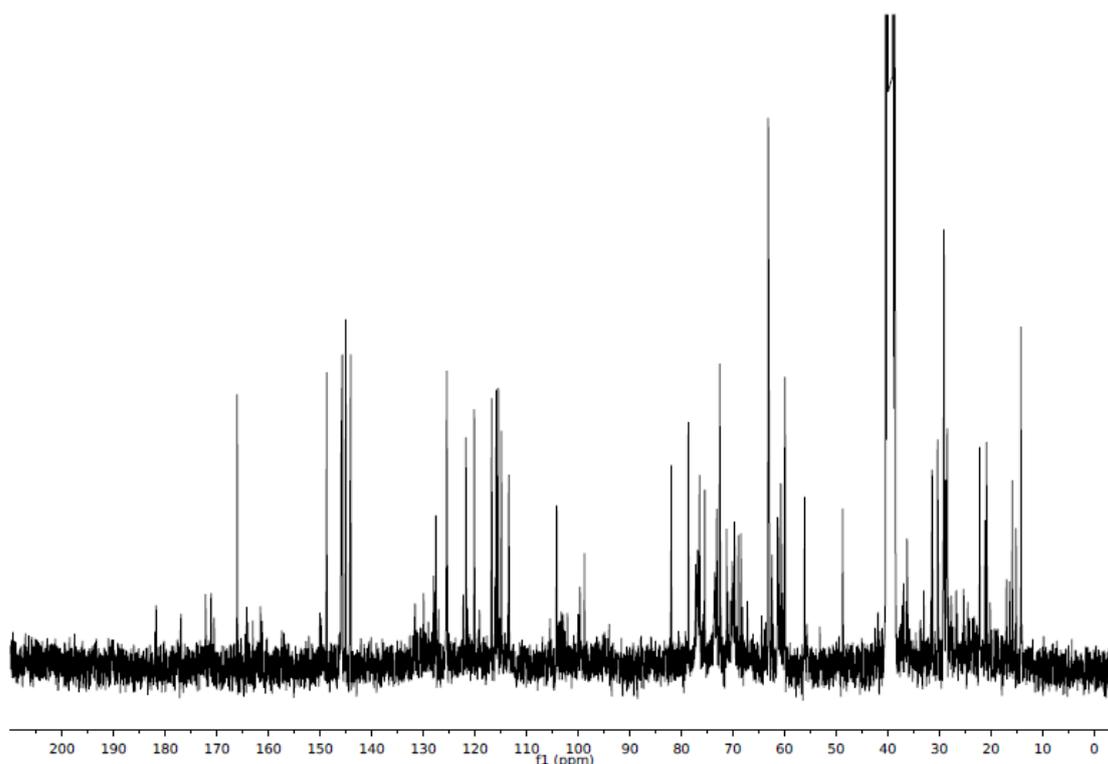


Fig. 2. Espectro de RMN ^{13}C da fração IX em DMSO $-d_6$, 75,46 MHz.

