

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA MIGLIORINI URBAN DE LIMA

ESTUDO FITOQUÍMICO, TESTES BIOLÓGICOS, ENSAIOS FARMACOLÓGICOS
E ATIVIDADES HIPOGLICÊMICAS DE *Cantinoa althaeifolia* Pohl ex Benth Harley &
J. F. B. Pastore (LAMIACEAE)

CURITIBA

2021

AMANDA MIGLIORINI URBAN DE LIMA

ESTUDO FITOQUÍMICO, TESTES BIOLÓGICOS, ENSAIOS FARMACOLÓGICOS
E ATIVIDADES HIPOGLICÊMICAS DE *Cantinoa althaeifolia* Pohl ex Benth Harley &
J. F. B. Pastore (LAMIACEAE)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências
da Saúde da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2021

Lima, Amanda Migliorini Urban

Estudo fitoquímico, testes biológicos, ensaios farmacológicos e atividades hipoglicêmicas de *Cantinoa althaeifolia* Pohl ex Benth Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae) [recurso eletrônico] / Amanda Migliorini Urban Lima – Curitiba, 2021.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

1. Lamiaceae. 2. Toxicologia. 3. Antioxidante. 4. Diabetes mellitus. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AMANDA MIGLIORINI URBAN DE LIMA** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, TESTES BIOLÓGICOS, ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E ATIVIDADES HIPOGLICÊMICAS DE *Cantinoa althaeifolia* Pohl ex Benth Harley & J. F. B. Pastore (LAMIACEAE)**, que após terem inquirido a

aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 09:49:52.0

MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 09:31:56.0

CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 13:05:25.0

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 12:41:45.0

VINICIUS BEDNARCUK DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPOS DE
ANDRADE)

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 10:47:15.0

DANIELA GASPARDI FOLQUITTO

Avaliador Externo (CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DOS CAMPOS
GERAIS)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 108611

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 108611

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedicatória

A **Deus**, por ter me carregado sempre nas mãos e nunca me abandonado.

“Grande coisa é haver recebido do céu uma partícula da sabedoria, o dom de achar as relações das coisas, a faculdade de as comparar e o talento de concluir!”

Machado de Assis

Aos meus pais **Sérgio e Angélica**, pela vida, por terem me ensinado que tudo se consegue com esforço e sacrifício, por terem sempre a palavra certa para meu espírito, pelo colo, o abraço e o beijo a cada instante, por acompanharem meus passos e me acalmarem nas dificuldades. Amo muito vocês!

“Quem ama extremamente, deixa de viver em si e vive no que ama.”

Platão

Ao meu esposo **Luis Cassiano Urban Lazarini de Lima**, pelo seu amor incondicional, pela paciência, pelo comprometimento em me ajudar sem medir esforços e por compreender minha dedicação ao projeto de pesquisa!

“Eu sem você sou só desamor, um barco sem mar, um campo sem flor.”

Vinícius de Moraes

Às minhas irmãs **Vanessa e Tamara**, por todos os momentos fraternos, pelo apoio incondicional e pelo tamanho do amor que sentimos umas pelas outras. Amo vocês!

“Eu gosto de olhos que sorriem, de gestos que se desculpam, de toques que sabem conversar e de silêncios que se declaram.”

Machado de Assis

Aos meus sobrinhos **Pedro Henrique, Matheus e Eduarda**, pelo carinho, pelo amor e por me trazerem inspiração e alegria de viver.

“Eu sem você sou só desamor. Um barco sem mar, um campo sem flor. Tristeza que vai, tristeza que vem. Sem você, meu amor, eu não sou ninguém...”

Vinícius de Moraes

Aos meus cunhados **César, Mariana e Daniel**, pelos ensinamentos, disponibilidade, conselhos e pela amizade. Obrigada por me apoiarem, me ajudarem e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos difíceis durante esses quatro anos de Doutorado.

“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos.”

Sócrates

Aos meus sogros **Lourdes Lazarini de Lima e José Luiz de Lima Neto**, pelas mensagens de apoio, pelo amor demonstrado e pela confiança depositada em mim. Obrigada por acreditarem no meu potencial.

“Não desanime quando os seus esforços forem em vão, pois até o sol, ao nascer, faz um belo espetáculo”.

À memória da minha avó **Lourdes**, que mesmo por ter nos deixado no ano de 2013, eu sempre dedicarei minhas conquistas a ela. Te guardo sempre em minhas memórias e em meu coração. Te amarei eternamente.

“A vida não passa de uma oportunidade de encontro; só depois da morte se dá a junção; os corpos apenas têm o abraço, as almas têm o enlace.”

Victor Hugo

Dedico este trabalho

Agradecimentos especiais

À minha Orientadora **Profa Dra Marilis Dallarmi Miguel**, pela paciência, dedicação e tolerância, pela orientação minuciosa e detalhada desta Tese, por me ensinar que a paciência e a perseverança são fundamentais. A sua competência, como professora e pesquisadora, serve-me como exemplo e estímulo. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao meu Coorientador **Prof Dr. Obdúlio Gomes Miguel**, pela disponibilidade para responder minhas dúvidas, recebendo-me com carinho e nunca medindo esforços para me ouvir, por me contagiar a paixão pela Fitoquímica e pela valiosa contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade.

Agradecimentos

À **Universidade Federal do Paraná**, ao reitor **Prof. Dr. Ricardo Marcelo Fonseca**, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR, **Prof. Dr. Francisco de Assis Mendonça** e a Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, **Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel**, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e Setor de Ciências da Saúde da UFPR, **Profa Dra Marilis Dallarmi Miguel, Prof Dr Obdulio Gomes Miguel, Profa Dra Josiane de Fátima Gaspari Dias, Profa Dra Sandra Maria Warumby Zanin, Profa Dra Deise Prehs Montrucchio**, pelos ensinamentos, orientações, sugestões e carinho.

Aos Professores do Programa de Graduação em Farmácia, do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Odontologia e Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas da UEPG, **Profa Dra Carmen Ito, Prof Dr. Fabio André dos Santos, Profa Dra Vanessa Migliorini Urban, Prof Ms Luis Antônio Esmerino**, pelo carinho, atenção, disponibilidade e pela amizade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES)**, pelo suporte financeiro concedido na forma de Bolsa de Doutorado durante o transcorrer do Curso.

Aos funcionários, **Paulo Sérgio Diniz, Jean Paulo Godoi, Maria da Graça Teixeira de Toledo, Ednéia Hitomi de Araujo e Gustavo Pierin**. Obrigada pela prontidão e ensinamentos.

Aos meus queridos amigos do Programa, **Juliana Hernandez Girardi, Yohans José Martínéz Moncada, Samanta Golin, Ana Angélica Rigoni, Paula Moura Nunes,**

Carolina Sette Barboza, Marina Piltz, Caroline Gribner Larissa Gatto, Mirna Clemente e Luciana Gibbert, pela parcerias nos experimentos, pela amizade e carinho, pelos momentos de felicidade, pelas conversas, por se importarem comigo e serem o conforto para a saudade e pelas risadas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

*“Um amigo é aquele que sabe a canção de seu coração e pode cantá-la quando
você tiver esquecido a letra.”*

Júlio Ramón Ribeyro

RESUMO

O objetivo deste estudo foi compor a composição fitoquímica, investigar as propriedades toxicológicas, antioxidantes, microbiológicas e introduzir o farmacológico da espécie vegetal *C. althaeifolia* (Pohl ex Benth) Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae). Esta espécie não é endêmica no Brasil, mas se dispõem nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. As folhas e caule foram coletadas no bairro Boqueirão Município de Curitiba - Paraná, Brasil. O material foi seco em temperatura ambiente e armazenado para preparação dos extratos para os testes analíticos e biológicos. Na sequência, foi realizado o estudo fitoquímico onde foi confirmado a presença de esteroides, terpenos, flavonoides, cumarinas e taninos nas folhas e caule. Na extração do óleo vegetal, foi encontrado diversos componentes importantes, dentre eles, o cariofileno e o óxido de cariofileno, gama himachaleno, espatulenol e o pogostol que conferem atividades antioxidantes, antimicrobianas e toxicológicas que foram posteriormente confirmadas suas atividades nos ensaios biológicos e toxicológicos. Nas atividades frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e na atividade alelopática, não apresentaram toxicidade, neste último corrobora com o meio de vida da planta. Na atividade hemolítica, o óleo essencial apresentou maior toxicidade, depois as folhas e por último o caule que apresentou toxicidade apenas nas amostras mais polares. Na atividade antioxidante, no teste de compostos fenólicos totais, as amostras apresentaram um potencial antioxidante médio-alto, altas concentrações foram encontradas também na atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio e na atividade antioxidante por redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), as amostras menos polares obtiveram resultados mais próximos aos padrões testados. Para a análise microbiológica, foram testadas as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* inicialmente, onde apresentaram boa sensibilidade para as amostras testadas. Posteriormente, foram testadas as cepas *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida auris 01*, *Candida auris 02*, *Candida auris 03* e *Candida krusei*, a amostra da fração remanescente apresentou resistência a todos os microrganismos testados. Na análise toxicológica *in vitro*, foram testadas as linhagens celulares de Melanoma murinho (B16F10), Carcinoma de câncer de mama humano (MCF7), Leucemia mielóide crônica (K562) e Leucemia Linfoma de célula T (Jurkat) e como linhagem celular comparativa foi utilizada a linhagem celular de Fibroblasto murinho (3T3). As amostras apresentaram uma concentração inibitória (CI) de 50% de morte nas concentrações de 25 e 50 µg. No ensaio preliminar farmacológico, foram utilizados ratos wistar machos, foram separados em 6 grupos diferentes. A droga padrão utilizada foi a metformina. Foi administrado estreptozotocina para indução do diabetes mellitus. Foi analisado o índice de ingestão de água pós indução do diabetes mellitus e o aumento do consumo de ração pós indução do diabetes mellitus.

Palavras-chave: Lamiaceae. Atividades biológicas. Atividades toxicológicas. Atividades antioxidantes. Diabetes mellitus.

ABSTRACT

The aim of this study was to compose the phytochemical composition, investigate the toxicological, antioxidant, microbiological properties and introduce the pharmacological of the vegetable species *Cantinoa althaeifolia* (Pohl ex Benth) Harley & J. F. B. Pastory (Lamiaceae). This species is not endemic in Brazil, but is available in the Midwest, Southeast and South regions. The leaves and stem were collected in the neighborhood Boqueirão Municipality of Curitiba - Paraná, Brazil. The material was dried at room temperature and stored for the preparation of extracts for analytical and biological tests. Afterwards, a phytochemical study was carried out, where the presence of steroids, terpenes, flavonoids, coumarins and tannins in the leaves and stem was confirmed. In the extraction of vegetable oil, several important components were found, among them, the caryophyllene and caryophyllene oxide, himachalene range, spatulenol and pogostol that confer antioxidant, antimicrobial and toxicological activities that were subsequently confirmed in biological and toxicological tests. In the activities against the microcrustacean *Artemia salina* and in the allelopathic activity, they did not present toxicity, in the latter corroborates with the plant's livelihood. In hemolytic activity, the essential oil showed greater toxicity, then the leaves and finally the stem that showed toxicity only in the most polar samples. In the antioxidant activity, in the test of total phenolic compounds, the samples showed medium-high antioxidant potential, high concentrations were also found in the antioxidant activity by reduction of the phosphomolibdenum complex and in the antioxidant activity by reduction of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), the less polar samples obtained results closer to the tested standards. For the microbiological analysis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* strains were initially tested, where they showed good sensitivity for the tested samples. Subsequently, the strains *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida auris* 01, *Candida auris* 02, *Candida auris* 03 and *Candida krusei* were tested, the sample of the remaining fraction showed resistance to all tested microorganisms. In the in vitro toxicological analysis, the cell lines of murine Melanoma (B16F10), Human breast cancer carcinoma (MCF7), Chronic myeloid leukemia (K562) and Leukemia T-cell lymphoma (Jurkat) were tested and a comparative cell line was used. the murine Fibroblast cell line (3T3). The samples showed an inhibitory concentration (CI) of 50% of death at concentrations of 25 and 50 µg. In the preliminary pharmacological trial, male wistar rats were used, separated into 6 different groups. The standard drug used was metformin. Streptozotocin was administered to induce diabetes mellitus. The water intake index after diabetes mellitus induction and the increase in feed consumption after diabetes mellitus induction were analyzed.

