



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Ochna serrulata* MONITORADO POR BIOENSAIOS SIMPLES

Mariana Andrade da Silva

Prof(a) Dr(a). Inês Maria Costa Brighente
Orientadora

Florianópolis, novembro de 2008.

MARIANA ANDRADE DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Ochna serrulata* MONITORADO POR BIOENSAIOS SIMPLES

Relatório da disciplina QMC 5510
apresentado ao curso de Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Bacharel em Química.

Mariana Andrade da Silva

Prof(a) Dr(a). Inês Maria Costa Brighente

Florianópolis, novembro de 2008.

MARIANA ANDRADE DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Ochna serrulata* MONITORADO POR BIOENSAIOS SIMPLES

Relatório da disciplina QMC 5510
aprovado pela banca examinadora
para obtenção do Grau de Bacharel
em Química pelo curso de Química
da Universidade Federal de Santa
Catarina.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a) Dr(a) Inês Maria Costa Brighente
Orientadora

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes

Florianópolis, novembro de 2008.

*“A beleza e a vitalidade são presentes da natureza
para aqueles que vivem segundo suas leis”.*

Leonardo da Vinci

*In Memoriam de meu pai,
Valdenir Joaquim da Silva*

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho não teria ter sido realizado sem a colaboração de um grande número de pessoas, das quais gostaria de agradecer:

A Deus em primeiro lugar, por toda proteção;

Ao meu pai pelo incondicional apoio e orientação, e à minha mãe pelo exemplo, perspicácia e estímulo ao crescimento profissional. Aos meus irmãos e ao meu padrasto pelos momentos de descontração;

A minha avó, Lourdes pela incondicional paciência, amizade e horas de orações. Aos meus avós Nina e Vico pelas palavras de conforto durante toda minha trajetória no curso de Química;

A todos meus familiares, em especial aos meus tios Paulo e Antônio pelos problemas computacionais solucionados;

Ao Marcelo, meu noivo, pela alegria, otimismo e momentos de ternura;

A professora Dra. Maria Inês Costa Brighente pela orientação e oportunidade que me proporcionaram um enorme amadurecimento pessoal e profissional; Ao professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti por sua inestimável colaboração.

A todos os meus colegas do LQPN pela cooperação, amizade, discussões construtivas e pelo ótimo ambiente de trabalho;

Ao professor Dr. Daniel Barcellos Falkenberg, do departamento de Botânica da UFSC, pela identificação de *Ochna serrulata*. Ao professor Dr. Eduardo Dalmarco da FURB pelas atividades antibacterianas testadas neste trabalho;

A professora Dilma Maria Marconi por minha iniciação à pesquisa científica, e aos meus colegas do projeto QUIMIDEX;

A todos os meus colegas do curso de Química, especialmente as “*glamorous*”: Ana Paula, Fernanda Rios, Fernanda Zeferino, Gabriela, Graziela, Karla, Marli, Patrícia e Raquel pela amizade;

A todos os professores do departamento pelos ensinamentos transmitidos e que tanto contribuíram para a minha formação profissional;

A todos os funcionários e colaboradores, em especial as bibliotecárias do CFM, que com sua presença, embora silenciosa, ajudaram a construir mais esta realidade;

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Família Ochnaceae.....	3
2.1.1 Gênero <i>Ochna</i>	3
2.1.2 <i>Ochna serrulata</i>	4
2.2 Atividade biológica no Gênero <i>Ochna</i>	5
2.3 Estudos fitoquímicos no Gênero <i>Ochna</i>	6
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivos Gerais.....	8
3.2 Objetivos Específicos.....	8
4. METODOLOGIA	9
4.1 Materiais.....	9
4.1.1 Equipamentos.....	9
4.1.2 Reagentes.....	9
4.2 Métodos.....	10
4.2.1 Coleta e identificação da planta.....	10

4.2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto	10
4.2.3 Particionamento do extrato bruto.....	10
4.2.4. Ensaio Antioxidantes	13
4.2.5 Ensaio Biológicos.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1.1 Análise de composto 1	20
5.1.2 Análise de composto 2	21
5.2. Atividade Antioxidante	22
5.3. Atividade de Toxicidade frente à Artemia salina.....	26
5.4. Atividade Alelopática	27
5.5. Atividade Antibacteriana	30
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8. ANEXOS	37

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

AcOEt	Acetato de Etila
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
DL₅₀	Dose letal para causar óbito em 50% dos microcrustáceos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EB	Extrato bruto
EBH	Extrato bruto hidroalcolico
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
EtOH	Etanol
FAe	Fração acetato de etila
FAq	Fração aquosa
FBu	Fração n-butanólica
FHe	Fração hexânica
G_n	Número de plântulas normais
Hex	Hexano
IC₅₀	Concentração inibitória para causar 50% de atividade antioxidante
IC₉₅	Intervalo de confiança de 95%

IGV	Índice de velocidade de germinação
IV	Espectroscopia no Infravermelho
MeOH	Metanol
N_n	Número de dias após a semeadura
ppm	Partes por milhão
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Tween 80	Polioxietilenosorbitano Monoleato
UV-Vis	Ultravioleta-Vísivel
δ	Deslocamento químico

Índice de Figuras

Figura 1 – Detalhes botânicos de <i>Ochna serrulata</i>	5
Figura 2 - Compostos isolados a partir de espécies do gênero <i>Ochna</i>	7
Figura 3 - Particionamento do extrato bruto das folhas de <i>Ochna serrulata</i>	11
Figura 4 - Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila de <i>O. serrulata</i>	12
Figura 5 - Curva de calibração para determinação do conteúdo de fenólicos. 13	
Figura 6 - Curva de calibração para determinação do conteúdo de flavonóides.	14
Figura 7 - Obtenção de IC ₅₀ para a fração acetato de etila de <i>O. serrulata</i>	15
Figura 8 - Curva de calibração para determinação do poder redutor.	16
Figura 9 – Obtenção da DL ₅₀ para a fração acetato de etila de <i>O. serrulata</i>	17
Figura 10 – Estruturas químicas flavonóidicas básicas encontradas no gênero <i>Ochna</i>	22
Figura 11 – Reação de óxido-redução para determinação de compostos fenólicos.....	23
Figura 12 - Formação do anel estável de seis membros do Al ³⁺ com o flavonóide.	23
Figura 13 – Ação seqüestrante do DPPH sobre um composto fenólico.	25
Figura 14 – Reação de óxido-redução para determinação do poder redutor... 26	

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides e ensaios antioxidantes aplicados aos extratos vegetais de <i>Ochna serrulata</i> .	24
Tabela 2 - Letalidade frente à <i>Artemia salina</i> dos extratos e frações de <i>O. serrulata</i>	27
Tabela 3 - Aplicação do teste alelopático aos extratos brutos da <i>Ochna serrulata</i>	29
Tabela 4 - Atividade antibacteriana (CIM) para os extratos brutos e frações de <i>Ochna serrulata</i> .	30

RESUMO

Ochna serrulata (Ochnaceae), planta ornamental introduzida no Brasil, é conhecida popularmente como Mickey Mouse bush, devido seus frutos serem pretos e suas flores vermelhas, lembrando Mickey Mouse. As tribos sul-africanas usam as raízes deste arbusto na forma de decocção para o tratamento doenças ósseas e hemorróidas. Espécies do gênero *Ochna* são ricas em compostos fenólicos, principalmente os flavonóides. Neste trabalho desenvolveu-se o estudo fitoquímico de *Ochna serrulata*, monitorado por bioensaios para avaliação das atividades antioxidantes, tóxica, alelopática e antibacteriana.

Foram preparados os extratos brutos das folhas e caules, separadamente, sendo o extrato bruto das folhas particionado com solventes de polaridade crescente, originando as frações hexânica, acetato de etila e n-butanólica. A partir do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila obteve-se dois compostos, provavelmente flavonóides glicosídicos, porém as análises espectroscópicas foram insuficientes para a completa elucidação estrutural destes compostos. A atividade antioxidante avaliada através da ação seqüestrante de radical livre e do poder redutor mostrou uma significativa atividade para as frações acetato de etila e butanólica das folhas de *O. serrulata*, que pode ser justificada pela maior concentração de substâncias fenólicas nestas frações, entre elas os flavonóides, conhecidos por sua eficiente atividade antioxidante. O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* mostrou que o extrato bruto das folhas e caules, e as frações hexânica e acetato de etila apresentaram atividade, com destaque para esta última fração. Os extratos brutos das folhas e caules de *O. serrulata* foram testados segundo a atividade alelopática. Este bioensaio avalia a germinação de sementes de alface (*L. sativa*) e posterior desenvolvimento da plântula. Estes extratos foram eficientes em inibir não só a germinação das sementes, como também afetou o desenvolvimento das plântulas. Isto indica que nestes extratos há compostos com potencial ação herbicida. Os extratos brutos e frações foram avaliados através da atividade antibacteriana. As frações hexânica e acetato de etila

foram as mais ativas frente a *P. aeruginosa*, um bacilo gram-negativo, com valores de concentração inibitória mínima em torno de 0,7 mg/mL.

Deste modo verifica-se a importância da continuidade dos estudos fitoquímicos e biológicos de *Ochna serrulata*, porque esta espécie se mostra promissora no isolamento de flavonóides, bem como valida seu uso popular contra doenças inflamatórias.

Palavras-chaves: *Ochna serrulata*, antioxidantes, alelopatia, antibacteriana, *Artemia salina*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais era conhecido e praticado pelas antigas civilizações. O hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais é uma das primeiras manifestações do esforço do homem para compreender e utilizar a natureza.

A *Ochna serrulata* é uma planta nativa de regiões tropicais da África e da Ásia introduzida no Brasil como planta ornamental. Dois aspectos motivaram seu estudo: o primeiro deve-se ao fato desta espécie apresentar poucos relatos na literatura, seja sob o aspecto fitoquímico, seja sob o aspecto biológico; o segundo deve-se a facilidade da coleta da planta ao longo das quatro estações do ano, mantendo-se sempre viçosa.

A biodiversidade do reino vegetal se constitui num verdadeiro arsenal terapêutico. As plantas ornamentais aparecem neste contexto, contribuindo para a descoberta de novos fármacos, como foi o caso da papoula (*Papaver somniferum*), de onde foi isolada a morfina, utilizada como anestésico e analgésico; da dedaleira (*Digitalis purpurea*), de onde foram isolados glicosídeos cardiotônicos, usados como reguladores da frequência cardíaca; da beladona (*Atropa belladonna*), de onde foram isolados alcalóides atropínicos, que atuam nos problemas oculares e de hipertensão; da maria-sem-vergonha (*Catharanthus roseus*), de onde foram isolados alcalóides bis-indólicos, que atuam como coadjuvantes no tratamento da leucemia.

A análise fitoquímica realizada juntamente com o biomonitoramento de extratos vegetais se mostra viável e extremamente importante na busca de princípios ativos nas plantas. Estes podem se tornar protótipos para a síntese de fármacos em laboratório de forma mais eficiente, o que diminui o impacto ambiental, preserva a flora local, e promove o desenvolvimento da indústria química e farmacêutica. Contudo, os laboratórios de fitoquímica normalmente não estão preparados para a realização de ensaios biológicos mais elaborados. Deste modo, o biomonitoramento de plantas torna-se eficaz se o ensaio empregado for rápido, barato, reprodutível e viável em um laboratório de química. Enfim, os estudos de biomonitoramento de extratos vegetais com

testes biológicos mais simples podem proporcionar um direcionamento nas pesquisas e resultados mais imediatos.

Neste trabalho foi desenvolvido o estudo fitoquímico e biológico de *Ochna serrulata*. Para o monitoramento biológico dos extratos e frações vegetais foram usados testes para detectar atividade antioxidante, teste de toxicidade frente à *Artemia salina*, que está relacionada com a atividade tóxica celular, teste alelopático, aplicado na busca de compostos com potencial atividade herbicida e o teste antibacteriano.

Deste modo, o particionamento do extrato bruto de *Ochna serrulata* monitorados pelos ensaios biológicos, bem como o isolamento e caracterização de seus compostos, tornam-se importantes na busca de compostos com potencial atividade farmacológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

São poucos os relatos na literatura sobre *Ochna serrulata*. Os estudos envolvendo espécies do gênero *Ochna* são escassos, entretanto os estudos fitoquímicos existentes mostram-se bastante promissores quanto ao isolamento de flavonóides¹. O único estudo fitoquímico realizado sobre *Ochna serrulata* confirma a presença de feofitinas, a partir do extrato das folhas particionado com acetato de etila².

2.1. Família Ochnaceae

A família Ochnaceae compreende 30 gêneros e aproximadamente cerca de 400 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. No Brasil ocorrem 11 gêneros e cerca de 120 espécies, sendo plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas que possuem interesse econômico restrito a algumas poucas espécies ornamentais, como *Ochna serrulata*³. Como exemplos dos gêneros desta família encontrados no Brasil, podemos citar o gênero *Ochna* que é comumente encontrado em jardins; nos campos cerrados é observada a presença do gênero *Ouratea* com flores amarelas; enquanto que nos brejos ácidos da região da Serra do Mar é freqüente uma erva de flores branco-rosadas do gênero *Sauvagesia*⁴.