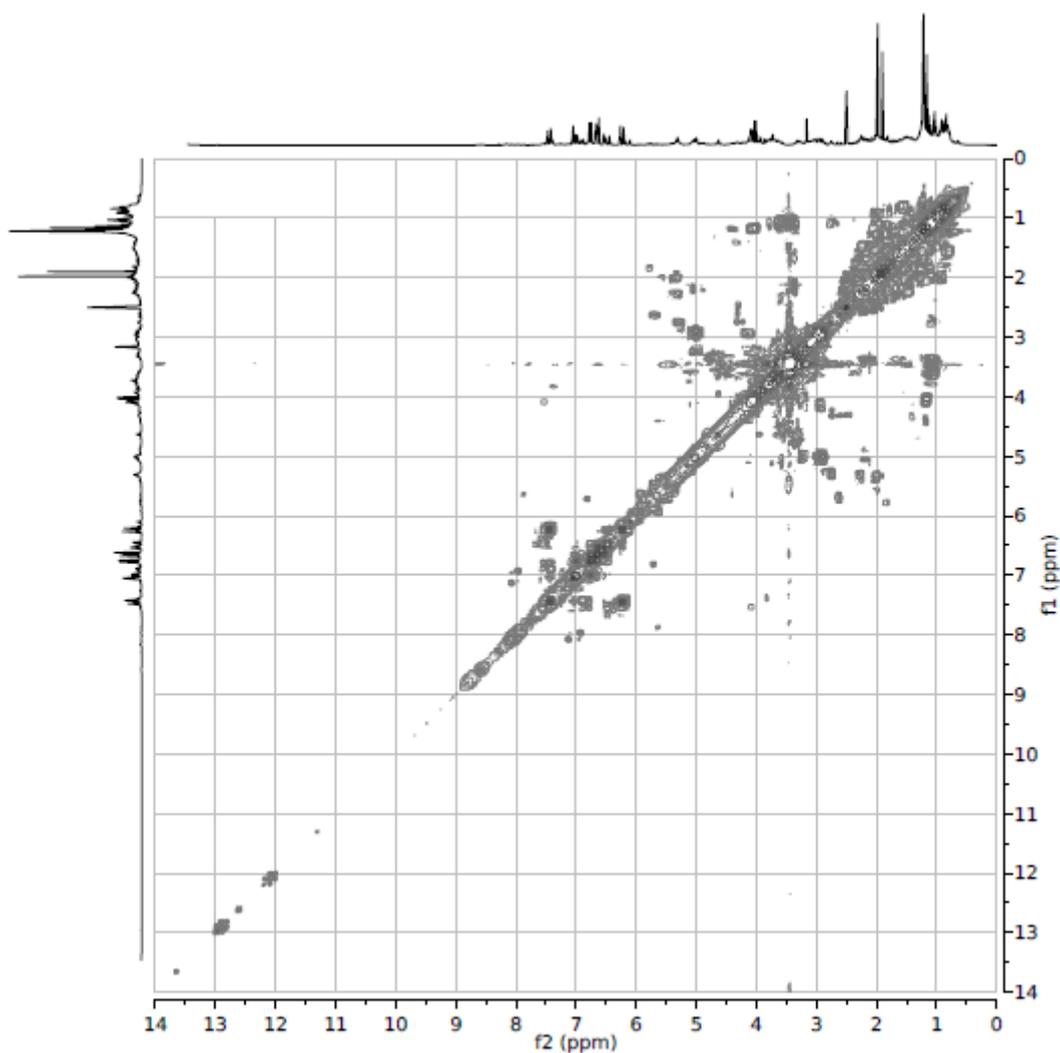


Fig. 3. Espectro de RMN COSY ^1H - ^1H da fração IX em DMSO -d₆, 300 MHz.

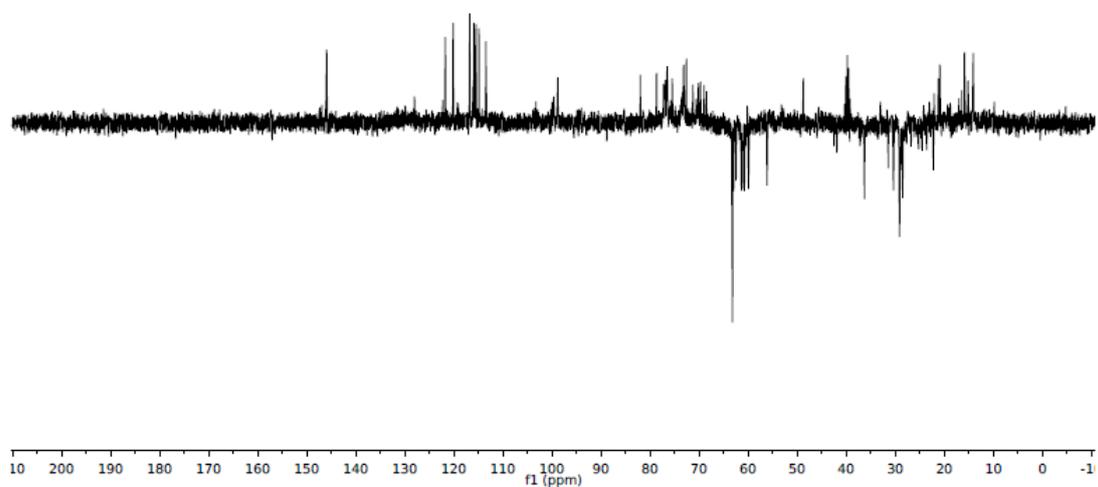


Fig. 4. Espectro de RMN DEPT 135° da fração IX em DMSO -d₆, 75,46 MHz.