Keywords: Lamiaceae. Biological activities. Toxicological activities. Antioxidant activities. Diabetes mellitus.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – FOTO ILUSTRATIVA DE <i>C. althaeifolia</i> EM SEU HABITAT.....	29
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>C. althaeifolia</i> NO BRASIL.....	30
FIGURA 3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <i>C. althaeifolia</i>	31
FIGURA 4 – PRINCIPAIS ROTAS DE BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	34
FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS BÁSICAS DE TANINOS HIDROLISÁVEIS.....	36
FIGURA 6 – MONÔMEROS BÁSICOS DE TANINOS CONDENSADOS.....	37
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DAS FASES DO ESTUDO COM A ESPÉCIE <i>C. althaeifolia</i>	46
FIGURA 8 – MATERIAL REPRODUZIDO PELA AUTORA SOBRE A ESPÉCIE <i>C. althaeifolia</i>	48
FIGURA 9 – OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO.....	53
FIGURA 10 – ESQUEMA DE DILUIÇÃO SERIADA.....	62
FIGURA 11 – ESQUEMA DE INOCULAÇÃO.....	63
FIGURA 12 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM <i>C. althaeifolia</i>	80
FIGURA 13 – COLUNA ABERTA DE SEPARAÇÃO SEPHADEX.....	84
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS.....	85
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA APÓS SCREENING.....	86
FIGURA 16 – ESPECTRO DA AMOSTRA DO PRECIPITADO POR EDI-MS NO MODO ÍON NEGATIVO POR INJEÇÃO DIRETA EM LOOP NA MASSA DE CAPTURA DE ÍONS.....	87

FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS.....	88
FIGURA 18 – CURVA DOS PADRÕES BHT, VITAMINA C E RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	103
FIGURA 19 – CURVA DAS FRAÇÕES EXTRATO BRUTO, HEXANO, CLOROFÓRMIO, AC. DE ETILA, REMANESCENTE, EXTRATO AQUOSO E PRECIPITADO DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	104
FIGURA 20 – CURVA DAS FRAÇÕES EXTRATO BRUTO, HEXANO, CLOROFÓRMIO, AC. ETILA, REMANESCENTE E EXTRATO AQUOSO DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	105
FIGURA 21 – GRÁFICO COMPARATIVO DOS DIFERENTES VALORES DE IC_{50} DE <i>C. althaeifolia</i> OBTIDOS PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	107
FIGURA 22 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM MCF7.....	112
FIGURA 23 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F19.....	113
FIGURA 24 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. althaeifolia</i>	113
FIGURA 25 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7.....	114
FIGURA 26 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10.....	114
FIGURA 27 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3.....	115
FIGURA 28 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7.....	115

FIGURA 29 – VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀ DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10.....	116
FIGURA 30 – VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀ DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3.....	116
FIGURA 31 – VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7.....	117
FIGURA 32 – VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10.....	117
FIGURA 33 – VIABILIDADE CELULAR E IC ₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3.....	118
FIGURA 34 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NAS LINHAS CELULARES NÃO TUMORAIS DE FIBROBLASTOS MURINO, 3T3, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> POR 24 HORAS.....	123
FIGURA 35 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NA LINHAGEM MCF7 DE ADENOCARCINOMA DE MAMA, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> POR 24 HORAS.....	124
FIGURA 36 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NA LINHAGEM DE TUMOR DE MELANOMA MURINHO B16F10, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE <i>C. althaeifolia</i> POR 24 HORAS.....	125

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DAS FOLHAS E CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	77
GRÁFICO 2 –	ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i>	91
GRÁFICO 3 –	ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE <i>C. althaeifolia</i>	91
GRÁFICO 4 –	INFLUÊNCIA PROVIENTES DAS FOLHAS DE <i>Cantinoa althaeifolia</i> QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS.....	96
GRÁFICO 5 –	INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS.....	97
GRÁFICO 6 –	INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS.....	98
GRÁFICO 7 –	INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS.....	99
GRÁFICO 8 –	TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR MCF7 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE <i>C. althaeifolia</i>	119
GRÁFICO 9 –	TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR B16F10 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE <i>C. althaeifolia</i>	120
GRÁFICO 10 –	TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR 3T3 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE <i>C. althaeifolia</i>	121

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DIVISÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	52
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	FAMÍLIA DAS PLANTAS QUE POSSUEM ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE.....	41
TABELA 2 –	COMPARAÇÃO ENTRE DIABETES TIPO 1 E 2.....	42
TABELA 3 –	RESUMO DOS EFEITOS DA INSULINA SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, LIPÍDEOS E PROTEÍNAS DO FÍGADO, MÚSCULO E TECIDO ADIPOSEO.....	43
TABELA 4 –	CONSTITUIÇÃO DA FASE MÓVEL, DO REVELADOR E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA CCD.....	54
TABELA 5 –	CONTROLES FARMACOLÓGICOS UTILIZADOS PARA CADA MICRORGANISMO.....	64
TABELA 6 –	PERDA POR DESSECAÇÃO, DE CINZAS TOTAIS E TEOR DE SÓLIDOS DE <i>C. althaeifolia</i>	74
TABELA 7 –	PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS E CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	76
TABELA 8 –	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS	79
TABELA 9 –	RENDIMENTOS OBTIDOS A PARTIR DE <i>C. althaeifolia</i>	82
TABELA 10 –	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS E CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> , EM ANÁLISE POR CCD.....	83
TABELA 11–	TAXA DE MORTALIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES FRENTE À <i>Artemia salina</i>	89
TABELA 12 –	RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i>	93
TABELA 13 –	RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> cv. GRAND RAPIDS TRATADS COM	

	CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTES DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	94
TABELA 14 –	QUANTIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO – EAG) NOS EXTRATOS BRUTO, AQUOSO, PRECIPITADO E FRAÇÕES DA ESPÉCIE <i>C. althaeifolia</i>	100
TABELA 15 –	RESULTADOS DO ENSAIO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO OBTIDA DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i> PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIDBÊNIO.....	101
TABELA 16 –	RESULTADOS DO ENSAIO DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDA DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i> PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIDBÊNIO.....	102
TABELA 17 –	RESULTADOS DE CL ₅₀ PARA A REDUÇÃO DO DPPH* DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO OBTIDAS DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i>	105
TABELA 18 –	RESULTADOS DE Cl ₅₀ PARA A REDUÇÃO DO DPPH* DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDAS DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	107
TABELA 19 –	REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PRECIPITADO OBTIDOS DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i>	108
TABELA 20 –	REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DO CAULE DE <i>C. althaeifolia</i>	109
TABELA 21 –	DISTRIBUIÇÃO DAS CIMS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. althaeifolia</i> TESTADAS CONTRA CEPAS DE REFERÊNCIA ATCC.....	110
TABELA 22 –	DISTRIBUIÇÃO DAS CIMS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>C. althaeifolia</i> TESTADAS CONTRA DIVERSAS CEPAS DE CANDIDA.....	110

TABELA 23 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS GRUPOS TESTADOS EM RATOS WISTARS.....	126
TABELA 24 – PARÂMETROS GLICÊMICOS E HEMOGLOBINA GLICADA EM ANIMAIS.....	127
TABELA 25 – CONSUMO MENSAL DE INGESTÃO DE ÁGUA E DA RAÇÃO.....	128

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.1.1	Objetivos específicos.....	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	FAMÍLIA LAMIACEAE.....	26
3.1.1	<i>Cantinoa althaeifolia</i>	29
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	32
3.2.1	Óleos essenciais.....	33
3.3	Taninos.....	34
3.4	Terpenos.....	37
3.5	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	38
3.5.1	Atividade farmacológica da família Lamiaceae.....	38
3.5.2	Modelo farmacológico.....	39
3.6	ASPECTOS HIPOGLICEMIANTES DA FAMÍLIA LAMIACEAE...	40
3.6.1	Diabetes Mellitus.....	41
4	METODOLOGIA	45
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	47
4.1.1	Coleta e identificação do material vegetal.....	47
4.2	PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	48
4.3	ENSAIOS DE PUREZA.....	49
4.3.1	Determinação da perda de água por dessecação.....	49
4.3.2	Determinação das cinzas totais.....	49
4.3.3	Determinação do teor de sólidos.....	50
4.3.4	Análise térmica.....	50
4.4	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	50
4.4.1	Composição química do óleo essencial de <i>C. althaeifolia</i>	51
4.5	EXTRATOS.....	51
4.5.1	Obtenção dos extratos etanólicos bruto.....	52
4.5.2	Screening fitoquímico por cromatografia de camada delgada (CCD).....	53

4.5.3	Isolamento por coluna cromatográfica aberta (CC) e identificação de substâncias.....	55
4.5.4	Processo de separação de compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	55
4.5.5	Espectroscopia de massas.....	56
4.5.6	Fracionamento do extrato bruto das folhas e do caule.....	56
4.5.7	Ressonância magnética nuclear.....	56
5	ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS.....	57
5.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	57
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	57
5.2.1	Testa da atividade hemolítica com hemácias em suspensão.....	57
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	58
5.3.1	Teste de germinação dos extratos, frações e precipitado.....	58
5.3.2	Teste de crescimento dos extratos, frações e precipitado.....	59
5.3.3	Teste de germinação em óleo essencial.....	59
5.3.4	Teste de crescimento do óleo essencial.....	59
5.3.5	Análise estatística.....	59
6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	60
6.1	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	60
6.2	REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	60
6.3	REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	60
6.4	MÉTODOS DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICOS (TBARS).....	61
7	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	61
7.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	61
7.1.1	Solução Estoque (SE) e diluição dos extratos e frações.....	62
7.1.2	Microrganismos e Inóculo Microbiano.....	62
7.1.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	64
7.2	ENSAIO CITOTÓXICO.....	65
7.2.1	Linhagens tumorais.....	65

7.2.1.1	Células aderentes.....	65
7.2.1.2	Ensaio de viabilidade com MTT.....	65
7.2.1.3	Cálculo da Concentração Inibitória Mínima IC ₅₀	66
7.2.1.4	Cálculo de Índice de Seletividade.....	66
7.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	67
7.3.1	Células em suspensão.....	67
7.3.1.1	Ensaio de integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan.....	67
7.3.1.2	Ensaio de viabilidade com MTT.....	68
8	TESTE PRELIMINAR FARMACOLÓGICO.....	68
8.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	68
8.2	ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS COM ESTREPTOZOTOCINA.....	69
8.2.1	Análises Bioquímicas.....	70
8.2.2	Análise Histopatológica.....	71
8.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
9.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL.....	74
9.1.2	Análise Termogravimétrica (TG).....	75
9.2	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>C. althaeifolia</i>	78
9.3	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	81
9.3.1	Screening fitoquímico por cromatografia de camada delgada (CCD).....	82
9.3.2	Isolamento e identificação de compostos por coluna Sephadex	84
9.3.3	Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	84
9.3.4	Isolamento e identificação de compostos por espectroscopia de massas.....	86
9.3.5	Isolamento e identificação de compostos por RMN.....	87
9.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	88
9.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	90
9.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	92

9.7	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS – TESTE DE FOLIN-CIOCALTEU.....	99
9.8	REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	100
9.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	102
9.10	MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICOS (TBARS).....	108
9.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	109
9.12	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO MITOCONDRIAL DE MTT.....	112
9.12.1	Análise morfológica.....	121
10	TESTES PRELIMINARES FARMACOLÓGICOS.....	126
11	CONCLUSÕES.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estimativas, cerca de 70.000 espécies de plantas são utilizadas para fins medicinais em todo o mundo. Os efeitos dos extratos das plantas têm sido estudados abundantemente em diversos testes, incluindo testes para dor, hipoglicêmicos, antitumorais e antiinflamatórios (URITU et al, 2020). A inserção desses fitoativos na medicina está cada vez mais crescente e o seu completo interesse está progressivo (YANG et al, 2020).

Por muito tempo, a raça humana usou plantas medicinais para fins terapêuticos, na alimentação e em outras indústrias. Com o uso crescente das plantas medicinais, técnicas clássicas de biotecnologia têm sido exploradas e criou-se então a necessidade de aplicar métodos de melhoramento baseados em biotecnologia (BBBMs) mais rápidos a essas plantas de interesse. A avaliação da diversidade genética, conservação, proliferação e superprodução são as principais maneiras pelas quais a genética e a biotecnologia podem ajudar a melhorar mais rapidamente as plantas medicinais. A cultura de tecidos vegetais desempenha um papel importante como plataforma para a aplicação de outros BBBMs em plantas medicinais. O grande uso na indústria farmacêutica, criou-se a necessidade de validar os processos de desenvolvimento de fitoterápicos, aumentando o estímulo a pesquisas com plantas, como seus usos e aplicações, para obter eficiência e segurança terapêutica, pois trata-se de medicamentos de origem complexa (NIAZIAN, 2019).

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade do planeta, que associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um inestimável conhecimento tradicional associado ao uso de plantas com fins medicinais, possui também um potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas oportunas. Segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população global ainda depende de drogas botânicas, vários medicamentos devem sua origem a medicamentos de plantas (SEN; SAMANTA, 2015).

A família Lamiaceae, possui espécies que são amplamente utilizadas, como o uso de óleos essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Marrubis*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, entre outras), tanto para utilização em cosméticos, como condimentos, aromático e/ou medicinal e também são cultivadas

como plantas ornamentais (SOUZA; LORENZI, 2012). Possuem substâncias com ampla variedade estrutural, apresentando esteroides, flavonoides, iridóides e terpenóides, atribuindo assim, várias atividades como: antitumoral, anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana), anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, dentre outras (LEMES; FERRI, 2011).

O conhecimento taxonômico das angiospermas brasileiras, principalmente nas Regiões Sul, Sudeste e Nordeste, contudo, em algumas áreas da Floresta Atlântica, os estudos ainda não são suficientes (MARTINELLI et al., 2008).

C. althaeifolia, possui apenas estudo taxonômico, sendo assim, promissor para o desbravamento desta espécie. Isto posto, visando buscar novos produtos da biodiversidade brasileira, foram iniciados os estudos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos conduzidos com extratos, frações, sub - fração e óleo essencial de *C. althaeifolia* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore da família Lamiaceae para a detecção da presença de compostos com potencial medicinal, contribuindo para a correta identificação e caracterização da planta em estudo.

Em Dezembro de 2019, uma doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, se espalhou pelo mundo e até Abril de 2020, mais de 1,6 milhões de casos foram confirmados no total e quase 100.000 mortes foram identificadas em todo o mundo. Tudo começou em Wuhan, província de Hubei, na China e, portanto, praticamente, todos dados clínicos relevantes vêm da China. Essas descobertas estão mostrando que hipertensão arterial, diabetes, doenças cardiovasculares e doença pulmonar obstrutiva crônica são comuns comorbidades em pacientes com COVID-19 (TADIC et al, 2020).

O presente estudo se justifica pela necessidade de novos agentes hipoglicemiantes e antitumorais mais seletivos e da espécie *C. althaeifolia* possuir pouco estudo, a torna de interesse, correlacionando também inúmeros estudos promissores com outras espécies da família Lamiaceae.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica, propriedades toxicológicas e atividades antioxidantes, atividades microbiológicas e propriedades farmacológicas da espécie *C. althaeifolia* (Pohl ex Benth.) Harley & J. F. B. Pastory, Lamiaceae.

2.1.1 Objetivos específicos

- Extrair e identificar os compostos químicos do óleo essencial de *C. althaeifolia*;
- Investigar a composição fitoquímica preliminar;
- Isolar os compostos presentes nas frações por meio de técnicas cromatográficas;
- Identificar os compostos isolados por CLAE – MS;
- Identificar compostos por ressonância magnética nuclear RMN;
- Avaliar a toxicidade frente ao crustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade hemolítica com hemácias em suspensão;
- Avaliar a capacidade alelopática;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais;
- Avaliar a propriedade antioxidante pelo método de sequestro de radicais DPPH; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pelo ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar a atividade antibacteriana;
- Avaliar atividade citotóxica *in vitro* e
- Avaliar a atividade antiglicêmica *in vivo*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae inclui cerca de 240 gêneros e 7.200 espécies com distribuição cosmopolita (HARLEY; PASTORE, 2012). Ocorre principalmente em lugares abertos e em quase todos os tipos de habitats e em todas as altitudes, do Ártico ao Himalaia, do sudeste da Ásia ao Havaí; na Austrália, África, e de norte a sul no Novo Mundo, sendo o Mediterrâneo e a Ásia Central as regiões de maior concentração de espécies (HEYWOOD, 1979; SUDDE, 2016). No Brasil, ocorrem 34 gêneros nativos e cerca de 496 espécies (HARLEY, et al., 2010), muitas delas introduzidas como ornamentais ou para usos na culinária e até como madeira (HARLEY; FRANÇA, 2009).