2.1.1 Gênero *Ochna*

O gênero *Ochna*, introduzido no Brasil, possui o maior número de espécies, cerca de 86 espécies, ocorrendo principalmente no sul da África, Madagascar e Ásia. Há aproximadamente 12 espécies do gênero *Ochna* no sul da África que incluem árvores e arbustos⁵, dentre elas destaca-se a espécie *Ochna serrulata*, espécie investigada neste estudo. Inúmeras espécies do gênero *Ochna* são utilizadas na medicina popular, por exemplo, *Ochna afzelii* é usada no tratamento de icterícia, cólicas menstruais, dores nas costas, disenteria e dor de dente⁶. O caule de *Ochna lanceolata* é usado no tratamento

de complicações gástricas, cólicas menstruais e pode ser abortivo⁷. As folhas de *Ochna squarrosa* são usadas no tratamento de constipações, úlceras e câncer; As raízes são usadas no tratamento de cólicas menstruais e asma⁸. Na Tailândia o caule de *Ochna integerrima* é usado como tônico digestivo, enquanto na Indonésia a infusão das raízes e folhas possui ação antipirética e antidesintérica⁹.

2.1.2 *Ochna serrulata*

A *Ochna serrulata* é natural da África tropical, possui folhagem brilhosa composta de ramos curtos e laterais, flores amarelas com perfume suave e de pouca durabilidade que surgem nas extremidades dos ramos. Quando as flores são fecundadas por insetos seus cálices verdes tornam-se vermelhos e no centro incham até formar uma bola de onde nascem de 3 a 10 pequenos frutos de cor negra, contendo uma semente cada um, com os quais atraem pássaros frutívoros (sabiás, bem-te-vis, tesouras, sanhaços, saíras, etc.). Os frutos da planta são pretos e as flores vermelhas separam-se de uma forma que lembram a cara de Mickey Mouse, daí o nome comum *Mickey Mouse bush*¹⁰.

O nome *Ochna* vem de *Ochne*, antigo nome grego dado para pêra selvagem, porque as folhas se assemelham aos da pêra selvagem. O nome específico *serrulata* refere-se à forma serrilhada nas margens das folhas.

A *Ochna serrulata* é um pequeno arbusto de 1 a 2 m de altura, mas ocasionalmente pode crescer até 6 m, contudo é referida como uma árvore de pequeno porte. Tem um caule delgado com a casca marrom. As folhas são elípticas, 13-50 mm, mas ocasionalmente estreitas com pontas arredondadas e base arredondada. Suas margens são dentadas com folhas eretas e pontiagudas. A folhagem jovem é de coloração rosa-bronze e quando maduras de coloração verde-brilhante. Na Figura 1 podem ser observados alguns detalhes botânicos desta planta.

As tribos sul-africanas usam as raízes de *Ochna serrulata* na forma de decocção para tratamento doenças ósseas e hemorróidas¹¹.



Figura 1 – Detalhes botânicos de *Ochna serrulata*.

2.1.1.1 Classificação Taxonômica

<i>Ochna serrulata</i>	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malpighiales
Família	Ochnaceae
Gênero	<i>Ochna</i>
Espécie	<i>Ochna serrulata</i>

2.2 Atividade biológica no Gênero *Ochna*

São muitas as atividades biológicas estudadas em diferentes espécies de *Ochna*. A atividade analgésica e antiinflamatória foi observada no extrato metanólico das raízes de *Ochna squarrosa*¹². Foi observada a atividade anti-HIV na fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Ochna integerrima*¹³. Nos caules de *Ochna integerrima* observou-se uma excelente atividade antimalária¹⁴. A atividade citotóxica e antibacteriana foi observada no extrato etanólico dos caules de *Ochna macrocalyx*¹⁵.

2.3 Estudos fitoquímicos no Gênero *Ochna*

O estudo fitoquímico mostra que foram muitos os compostos isolados e caracterizados nas diferentes espécies do gênero *Ochna*. Estes metabólitos secundários pertencem essencialmente à classe dos flavonóides.

A partir do extrato metanólico do caule de *Ochna afzelii* foram encontrados três biflavonóides denominados de isolofirona C, diidrolofirona C e lofirona C¹⁶. No extrato metanólico das folhas da mesma espécie foram encontradas duas isoflavonas, 5,4'-dimetoxi-6,7-metilenodioxiiisoflavona (**1**) e 5-metoxi-4'-hidroxi-2''-dimetilpirano-(3'',4'',7,8)^{17a}, dois biflavonóides, afzelonas A e B, e cinco flavonóides já conhecidos denominados de calodenins A e B, afzelonaC, 4'',5-dimetoxi-6,7-metilenodioxiiisoflavona, 4'',5,7-trimetoxiiisoflavona, o glicosídeo lanceosídeo^{17b}, e um novo flavonóide, afzelone D^{17c}. No extrato metanólico do caule de *Ochna calodendron* foi encontrado primeiramente um biflavonóide denominado calodenone¹⁸ e posteriormente foram encontrados os biflavonóides, lofirona K e calodenins A e B¹⁹ e um pentaflavonóide, ochnachalcona (**2**)²⁰. No extrato diclorometano das folhas de *Ochna calodendron* foram isolados dois triflavonóides denominados de caloflavans A (**3**) e B²¹. Em *Ochna squarrosa* foram isolados do caule, furanoflavonas: 5-metoxifurano(2'',3'':7,8)flavona (**4**), 4'-hidroxi-3'-metoxifurano [4'',5'',6,7]-flavona e 3',4'-diidroxifurano[4'',5'',6,7]flavona²² e os biflavonóides já conhecidos, lofirona A (**5**) e lofirina H¹².

Das folhas de *Ochna integerrima* foram isolados dois biflavonóides denominados de 2'',3''-diidroochnaflavona e 2'',3''-diidroochnaflavona-7''-O- metil éter e um flavonóide glicosilado, 6- γ,γ -dimetilalifaxifolina-7-O- β -D-glucosídeo (**6**)¹³. Do caule foram isolados dois biflavonóides: 6'''-hidroxilofirona B e 6'''-hidroxilofirona B 4'''-O- β -glucosídeo²³. Dois biflavonóides foram isolados de *Ochna lanceolata* 7,4',7'',4'''-tetrametiliso-chamaejasmin e 2,3-diidroochnaflavona-7''-O-metiléter²⁴.

Em *Ochna Beddomei* foram encontrados os biflavonóides 7-O-metiltetraidroochnaflavona obtido a partir do extrato das folhas²⁵ e 2,3-

diidrochnaflavona-7,4',7''-tri-O-metiléter do extrato dos caules²⁶. A partir do extrato das folhas de *Ochna pumila* foram isolados os biflavonóides, tetraidroamentoflavona e 7''-O-metiltetraidroamentoflavona²⁷. Foram encontrados no extrato do caule de *Ochna macrocalyx* os biflavonóides, calodenin B e diidrocalodenin B, sendo dímeros da isoflavona deidroxihexaspermona C¹⁵.

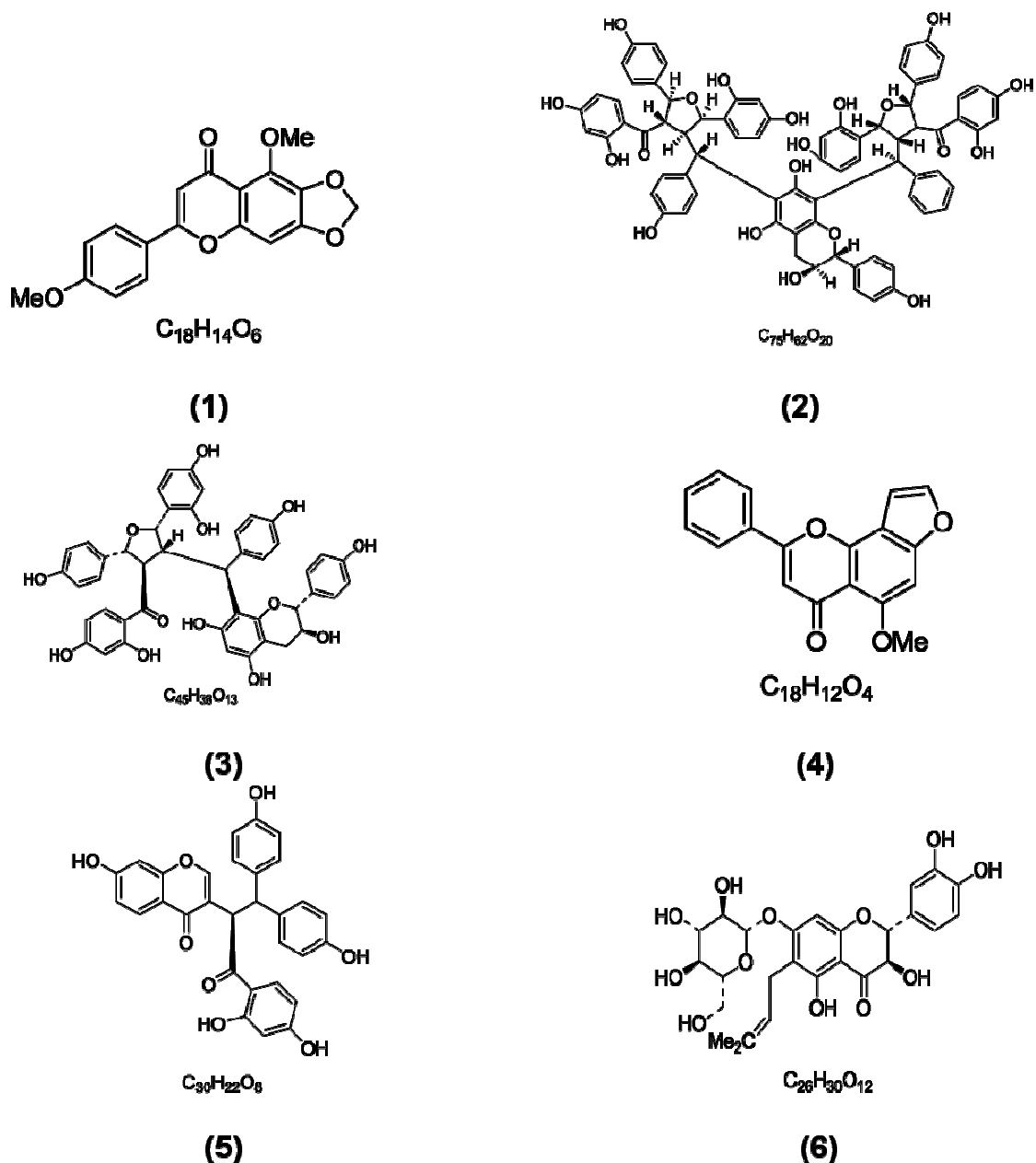


Figura 2 - Compostos isolados a partir de espécies do gênero *Ochna*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento do estudo fitoquímico de *Ochna serrulata*, monitorado por ensaios de bancada para avaliação das atividades antioxidantes, tóxica, alelopática e antibacteriana.

3.2 Objetivos Específicos

- i) Obtenção do extrato bruto das folhas e caule, separadamente, de *Ochna serrulata*, por maceração em etanol;
- ii) Particionamento do extrato bruto das folhas por diferentes solventes, a fim de obter frações em quantidades expressivas do extrato para posterior estudo fitoquímico e biológico;
- iii) Aplicação dos ensaios antioxidantes aos extratos brutos e frações;
- iv) Aplicação do bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* aos extratos brutos e frações, a fim de avaliar a atividade tóxica;
- v) Aplicação do bioensaio de germinação de sementes para avaliar a atividade alelopática aos extratos brutos das folhas e caules;
- vi) Aplicação do bioensaio antibacteriano para avaliar a concentração mínima inibitória dos extratos brutos ou frações frente a bactérias padrão;
- vii) Análise fitoquímica das frações mais ativas a partir das folhas de *Ochna serrulata*, para elucidação estrutural dos possíveis princípios ativos.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização deste projeto foram os mais diversos, tais como: estufa, rota-vapor, balança analítica, gabinete revelador cromatográfico, aparelho de ponto de fusão, centrífuga, lavadora ultra-sônica, espectrofotômetro UV-Vis e estufa com fotoperíodo. Os espectros de Infravermelho foram determinados em aparelho PERKIN ELMER – FT 16 PC. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelho Varian, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), utilizando tetrametilsilano como referencial interno. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singleto), d (duplete), t (tripleto) e m (multiplete).