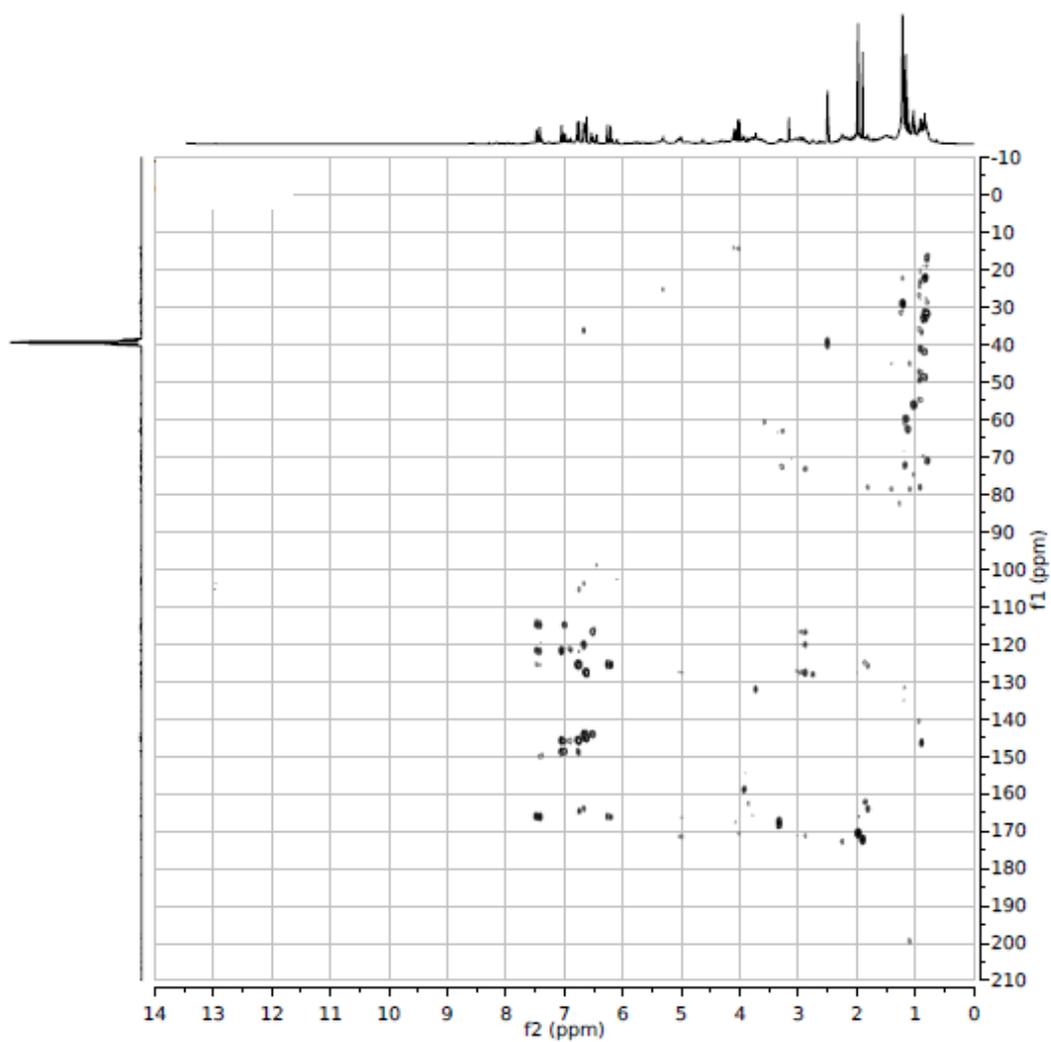


Fig. 5. Espectro de RMN HMBC da fração IX em DMSO -d₆, 300 e 75,46 MHz.