Está posicionada no clado Euasteridae I, grupo Lamiídeas, ordem Lamiales e apresenta sete subfamílias: Ajugoideae Kosteletzky, Lamioideae Harley, Nepetoideae Kosteletzky, Prostantheroideae Luerson, Scutellarioideae Caruel, Symphorematoideae Briquet e Viticoideae Briquet. A subfamília Nepetoideae é monofilética e apresenta estilete completamente ginobásico, suportado por pólen hexacolpados, endosperma ausente e seus óleos essenciais são constituídos por terpenoides muito voláteis e sequência de *rbcL* (ribulose – 1,5 – bisfosfato carboxilase/oxigenasse) (JUDD et al., 2009), utilizado como um sistema de DNA Barcode e presente no DNA dos cloroplastos das plantas, sendo o responsável pela produção subunidade maior da que converte dióxido de carbono e água em carboidratos. Esta subfamília é dividida em treze tribos: Nepeteae, Prunelleae, Glechoneae, Mentheae Rosmarineae, Lavanduleae, Hormineae, Monardeae, Salviae, Meriandreae, Lepechinieae Elsholtzieae, Ocimeae e três subtribos: Hyptidinae, Plectranthinae e Ociminae.

A tribo Ocimeae é caracterizada por apresentar estames declinados e anteras sintecas; possui aproximadamente 35 gêneros e cerca de 1.000 espécies, distribuída principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo seus principais centros de diversidade a América do Sul, a África Tropical, Madagascar e a China (PATON; RYDING, 1998).

A subtribo Hyptidinae é determinada por flores dispostas em cimeiras bracteoladas de diferentes tipos e os estames de currentes estão protegidos no lobo inferior da corola, sendo essa qualidade atribuída ao mecanismo de polinização reprodutiva (HARLEY, 1971). A subtribo consiste de núculas com auréolas expandidas (PATON; RYDING, 1998). Compreende de dezenove gêneros neotropicais: *Asterohyptis* Epling, *Physominthe* Harley & J.F.B. Pastore, *Hypenia* (Mart. ex Benth.) Harley, *Eriope* Humb. & Bonpl. ex Benth., *Eriopidion* Harley, *Marsypianthes* Mart. ex Benth., *Rhaphiodon* Schauer, *Oocephalus* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Medusantha* Harley & J.F.B. Pastore ex Benth., *Hyptis* Jacq., *Cyanocephalus* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Martianthus* Harley & J.F.B. Pastore, *Hyptidendron* Harley, *Leptohyptis* Harley & J.F.B. Pastore, *Condea* Adans., *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore, *Gymneia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Cantinoa* Harley & J.F.B. Pastore e *Mesosphaerum* P. Browne.

As espécies pertencentes a esta família manifestam diversas formas, regularmente arbustos, subarbustos, ervas, esporádicas trepadeiras ou árvores que podem ser perenes, bienais ou anuais. Suas folhas são opostas decussadas ou verticiladas, simples ou compostas, podendo ser inteiras, denteadas ou lobadas, pecioladas ou sésseis e sem estípulas (HARLEY, et al., 2004).

Geralmente, as inflorescências são vistosas, axilares ou terminais, com ramos cimosos. As flores são andróginas, diclamídeas e zigomorfas. O cálice possui cinco sépalas unidas e persistentes, podendo ser tubuloso, campanulado ou infundiforme, com ápice bilabiado ou 5-10 denteado ou lobado. A corola tem cinco pétalas unidas, podendo ser tubulosa, campanulada ou infundiforme, com o ápice bilabiado. O androceu possui quatro ou dois estames que estão inseridos no tubo da corola, os filetes são livres entre si, retos ou curvos e as anteras apresentam uma ou duas tecas. O gineceu é bicarpelar, sincárpico, com quatro lóculos, dois óvulos em cada carpelo, o ovário é súpero e apresenta um estilete do tipo ginobásico e dois estigmas. Na família Lamiaceae, o fruto é denominado núcula (BENTHAM, 1832-1836; HARLEY, et al., 2004). A polinização é prestada por animais, precipuamente por vários insetos (HARLEY, et al., 2004).

As espécies da família Lamiaceae são conhecidas por apresentarem óleos essenciais presentes nos tricomas glandulares e nas superfícies das folhas e nas inflorescências (HARLEY, et al., 2004). Os óleos voláteis consistem de

monoterpenóides, diterpenoides e sesquiterpenoides. Uma das classes de terpenoides mais vista nesta família são os diterpenoides, onde, vários destes compostos denotam características antibacteriana e antifúngica (HARLEY, et al., 2004; RICHARDSON, 1992). Os ácidos ursólico e oleanólico que fazem parte dos triterpênicos, também são frequentemente encontrados na família Lamiaceae (BRUNETON, 2001). Vários estudos com espécies de Lamiaceae revelaram que alguns compostos químicos presentes neste gênero podem estar envolvidos na atividades antiedematogênica (COSTA, et al., 2008) e antifúngica (LEMES, et al., 2011), além de apresentarem atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral (DALLA VECHIA, et al., 2009), antineoplásica (TOKUDA, et al., 1986) e hepatoprotetora (SARASWAT, et al., 1996). Constituintes fenólicos, do mesmo modo, são encontrados na família Lamiaceae, como o estéres do ácido caféico, a exemplo do ácido rosmarínico (HARLEY, et al., 2004; RICHARDSON, 1992), sendo que, o ácido rosmarínico demonstrou atividades com ações farmacológicas, tais como, antibacteriana, anticomedogênica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e neuroprotetora (PETERSEN, 1997).

A família Lamiaceae também evidencia por sua importância econômica e é muito utilizada para fins culinários, como por exemplo: *Ocimum basilicum* L. (alfavaca), *Ornithoglossum vulgare* L. (orégano), *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho); na perfumaria como *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda, alfavaca); na preparação de bebidas, refrescos ou chás como *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), *Mentha* spp. (hortelã) e *Salvia hispanica* L. (sálvia-azul) e *Salvia splendens* Sellow ex Roem. & Schult. (sangue-de-adão) (HARLEY, et al., 2004), e na medicina popular, a *M. piperita*, é utilizada para alívio da congestão nasal e sinusite e externamente como analgésico em reumatismos (NUÑEZ; OBÓN DE CASTRO, 1992). Já a população nativa representando a América do Norte, prepara a hortelã-pimenta para o tratamento de distúrbios neurológicos, cardíacos, respiratórios e gastrointestinais (também utilizado pela população da América do Sul) (HARLEY; REYNOLDS, 1992). No estado de Minas Gerais/Brasil, *Leonurus sibiricus* L. (macaé) é utilizada no tratamento da bronquite, *M. officinalis* como digestivo e calmante, *Mentha arvensis* L. (vick) contra congestão nasal, *M. pulegium* como calmante e contra a gripe e *O. basilicum* na constipação (OLIVEIRA, et al., 2010).

3.1.1 *Cantinoa althaeifolia*

C. althaeifolia (FIGURA 1) é da família Lamiaceae Martinov, possui forma de vida de arbusto e subarbusto e substrato terrícola. Não existem estudos relacionados a este gênero.

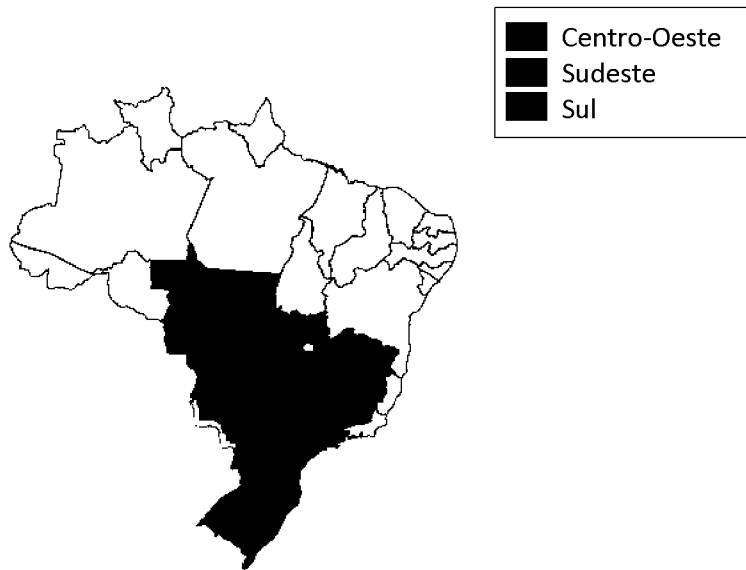
FIGURA 1 - FOTO ILUSTRATIVA DA *Cantinoa althaeifolia* EM SEU HABITAT



FONTE: a autora (2018).

Possui sinônimos tais como *Hyptis althaeifolia* Pohl ex Benth., *Hyptis althaeifolia* Pohl ex Benth., heterotípicos tais como *Hyptisvestita* Benth., *Hyptisvestita* var. *tomentosa* J.A. Schmidt e *Mesosphaerum vestitum* (Benth.) Kuntze e homotípico *Mesosphaerum althaeifolium* Kuntze (HARLEY et al., 2004).

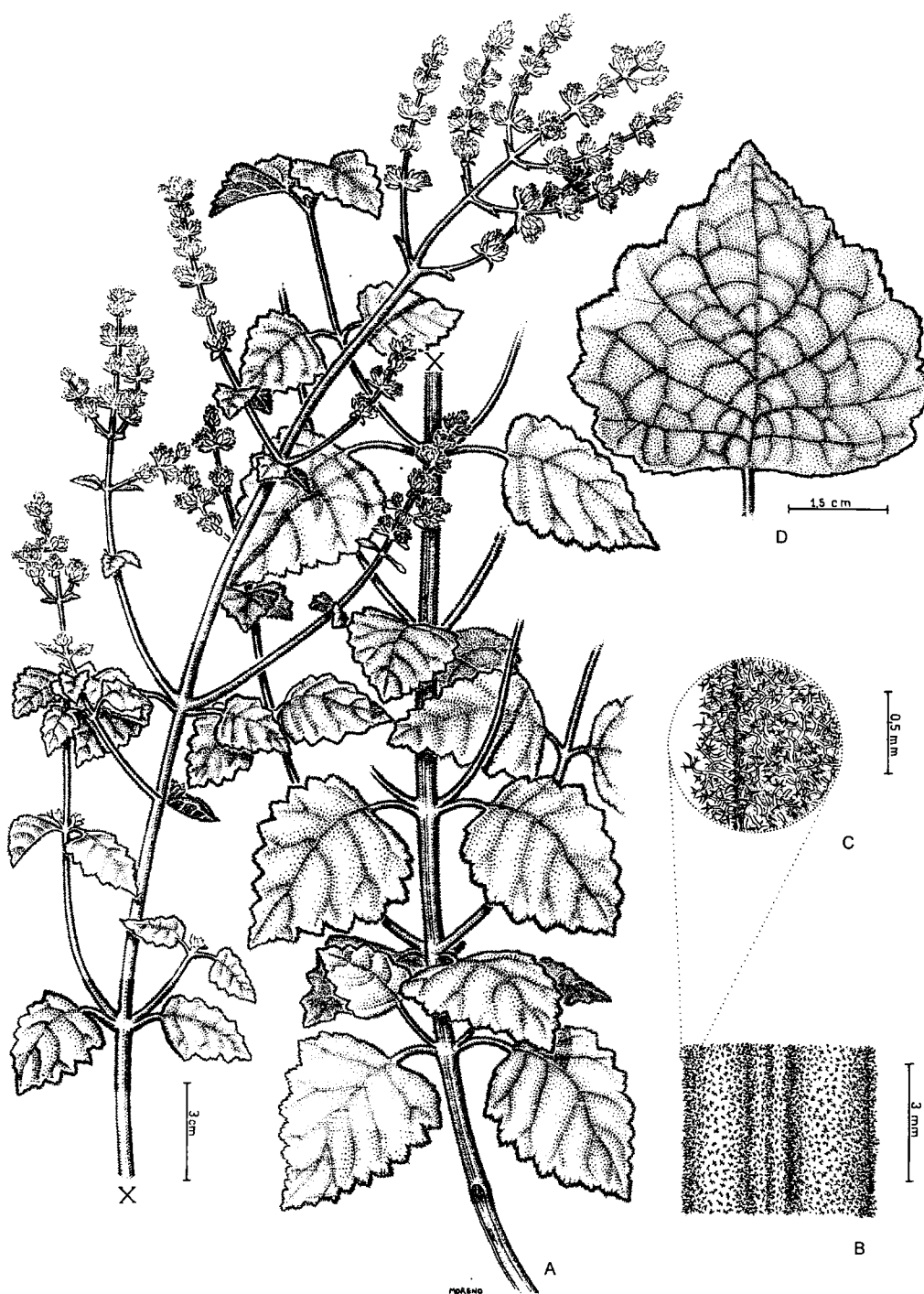
Sua distribuição geográfica com ocorrências confirmadas são: Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) mostradas na FIGURA 2.

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *C. althaeifolia* NO BRASIL

FONTE: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB132549> (2016).

Possui subarbusto aromático, medindo entre 1 – 1,8 metros de altura, com pubescência densamente lanosa, com pêlos dendóides presentes no caule e nas folhas. Suas folhas possuem pecíolo, medindo entre 1 – 2,5 cm de comprimento, apresentam lâmina ovalada medindo entre 3,5 – 8,0 x 3 – 7 cm, ápice agudo ou obtuso, possui cordão, base truncada ou redonda, possui margem irregularmente serrilhada e ambas superfícies são densamente pubescentes com pêlos dendóides. Suas flores são agrupadas em 20 cymes floridos, cercado por um involúcro de numerosas bractéolas medindo entre 2,5 a 5 mm de comprimento, extensor lanoso e inferior glabro. Cymes dispostas em panículas ramificadas medindo entre 5 a 15 cm de comprimento. Apresenta cálice com 2 – 5,5 mm de comprimento, dentes medindo 0,5 mm parcialmente ou totalmente obsolentos, são densamente lanosos com glândulas sésseis dispersas (FIGURA 3) (HARLEY; PASTORE, 2012).