4.1.2 Reagentes

Os solventes utilizados foram etanol, metanol, acetona, hexano, acetato de etila, n-butanol e ácido acético. Todos obtidos comercialmente. Utilizou-se sulfato de sódio anidro, como sal dessecante (Cromaline), sílica gel para colunas cromatográficas de granulometria 0,05:0,20 mm e sílica gel para coluna flash de granulometria 0,04:0,063 mm (Carlo Erba). Utilizou-se cromatoplasmas de alumínio cobertas com sílica gel 60 para cromatografia em camada delgada de 0,2 mm de espessura (Merk). Os reveladores utilizados foram vapores de iodo e soluções reagentes de anisaldeído sulfúrico 5% em metanol, cloreto férrico 5% em etanol. O Reagente de Folin-Ciocalteu, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e Tween 80 (polioxietilenosorbitano monoleato) foram obtidos pela Aldrich. Os demais reagentes utilizados eram de pureza

analítica e foram utilizados sem tratamento prévio. Os cistos de *Artemia salina* e o sal marinho foram adquiridos em lojas de aquário e as sementes de alface (*Lactuca sativa*), em lojas agropecuárias.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e identificação da planta

O material vegetal foi coletado no município de São José - SC, em novembro de 2007, sendo posteriormente identificado pelo professor Dr. Daniel Barcellos Falkenberg do departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.2.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto

Após a coleta, o material vegetal, foi seco em estufa, e em seguida as folhas e caules foram triturados separadamente. Obteve-se aproximadamente 386,0g de material vegetal, sendo que destes 224,2g eram referentes às folhas e 161,6g aos caules, no entanto houve perdas de massa durante a trituração das folhas, resultando em 161,8g de folhas ao final deste processo. Depois da trituração, as folhas e caules, foram extraídos separadamente por maceração em solução hidroalcoólica (álcool etílico de grau comercial) por sete dias. Posteriormente, o extrato bruto foi concentrado sob pressão reduzida (temperatura aproximada de 70°C) até secura, obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico. A maceração foi feita em triplicata. Foi obtida cerca de 57,92g do extrato bruto (EB) das folhas (35,80%) e 13,50g dos caules (8,30%).

4.2.3 Particionamento do extrato bruto

O extrato bruto das folhas foi suspenso em metanol e deixado em geladeira para decantar o material não solúvel. Este resíduo foi filtrado, sendo

denominado de resina (20,98%), e ao filtrado restante foi adicionado água destilada para posterior extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes. Foram obtidas assim, as respectivas frações: hexânica (FHe) 0,18%, acetato de etila (FAe) 27,25%, n-butanólica (FBu) 8,36% e aquosa (FAq). Todas as frações e a resina foram secas e conservadas em geladeira (Figura 3).

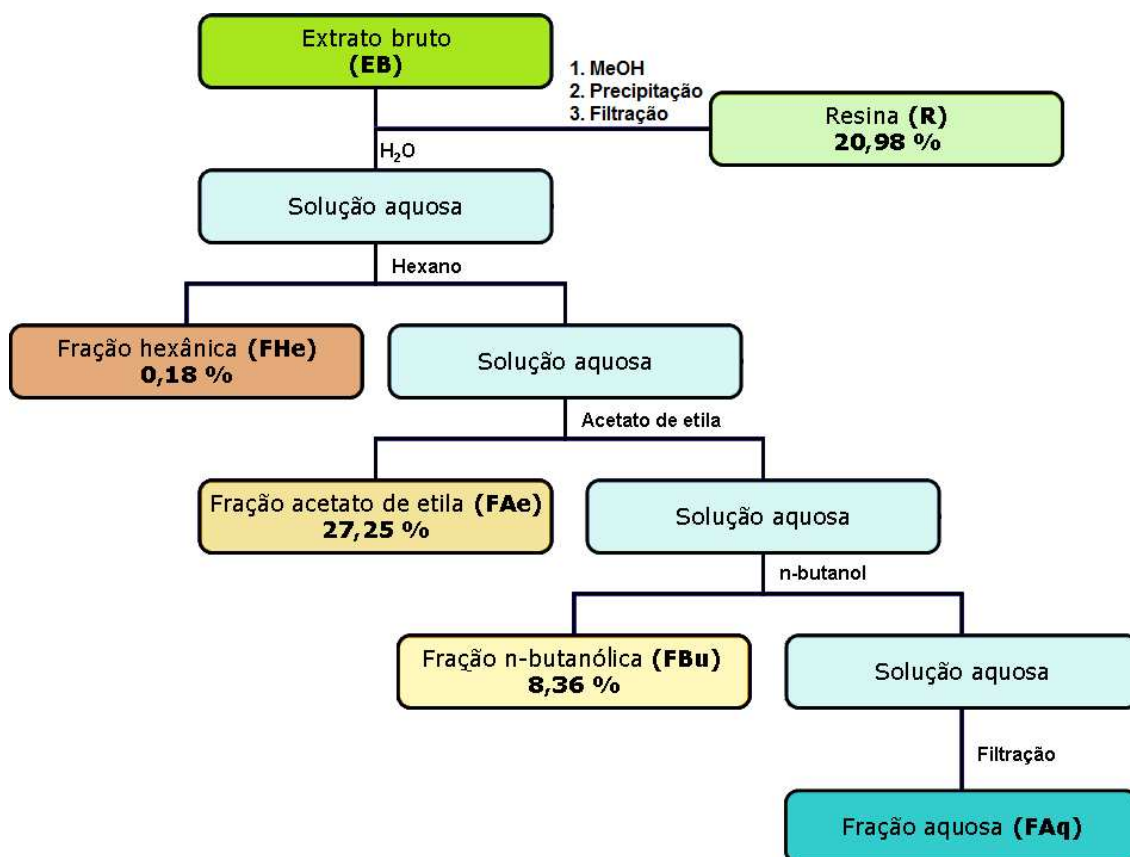


Figura 3 - Particionamento do extrato bruto das folhas de *Ochna serrulata*.

A Fração acetato de etila (FAe) (14,93 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (CC-1), utilizando como eluentes acetato de etila/hexano/ metanol com gradientes de polaridade crescente. Desta cromatografia foram obtidas 37 frações, sendo que as mesmas foram reunidas de acordo com o perfil visualizado na cromatografia em camada delgada (CCD). A purificação das frações foi feita através de técnicas de recristalização (utilizando solventes como, acetona e metanol), o que resultou na formação de

precipitados relativos às frações 18-19 (106,28 mg), que foram analisados por métodos espectroscópicos como, o infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono 13 (RMN ¹³C) e teve seu ponto de fusão determinado. Após análise dos dados espectroscópicos observou-se que este precipitado tratava-se de uma mistura de compostos, sendo feita uma segunda coluna (CC-2) contendo 38 frações na tentativa de isolamento do composto puro. A partir das frações 28-33 da coluna (CC-2) foi isolado o composto1 (38,5mg).

Foi feita ainda, outra coluna de sílica gel (CC-3) com as frações 12-15 (115,4mg), obtidas da primeira coluna. Deste particionamento obtiveram-se precipitados correspondentes às frações 6-8 (76,9mg) que foram analisados por técnicas de espectroscopia, constituindo deste modo o composto 2.

As outras frações obtidas da primeira coluna cromatográfica foram deixadas para análise posterior. Um resumo destes procedimentos pode ser observado na Figura 4.

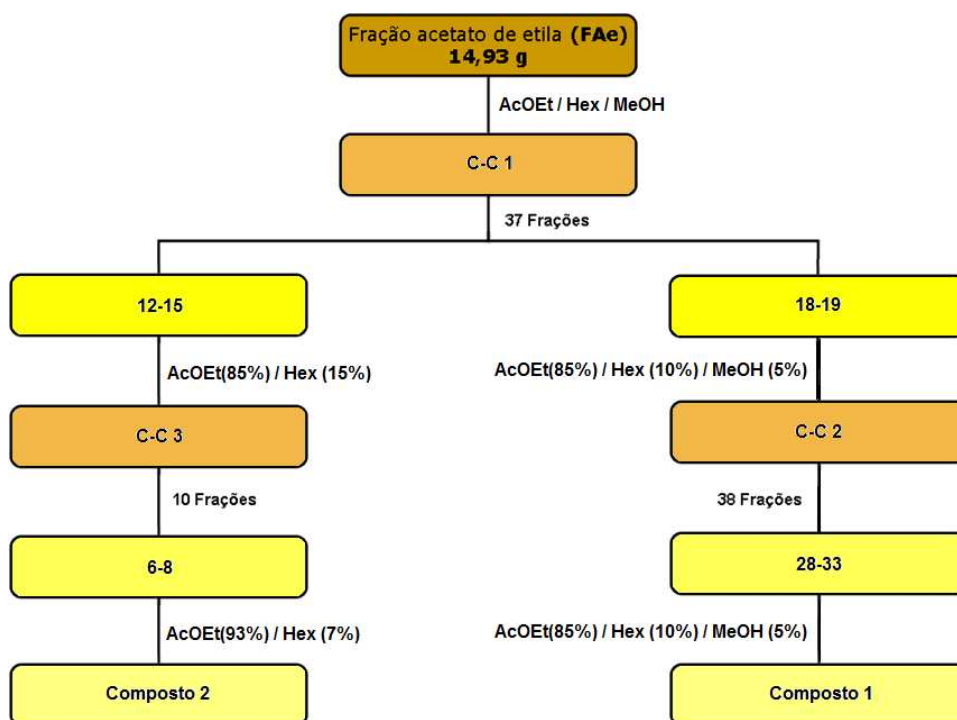


Figura 4 - Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila de *O. serrulata*

4.2.4. Ensaios Antioxidantes

4.2.4.1. Determinação do Conteúdo de Fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-ciocalteau, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores, 2006²⁸. A cada 0,5 mL de uma solução da amostra (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-ciocalteau. Após 3 minutos, foram adicionados 1,0 mL da solução saturada de Na₂CO₃, agitou-se e a solução descansou por 1 hora. A absorvância da solução foi determinada em espectrofotômetro a 725nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução amostra. Um aparecimento da cor azul-escuro é indicativo da presença de fenólicos no extrato ou fração testada. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500 µg/mL, diluídos em etanol, para comparação (Figura 5). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em equivalentes de ácido gálico, ou seja, mg de ácido gálico (AA)/g de extrato bruto ou fração seca.

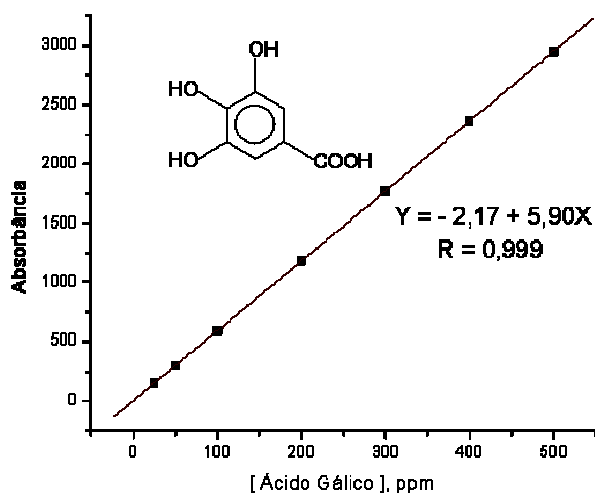


Figura 5 - Curva de calibração para determinação do conteúdo de fenólicos.

4.2.4.2 Determinação do Conteúdo de Flavonóides

O teor de flavonóides foi realizado conforme método descrito por Woisky e Salatino, 1998²⁹. A 0,5 mL de uma solução da amostra (extratos e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em etanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl₃ 2 %. Após 1 hora, as absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 415nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da solução de AlCl₃. O aparecimento da cor verde fluorescente é indicativo da presença de flavonóides. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 2,5 a 100 µg/mL, diluídas em etanol, para comparação (Figura 6). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de flavonóides foi determinado em equivalentes de quercetina, ou seja, mg de quercetina (QE)/g de extrato bruto ou fração seco.

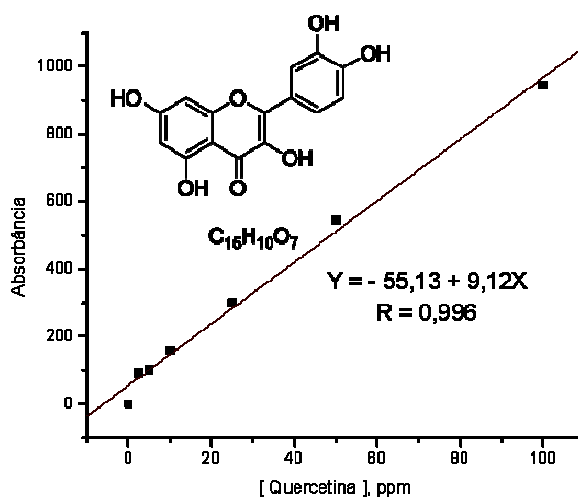


Figura 6 - Curva de calibração para determinação do conteúdo de flavonóides.

4.2.4.3 Captura de Radicais Livres usando DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Bouchet,1998 e Calvin et al.1998 ^{30,31}, com algumas modificações. O ensaio consiste em fazer uma solução etanólica de DPPH 0,004% preparada momentos antes do uso, e de soluções com concentração de 25 a 200 µg/mL das frações ou extratos brutos. Foi misturada 2 mL de solução de DPPH com 1 mL da amostra vegetal. Agitou-se e após 30 minutos, foi feita a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, corrigindo cada absorbância com o seu respectivo controle, que consiste na solução onde há presença do extrato vegetal juntamente com etanol. Uma solução contendo 2 mL de DPPH em etanol foi considerado como 100% de absorbância. O gráfico do percentual de decréscimo na absorbância do DPPH em função na concentração do extrato fornece IC₅₀, concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante (Figura 7).