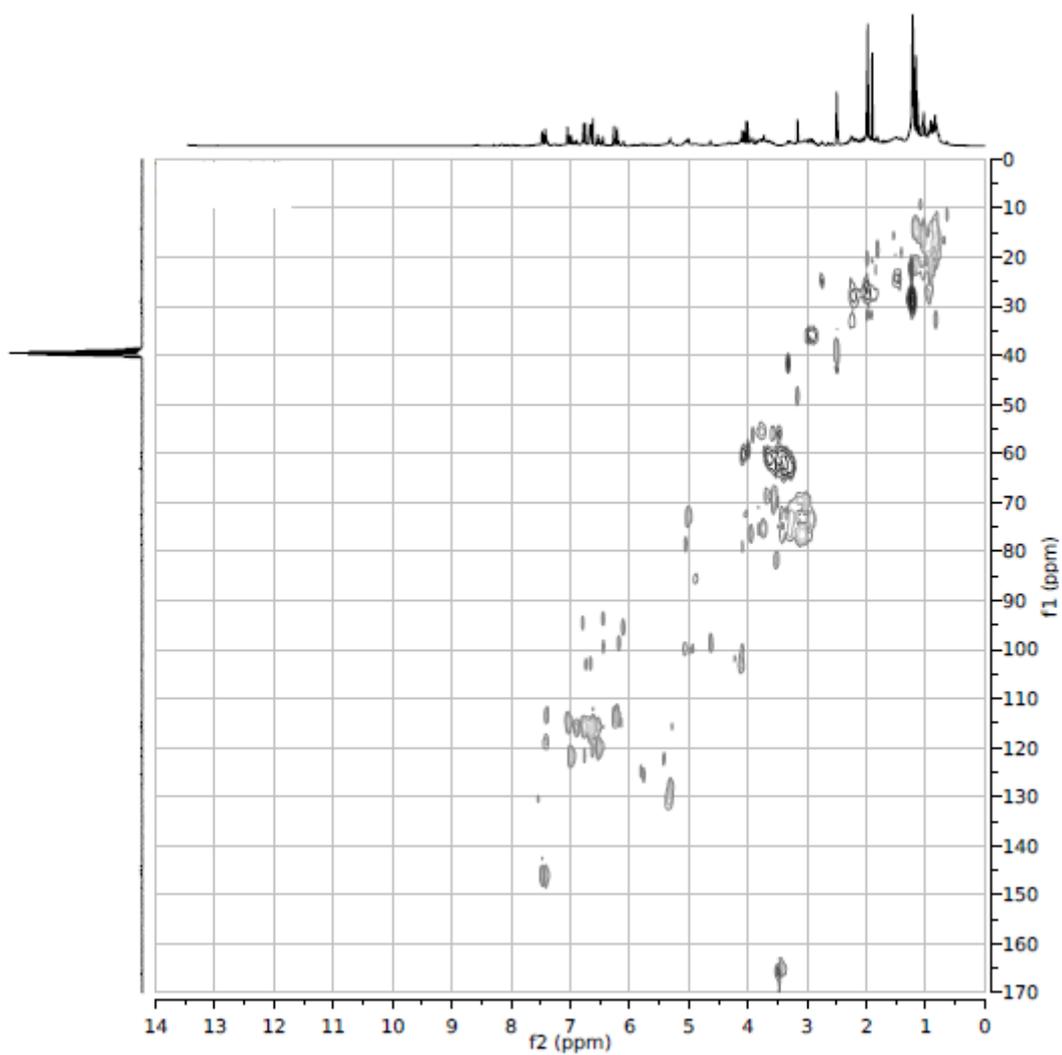


Fig. 6. Espectro de RMN HSQC da fração IX em DMSO -d₆, 300 e 75,46 MHz.