FIGURA 3 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE *C. althaeifolia* (HARLEY; PASTORE, 2012)



Nota: *C. althaeifolia* (Pohl ex Benth) Harley e Pastore. A – ramo da planta. B – caule pubescência. C – detalhe da pubescência do caule. D – Folha, superfície adaxial.

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A designação de metabolismo se dá ao conjunto das transformações das moléculas orgânicas nas células vivas, catalisadas por enzimas específicas, tendo como função compor o organismo de energia, modificar suas moléculas e assegurar a continuidade do estado organizado. A presença dessas enzimas específicas possibilita uma determinada orientação a essas transformações, denominando-as de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados e degradados são intitulados de metabólitos e são divididos em dois grandes grupos, os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são os carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras substâncias importantes que participam da nutrição e dos processos metabólitos vitais à manutenção da vida do organismo e os compostos secundários que são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (SIMÕES, 2007). Após os metabólitos primários, o grupo originado em seguida são os metabólitos secundários, correntemente produzidos em pequenas quantidades, possuindo características químicas muito variadas e pouco definidas, não os tornando menos importantes (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários por diversos anos, foram apontados como produtos de excreção do vegetal, sem nenhuma vantagem biológica, porém, com os estudos relacionados à plantas, se tem encontrado muito sobre a finalidade dessas substâncias, tais como, a utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seus papéis como intercessores das interações entre as plantas e outros organismos (alelopatia) (SIMÕES, 2007). Esses metabolismos produzidos pelas plantas provêm do metabolismo da glicose, via de dois principais intermediários: o ácido chiquímico e o acetil-CoA (acetilcoenzima A), formando os alcaloides, os flavonoides, as cumarinas, os taninos, as quinonas, os óleos essenciais (constituídos basicamente de terpenos e fenilpropanoides), entre outros (FIGURA 4) (SIMÕES, 2007).

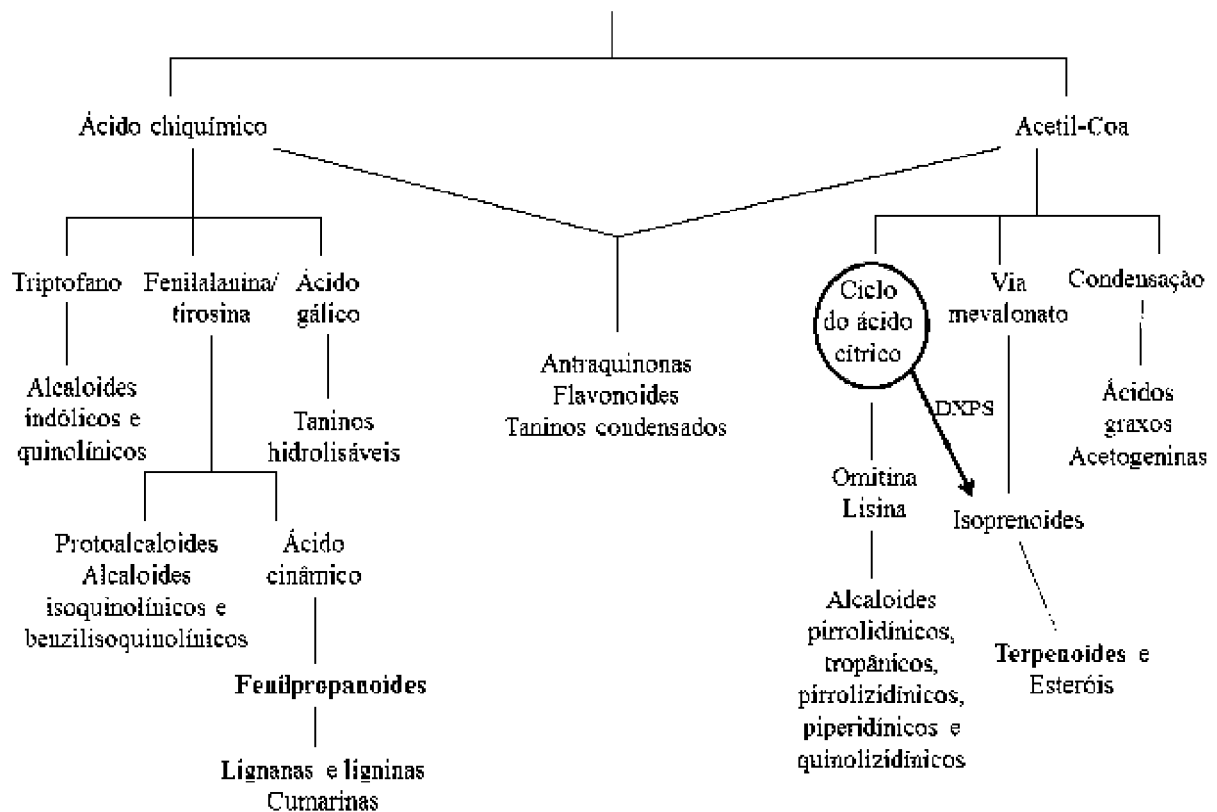
3.2.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são delineados como produtos adquiridos das plantas ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água); ou de pericarpos de fruto cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento (BRAGANÇA, et al., 2007). São também nomeados óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por apresentarem aspecto oleoso à temperatura ambiente. São incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos essenciais que demonstram alto teor de azuleno, como o de camomila e mil-folhas (SIMÕES, 2007). Por definição, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas lipofílicas, comumente odoríferas e líquidas, possuem elevada volatilidade, instabilidade na presença de luz, de oxigênio, de substâncias oxidantes e redutoras, em meios com pH extremos, ou na presença de traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Os óleos essenciais são amplamente estudados, pelo seu aroma e por possibilitar sabor aos alimentos e bebidas. Também são apreciados por serem produtos naturais. Apresentam diversas propriedades funcionais, entre elas, antibacterianas, antifúngicas, inseticida, alelopática, antiparasitária, sequestradora de radicais, anti-inflamatória, antiproliferativa e outras (SACCHETTI, et al., 2005).

Nas famílias Lamiaceae e Verbenaceae, os óleos essenciais encontram-se armazenados nos pelos ou tricomas glandulares, nas famílias da Lauraceae, Piperaceae e Poaceae, os óleos essenciais são encontrados nas células parenquimáticas diferenciadas, na família Apiaceae, são encontrados nos canais oleíferos e nas famílias Pinaceae e Rutaceae, os óleos essenciais são encontrados em bolsas lisígenas e esquizolisígenas (SIMÕES, 2007).

FIGURA 4 – PRINCIPAIS ROTAS DE BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS



FONTE: (SIMÕES, 2007 – com alterações).

Podem ser encontradas nas folhas, caules e flores (SVOBODA; GREENAWAY, 2003), e mostram três tipos: o glandular capitado (com pedúnculo alongado e cabeça secretora), o glandular peltado (sem pedúnculo ou com pedúnculo reduzido) e o tricoma não glandular (constituído de uma célula basal em nível com a epiderme e de quatro a cinco células intermediárias esclerenquimatosas e uma longa célula apical) (COMBRINCK, et al., 2007).

3.3 Taninos

Alguns metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, tais como, alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, entre outros, estão envolvidos principalmente em mecanismos de defesa vegetal contra herbívoros, microrganismos, proteção contra raios UV (ultravioleta) e atração de polinizadores e/ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990).

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água, possui massa molecular entre 500 e 3.000 Daltons, as quais apresentam a competência de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962). Esta propriedade os distingue dos demais compostos fenólicos, ou seja, a formação de complexos com alcaloides, proteínas e alguns polissacarídeos, formando precipitados (HAGERMAN, 1992).

Historicamente, a relevância das plantas ricas em taninos, está diretamente ligada às suas propriedades de transformar a pele do animal em couro (SANTOS; MELLO, 2003). O termo tanino foi dado à infusão de cascas de árvores como o carvalho e a castanheira, na qual, peles de animais eram tratadas para a messe de couros maleáveis e de grande durabilidade (QUEIROS, et al., 2002).

Este composto fenólico se encontra difundido em plantas e alimentos de origem vegetal, tais como, frutas, sementes, legumes, cereais, grãos e bebidas (vinho, chá, cidra, cacau) (BUELGA; SCALBERT, 2000). Os taninos denotam gosto amargo e adstringente e estão presentes em raízes, folhas, cascas, flores, fruto e na madeira de várias espécies vegetais e sua relevância nas plantas se dá pela sua defesa contra animais. Causam diminuição da palatabilidade, dificuldade na digestão através da complexação com enzimas e/ou proteínas, impedindo assim, a invasão dos vegetais por parasitas (BATE-SMITH, 1973).

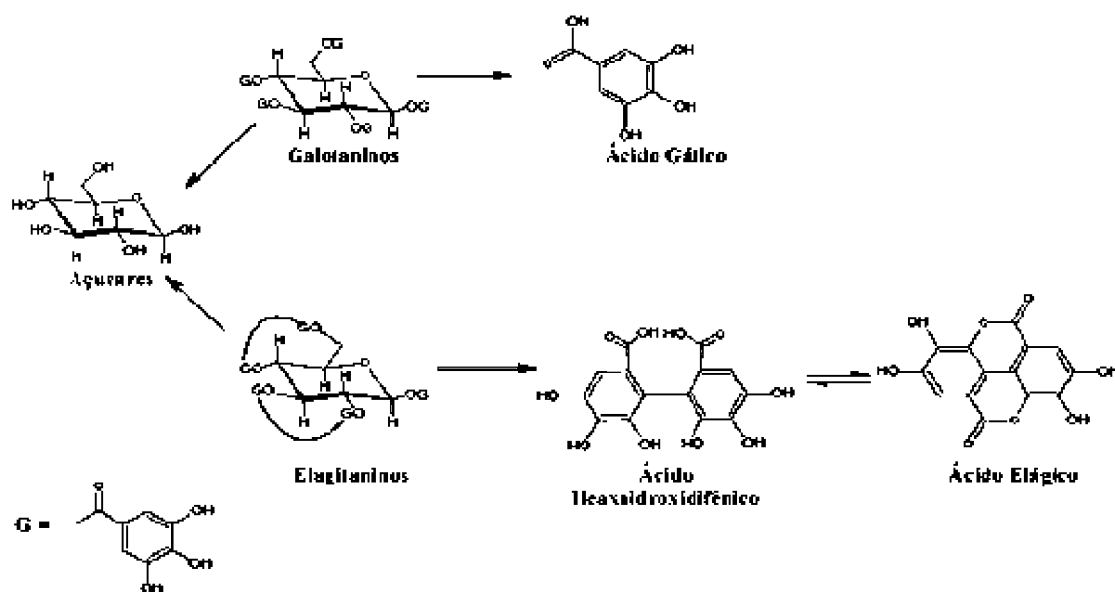
Os taninos são classificados de acordo com a sua estrutura química, em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por possuir um poliol central, comumente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico e são intitulados de galotaninos. Os denominados elagitaninos dispõem de um ou dois resíduos de hexa-hidróxi-difenoil-D-glicose (HHDP), onde são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes (SANTOS; MELLO, 2003).

A FIGURA 5 denota os galotaninos produzindo ácido gálico após a hidrólise e os elagitaninos produzindo ácido elágico após sua hidrólise.

Os taninos condensados são classificados como flavonoides poliméricos, oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades: flavan-3-ol e flavan-3-4-diol. Possuem também outras denominações, tais como, proantocianidinas ou leucocianidinas (HASLAM, et al., 1975). Dispõem desta

denominação devida às características dos taninos condensados (ou proantocianidinas) de formarem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído a quente (BUELGA; SCALBERT, 2000; SANTOS; MELLO, 2003).

FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS BÁSICAS DE TANINOS HIDROLISÁVEIS

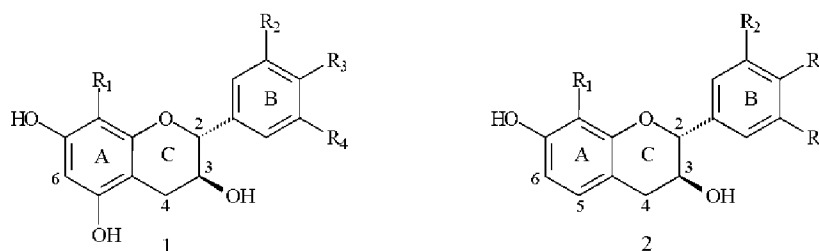


FONTE: (QUEIROS, et al., 2002).

Estruturalmente se diferem entre si de acordo com o número de grupos hidroxila presentes nos anéis aromáticos e da estereoquímica do carbono assimétrico do núcleo heterocíclico. A ocorrência de O-metoxilação, O-glicosilação e O-galoilação aumentam a complexidade estrutural (DE BRUYNE, et al., 1999).

Os taninos condensados são divididos em tipo 1 e tipo 2, conforme a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A e também podem ser classificados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos (FIGURA 6) (SANTOS; MELLO, 2003).

FIGURA 6 – MONÔMEROS BÁSICOS DE TANINOS CONDENSADOS



Tipo	Proantocianidina	Monômero	Substituinte			
		Nome trivial	R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargonidina	Afzelequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelfinidina	Galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacinidina	Oritina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

FONTE: (SANTOS; MELLO, 2003).

3.4 Terpenos

Uma das maiores e mais variadas classes de metabolitos secundários é representada pelos terpenos. Sua enorme diversidade estrutural de compostos garante diversas atividades, tais como, ação neutrófica, citotóxica e anti-malarial, por exemplo. Desde o início da humanidade, os terpenos foram e continuam sendo utilizados especificamente como fragrâncias, hormônios, fármacos e materiais (borracha natural). Desde então, são utilizados para pesquisas em diversos ambientes, acadêmico e/ou industrial (MAIMONE; BARAN, 2007).