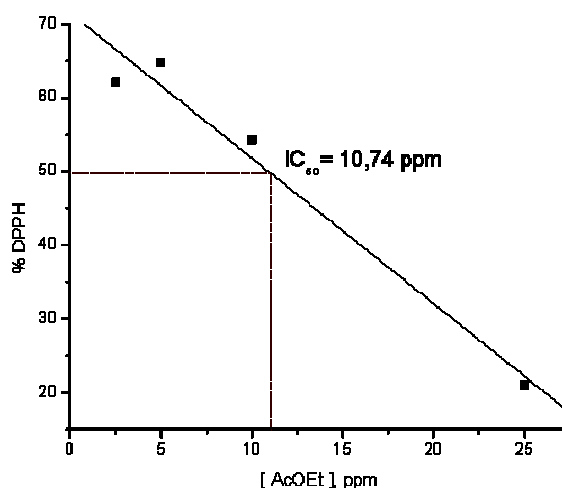


Figura 7 - Obtenção de IC₅₀ para a fração acetato de etila de *O. serrulata*.

4.2.4.4 Determinação do Poder Redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método de Price e Butler,

proposto por Waterman e Mole, 1994 ³², com adaptações. A cada 100 µL das amostras (extratos brutos e frações na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água destilada e 1,0 mL da solução de FeCl₃ 0,1M. Após 3 minutos, adicionou-se 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08M. Passados 15 minutos foram realizadas as leituras das absorvâncias das soluções em espectrofotômetro a 720nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido ascórbico nas concentrações de 100 a 1000 µg/mL, diluídas em etanol, para comparação (Figura 8). Todos os testes foram realizados em triplicata. O potencial redutor foi determinado em equivalentes de ácido ascórbico, ou seja, mg de ácido ascórbico (A.A)/g de extrato bruto ou fração seco.

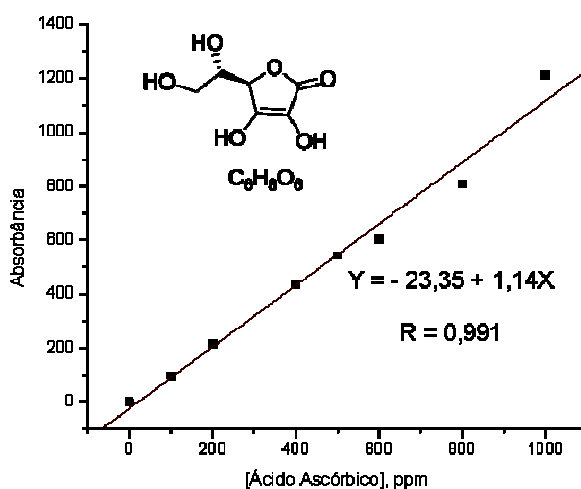


Figura 8 - Curva de calibração para determinação do poder redutor.

4.2.5 Ensaio Biológicos

4.2.5.1 Teste de Toxicidade frente à *Artemia salina*

Os extratos brutos e frações foram avaliados pelo teste de toxicidade frente *A. salina*, segundo a metodologia de Meyer et al., 1982 ³³ com

modificações. Estes foram dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração final de 10.000 ppm que posteriormente foram diluídos nas concentrações de 100 a 1000 ppm. Em cada pocinho de uma placa contendo 24 pocinhos colocou-se 1 mL solução salina (cerca de 20g de sal marinho por litro de água destilada) com 1% tween 80 (v/v) (Polioxietilenosorbitano Monoleato) e de 5 a 10 larvas, coletadas do meio salino. Após 24 horas procedeu-se a leitura dos animais mortos com ajuda de uma lâmpada e uma lupa em oposição a um fundo escuro. O teste foi feito em triplicata e foi acompanhado de controle positivo ($K_2Cr_2O_7$), cuja toxicidade está entre 20 e 40 ppm de acordo com a literatura³⁴ e de controle negativo (etanol:água destilada). Cada extrato ou fração foi testado pelo menos duas vezes para que o resultado fosse confiável. Para o tratamento estatístico dos dados usou-se o método descrito por Reed-Muench³⁵. Este método assume que um animal que sobrevive a uma determinada dose também sobreviverá a uma dose menor, conseqüentemente, um animal que morre com certa dose também morrerá com uma dose maior³⁴, mostrando que existe uma relação entre a dose testada e a mortalidade, no sentido de quanto maior for a dose maior será a letalidade das larvas. Isto permite calcular a DL_{50} (Figura 9) com intervalo de confiança de 95%, onde DL_{50} é a concentração de extrato necessária para causar óbito em 50% das larvas testadas após 24 horas de exposição.

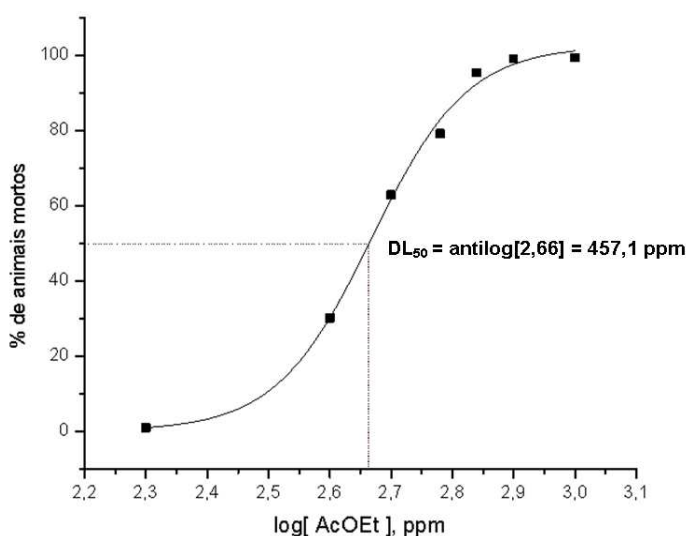


Figura 9 – Obtenção da DL_{50} para a fração acetato de etila de *O. serrulata*.

4.2.5.2 Teste Alelopático

Foram utilizadas para os testes de germinação, sementes de *Lactuca sativa* (alface), uma dicotiledônea pertencente à família Compositae. Estas sementes foram usadas como indicadores da presença de aleloquímicos, conforme metodologia utilizada por Nishimura et al., 1984³⁶ com modificações. Os extratos de plantas foram dissolvidos em etanol nas concentrações desejadas (0,25 – 2,00 %) onde impregnou-se em discos de papel filtro Whatman Nº 1 (5,5 cm de diâmetro) 1 mL do extrato bruto da planta. Após a evaporação do solvente, os papéis filtro impregnados foram colocados em placas de Petri (6,0 cm de diâmetro). Foram adicionados 1,5 mL de tween 80 (100 µg/mL), sendo deixados em repouso por uma noite. No dia seguinte, cada disco de papel filtro recebeu 25 sementes de *L. sativa*, distribuídas sem obedecer a um espaçamento uniforme, sendo o teste desenvolvido em triplicata^{37,38,39}. As sementes de alface foram previamente esterilizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (10%) durante 5 minutos. Utilizou-se um controle negativo, seguindo procedimento similar, porém na ausência do extrato de planta, denominado de testemunha. A germinação foi conduzida em fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro a 25°C, sendo os discos de papel filtro regados diariamente com água destilada. As leituras para a avaliação da germinação de sementes foram diárias, sendo que, para padronização do teste, observou-se a germinação até o 5º dia. Como critério de germinação foi estabelecido à profusão radicular. Após o 5º dia, efetuaram-se as medidas do comprimento da radícula e do hipocótilo com ajuda de uma régua, sendo estes resultados comparados com os controles negativos (testemunha).

4.2.5.3 Teste Antibacteriano

A atividade antibacteriana foi realizada em parceria com a Universidade Regional de Blumenau sob orientação do professor Dr. Eduardo Dalmarco. Esta atividade foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O extrato bruto das folhas e caules e frações foram testados

frente a microorganismos padrões, conforme recomendado pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁴⁰: *Staphylococcus aureus* – ATCC – 6538 (coco gram positivo), *Escherichia coli* – ATCC – 25922 (bacilo gram negativo) e *Pseudomonas aeruginosa* (bacilo gram negativo).

Estas determinações foram realizadas em microplacas Elisa estéreis, contendo 96 micropoços. As soluções testes foram colocadas nas primeiras microcavidades, contidas nas microplacas, os quais em seguida foram transferidas para microcavidades adjacentes, as quais já continham caldo BHI (Brain Heart Infusion), com objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois das amostras (de 1:2 até 1:256 partindo da concentração de 50 mg/mL). Em cada poço, o inóculo foi adicionado no volume de 5 mL de uma solução ajustada para 0,5 da escala de MacFarland.

O teste foi acompanhado de controle negativo (DMSO + bactéria em estudo e BHI) e controle de inibição (BHI + bactéria em estudo + gentamicina). As microplacas foram incubadas aerobicamente a 35°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi verificado pela adição de um revelador, composto pela solução metanólica a 5% de cloridrato de 2,3,5 trifeniltetrazólio, onde na presença de crescimento bacteriano é observada uma coloração avermelhada.

A CIM foi definida como a última concentração do extrato ou fração capaz de inibir a presença de crescimento bacteriano. Quanto maior a diluição obtida como concentração inibitória mínima (CIM), menor a concentração do extrato necessária para inibir o crescimento bacteriano, que significa também, a melhor atividade antibacteriana do extrato ou fração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Compostos de *Ochna serrulata*

O extrato bruto das folhas de *Ochna serrulata* foi particionado com solventes de diferentes polaridades, originando as frações hexânica, acetato de etila e n-butanólica. O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila resultou em dois compostos com características espectroscópicas muito similares e de perfil compatível com estrutura flavonoídica, que foram denominados de compostos 1 (38,5mg) e 2 (76,9mg).

5.1.1 Análise de composto 1

O composto 1 isolado apresentou-se na forma de um pó amarelado com ponto de fusão 213,1-213,3°C, Rf.= 0,52 (AcOEt 100%), e foi revelado positivamente em cromatografia em camada delgada (CCD) com FeCl₃ indicando a presença de hidroxilas fenólicas. O espectro de IV apresentou bandas típicas de absorção de grupo –OH (3371 cm⁻¹), grupo >C=O conjugada (1661 cm⁻¹), duplas ligações conjugadas (1620 cm⁻¹) e duplas ligações de anéis aromáticos (1520 cm⁻¹) (Anexo 1). A análise do espectro de IV, juntamente com a revelação na CCD com FeCl₃, sugerem que estes compostos pertencem a classe dos flavonóides glicosídicos.

A análise do espectro de RMN de ¹H revelou a presença de vários picos na região de H aromáticos (6,2-8,3 ppm) e na região de H ligado a carbono oxigenado entre 3,5-5 ppm. Em 10,79 ppm observa-se um sinal referente à hidroxila fenólica, provavelmente do C-5 quelada à carbonila C-4. Este espectro apresenta um perfil compatível para uma estrutura flavonoídica glicosilada, (Anexo 2). A ausência de sinais na região de 2,3-3,4 ppm exclui a possibilidade da aglicona flavanona, também a ausência do típico par de dupletes na região de 4,6 e 5,1 com constantes de acoplamento da ordem de 11 Hz exclui a estrutura flavanonol. No espectro de RMN de ¹³C podemos observar este mesmo perfil também excluindo a possibilidade de flavanonol e flavanona. Os

sinais entre 61,5 a 81,2 ppm são referentes a carbono de açúcar, isto é, carbono sp^3 oxigenados. Os sinais em 100,18 e 102,51 ppm correspondem provavelmente aos carbonos anoméricos da glicose. O sinal em 56,4 e 56,8 ppm refere-se a presença de metoxilas na estrutura. Entre 98,8 e 130,4 ppm observa-se os picos referentes a carbonos aromáticos e entre 148,5 e 164,9 ppm observa-se os picos referentes a carbonos aromáticos oxigenados. Finalmente, em aproximadamente 182 ppm observa-se picos correspondentes a $>C=O$, (Anexo 3). Estes dados sugerem que o composto 1 possua dois núcleos flavona ou flavonol ligados a metoxilas e açúcares. Infelizmente são necessárias análises mais apuradas para propor uma estrutura para este composto.

5.1.2 Análise de composto 2

O composto 2 apresentou-se na forma de cristais amarelados com ponto de fusão 168,3-168,8°C, Rf.= 0,87(AcOEt 100%). A análise espectroscópica sugere que este composto tenha as mesmas características que o composto 1. Apesar de apresentar mais sinais em seus espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C (Anexos 4 e 5) que o composto 1, não se pode afirmar, se o conjunto de sinais correspondem a trímeros ou pentâmeros de flavonóides ou são sinais dos vários rotâmeros de um biflavonóide.

Segundo Likhitwitayawuid e colaboradores¹, a composição de flavonóides do gênero *Ochna* pode ser específica dependendo da parte da planta estudada. Nas folhas, que é o alvo deste estudo fitoquímico, as espécies de *Ochna* podem se dividir em dois grupos, dependendo da habilidade de produzir ou não ochnaflavona (**7**), considerando este composto um marcador quimiotaxonômico nas espécies do gênero. Espécies de *Ochna* que produzem ochnaflavona acumulam biflavonóides flavona (**8**) e flavanona (**9**), enquanto que as espécies que não produzem ochnaflavona, normalmente não acumulam biflavonóides¹. Além disso, os flavonóides glicosídicos possuem como agliconas estruturas flavona/flavanona, sendo encontrados quase que exclusivamente nas folhas. A formação de triflavonóides nas folhas e

pentaflavonóides nas cascas do caule ilustram a capacidade do gênero para produzir derivados complexos¹.