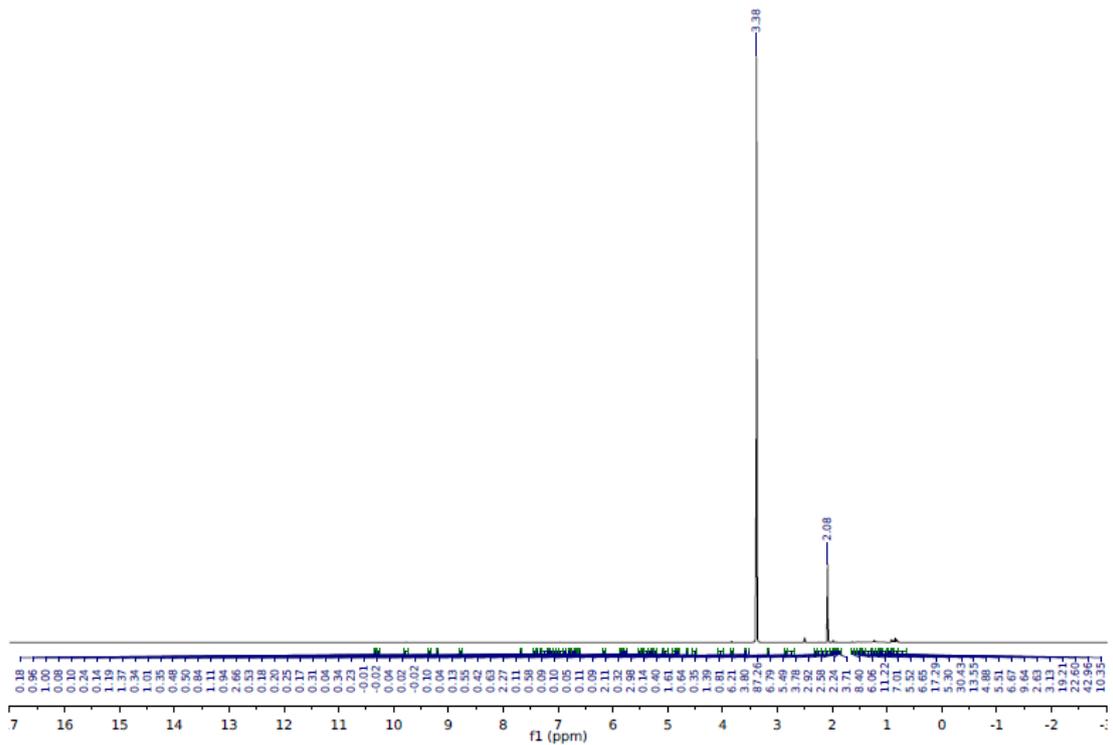


Fig. 7. Espectro de RMN ^1H da fração II em DMSO $-d_6$, 300 MHz.

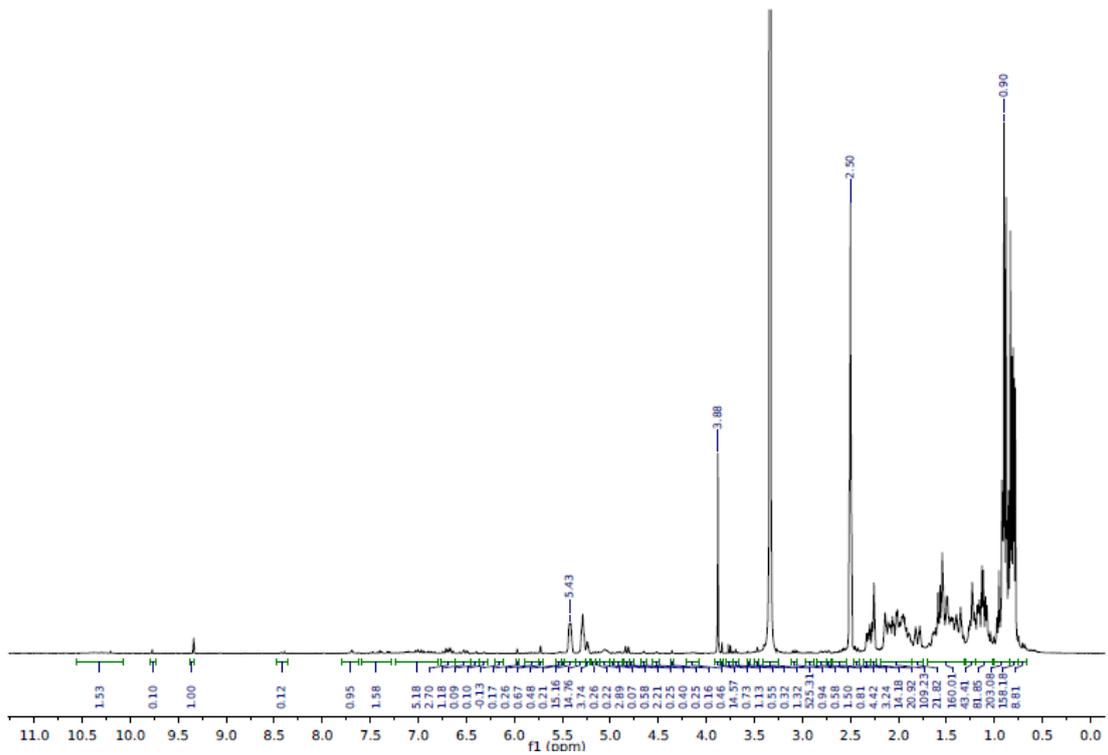


Fig. 8. Espectro de RMN ^1H da fração III em DMSO $-d_6$, 300 MHz.