Na biossíntese dos terpenos, a natureza constitui de uma maneira própria em elaborar esses produtos naturais, o esqueleto carbônico dos terpenos é formado pela conexão de duas unidades isoprenóides básicas, o IPP (pirofosfato de isopentenila) e o DMAPP (pirofosfato de dimetilalila). As três principais abordagens na obtenção de terpenos complexos, se baseiam nos princípios de análise retrossintética: a primeira abordagem utiliza a lógica padrão para o planejamento sintético, em que ligações estratégicas são desconectadas sequencialmente até a identificação de um material de partida adequado. Essa estratégia se apoia bastante em transformações já conhecidas. A segunda vertente se baseia na identificação de um fragmento do

produto natural que possa ser construído por uma nova metodologia, mostrando sua utilidade sintética. Na terceira abordagem, busca-se uma correlação entre o alvo complexo e um terpeno mais simples comercialmente disponível. Exemplos de terpenos simples e complexos: Prenol, Isoprenol, Geraniol, Acetato de geranila, Nerol, Acetato de nerila, Citral, Linalol, β -Citronelol, Ocimeno, Farnesol, Carvacrol, Carvona, Limoneno, Felandreno, Álcool perilico, Perialdeído, Mentol, Pulegona, Esclareolídeo, Valenceno, α -Santonina, Óxido de Cariofileno, Progesterona, β -Sitosterol e Colesterol (BRILL, et al., 2017).

Duas rotas biossintéticas são descritas para a preparação destes blocos a partir de intermediários gerados na glicólise: uma rota se inicia com acetilcoenzima A, enquanto a outra utiliza ácido pirúvico como material de partida (LIN, et al., 2020).

3.5 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

3.5.1 Atividade Farmacológica da família Lamiaceae

As plantas do gênero *Thymus* são usadas tradicionalmente como chás de ervas, condimentos culinários e analgésicos, anti-reumáticos, anti-sépticos, agentes adstringentes e diuréticos. Além disso, as plantas são consideradas uma fonte importante de óleos essenciais e de óleo de tomilho, com suas diversas propriedades biológicas, incluindo antioxidantes, antibacterianos, propriedades antimicóticas e que retardam a idade, estão incluídas nos dez principais óleos essenciais do mundo (ZIANI, et al., 2019). De acordo com Sobeh e colaboradores, mostrou que ambas as espécies em estudo, *Thymus algeriensis* Boiss e *Thymus fontanesii* Boiss, apresentaram efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos nos experimentos realizados *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, que podem ser atribuídos a seus compostos fenólicos. Apresentam uma ação antioxidante mais potente que o ácido ascórbico e são mais seletivo contra a ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Em conclusão, *Thymus algeriensis* Boiss e *Thymus fontanesii* Boiss são bons candidatos para combater a inflamação e doenças relacionadas a espécies reativas de oxigênio (SOBEH, et al., 2020).

A atividade antibacteriana frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus*

subtilis foi testada para os óleos essenciais de *Thymus capitatus* L., *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum majorana* L. Os óleos testados apresentaram variações consideráveis entre as diferentes cepas bacterianas testadas. A atividade bacteriana do óleo essencial de *T. capitatus* foi ainda maior que a do antibiótico padrão testado Gentamicina (MOUMNI, et al., 2020). O estudo demonstrou que a atividade do óleo essencial do Tomilho era principalmente à presença de compostos fenólicos e à presença de hidrocarbonetos monoterpênicos (DZAMIC, et al., 2015).

Roylea cinerea (D. Don) é uma planta indígena do Himalaia Ocidental e tem sido usada pela população nativa para o tratamento de várias doenças, como febre, malária, diabetes, icterícia e doenças de pele. Portanto, Bhatia e colaboradores desenvolveram um estudo para explorar as atividades antioxidantes e antiproliferativas desta planta. Observou-se atividade antioxidante significativa para o extrato metanólico das folhas. Na atividade antiproliferativa e apoptótica na linha de células cancerígenas musculares esqueléticas de ratos L6, o extrato testado inibiu o crescimento celular com um valor IC₅₀ significativo. Os achados *in vitro* deste estudo, revelou que os ingredientes bioativos presentes no extrato metanólico das folhas e caule de *Roylea cinerea* tem o potencial anticâncer (BHATIA, et al., 2020).

3.5.2 Modelo Farmacológico

Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo do diabetes são roedores tratados com aloxano ou estreptozotocinas (STZ) (MARLES; FARNSWORTH, 1995). A indução química do diabetes com STZ é o modelo mais frequentemente utilizado para ratos e são administradas principalmente por via intraperitoneal e intravenosa. Diferentes doses são descritas na literatura, variando de 35 mg/kg a 80 mg/kg, e em menor número, referências de 150 a 200 mg/kg. O principal mecanismo para promover a morte das células β -pancreáticas é pela alquilação do seu DNA, tornando os animais induzidos, em modelos de diabetes tipo 1 (RADENKOVIC, et al., 2016).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos

tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (MARLES; FARNSWORTH, 1995; HUO et al., 2003; VOLPATO et al., 2002).

Algumas plantas associadas ao tratamento do diabetes são consideradas tóxicas. Há muitos efeitos tóxicos das plantas, os quais podem resultar em hipoglicemia, tais como, hepatotoxicidade e bloqueio β -adrenérgico. Detalhes tais como, identificação da planta, parte a ser usada, preparação, padronização química e biológica do extrato, estabilidade do extrato, dosagens terapêuticas, efeitos colaterais, interações medicamentosas e alimentares e contraindicações devem ser incorporados à farmacopeia nacional. A toxicidade é influenciada pela parte da planta usada na preparação do extrato, método de preparação e rota de administração. A alergenicidade e fotossensibilização são outros aspectos de toxicidade, os quais não são revelados nos testes de toxicidade aguda e que ainda representam riscos significativos (MARLES; FARNSWORTH, 1995; HUO et al., 2003; SAID et al., 2002).

3.6 ASPECTOS HIPOGLICEMIANTES DA FAMÍLIA LAMIACEAE

Muitas espécies de plantas têm sido empregadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar dos sintomas do diabetes mellitus (SAXENA, VIKRAM, 2004). Entretanto, as análises posteriores revelaram grande variedade de mecanismos de ação que podem levar ao efeito hipoglicemiante, nem todos terapeuticamente úteis (HUO et al., 2003). Na região sudoeste do Marrocos, 37 plantas são usadas no tratamento do diabetes, porém devem ser utilizadas com muito cuidado, especialmente no diabetes tipo I, porque algumas dessas plantas medicinais podem provocar acidentes hipoglicêmicos, A TABELA 1 mostra as famílias que possuem atividade hipoglicemiantes (EDDOUKS, et al., 2002).

TABELA 1 – FAMÍLIAS DAS PLANTAS QUE POSSUEM ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE

	Espécies citadas	Total de espécies
Família		
Fabaceae	127	18.000
Asteraceae	98	21.300
Lamiaceae	36	3.500
Limniaceae	35	6.460
Poaceae	30	10.000
Euphorbiaceae	30	7.000

FONTE: Marles e Farnsworth (1995).

3.6.1 Diabetes Mellitus

O diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a DM é geralmente classificada como Diabetes Mellitus Tipo 1, Diabetes Mellitus Tipo 2 e Diabetes Gestacional (TABELA 2).

O Diabetes Mellitus tipo 1 caracteriza-se pela ausência da secreção de insulina por destruição total ou parcial das células β do pâncreas. O tratamento consiste principalmente no uso diário de injeções de insulina e as possíveis complicações decorrentes da insulino terapia compreendem: hipoglicemia, lipodistrofia, alergia local ou sistêmica e infecção nos locais de aplicação (CHAMPE; HARVEY, 1996; RANG et al., 2000; BRAGANÇA, 1996).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias polipeptídicas, designadas A e B, as quais, estão ligadas por pontes dissulfeto (conectando os aminoácidos A7 ao B7 e A20 ao B19). Uma terceira ponte dissulfeto na cadeia A liga os resíduos A6 e A11. Sua principal função é controlar o metabolismo intermediário, exercendo ações sobre o fígado, músculo e tecido adiposo. O efeito

global da insulina consiste em conservar os combustíveis energéticos ao facilitar a captação, utilização e o armazenamento da glicose, dos lipídios e das proteínas (CHAMPE, HARVEY, 1996; RANG et al, 2000; BRAGANÇA, 1996).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE DIABETES TIPO 1 E 2

	DIABETES MELLITUS INSULINO- DEPENDENTE (DMID)	DIABETES MELLITUS NÃO-INSULINO- DEPENDENTE (DMNID)
SINÔNIMO	Tipo 1 ou início juvenil	Tipo 2 ou início adulto
IDADE DE INÍCIO	Usualmente na infância ou puberdade	Frequentemente acima de 40 anos
TIPO FÍSICO	Magro	Obeso
PREVALÊNCIA	10-20% dos diabetes diagnosticados	80-90% dos diabetes diagnosticados
INSULINA PLASMÁTICA	Baixa a ausente	Normal a elevada
DEFEITO OU DEFICIÊNCIA	Células β destruídas	Incapacidade das células β em produzir quantidades apropriadas de insulina; Resistência à insulina
COMPLICAÇÕES AGUDAS	Cetoacidose	Coma hiperos molar
CETOSE	Comum	Rara
TRATAMENTO INSULINA	Sempre necessário	Usualmente não requerido
HIPOGLICEMIANTE ORAIS	Não responsivo	Responsivo

FONTE: Organização Mundial da Saúde (2019).

Os efeitos metabólicos da insulina podem ser observados no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. No metabolismo dos carboidratos os efeitos da insulina são mais evidentes em três tecidos: fígado, músculo e tecido adiposo. No

fígado, a insulina diminui a produção de glicose por inibir a gliconeogênese, diminui a degradação do glicogênio (glicogenólise) e estimula a síntese de glicogênio. No músculo, a insulina aumenta a síntese de glicogênio, aumenta a glicólise e aumenta a captação de glicose por aumentar o número de transportadores de glicose (Glut-4) na membrana plasmática. No tecido adiposo, a insulina aumenta a captação de glicose semelhante ao músculo. Assim, a administração intravenosa de insulina causa diminuição imediata na concentração da glicose no sangue. No metabolismo dos lipídios a insulina aumenta a síntese de ácidos graxos e a formação de triglicerídeos no tecido adiposo, enquanto inibe a lipólise, em parte através da desfosforilação (e, portanto, inativação) das lipases e, também provoca lipogênese no fígado. No metabolismo das proteínas a insulina estimula a entrada de aminoácidos nas células e aumenta a síntese de proteínas, na maioria dos tecidos (TABELA 3) (CHAMPE; HARVEY, 1996) (CHAMPE; HARVEY, 1996; RANG et al., 2000; BRAGANÇA, 1996).

TABELA 3: RESUMO DOS EFEITOS DA INSULINA SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, LIPÍDIOS E PROTEÍNAS NO FÍGADO, MÚSCULO E TECIDO ADIPOSEO

TIPO DE METABOLISMO	CÉLULAS HEPÁTICAS	TECIDO ADIPOSEO	MÚSCULO
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	Diminuição da glicogênese e glicogenólise; Aumento da glicólise e glicogênese	Aumento da captação de glicose e síntese de glicerol	Aumento da captação de glicose, da glicólise e glicogênese
METABOLISMO DE LIPÍDIOS	Aumento da lipogênese; Diminuição da lipólise	Aumento da síntese de triglicerídeos e da síntese de ácidos graxos	-----
METABOLISMO DE PROTEÍNAS	Diminuição da degradação das proteínas	-----	Aumento da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas

FONTE: Champe et al (1993).

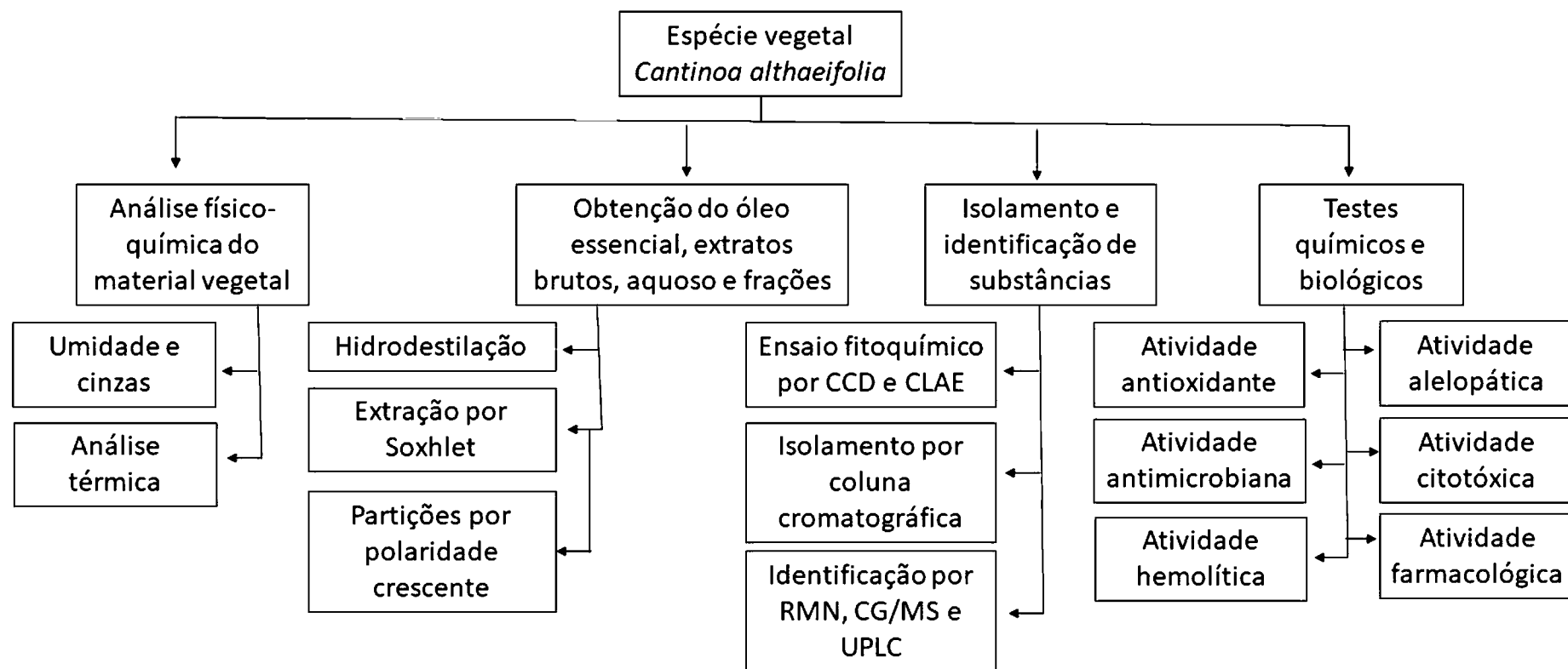
No Diabetes Mellitus tipo 2 existem no mínimo dois defeitos fundamentais: o primeiro é a diminuição na habilidade dos tecidos periféricos em responder a insulina (o que é denominado resistência à insulina) e o segundo é a deficiência funcional das células β do pâncreas em secretar insulina, o que resulta numa hiperglicemia duradoura. Os principais grupos de agentes hipoglicemiantes orais que reduzem a glicemia são as sulfoniluréias, as biguanidas e os inibidores da α -glicosidase (BRAGANÇA, 1996). As sulfoniluréias exercem a principal ação sobre as células β estimulando a secreção de insulina e reduzindo assim a concentração plasmática de glicose. Mas para exercerem esta função exigem a presença de células β funcionais. Seus efeitos colaterais são: hipoglicemia e ganho de peso corporal. Os principais fármacos encontrados no mercado são: glibenclamida, clorpropamida e outros (CHAMPE; HARLEY, 1996). O grupo das biguanidas não necessita das células β funcionais. Sua ação é complexa e ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que elas aumentam a sensibilidade à insulina, reduzem a absorção intestinal de glicose, diminuem a gliconeogênese e aumentam a captação de glicose pelos tecidos periféricos. O principal efeito indesejável consiste em distúrbio gastrointestinal transitório. Exemplo: metformina. Os inibidores da α -glicosidase intestinal atuam no retardamento da absorção de carboidratos, reduzindo o aumento pós-prandial da glicemia. Os efeitos colaterais mais comuns são flatulência, fezes moles, diarreias, dores e distensões abdominais, exemplo acarbose. Tanto as biguanidas e como os inibidores da α -glicosidase intestinal são indicados para pacientes com diabetes do tipo 2 que são obesos e não respondem ao tratamento apenas com a dieta (RANG, et al., 2000). Sendo assim, a busca e o desenvolvimento de compostos oralmente ativos que imitam ou aumentam as propriedades da insulina é uma tarefa urgente. O mau controle do diabetes pode causar complicações em diferentes partes do corpo como, neuropatia diabética, doença microvascular e macrovascular, complicações na visão, doenças e ataques cardíacos, complicações renais, complicações nos pés, na gravidez, complicações dentárias e agravamento da Covid-19 (OMS, 2020). Estes compostos orais poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina no diabetes do tipo 1 e diminuir os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no diabetes do tipo 2 (OMS, 2020).