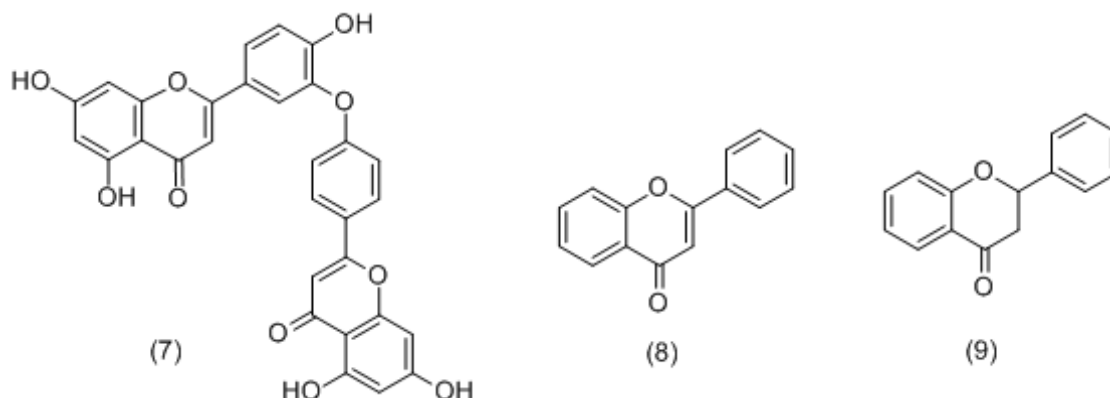


Figura 10 – Estruturas químicas flavonóidicas básicas encontradas no gênero *Ochna*.

5.2. Atividade Antioxidante

Espécies oxidantes, como os radicais livres, atuam sobre o organismo causando uma série de patologias, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Os efeitos resultantes do metabolismo celular geram da oxidação de componentes, espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), produzidas como parte do processo metabólico (de 2 a 5 % do oxigênio respirado, por exemplo), e de fontes exógenas. Os antioxidantes são substâncias que, numa concentração menor que o substrato oxidável, retarda o processo oxidativo, diminuindo a velocidade da reação⁴¹.

A maioria dos extratos vegetais são conhecidos por sua eficácia antioxidante, considerando isto, foi avaliada a capacidade antioxidante de compostos químicos e/ou extratos vegetais, através de ensaios, como a atividade seqüestrante de radicais livres e potencial redutor. O conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides foram determinados para os extratos vegetais, a fim de correlacionar estes dados com a atividade antioxidante.

Numerosos estudos demonstram que os compostos fenólicos possuem alta capacidade antioxidante, especialmente os ortodifenóis, ou catecóis⁴². A

determinação do conteúdo de fenólicos baseia-se na formação de um complexo inorgânico entre os compostos fenólicos e os ânions tungstato e molibdato, formado o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico (Figura 11), que fornece uma coloração azul para a solução³².

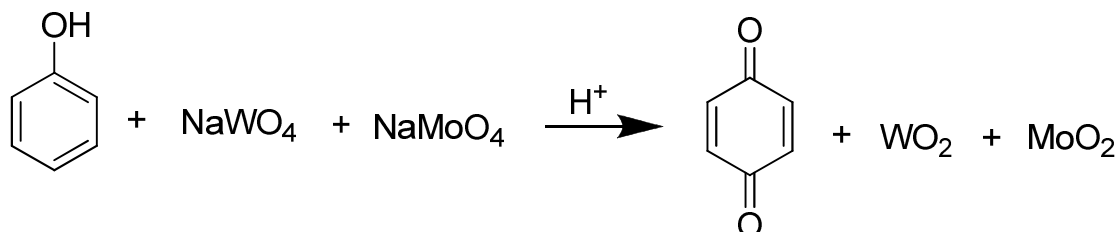


Figura 11 – Reação de óxido-redução para determinação de compostos fenólicos.

Os flavonóides são uma classe de metabólitos vegetais secundários, de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante. Para a determinação do teor de flavonóides nos extratos e frações vegetais utilizou-se a complexação com cloreto de alumínio (AlCl₃)²⁹. Este reagente forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonóides (Figura 12), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de UV/VIS para uma região característica⁴³.

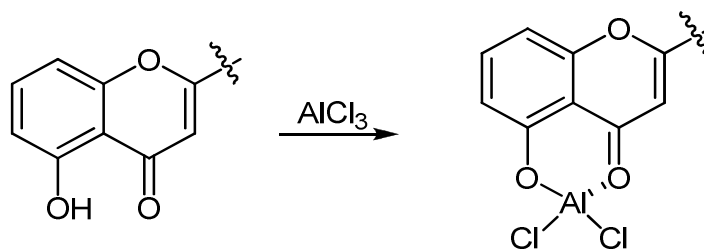


Figura 12 - Formação do anel estável de seis membros do Al³⁺ com o flavonóide.

O teor de compostos fenólicos e flavonóides no extrato bruto das folhas e suas frações e no extrato bruto dos caules de *Ochna serrulata*, pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos, teor de flavonóides e ensaios antioxidantes aplicados aos extratos vegetais de *Ochna serrulata*.

<i>Ochna serrulata</i>	Fenólicos	Flavonóides	DPPH IC ₅₀	Poder redutor
	mg AG/ g	mg QE/ g	µg/mL	mg AA / g
EB Caule	219,9±11,1	20,1±0,1	13,3	261,7±5,2
EB Folhas	290,9±2,4	105,8±4,0	15,2	617,8±4,4
Resina	273,0±6,9	202,5±4,9	12,8	676,2±5,7
F. hexânica	234,4±6,3	48,6±4,0	32,6	506,4±1,1
F. acetato de etila	339,8±20,5	123,0±5,1	10,7	981,4±22,4
F. n- butanólica	290,9±6,0	18,8±0,5	13,6	597,2±1,3
Composto 1			13,4	
Composto 2			***	
BHT ^a			17,3	
Ác. Ascórbico ^b			9,20	
Ácido Gálico ^c			2,40	

*** não apresentou resultados na concentração testada.

a,b,c são considerados antioxidantes conhecidos.

Através destes resultados observou-se que o EB das folhas apresentou maior concentração de fenólicos e flavonóides, e conseqüente maior atividade antioxidante que o EB do caule em relação ao teste do poder redutor. A maior concentração de compostos fenólicos nas folhas em relação ao caule pode ser justificada devido à função protetora dos flavonóides nas folhas contra a radiação emitida pelo sol.

Quando o EB das folhas foi particionado com diferentes solventes, foi observado maior teor de fenólicos na fração acetato de etila, seguida da fração n-butanólica. Os compostos flavonóides estão em maior concentração na fração acetato de etila, seguida da fração hexânica, provavelmente nesta última fração, na forma de aglicona.

A maior concentração de flavonóides está presente na fração acetato de etila, motivo pelo qual esta fração foi escolhida como primeira a ser particionada por cromatografia em coluna; mostrando a importância do acompanhamento simultâneo dos ensaios para direcionar o estudo fitoquímico. Nesta fração foram obtidos os flavonóides referentes aos compostos 1 e 2.

O ensaio antioxidante utilizando o radical livre DPPH avalia a capacidade seqüestrante de radicais livres da amostra analisada. A habilidade dos compostos fenólicos em doar hidrogênios ao radical livre DPPH leva à formação de espécies pouco reativas. Este radical livre é relativamente estável, de forte coloração púrpura e abstrai um átomo de hidrogênio de compostos fenólicos, formando o DPPH reduzido, que é descolorado, de acordo com a seguinte reação (Figura 13).

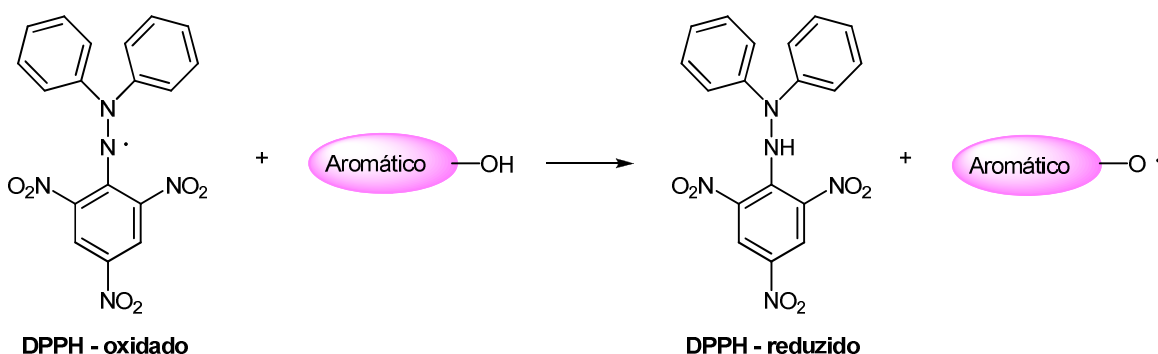


Figura 13 – Ação seqüestrante do DPPH sobre um composto fenólico.

No ensaio da determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH foi verificada uma excelente atividade antioxidante para todos os extratos e frações vegetais, sendo que, com exceção da fração hexânica, estes extratos e frações possuem valores de IC₅₀ equivalentes a compostos antioxidantes bastante conhecidos, como o BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno), ácido ascórbico e ácido gálico (Tabela 1).

A capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lipídica, através da doação de elétrons, é caracterizada como potencial redutor de uma amostra⁴⁴. O ensaio para a determinação da atividade do potencial redutor baseia-se no fato de que, quando o íon fenolato, presente nos compostos e extratos vegetais é oxidado, os íons férricos são reduzidos para íons ferrosos (Figura 14), e detectados a partir da formação de um complexo azul, Fe₄[Fe(CN)₆]₃ (Figura 14), com o reagente ferricianeto de potássio³².

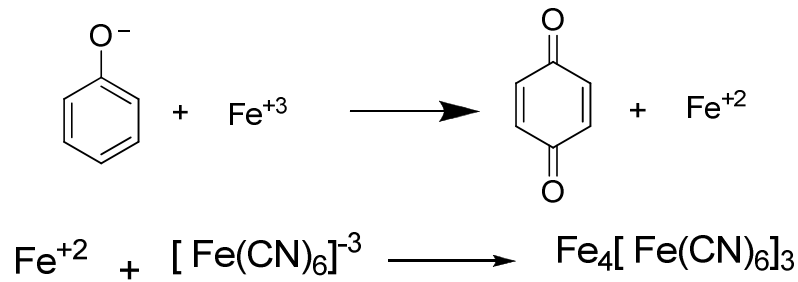


Figura 14 – Reação de óxido-redução para determinação do poder redutor.

A atividade antioxidante avaliada através do teste do poder redutor mostrou uma correlação com o conteúdo de fenólicos existente nas frações, isto é, a fração acetato de etila apresentou maior atividade, seguida da fração n-butanólica e da fração hexânica.

Portanto, a significativa atividade antioxidante exibida pelas frações mais polares das folhas de *Ochna serrulata* pode ser justificada pela maior concentração de substâncias fenólicas, entre elas os flavonóides, conhecidos por sua eficiente atividade antioxidante.

5.3. Atividade de Toxicidade frente à *Artemia salina*

Os ensaios de letalidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* são amplamente usados como técnica de triagem para verificar a atividade biológica de toxinas naturais^{45,46}, e de extratos vegetais e seus compostos isolados⁴⁷. Uma das vantagens deste ensaio é que, devido à grande sensibilidade deste microcrustáceo, várias atividades biológicas podem estar relacionadas a este, pois os compostos ativos podem ser potencialmente tóxicos, dependendo da dose³³. São considerados ativos diante deste bioensaio, os extratos ou frações vegetais que apresentarem valores de DL₅₀ até 1000 µg/mL. A tabela abaixo apresenta os resultados do ensaio de letalidade utilizando larvas de *A. salina*.

Tabela 2 - Letalidade frente à *Artemia salina* dos extratos e frações de *O. serrulata*.

Extrato/fração	DL ₅₀ (ppm)	IC ₉₅
EB do caule	933,2	897,4 - 970,5
EB das folhas	998,4	907,8 – 1096,7
F. hexânica	868,0	755,3 – 997,5
F. acetato de etila	457,1	385,8 – 542,0
F. n-butanólica	> 1000	-
Resina	> 1000	-

Foi observado que o extrato bruto das folhas e caules, e as frações hexânica e acetato de etila apresentaram relativa toxicidade frente à *Artemia salina*, sendo a fração acetato de etila, foi a fração que apresentou a mais notável toxicidade. A resina e a fração n-butanólica não apresentaram toxicidade, e o extrato bruto das folhas apresentou uma baixa toxicidade com DL₅₀ = 998,4 (ppm).