2. Normas da Revista

The Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews, and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

1. General rules

1.1 All submitted manuscripts must be unpublished. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The Journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication; in the case of several authors, each of them should have consented to the corresponding author.

1.2 The Revista Brasileira de Farmacognosia accepts for publication original scientific work, reviews, and communication articles written only in English. The content of the text is of entire responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.

1.3 Manuscripts written by authors whose mother language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista/englishassistance.html>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1.4 The Revista Brasileira de Farmacognosia reserves the right to submit all received manuscripts to ad hoc referees, whose names will be kept confidential, and will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may send back manuscripts to Editor-in-Chief, or to Section Editors, for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations, which are to be made in order to conform to the standards and editorial rules of the Journal.

1.5 All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.

1.6 All plant, microorganism, marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material, and the location of the voucher specimen.

1.7 Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.

1.8 It is desirable manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity exploring mechanisms of action or synergism.

1.9 The journal will not accept responsibility for research works which do not comply with the author's country of residence legislation.

1.10 We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, in vitro or in vivo tests using animals.

1.11 The following immediate rejection criteria apply:

the manuscript does not fall into the areas of interest of the Journal;

manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);

the manuscript results are preliminary;

manuscripts reporting activity data without comparison to a reference, or without a positive control, or no proper controls, and not based on adequate statistics;

the biological source (e.g. plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated, and documented;

experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;

experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/mL}$) for antimicrobial activity ($\geq 250 \mu\text{g/mL}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ for pure compounds), and without proper identification of culture collections/strain designation codes;

experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without proper statistical analysis; without oil yield (%) and characterization and components quantification not performed using GC-MS-FID and the analysis of the retention indexes of the components not calculated using n-alkane homologous series together with analysis some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds.

Too preliminary data using in-vitro assays will not be acceptable, when i) no information on the type of activity is given; ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); iv) lack of proper controls (solvents; positive or negative substances according to the study); v) no IC₅₀ values whenever it is the case.

manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;

use solely the brine shrimp assay (*Artemiasalina*) to access toxicity of extracts;

isolation and bioassay of well known compounds with tiny or no relation to the activity or to the plant medicinal use without clear justification;

manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.

2. Rules for the elaboration of contributions

2.1 The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript, in the event the loss or damage to the original sent to the journal.

2.2 The figures (photographs, charts, drawings etc) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numbers. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations, and located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript.

When figures are from another font, a formal authorization is required.

2.3 Tables should be presented after the References and numbered consecutively using Arabic numbers. Tables (numeric data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations, and located above table. There should be an indication of the

approximate position in the text where tables should be placed, preferentially, just after their citation in the body of the manuscript.

2.4 The captions of botanical illustrations (anatomical description abbreviations) should be in accordance with the rules adopted by the Journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosia.org.br.

3. Text formatting and contents of the work

3.1 Original papers: Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables, Structural Formulas. Results and Discussion sections may appear as a combined “Results and Discussion” section. The normal length of the main text of an Original Paper, excluding references, tables, figures and figure legends, is about 3,000 words. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the cover letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2 Short communications: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical fonts, or complementary results of an ongoing work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References up to 20 citations, Figures and/or Tables up to 3. Authors should limit the text and not exceed 2,000 words.

3.3 Reviews will generally be invited by the Editor-in-Chief, and will only be considered those with more than one hundred references. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter, and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be as concise as possible and not include experimental details.

3.4. In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample cover letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

3.5 The originals should be on A4 size paper, double spaced using Times New Roman size 12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

3.6 Title and subtitle: They should be in lower case, using Times New Roman size 14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the Journal.

3.7 Authors: The authors' names should appear centered underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

3.8 Authors' affiliation: After each author name there should be superscript Arabic numbers indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone, and fax number of the main author should appear after references. The Journal will not publish commercial e-mail address.

3.9 Abstract: A brief and concise abstract with 200 or less words highlighting the most important information, including the methodology, results, and conclusions that allow readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding the reading of the full work.

3.10 Keywords: Very important for data base searches, thus validating the article, the authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

3.11 Introduction: The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published, and are available.

3.12 Materials and methods: The description of the Material and the Methods used should be brief, and clear enough to make possible the comprehension and the reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>; www.theplantlist.org/ or www.tropicos.org.