4 METODOLOGIA

Este estudo compreende 5 fases de análise da espécie vegetal *C. althaeifolia*, subdividindo em:

- Estudo fitoquímico;
- Estudo de propriedades químicas (antioxidante);
- Estudo citotóxico e
- Estudo farmacológico.

O fluxograma abaixo auxilia na compreensão das técnicas e métodos empregados em cada parte da pesquisa científica (FIGURA 7).

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DAS FASES DO ESTUDO COM A ESPÉCIE *C. althaeifolia*

FONTE: a autora (2016).

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta e Identificação do material vegetal

A coleta das folhas e do caule de *C. althaeifolia* (Pohl ex Benth.) Harley & J. F. B. Pastore foi realizada no bairro Boqueirão Município de Curitiba - Paraná, Brasil, 25°32'43" S, 49°14'11" W, altitude: 900 m, no mês de Fevereiro do ano de 2018. A exsicata foi depositada no Herbário do Museu Botânico de Curitiba sob o registro: MBM 408166 (FIGURA 8). A planta foi identificada pelo botânico Eraldo Barboza do Museu Botânico de Curitiba. Este estudo foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) incluído no Processo de nº 02001.001165/2013-47, registrado no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético).

80 horas aproximadamente para as três extrações, com esgotamento total. O extrato bruto das folhas e do caule obtidos foram filtrados e (5 g/mL deste material foi reservado para os ensaios biológicos) submetidos à concentração em Soxhlet por destilação e posteriormente levados em banho-maria para remoção total do solvente.

Os fracionamentos foram realizados por partição líquido/líquido utilizando-se solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para os fracionamentos, foi utilizado aparato de Soxhlet.

4.3 ENSAIOS DE PUREZA

4.3.1 Determinação da perda por dessecação

Para a determinação do teor de água por dessecação, tanto para as folhas e para o caule, utilizou-se o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA 6ª EDIÇÃO, 2019). As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras previamente dessecadas e os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação à droga vegetal.

Foi transferido 1 g da amostra para pesa-filtro tarado, previamente dessecado durante 30 minutos. A amostra foi dessecada em estufa (100-105 °C) durante 5 horas até peso constante e posteriormente resfriada em dessecador, sendo verificada a sua massa para cálculo da porcentagem de perda por dessecação.

4.3.2 Determinação das cinzas totais

O teor de cinzas totais foi avaliado por incineração das amostras, tanto das folhas, quanto para o caule, em mufla conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). As análises foram realizadas em triplicata. As amostras foram levadas a uma mufla em temperatura aproximadamente de 600 °C por 12 horas para incineração total das amostras, sendo assim, verificada a sua massa para o cálculo da porcentagem de perda por incineração.

4.3.3 Determinação do teor de sólidos

Uma placa de petri inicialmente tarada contendo 5 mL do extrato das folhas e uma placa para o caule, foram levadas à estufa (40 °C) até total secura. O resultado foi apresentado em peso de extrato seco (folha e caule) em relação a amostra do vegetal, este teste foi realizado em triplicata.

4.3.4 Análise Térmica

O estudo termogravimétrico de folhas e de caule de *C. althaeifolia* foi realizado por termogravimetria (TG) com o objetivo de avaliar a degradação térmica das amostras estabelecendo suas relações com a degradação do vegetal.

As curvas de TG foram obtidas a partir de 10 mg de amostras de folhas e caule secos de *C. althaeifolia*, aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, sendo obtidas no intervalo de temperatura entre 20 e 600°C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Whaltam, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando Índio (In; PF: 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}}$: 28,54 J.g⁻¹) como padrão.

O cálculo termoanalítico das folhas e de caule de *C. althaeifolia* foi realizado por termogravimetria (TG) utilizando o programa Origin 9.0.

4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial das folhas secas de *C. althaeifolia* (331,87g) em temperatura ambiente, foi extraído por meio da técnica de hidrodestilação em Clevenger modificado (WASICKY; 1963), por 6 seis horas, tendo como base a metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019). O balão acoplado ao aparelho de Clevenger foi mantido sobre uma manta térmica a 95°C, aproximadamente. Após esse tempo, a quantidade de óleo essencial extraída foi medida em tubo graduado, coletado em tubo tipo *ependor* e mantido ao abrigo de luz, sob refrigeração em temperatura (4 ± 0,5 °C). O rendimento do óleo extraído foi calculado pela equação $T\%(v/m) = \text{volume da essência (mL)} \times 100(g)$,

equivalente a porcentagem de óleo essencial existente na massa de 100 g de vegetal. O líquido pertencente ao balão foi filtrado, congelado a um Ultra Freezer -80°C 900 series, Thermo Scientific® e levado para o aparelho Liofilizador Bench Top Pro, VirTis SP Scientific®, após liofilizado, a amostra foi nomeada de extrato aquoso das folhas (EAF) e adicionado aos testes.

Para a amostra do extrato aquoso do caule (EAC), foi feito o mesmo processo que o EAF, porém, o óleo essencial obtido, foi desprezado e não utilizado nos testes por ter um rendimento extremamente baixo, não sendo de interesse para a continuidade desse óleo para os demais testes.

4.4.1 Composição química do óleo essencial de *C. althaeifolia*

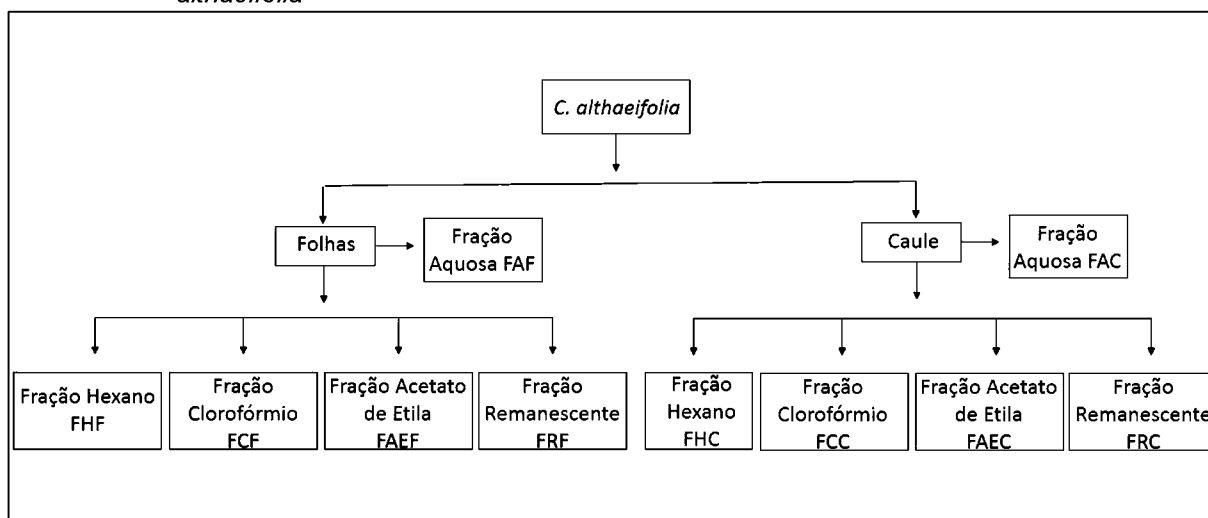
A identificação da composição química do óleo essencial de *C. althaeifolia* foi realizada pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) por sistema de cromatografia gasosa, acoplado a um espectrômetro de massa, Shidmazu® CG-EM QP2010 Plus, equipado com coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250 °C, interface e fonte de íons a 300 °C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 450, utilizando o gás Hélio como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250 °C, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50 °C por 5 min elevando para 200 °C a uma razão de 5 °C.min⁻¹. Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007) e perfis do espectro de massa das bibliotecas NIST-14.

4.5 EXTRATOS

A divisão dos extratos e frações das folhas e caule obtidos de *C. althaeifolia*, com as respectivas abreviações que lhe foram atribuídas, são observadas no QUADRO 1 para as folhas e para o caule.

Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

QUADRO 1 – DIVISÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DO CAULE DE *C. althaeifolia*



Nota: FAF – fração aquosa das folhas; FHF – fração hexânica das folhas; FCF – fração clorofórmica das folhas; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FRF – fração remanescente das folhas; FAC – fração aquosa do caule; FHC – fração hexânica do caule; FCC – fração clorofórmica do caule; FAEC – fração acetato de etila do caule; FRC – fração remanescente do caule.

FONTE: a autora (2017).

4.5.1 Obtenção dos extratos etanólicos brutos

Para obtenção dos extratos etanólicos das folhas e do caule de *C. althaeifolia*, secos e moídos (moinhos de facas e martelos) foram submetidos à extração, separadamente, em aparelho de Soxhlet modificado (60 °C) (PI 0601703-7A) (CARVALHO et al., 2006) (FIGURA 9), utilizando-se álcool etílico como líquido extrator.

A um aparelho de Soxhlet modificado segundo Carvalho (2009) foi conectado um condensador de bolas e um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. O material vegetal seco e triturado foi introduzido neste sistema juntamente com álcool etílico 96°GL para a extração. No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atinge o ponto de refluxo, o extrato é descarregado no balão por sifonamento e o processo repetido 10 vezes. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e capaz de solvatar os compostos presentes. Os extratos obtidos foram concentrados em Soxhlet para posterior particionamento (FIGURA 9).

FIGURA 9 – OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO



FONTE: a autora (2017).

Os extratos etanólicos brutos de folhas (EBF) e de caules (EBC) foram filtrados utilizando-se funil de Büchner e concentrados até 30% do seu volume.

Posteriormente foram particionados com solventes de polaridade crescente, em Soxhlet modificado, obtendo-se as frações: hexano (FHF e FHC), clorofórmio (FCF e FCC) e acetato de etila (FAEF e FAEC) de folhas e de caules (separadamente e respectivamente). Os resíduos dos extratos de folhas e caules constituem as frações remanescentes (FRF e FRC). As frações foram concentradas em rota vapor e acondicionadas em frasco âmbar, rotuladas e mantidas sob o abrigo de luz.

4.5.2 Screening fitoquímico por cromatografia de camada delgada (CCD)

Para o desempenho deste método de identificação dos grupos de metabólitos secundários por cromatografia de camada delgada (CCD), foram utilizados os extratos e frações preparados conforme item 4.5.1. A fase móvel foi colocada na cuba cromatográfica para saturação do meio. O tempo é fundamental, promovendo a saturação da atmosfera interior com a fase móvel na forma de vapor auxiliando na migração das substâncias através da camada delgada. As paredes internas da cuba foram revestidas com papel filtro e no fundo colocada certa quantidade da fase móvel a ser utilizada, o que permite uma completa saturação do meio cromatográfico. Para a realização do ensaio de CCD

foi utilizado cromatoplasmas de sílica gel 60 UV254, cortadas no comprimento de 2,5 cm de largura por 5 cm de comprimento. As amostras foram aplicadas com capilar de modo que os pontos de aplicação fiquem concentrados em uma pequena área. Após a eluição da fase móvel pela cromatoplasma, o solvente foi seco e utilizado reveladores específicos para os grupos de metabólitos secundários presentes na TABELA 4.

TABELA 4 – CONSTITUIÇÃO DA FASE MÓVEL, DO REVELADOR E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA CCD

	FASE MÓVEL	REVELADORES ESPECÍFICOS	EVIDÊNCIAS	REFERÊNCIAS
Esteróides/ Terpenos	Tolueno/ AcEt (93:7)	Anisaldeído Sulfúrico: - Anisaldeído – 0,5 mL – - ácido acético glacial – 10 mL - metanol – 85 mL - ácido sulfúrico – 5 mL	Coloração rosa/violácea após aquecimento em estufa 105 °C	CARVALHO, 2001.
Alcalóides	Clorofórmio / Metanol (95:5) Universo de amônio em tubo de ensaio	Dragendorff: - Carbonato de bismuto – 5 g - Iodeto de potássio – 25 g - Ácido clorídrico concentrado - 12 mL Água destilada qsp. 100 mL	Coloração alaranjado forte na presença de alcaloides	OLIVEIRA et al., 2014.
Flavonoides	AcEt / Ácido fórmico/ Ácido Acético glacial/ Água destilada (100:11:11:26)	NEU - Difenoil boril oxi etil amino – 1 g - Metanol – 100 mL	Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV	CARVALHO, 2001.
Cumarinas	DCM/ Acetona	Hidróxido de potássio 1% Hidróxido de potássio – 1 g Etanol qsp 100 mL	Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV	AMARAL et al., 2009.
Taninas	AcEt/ Ácido fórmico/Ácido Acético glacial/ Água destilada (100:11:11:26)	Cloreto Férrico 2% Cloreto férrico – 2 g Metanol ou água qsp 100 mL	Verde para taninos condensados. Azul para taninos hidrolisáveis. marrom para compostos fenólicos	OLIVEIRA et al., 2014.
Antraquinona s	AcEt / Metanol/ Água destilada (100:17:13)	Hidróxido de potássio 5% Hidróxido de potássio – 5 g Etanol qsp 100 mL	Coloração Vermelha	WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1996

Nota: Qsp: quantidade suficiente para.
FONTE: Adaptado de OLIVEIRA (2016).