5.4. Atividade Alelopática

Alelopatia é o fenômeno pelo qual as plantas ao se defenderem, produzem uma diversidade de metabólitos secundários, liberando-os para o meio externo, exercendo assim um efeito sobre outras plantas. Um bioensaio útil para avaliar a atividade alelopática é a aplicação do teste de germinação de sementes. Neste teste avalia-se a velocidade de germinação de sementes e posterior observação do desenvolvimento da plântula, isto é, do crescimento da radícula e do hipocótilo.

A velocidade de germinação de sementes é determinada através da equação: $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$, onde IVG é o índice de velocidade de germinação, G_1 , G_2 , G_n é o número de plântulas normais computada na

primeira, segunda e última contagem; N_1 , N_2 , N_n corresponde ao número de dias após a semeadura na primeira, segunda e última contagem.

Na utilização de sementes de culturas, como as de *Lactuca sativa* (alface) usadas neste estudo, interessa observar a inibição da velocidade de germinação com a perspectiva de encontrar possíveis compostos com potencial atividade herbicida. As sementes de *L. sativa* (alface) germinam em aproximadamente três dias, sendo que após o quinto dia foi avaliado o desenvolvimento da plântula através de medidas da radícula e do hipocótilo. A avaliação da atividade alelopática nos extratos brutos dos caules e folhas (0,25 a 2,0 g%) de *O. serrulata* está apresentada na Tabela 3.

De uma maneira geral, à medida que aumenta a concentração do extrato, observa-se uma inibição na velocidade de germinação. Através dos valores do IVG pode-se observar que o extrato bruto das folhas da *O. serrulata* possui maior velocidade de germinação de inibição do que o extrato bruto caule, mostrando que nos extratos brutos folhas concentram-se os compostos com maior propriedade de inibir a germinação de sementes de *L. sativa*. Porém, no extrato bruto das folhas na concentração 2,0 g% houve um estímulo na velocidade de germinação em comparação com a concentração de 1,0 g%.

Os extratos brutos da *Ochna serrulata* foram eficientes em inibir não só a germinação das sementes de alface, como também o desenvolvimento das plântulas, que foi avaliado após o 5º dia, calculando-se o percentual de crescimento da radícula e do hipocótilo, considerando-se 100% o crescimento da testemunha (Tabela 3).

Tabela 3 - Aplicação do teste alelopático aos extratos brutos da *Ochna serrulata*.

	Índice de velocidade de germinação	Crescimento da radícula	Crescimento do hipocótilo
Extrato bruto - Folhas		%	%
Testemunha	20,36	100,0	100,0
0,25 %	9,90	117,2	98,8
0,50 %	6,50	116,6	108,7
1,00 %	1,25	58,3	79,1
2,00 %	2,30	39,5	57,7
Extrato bruto - Caules		%	%
Testemunha	34,53	100,0	100,0
0,25 %	20,53	77,6	101,7
0,50 %	16,08	71,1	86,2
1,00 %	12,46	85,5	88,5
2,00 %	4,26	64,8	72,2

O desenvolvimento da radícula e do hipocótilo foi afetado na presença do extrato bruto das folhas e dos caules e com maior inibição à medida que as concentrações foram aumentadas. Na presença do extrato bruto das folhas observou-se um estímulo no crescimento tanto da radícula quanto do hipocótilo nas concentrações de 0,25 e 0,50%, porém em concentrações superiores houve uma inibição do desenvolvimento da plântula, sendo que na concentração de 2,0 g% a inibição foi de aproximadamente 60 e 40% para a radícula e hipocótilo, respectivamente. O extrato bruto caule afetou muito pouco o crescimento do hipocótilo, no entanto a radícula teve uma inibição de 35% na presença deste extrato na concentração de 2 g%.

5.5. Atividade Antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana é de suma importância, devido a certas bactérias como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* serem consideradas patógenos causadores de infecção hospitalar; que se tornam resistentes progressivamente a um número cada vez maior de antibióticos^{48,49}. Baseado neste fato faz-se o incentivo à busca de antibióticos de ocorrência natural.

De acordo com a Tabela 4, observa-se que de modo geral, os resultados de CIM contra *P. aeruginosa* foram os mais eficientes quando comparados as demais bactérias envolvidas no teste. As frações hexânicas e acetato de etila apresentaram as melhores atividades com valores de concentração inibitória mínima (CIM de 0,70 mg/mL), quando testadas contra *P. aeruginosa*.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana (CIM) para os extratos brutos e frações de *Ochna serrulata*.

Extrato/ Fração	<i>S. aureus</i> (mg/mL)	<i>P. aeruginosa</i> (mg/mL)	<i>E. coli</i> (mg/mL)
Extrato bruto caule	5,02	2,51	2,51
Extrato bruto folha	2,86	2,86	2,86
Resina	1,37	1,37	1,37
Fração hexânica	2,77	0,69	1,38
Fração acetato etila	2,80	0,70	1,40
Fração n-butanólica	2,80	1,43	1,43
Gentamicina ^a	0,005	0,0075	0,001

^a antibiótico usado comercialmente.

6. CONCLUSÃO

A partir do estudo fitoquímico de *Ochna serrulata* monitorado pelos ensaios biológicos conclui-se que:

i) Na análise fitoquímica da fração acetato de etila obtida a partir do extrato bruto das folhas, foram encontrados dois flavonóides glicosilados, entretanto suas estruturas químicas não foram completamente elucidadas.

ii) Nos testes antioxidantes observou-se que o extrato bruto das folhas apresentou maior concentração de fenólicos e flavonóides, e conseqüente maior atividade antioxidante (em relação ao teste do poder redutor) que o extrato bruto dos caules. A atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH mostrou uma excelente atividade antioxidante para todos os extratos e frações vegetais, com exceção da fração hexânica.

iii) O extrato bruto das folhas e caules, e as frações hexânica e acetato de etila das folhas apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, sendo a fração acetato de etila a mais ativa.

iv) O teste alelopático mostrou que o extrato bruto das folhas e caules exerce uma inibição não só na germinação de sementes de alface, como também uma inibição no desenvolvimento da plântula, mostrando que os extratos brutos de *O. serrulata* possuem compostos com potencial herbicida.

De modo geral, verifica-se que os estudos referentes à *Ochna serrulata* mostram-se promissores quanto ao isolamento de flavonóides, e que os extratos brutos e frações desta planta possuem atividades biológicas, dentre elas uma significativa ação antioxidante. Faz-se então o incentivo ao estudo fitoquímico posterior das demais frações de *Ochna serrulata*, bem como o particionamento do extrato bruto dos caules para isolamento e caracterização de novos compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LIKHITWITAYAWUID, K; RUNGSERICHA, R; RUANGRUGSI, N; PHADUNGCHAROEN, T., Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*, **Phytochemistry**, v.56, p.353–357, **2001**.
2. MIGUEL, M.A; SARTONELLI, P.; **Livro de Resumos da Sociedade Brasileira de Química**, SBQ, Águas de Lindóia, **2006**.
3. SOUZA, V.C; **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**, volume único, Instituto Plantarium, São Paulo, **2005**.
4. BRANDÃO, A.J; **Introdução à Taxonomia Vegetal**, ed.10^a, Editora Nacional, São Paulo, **1991**.
5. COATES, P.K; **Trees of southern Africa**, ed.2^a, CapeTown, South Africa, **1977**.
6. BOUQUET, A.; **Feticheurs et Medecines Traditionnelles du Congo**, Brazzaville, p.178-179, Paris, **1969**.
7. MUTHKUMARASAMY, S; MOHAN, V.R; KUMARESAN, S. Pharmacognostic studies on the trunk bark of *Ochna lanceolata*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.25, p.344–349, **2003**.
8. KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D; **Indian Medicinal Plants; Periodical book agency: Vivek Vihar**, p. 515, New Delhi, India, **1980**.
9. PERRY, L.M; **0 Medicinal Plants of East and Southeast Asia**, The MIT Press, Massachusetts, Estados Unidos, **1980**.
10. ALEXANDER, M; **Mickey Mouse Bush: *Ochna serrulata***, Garden & Home p.128-129, **2001**.
11. PALMER & PITMAN, **Trees of southern Africa**, Balkema, CapeTown, South Africa, **1972**.
12. ANURADHA, V; PULLELA, V.S; RAO, R.R; MANJULATHA, K; PUROHIT, M.G; RAO, J.M; Isolation and synthesis of analgesic and anti-inflammatory compounds from *Ochna squarrosa*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 6820-6826, **2006**.

13. REUTRAKUL, V; NINGNUEK, N; POHMAKOTR, M; YOOSOOK,C; Napaswad Chanita; Kasisit, J; Santisuk, T; Tuchinda, P; Anti HIV – 1 Flavonoid Glycodides from *Ochna integerrima*, **Planta Medica**, v.73, p.683-688, **2007**.
14. ICHINO, C; KIYOHARA, H; SOONTHORNCHAREONNON, N; CHUAKUL, W; ISHIYAMA, A; SEKIGUCHI, H; NAMATAME, M; Antimalarial Activity of Biflavonoids from *Ochna integerrima*, **Planta Medica**,v.72, p.611-614, **2006**.
15. TANG, S; BREMMER, P; KORTENKAMP, A; SCHLAGE, C; GRAY, A; GIBBONS, S; HEINRICH, M., Biflavonoids with Cytotoxic and Antibacterial Activity from *Ochna macrocalyx* , **Planta Medica**,v.69, p.247-253, **2003**.
16. PEGNYEMB, D.E; TIH, G.R; SONDEGAM,B.L; BLOND,A; BODO,B, Biflavonoids of *Ochna afzelii*, **Phytochemistry**, v.57, p.579-582, **2001**.
- 17a. PEGNYEMB, D.E; TIH, G.R; SONDEGAM,B.L; BLOND,A; BODO,B, Flavonoids from leaves of *Ochna afzelii*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.219-221, **2003**.
- 17b. PEGNYEMB, D.E; TIH, G.R; SONDEGAM,B.L; BLOND,A; BODO,B, Flavonoids of *Ochna afzelii*, , **Phytochemistry**, v.64, p.661-665, **2003**.
- 17c.PEGNYEMB, D.E; TIH, G.R; SONDEGAM,B.L; BLOND,A; BODO,B; Isolation and Structure Elucidation of a New Isobiflavonoid From *Ochna afzelii*, **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.92-95, **2003**.
18. MESSANGA,B;TIH, R.G; SONDEGAM,B.L; MARTIN, M.T;BODO,B; Biflavonoids from *Ochna calodendron*, **Phytochemistry**, v.35, n.3, p.701-793,**1994**.
19. MESSANGA,B;TIH, R.G; SONDEGAM,B.L; MARTIN, M.T;BODO,B; Caledonone, A New Isobiflavonoid *Ochna calodendron*, **Journal of Natural Products**, v.55, n.2, p.245-248, **1992**.
20. MESSANGA,B;TIH, R.G; SONDEGAM,B.L; MARTIN, M.T;BODO,B; Isolation and tructual elucidation of a new pentaflavonoid from *Ochna calodendron*, **Journal of Chemistry**, v.25, n.8, p.1098- 1100, **2001**.
21. MESSANGA,B; KIMBU,S.F; SONDEGAM, B.L; BODO,B; Triflavonoids from *Ochna calodendron*, **Phytochemistry**, v.59, p.435-438, **2002**.
22. REDDY, K.C; AKSHAYA, K; 5-Metoxifyfurano(2'',3'':7,8)flavones from the stems of *Ochna squarrosa*, **Phytochemistry**, v.22, n.3, p.800-801, **1983**.

23. KAEWAMATANWONG, R; LIKHITWITAYAWUID, K; RUANGRUGSI, N; Novel Biflavonoids from the Stem Bark of *Ochna integerrima*, **Phytochemistry**, v.65, n.7, p.1027-1029, **2002**.
24. REDDY, B.A.K; REDDY, N.P; GUNASEKA, D; BLOND, A; BODO, B; Biflavonoids from *Ochna lanceolata*, **Phytochemistry**, v.1, p.27-30, **2008**.
25. JAYAPRAKASAM, B; DAMU, A.G; RAO, K.V; GUNASEKAR, D; BLOND, A; BODO B; 7-O-Methyltetrahydrochnaflavone, a New Biflavanone from *Ochna beddomei*, **Journal of Natural Products**, v.63, p.507-508, **2000**.
26. JAYAKRISHINA, G; REDDY, M.K; JAYAPRAKASAM, B; A New Biflavonoid of *Ochna beddomei*, **Journal of Asian Natural Products Research**, v.5, n.2, p.83-87, **2003**.
27. KAMIL, M; KHAN, N.A; ALAM, M.S; ILYAS M; A biflavone from *Ochna pumila*, **Phytochemistry**, v.26, n.4, p.1171-1173, **1987**.
28. ANAGNOSTOPOULOU, M.A; KEFALAS, P; PAPAGEORGIU, V.P; ASSIMOPOULOU, A.N; Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), **Food Chemistry**, n.94, p.19-25, **2006**.
29. WOISKY, R.G; SALATINO, A; Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, **Journal of Apiculture Research**, v.37, p.99-105, **1998**.
30. BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis*, **Phytotherapy research**, v.12, p.159-162, **1998**.
31. CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O; The Potential of Higher Plants as a source of new drugs, **CHIMIA Internacional Journal for Chemistry**, v.52, n.1, p.10-17, **1998**.
32. WATERMAN, P.G & MOLE, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, **Oxford:Black Scientific Publications**, p.238, **1994**.
33. MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, **Planta Medica**, v.45, n.31-34, **1982**.
34. SAM, T.W et al.; **Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*, bioactive natural products**, Ed.CRC Press, **1993**.