3.13 Results: The Results should be presented with a minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by adequate tables and figures. The data, when pertinent, should be submitted to statistical analysis.

3.14 Discussion: The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based on them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion could be presented in one section.

3.15 Acknowledgements: This is an optional item. Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to the article.

3.16 Authors' contributions: The role of each author for the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, referred to by their initials. Please see template for example.

4. References

The formatting of the references should be standardized to conform to the requirements of the journal as outlined. Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide.

4.1 References inside the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999) or (Silva and Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, e.g. (Silva, 1999, p. 24).

4.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

4.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>). In the case of an authorized abbreviation of a certain periodical can not be located and it is not obvious, the title should be cited complete (e.g.):

Kumar, D., Bhujbal, S.S., Deoda, R.S., Mudgade, S.C., 2010. In-vitro and in-vivo antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. J. Sci. Res. 2, 196-202.

In case the cited journal can not be easily accessible, it is recommended to present its Chemical Abstract Number, as follows:

Qu, W., Li, J., Wang, M., 1991. Chemical studies on *Helicteresisora* L. *ZhongguoYaokeDaxueXuebao* 22, 203-206, apud Chemical Abstracts 116, 124855r.

In a citation the sources should be shown in italics:

Wax, E.T., 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J. Braz. Biol. Res.* 41, 77-82, apud *Nat. Prod. Abs.* 23, 588-593, 1978.

4.2.2 Book:

Costa, A.F., 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter:

ElSohly, M.A., Stanford, D.S., Murphy, T.P., 2007. Compounds properties and drug quality. In ElSohly, M.A. (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

4.2.4 Thesis or dissertation materials:

Singab, A.N.B.I., 1996. *Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants*. Tokyo, 173 p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy.

Romero, M.A.V., 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Scientific meetings:

Oliveira, R.M.M.W., Lolli, L.F., Santos, C.A.M., 2006. Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. 19th ECNP Congress. Paris, France.

4.2.6 Patents: Should be identified as indicated below; whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be informed.

Ichikawa, M., Ogura, M., Lijima, T., 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoepinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396*, apud Chemical Abstracts 105, 178423q.

4.2.7 Internet pages:

Taylor, L., 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.raintree.com/plantdrugs.htm>, accessed Oct 2009.

5. Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m meter; cm centimeter; mm millimeter; μ m micrometer; nm nanometer; kg kilogram; g gram; mg milligram; μ g microgram; ng nanogram; ml milliliter; μ l microliter; s seconds; min minutes; h hours; N normal; M molar; mM millimolar; μ M micromolar; SD standard deviation; SE standard error; X mean; Ci Curie; mp melting point; bp boiling point; TLC thin-layer chromatography; GC gas chromatography; NMR nuclear magnetic resonance; MS mass spectrometry; UV ultraviolet; CD circular dichroism; and IR infrared; g instead rpm; ppm parts per million; cpm counts per minute; dpm disintegrations per minute; Hz hertz; LD₅₀ medial lethal dose; LC₅₀ medial lethal concentration; TLV threshold limit value. When using a word that is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ®.

6. Illustration

6.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

6.2 Remove all color from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in color (see Costs section for details).

6.3 Chemical structures should be drawn according to the ACS (American Chemical Society) style. Structure drawing preferences can be found as preset style in appropriate softwares.

6.4 Upload each figure in either .tiff .jpg or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please, include this in the figure legend.

6.5 The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

7. Submission of manuscripts

7.1 Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

7.2 Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfar-scielo>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by e-mail will not be accepted.

7.3 Important: All authors, with their respective e-mail addresses, should be entered into the system.

7.4 The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

8. Processing fee

8.1. The journal charges nominal publication fee for articles upon acceptance to cover production cost.

8.2 The charge is US\$ 200.00/paper when the corresponding author is a member of the Brazilian Society of Pharmacognosy and US\$ 300.00/paper for nonmembers. Articles with high scientific relevance will have reduced fee.

8.3 A limited number of waivers for article-processing charges are also available at the editors' discretion, and authors wishing to apply for these waivers should contact the editors.

8.4 Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; decisions to publish are only based on editorial criteria.

9. Proofs and reprints

9.1. Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences, or additions, is not permitted at the page proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within five days of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

9.2 The journal does not provide reprints to corresponding authors.

9.3 Before publication, the articles will be available ahead of print on the Scielo Portal.

For further information, please contact:

Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia,
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - JdBotânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br