Os solventes utilizados nas eluições cromatográficas apresentaram caráter analítico e foram combinados em gradiente crescente de polaridade conforme a fração vegetal a ser explorada e o metabólito secundário a ser pesquisado.

As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), antes da revelação com os reagentes, verificando a fluorescência dos pontos na CCD. Nas técnicas para flavonoides e cumarinas, as placas também foram visualizadas no ultravioleta, analisando a mudança da coloração após a utilização do revelador.

4.5.3 Isolamento por coluna cromatográfica aberta (CC) e identificação de substâncias na amostra do precipitado

Acondicionou-se a coluna Sephadex LH 20 com 50 mL de metanol (MeOH) e em seguida iniciou-se o processo de eluição com 2 mL de amostra. Lavou-se a coluna com duas porções de 200 mL de MeOH para garantir o arraste de toda a amostra para a coluna. Os primeiros 15 mL de eluente foram desprezados e a seguir foram coletadas as frações de 1 a 40, perfazendo um volume de 10 mL cada frasco.

As substâncias aparentemente isoladas foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C para elucidação de sua estrutura.

4.5.4 Processo de separação de compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O precipitado da fração hexânica das folhas de *C. althaeifolia* foi diluído em acetonitrila (ACN) e submetido à análise por CLAE Merck Hitachi – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 227 nm, coluna XTerra® RP18 5 μm , 4,6x250 mm, volume de injeção de 20 μL , fluxo 1,3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração água/acn (70:30/83:17) na seguinte programação: 1-30 min (OLIVEIRA, 2016). A ACN utilizado foi grau CLAE (TEDIA) e a água MilliQ.

4.5.5 Espectroscopia de massas

A amostra do precipitado obtido da fração hexânica das folhas, foi solubilizada em metanol, na concentração de 100 µg/mL. A análise de espectrometria de massas foi por infusão direta e foi realizada no equipamento Xevo TQD (Waters) triplo-quadrupolo equipamento com fonte de ionização eletrospray (ESI), usando os seguintes parâmetros: temperatura de desolvatação: 300 °C; fluxo de gás de desolvatação: 500 L/h; fluxo do gás do cone: 50 L/h; capilaridade: 3,0 k; modo de operação: negativo; cone: 35V. Scan range entre 100 e 950 m/z. A amostra foi injetada a um fluxo de 10 µL/ min. A energia de colisão foi variada para otimização de cada fragmento. Os resultados foram determinados usando o software MassLynx™.

4.5.6 Fracionamento do extrato bruto das folhas e do caule

A partição líquido-líquido consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis, propicia uma semi-purificação dos constituintes aplicados à extração (CECHINEL FILHO; YUNES, 1995). O extrato bruto (EB) das folhas e do caule de *C. althaeifolia* foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora, deixado sob refluxo por cerca 4h ou até esgotamento.

Foram utilizados solventes em escala de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações obtidas foram concentradas em Soxhlet, levadas a secar em banho-maria a 60°C, pesadas e armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo de luz para posterior estudo.

4.5.7 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos a 400 MHz em aparelho espectrômetro Ressonância Magnética Nuclear. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm), usando-se MeOH-d₆ como solvente. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e

suas multiplicidades descritas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), m (multiplete).

5 ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

As amostras dos extratos bruto das folhas e caule, fração hexânica folhas e caule, acetato de etila das folhas e caule, remanescente das folhas e caule, óleo essencial das folhas e do precipitado obtido da fração hexânica das folhas nas concentrações de 75, 200, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram diluídas em metanol, e o solvente evaporado em estufa a 40 °C, 24 horas antes do teste. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo, o metanol e salina. Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na solução para eclodirem durante 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz diurna e temperatura controlada (27-30 °C). Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para frascos contendo as amostras e controles, com volume final de 5 mL, e a contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24 horas. Os testes foram realizados em quadruplicata e os dados analisados com o método estatístico Probitos (Probits Analysis), no qual as frações foram consideradas tóxicas quando CL_{50} for menor que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MEYER, et al., 1982b).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

5.2.1 Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

Este ensaio seguiu a metodologia descrita por Aslan e colaboradores (1995) e Banerjee e colaboradores (2008) com adaptações. O extrato bruto etanólico, extrato aquoso, frações e o precipitado, foram utilizadas na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em diluição seriada, preparada com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue a 2%. Tendo como controle positivo uma suspensão de sangue de carneiro (Newprov®) a 2% e solução de saponina. Após o preparo dos tubos, os

mesmos foram invertidos e passados 30 minutos foram novamente agitados, cautelosamente, deixados em repouso por 150 minutos e centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. Ao término do ensaio foi verificada a presença de hemólise pela presença de solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Este teste foi realizado conforme Meyer et al., utilizando-se sementes de alface (*Lactuca sativa*) “Babá de verão”, sobre cada disco de papel filtro, com diferentes concentrações da amostra ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Este teste foi realizado em quadruplicata.

Para os extratos, frações e precipitado obtido da fração hexânica das folhas, foram colocados dois papéis Whatman número 6 em cada gerbox e adicionados 6 mL da solução da amostra. As gerbox foram deixadas secando sob fluxo laminar (desligado), em temperatura ambiente, por 24 horas para a evaporação do solvente, vedando a janela de ventilação com papel filme de pvc para evitar uma possível contaminação. Após evaporação total, os papéis filtro foram acomodados e ressuspensos com 6 mL de água destilada, umedecendo o extrato. As gerbox foram divididas em 4 quadrantes contendo 5 sementes de alface, representando a quadruplicata do teste.

Para o teste com o óleo essencial, foram colocados 1 papel filtro colado na tampa da gerbox e dois papéis filtro sobre a base da mesma. Foram colocados 3 mL da solução da amostra no papel filtro colado na tampa e 5 mL de água destilada no papel filtro na base da gerbox.

As gerbox foram levadas para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) à 20 °C por 7 dias.

5.3.1 Teste de Germinação dos extratos, frações e precipitado

Esta análise foi realizada conforme preconizado por Macias et al. (2000), na qual foram realizadas contagens diárias do número de sementes germinadas de alface a cada 12 horas ao dia, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. A germinação foi avaliada por meio do Índice

de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962) e porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983).

5.3.2 Teste de Crescimento dos extratos, frações e precipitado

Este ensaio seguiu a metodologia descrita por (MACIAS, et al., 2000), sendo que, após sete dias da protrusão radicular, foi medido o alongamento da raiz/radícula e do hipocótilo/coleótilo, expresso em porcentagem de inibição/estímulo.

5.3.3 Teste de Germinação do óleo essencial

Este ensaio seguiu a metodologia descrita por (SILVA, et al., 2014), na qual foram realizadas contagens diárias do número de sementes germinadas de alface a cada 12 horas ao dia, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. A germinação foi avaliada por meio do Índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962) e porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983).

5.3.4 Teste de Crescimento do óleo essencial

Este teste foi realizado segundo o item 5.3.2.

5.3.5 Análise Estatística

Para cada amostra, o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (controle água destilada, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg) em quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR. Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (água destilada) e demonstrados em gráfico de barras. O valor “0” representará o controle. Qualquer valor positivo implicará em estimulação dos parâmetros avaliados e os valores negativos inibição.

6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

6.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Foi realizado segundo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) com modificações. Foram utilizadas todas as amostras obtidas neste estudo. A curva padrão foi confeccionada com ácido gálico (2,5; 4, 5; 6,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e as amostras contendo o extrato bruto, extrato aquoso, frações e precipitado, foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$. As soluções foram mantidas em repouso por 10 minutos, adicionadas de 0,4 mL de solução de carbonato de sódio 10%, novamente deixadas em repouso por 30 minutos para leitura espectrofotômetro (760 nm). O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g) (KROYER; HEGEDUS, 2001; SINGLETON; ROSSI, 1965).

6.2 REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Foram preparadas soluções padrão de BHT, ácido ascórbico (vitamina C) e rutina, e do extrato bruto etanólico, aquoso, frações, óleo essencial e precipitado (200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) em metanol (BIANCO; SANTOS, 2003). As soluções (0,3 mL) foram adicionadas a 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio e os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 min, para leitura em espectrofotômetro (690 nm). A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à rutina, BHT e vitamina C.

6.3 REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

Foram preparadas soluções metanólicas do extrato bruto do caule nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, da FHC nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 400, 450 e 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, FCC 10, 20, 40, 50 e 60 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, FAEC nas concentrações de 1, 2, 3, 8 e 9 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, FAC em 15, 30, 60, 90, 120 e 150

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, para as folhas, o extrato bruto foi utilizado nas concentrações de 15, 45, 60, 75, 90, 120 e 135 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FHF nas concentrações de 50, 150, 200, 250, 300, 400, 450 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FACF nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FCF nas concentrações de 3, 6, 9, 12, 18, 21 e 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FRF nas concentrações de 5, 7, 8, 10, 11 e 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FAF nas concentrações de 50, 100, 300, 400, 450 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, óleo essencial nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e precipitado nas concentrações de 175, 250, 325, 475, 550, 775 e 850 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, das quais 2,5 mL foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,03 mmol.mL^{-1} . Para a fração de hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi utilizado como branco, 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol, e como controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 518 nm (MENSOR, et al., 2001). Os valores de IC_{50} foram comparados segundo o método estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

6.4 MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Este teste foi realizado como descrito por (MORAIS, et al., 2006), utilizando-se como padrão o BHT (3 mg), e leitura espectrofotométrica (532 nm). O teste foi realizado em triplicata e o Índice Antioxidante da amostra (IA%), foi obtido pela fórmula: $\text{IA}\% = (1 - A/C) \times 100$, onde C, é a absorbância do controle totalmente oxidado e A, a média aritmética das absorbâncias da amostra. Foram utilizadas todas as amostras obtidas neste estudo.

7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

7.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

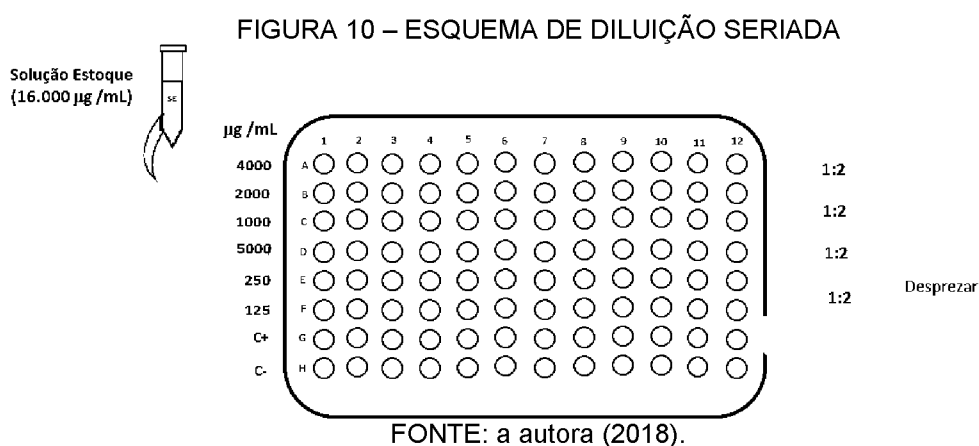
A Atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2015). O intervalo de concentração variou de 125 $\mu\text{g/mL}$ a 4000 $\mu\text{g/mL}$. O

volume final do teste foi de 200µL: 100µL do extrato ou fração diluídos e 100µL da suspensão microbiana.

7.1.1 Solução Estoque (SE) e diluição dos extratos e frações

A SE dos extratos e frações foram preparadas com 4 vezes mais que a maior concentração a ser testada, 16000 µg/mL e esterilizadas por filtração (membrana milipore 0,22 µm - TPP, Trasadingen, Suíça). Os solventes utilizados foram água destilada, metanol e DMSO de acordo com o extrato ou fração. Foi realizada diluição seriada em caldo Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemanha) distribuídos em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo chato conforme está disposto o passo a passo e o esquema da FIGURA 10.

- 1) Pipetar 100 µL de caldo Mueller-Hinton (CMH) em todos os poços;
- 2) Pipetar 100 µL da SE em cada poço da linha A (pipetador automático de 8 canais);
- 3) Homogeneizar e transferir 100 µL da linha A para a linha B. Repetir o procedimento até a linha E e desprezar os últimos 100 µL;
- 4) As linhas G e H devem conter somente caldo Mueller-Hinton para o controle positivo ou de viabilidade microbiana (C+) e o Controle negativo ou de esterilidade (C-).



7.1.2 Microrganismos e Inóculo Microbiano

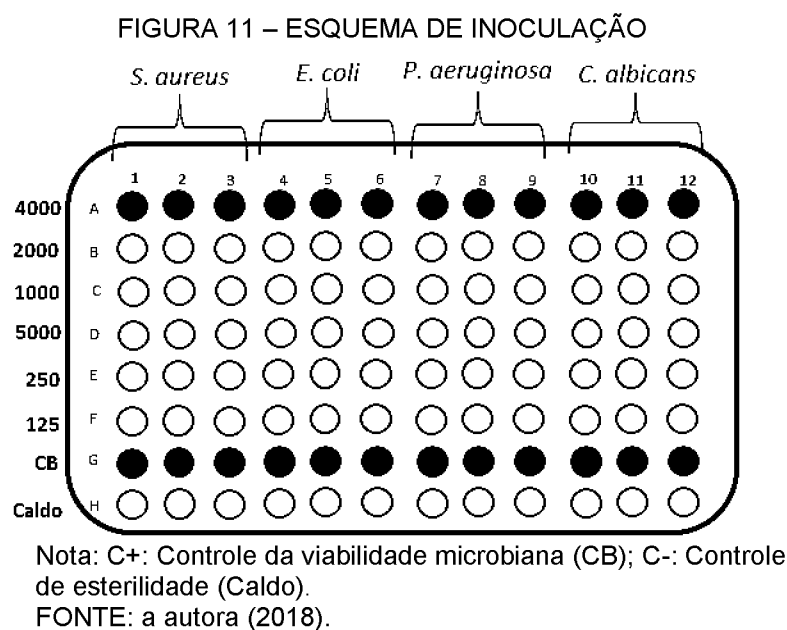
Os Microrganismos utilizados foram as cepas de referência American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 40175.