35. IPSEN, J; FEIGI, P; **Bancroft to Biostatistics**, 2^a ed, Harper & Row, New York, cap.15, **1970**.
36. NISHIMURA, H.; NAKAMURA, T.; MIZUTANI, J; Allelopathic effects of p-menthane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*, **Phytochemistry**, v.23, n.12, p.2777-2779, **1984**.
37. MÁCIAS, F.A.; SIMONET, A.M.; ESTEBAN, M.D; Potential Allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus messanensis*, **Phytochemistry**, v.36, n.6, p.1369-1379, **1994**.
38. DOBREMEZ, J.F; GALLET, C.; PELISSIER, F; Chemical warfare among the plants, **La Recherche**, v.26, n.279, p.912-916, **1995**.
39. ARELLANES, A.J. & MATA, A; Phytogrowth-Inhibitory Compounds from *Malmea depressa*, **Journal of Natural Products**, v.59, p.202-204, **1996**.
40. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Fifteenth Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA, **2005**.
41. HALLIWELL, B; DNA and Free Radicals, **Journal of American Chemical Society**, v.117, n.4, **1995**.
42. TUCK, K.L; HAYBALL, P.J; Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.11, p. 636-644, **2002**.
43. ZUAZANNI, J.A.C; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: Simões O. et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed, Porto Alegre, **2003**.
44. YEN, G.C; CHEN, H.Y.J, Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation, **Journal of Agriculture Food Chemical**, v.53, n.15, p.6151-6155, **2005**.
45. MOHAMED, Z. A.; EI-SHAROUNY, H.M; WAFSA; A; Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt, **Journal of The International Society on Toxinology**, v.47, n.5, p.584-590, **2006**.
46. BAIG, H.S; SAIFULLAH, S.M; DAR, A; Occurrence and toxicity of *Amphidinium carterae* Hulburt in the North Arabian Sea, **Harmful Algae** v.5, n.2, p.133-140, **2006**.

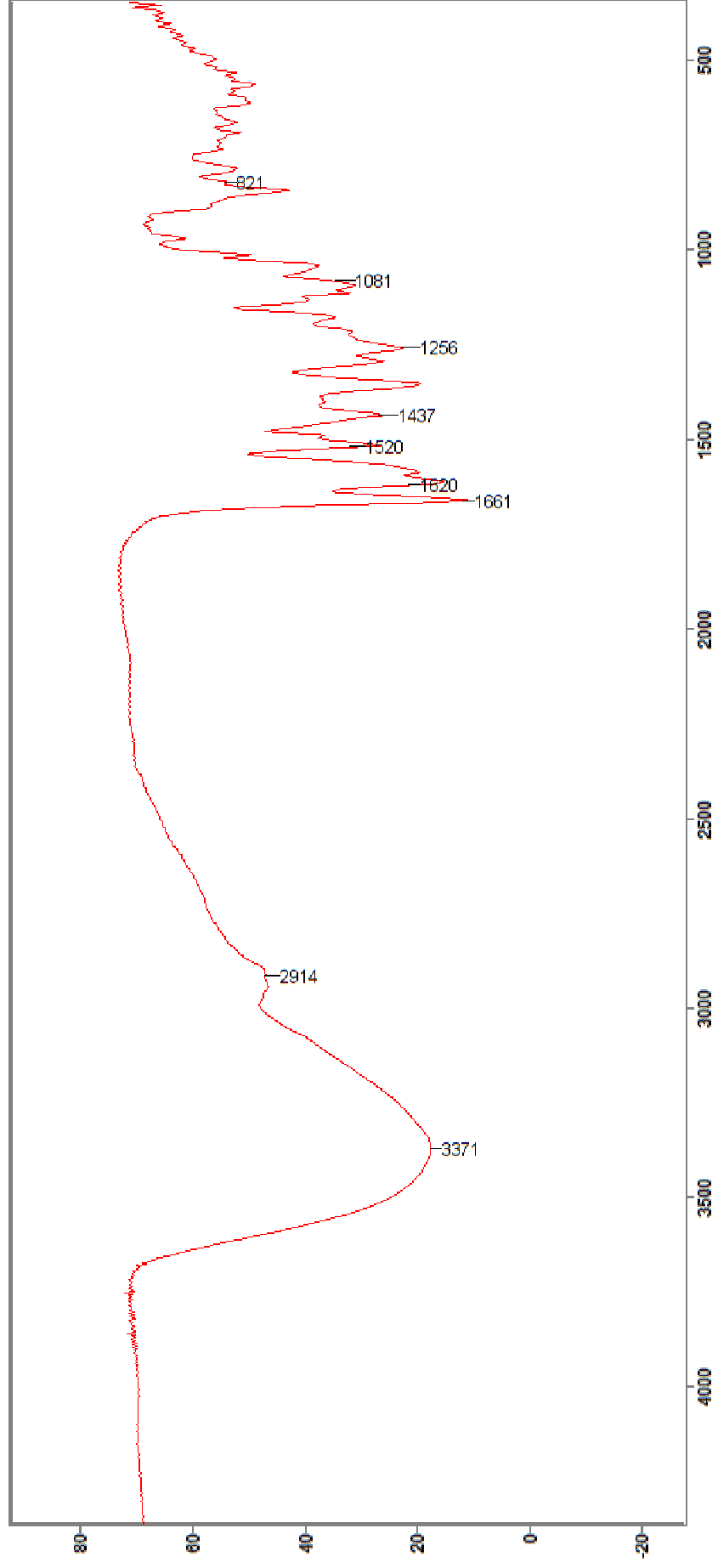
47. LUNA, J.S; The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.300-306, **2006**.

48. SOUZA, G.C; HAAS, A.P.S; POSER, G.L; SCHAPOVAL, E.E.S; ELISABETSKY,E.; **Journal of Ethmopharmacology**, v.90, p.135-143, **2004**.

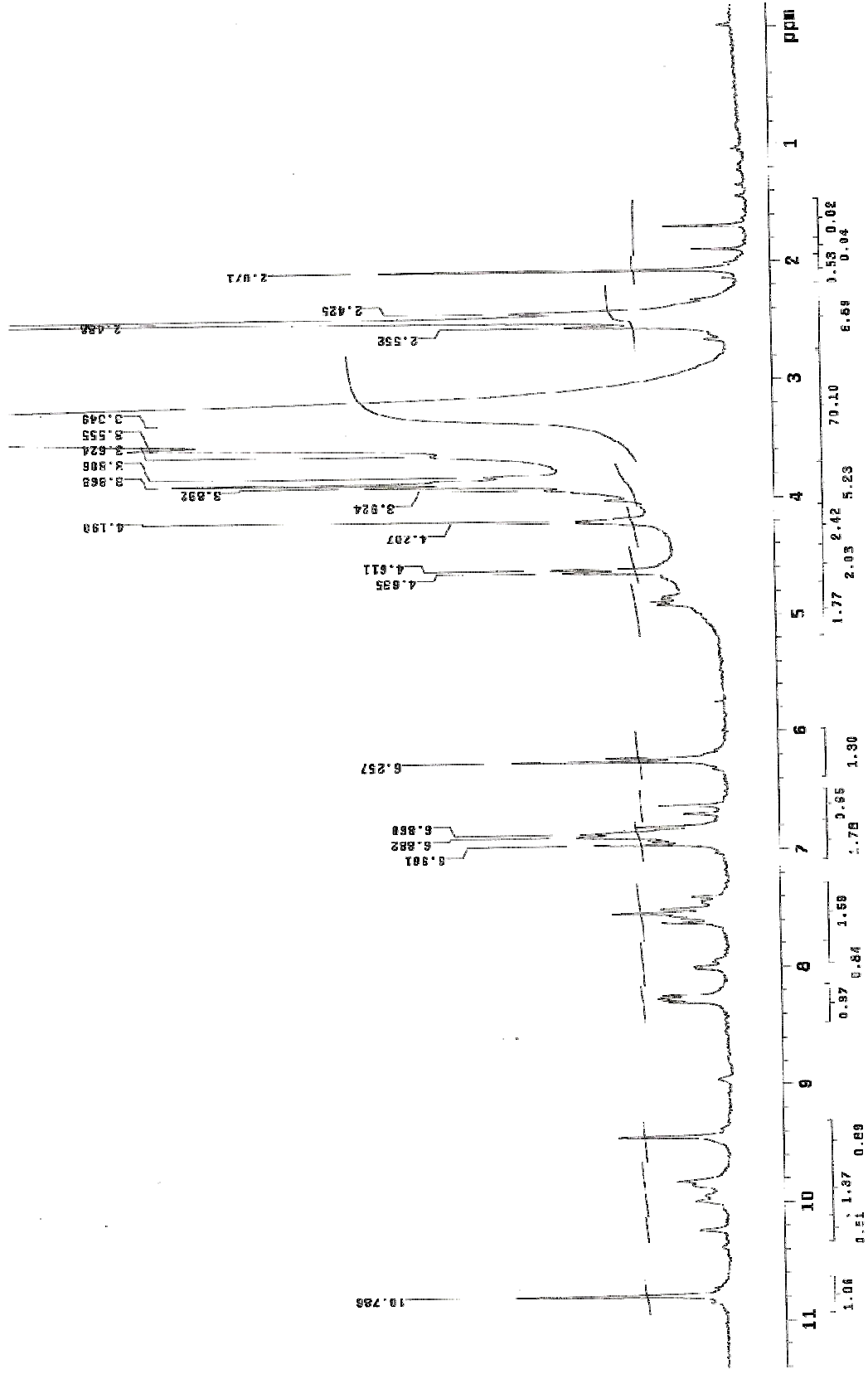
49. ZAMPINI, I.C, VATTUONE, M.A, ISLA, M.I, antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* cav et ethanolic extracts, **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, n.3, p.450-456, **2005**.

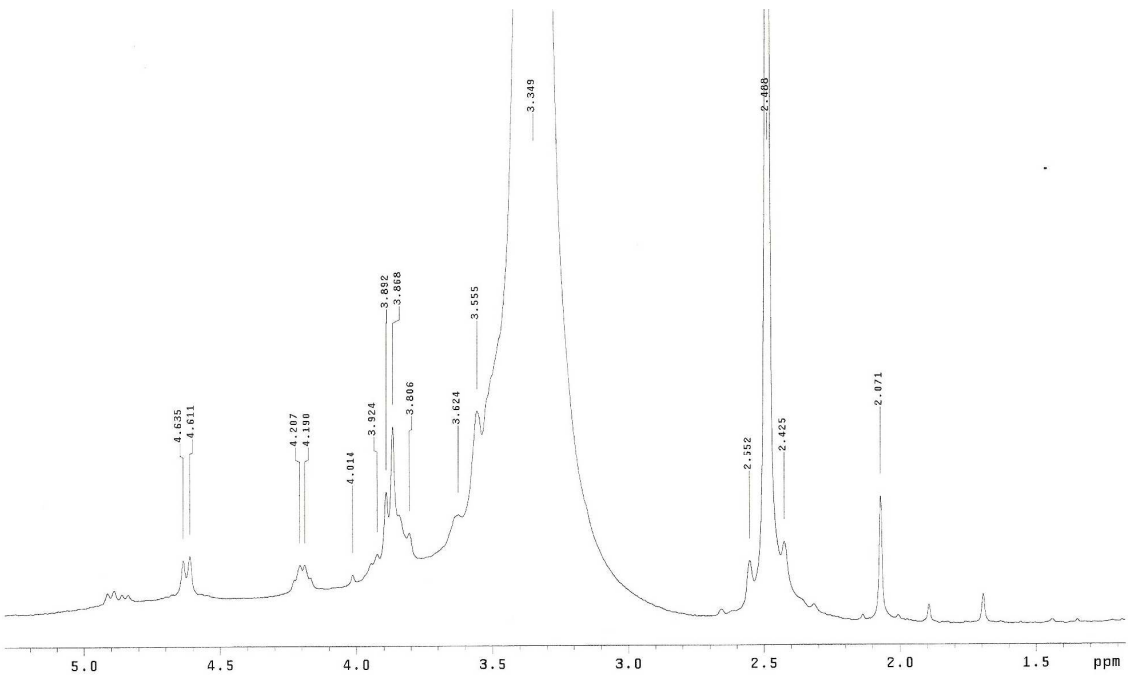
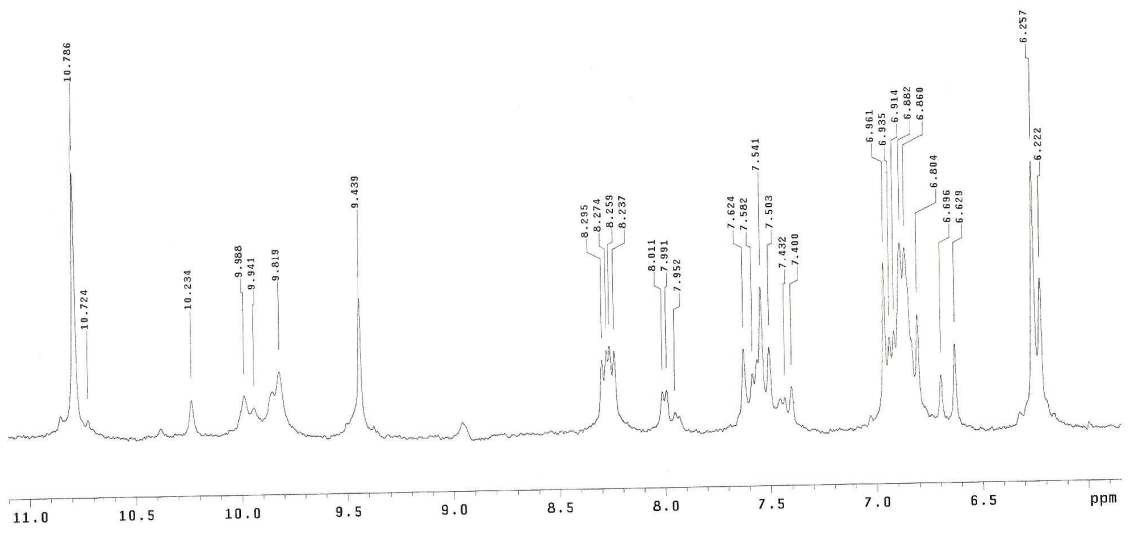
8. ANEXOS

Anexo 1 - Espectro de Infravermelho para o composto 1 (KBr).

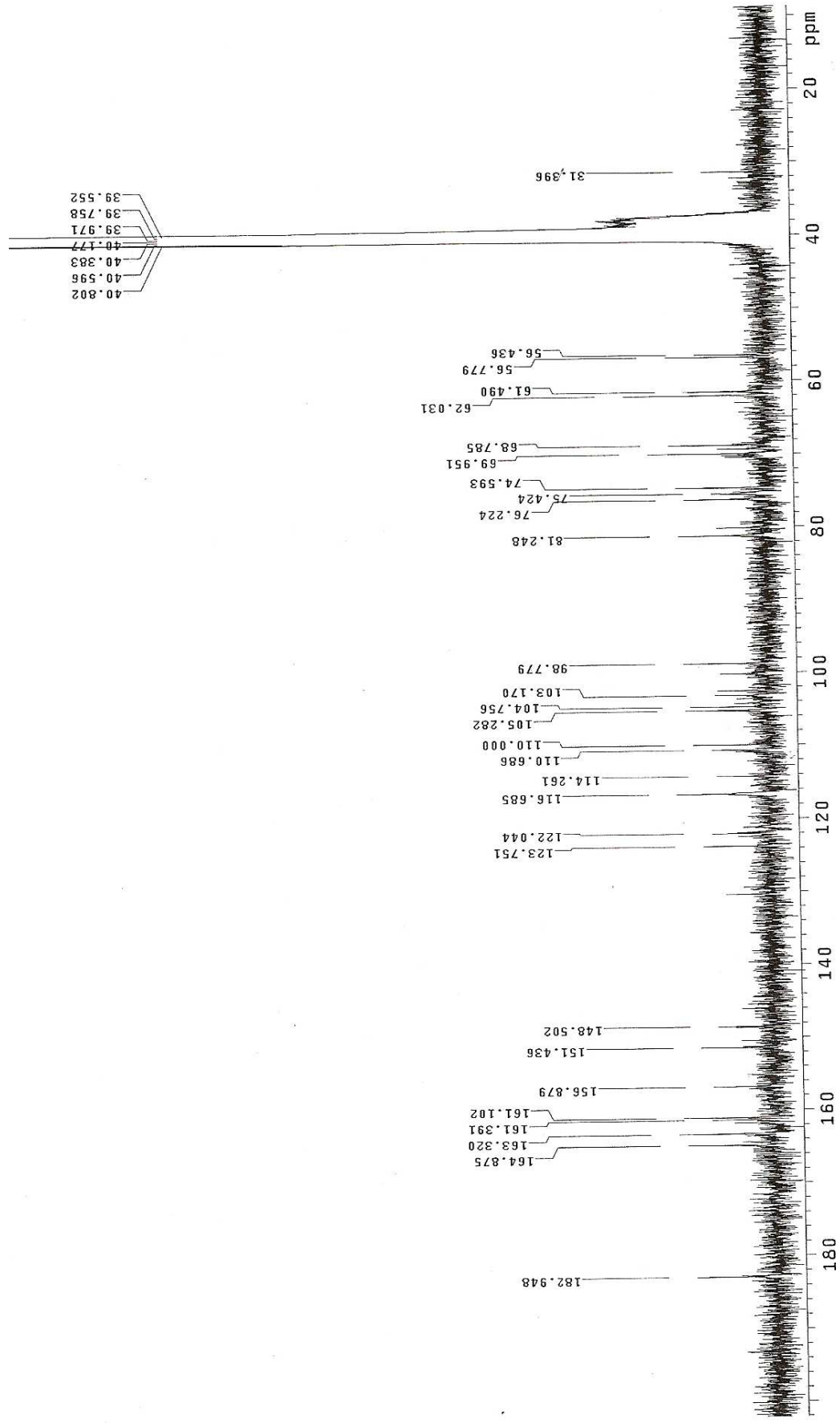


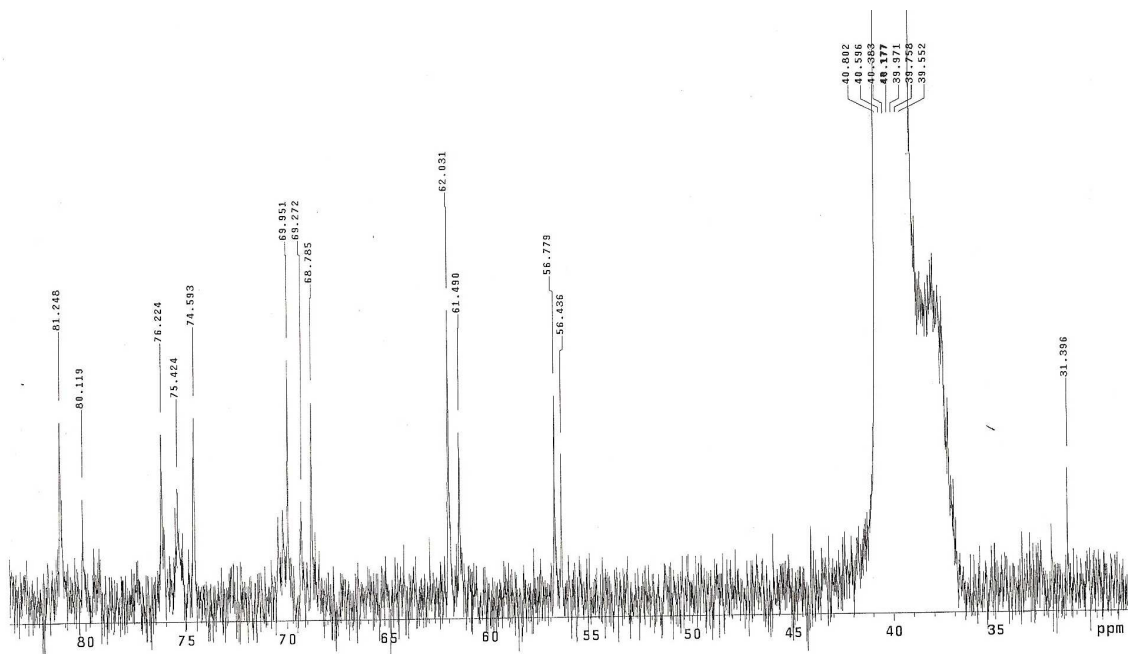
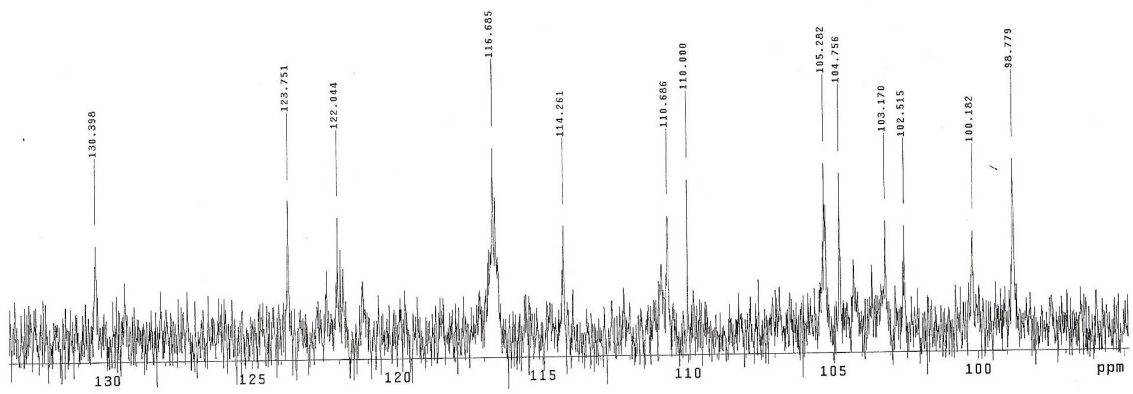
Anexo 2 - RMN ¹H para o composto 1 (DMSO)



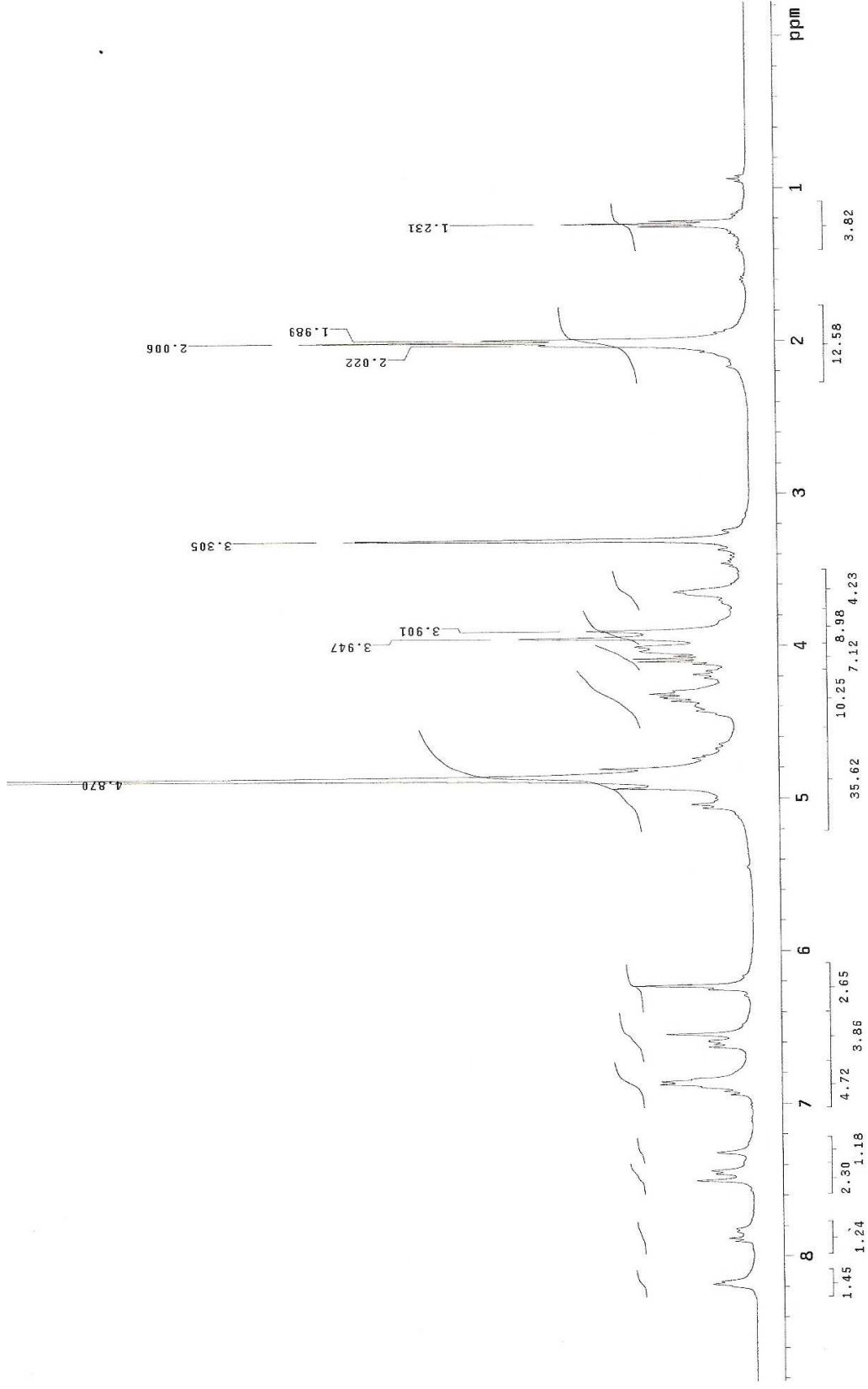


Anexo 3 - RMN ¹³C para o composto 1 (DMSO)





Anexo 4 - RMN ¹H para o composto 2 (CD₃OD)



Anexo 5 - RMN ¹³C para o composto 2 (CD₃OD)