A concentração final do inóculo microbiano preconizada para a técnica de microdiluição em caldo é de 10^4 UFC/mL e deve ser obtida de acordo com o volume final do teste. As suspensões microbianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. Em seguida, foram diluídas até a concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL em CMH (30 μ L da suspensão microbiana + 5970 μ L de CMH). Foram pipetados um volume de 100 μ L nas cavidades, levando a uma concentração final de 10^4 UFC/mL.

Os testes foram realizados em triplicata conforme o passo a passo e o esquema da FIGURA 11 a seguir.

- 1) Pipetar 100 μ L do inóculo microbiano por coluna até o poço G, a concentração do extrato cai pela metade;
- 2) Usar 3 colunas para cada bactéria teste (triplicata);
- 3) Pipetar 100 μ L de salina em todas as cavidades da linha H;
- 4) Vedar hermeticamente a placa e incubar por 18-24 horas a 35°C.



Para evitar a interferência da cor e/ou turbidez decorrente da reação do extrato/fração com caldo foi realizada a diluição seriada e adicionado 100 μ L de

salina (Branco da reação). O controle da atividade inibitória dos diluentes, metanol e DMSO foi realizado semelhante à diluição seriada dos extratos e frações mais 100 µL dos inóculos bacterianos. Como controle da técnica, foi determinada a CIM da Amicacina para cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e Fluconazol testado contra *Candida parapsilosis* ATCC 6258 expressos na TABELA 5.

Após a incubação foi realizada a leitura da absorbância (comprimento de onda 620 nm) em leitora de ELISA (Mod. EL800; BioTek, Highland Park, Winooski, VT, EUA).

TABELA 5 – CONTROLES FARMACOLÓGICOS UTILIZADOS PARA CADA MICROORGANISMO

Microrganismo	Antimicrobiano	Faixa de CIM esperada (µg/ml)	Bibliografia
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Amicacina	1,0-4,0	CLSI, M100-S27. (2017)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amicacina	0,5-4,0	CLSI, M100-S27. (2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Amicacina	1,0-4,0	CLSI, M100-S27. (2017)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 6258	Fluconazol	0,5-4,0	CLSI, M27-A, 200 (2015)

7.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que produz redução de crescimento microbiano de no mínimo 80% em relação ao C+ (HOLETZ, et al., 2002; LEMOS JDE, et al., 2005; SANTOS, et al., 2008). CIMs até 1000 µg/mL foram classificadas com potencial atividade inibitória e CIMs maiores que 1000 µg/mL sem atividade inibitória (TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

A CIM foi determinada da seguinte forma:

$$AT \text{ (Absorbância do teste)} \\ = \text{Leitura da Absorbância (LA)} - \text{Absorbância do Branco (AB)}$$

- Média das Absorbâncias do Teste (mAT) e do Controle positivo (mAC);
- Cálculo do Percentual de Inibição (PI)

$$\text{Percentual de Inibição (PI)} = \left(\frac{mAT}{mAC} \cdot 100 \right) - 100$$

7.2 ENSAIO CITOTÓXICO

7.2.1 Linhagens tumorais

7.2.1.1 Células aderentes

Foram utilizadas células de melanoma murinho (B16F10), carcinoma de mama humano (MCF-7) e a linhagem não tumoral de fibroblasto murino (3T3) obtidas de culturas mantidas no laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através de expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptamicina) em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

7.2.1.2 Ensaio de viabilidade com MTT

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para determinar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, majoritariamente pela hidrogenases. O MTT é um sal de tetrazólio, solúvel em água, o qual é convertido em um formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). As células 3T3, B16F10 e MCF7 foram semeadas em placas de 96 poços em 100 µL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100U/L respectivamente). O plaqueamento foi feito nas concentrações (2×10^3 , $1,3 \times 10^3$ e 4×10^3 /poço respectivamente). As placas foram armazenadas por 24

horas em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C. Posteriormente, substituiu-se o meio de cultura e adicionou-se sobre as células as amostras: EBC, EBF, HC, HF, CC, CF, AeC, AeF, RC, RF, OE e precipitado da planta *C. althaeifolia* nas concentrações crescentes de 12,5 µg/mL a 200 µg /mL, obtendo-se um volume final de 200 µL/poço e incubadas por 72 h. Imediatamente antes do tratamento, as amostras e o meio de cultivo eram submetidos a agitação vigorosa utilizando agitador do tipo “vortex” por pelo menos 15 segundos. Após período de tratamento o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5µg/µL) por 3 horas a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por álcool isopropílico ácido (HCl 0,1M) para solubilização dos cristais de formazan e leitura da absorbância em 570 nm em leitor de microplacas. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada por regra de três. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis. As amostras utilizadas para este teste foram o Extrato Bruto das folhas e caule, óleo essencial e do precipitado obtido na fração hexânica das folhas.

7.2.1.3 Cálculo da Concentração Inibitória Mínima IC₅₀

A concentração que inibe em 50% a atividade das desidrogenases mitocondriais (IC₅₀) foi calculada usando programa GraphPad Prisma, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) seguindo tutorial fornecido pela GraphPad Software, Inc, acessado em 11 de setembro de 2018. (<https://www.graphpad.com/support/faq/how-to-determine-an-icsub50sub/>).

7.2.1.4 Cálculo de Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) do óleo essencial foi definido pela razão da IC₅₀ do composto entre as linhagens não-tumoral (3t3) e as tumorais (MCF-7 e B16F10) conforme fórmula a seguir:

$$IS = (IC50 \text{ célula não tumoral}) / (IC50 \text{ célula tumoral})$$

7.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Foram feitas análises morfológicas das células na concentração de 77 µg/mL. As células (2.000) foram plaqueadas sobre lamínulas redondas estéreis depositadas no fundo dos poços de placas de 24 poços. Após 24 horas as células foram tratadas com as amostras e na concentração citada acima. Depois de 24 h de tratamento, as células foram lavadas com meio RPMI e fixadas com formol 2% em solução salina tamponada (PBS) por 10 minutos. Depois de fixadas as células foram submetidas à coloração de May-Grünwald-Giemsa e as alterações morfológicas observadas em microscopia convencional utilizando objetiva de imersão em microscópio com câmera digital acoplada (KROEMER et al, 2009).

7.3.1 Células em suspensão

Foram utilizadas células de Leucemia mielóide crônica (K562) e Leucemia Linfoma de células T (Jurkat) obtidas de culturas mantidas no laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através de expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptamicina) em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

7.3.1.1 Ensaio de integridade de membrana por exclusão de azul de Tripán

As células K562 e Jurkat foram semeadas na concentração de 2×10^3 /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente) em placas de 96 poços. Sequencialmente foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas.

Após o plaqueamento das linhagens, uma alíquota de 100 µL foi utilizada para determinação da viabilidade celular. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer utilizando o método de exclusão do azul de Tripán 0,5% em

PBS e a viabilidade calculada pelo coeficiente entre células viáveis e células totais (células viáveis e não viáveis).

7.3.1.2 Ensaio de viabilidade com MTT

As células K562 e Jurkat foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 2×10^3 /poço em meio de cultura RPMI 1640, 10% SFB e 1% de estreptomicina e penicilina (100 mg/L e 100 U/L respectivamente). Para estabilização das culturas, as placas foram mantidas em incubadora de CO₂ por 24 horas. Depois as células foram expostas a concentrações crescentes de 12,5 µg/mL a 200 µg /mL das amostras testadas. Imediatamente antes do tratamento, as amostras e o meio de cultivo eram submetidos a agitação vigorosa utilizando agitador do tipo “vortex” por pelo menos 15 segundos pelo período de tratamento de 72 horas e ao final da análise, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (0,5µg/µL) por 3 horas.

Transcorrido esse tempo, transferiu-se o conteúdo celular para tubos de 2 mL, os quais foram centrifugados a 10000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os cristais foram eluídos com 100 µL de DMSO e foi feita uma leitura da absorbância em 570 nm em leitor de microplacas. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada por regra de três. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis.

8 TESTE PRELIMINAR FARMACOLÓGICO

8.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre (150 – 200 g), machos, adultos com 30 dias, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) obtidos nas semanas de intervenção. O projeto foi aprovado para execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), (ANEXO 1). Todos os animais passaram por um período de ambientação de sete

dias após a chegada ao laboratório de experimentação. Neste período, os animais não foram submetidos a qualquer procedimento experimental, apenas pesagem e aferição da glicemia a título de comparação posterior aos resultados. Os ratos foram mantidos em grupos de dois animais por caixa, separados aleatoriamente, de forma que cada duas caixas representasse um grupo experimental, totalizando assim, 12 caixas. Foram utilizados oito grupos com quatro animais. No Grupo I – Saudável não intervenção; Grupo II – Diabéticos não intervenção; Grupo III – diabéticos intervenção (metformina); Grupo IV – Diabéticos intervenção (dose 1 precipitado); Grupo V – Diabéticos intervenção (dose 2 precipitado); Grupo VI – Diabéticos intervenção (dose 1 acetato de etila folhas); Grupo VII – Diabéticos intervenção (dose 2 acetato de etila folhas); Grupo VIII – Diabéticos intervenção (dose 1 remanescente caule).

Os animais foram mantidos com livre acesso a água e comida, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sistemas de ventilação adequados. Oito horas antes do início dos experimentos permaneceram em jejum com livre acesso à água. Os ensaios foram conduzidos de acordo com as orientações estabelecidas para a experimentação animal e com as considerações éticas, a partir da prévia aprovação do Comitê de ética em animais experimentais da Universidade Federal do Paraná.

8.2 ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS COM ESTREPTOZOTOCINA

Foram induzidos ao diabetes tipo 1 com uma única aplicação de estreptozotocina (STZ), dissolvida em tampão de citrato 2% com pH 6, via intraperitoneal (i.p.), em uma dose de 60mg/kg de peso para cada animal. Todos os ratos, incluindo o grupo controle saudável, foram submetidos ao jejum de 12 horas, previamente à indução. Após 72 horas da aplicação de STZ, foi avaliada a glicemia capilar, utilizando um glicosímetro portátil (FreeStyle Freedom Lite, Abbott®) e a confirmação do diabetes se deu pelos níveis de glicemia superiores a 200 mg/dl (YOSHINO et al., 1989).

As amostras foram administradas por via gavagem esofágica nos grupos intervenção e foram produzidas no dia em uma única etapa para evitar possíveis alterações. A dose por quilo de peso para cada animal e então ser dissolvido em

0,5 ml água destilada, conforme metodologia adaptada de GANDI e RAO, 2015. Induzido através de uma única injeção intravenosa de estreptozotocinas em soro fisiológico na dose de 60 mg/Kg de peso corporal em animais.

Os animais pertencentes ao grupo controle, tanto diabético, quanto controle, não receberam nenhum tratamento. Porém, também foram submetidos ao procedimento de gavagem, utilizando apenas água destilada na administração, a fim de evitar resultados discrepantes no controle glicêmico devido à exposição dos animais ao estresse. A gavagem foi realizada diariamente, entre as 13 horas e às 15 horas, durante 21 dias.

8.2.1 Análises Bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca no momento da eutanásia, com os animais previamente sedados. Cerca de 2 mL do sangue coletado foi mantido em tubo de coleta com EDTA e enviado para análise de hemoglobina glicada em laboratório externo imediatamente após a coleta. Outros 2 mL da amostra coletada foram centrifugados a 3500 RPM durante 15 minutos para separação do soro com auxílio de micropipeta. Os demais exames bioquímicos foram realizados no laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia de Universidade Federal do Paraná, nos grupos controle, diabéticos não tratados e diabéticos tratados com as amostras. As amostras foram mantidas congeladas a -18°C até o momento de análise. O soro utilizado para realização dos exames bioquímicos foi descongelado e pipetado (200 µl) em ependorffs acondicionados na raque de leitura do equipamento (CobasMira - Roche®). Para os testes de glicemia, triglicerídeos e colesterol total foram utilizados os kits comerciais com monoreagentes. AST, ALT, creatinina e uréia, birreagentes, em uma proporção de 2:1 de cada reagente e homogeneizados, conforme indicação do fabricante. Para determinação dos valores de colesterol HDL foi realizada anteriormente de maneira manual a fase de precipitação com o kit comercial LabTest®. Colocou-se 150 µl de soro de cada amostra em um tubo de ensaio de vidro para hemólise com 150 µl de precipitante e agitado por 30 segundos em agitador de tubos e centrifugado a 3500RPM durante 15 minutos para precipitação das lipoproteínas de baixa densidade. O

sobrenadante foi então utilizado para determinação dos valores de HDL colesterol com o mesmo kit de determinação para colesterol total. A glicemia foi determinada pelo método glicose oxidase/peroxidase (GOD/POD), utilizando o kit disponível comercialmente pela empresa LabTest®. Para as dosagens de hemoglobina glicada, o método utilizado foi por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Triglicerídeos, com o método enzimático colorimétrico. Para avaliação da função renal e hepática, foram utilizados os kits comerciais LabTest®.

Uréia, AST e ALT, realizadas pelo método cinético ultravioleta e creatinina pelo método cinético de dois pontos. Todos os exames bioquímicos, com exceção da hemoglobina glicada, foram realizados no aparelho COBAS®. Para determinação dos valores séricos de LDL-colesterol, colesterol não-HDL e VLDL foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

$$\text{LDL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{Colesterol não-HDL} = \text{total} - \text{HDL}$$

8.2.2 Análise Histopatológica

Os tecidos hepático, renal, pancreático, cardíaco, pulmonar e do baço foram dessecados após a eutanásia e pesados em balança semianalítica. As análises histopatológicas foram realizadas segundo metodologia de RIBEIRO, FILHO e GROTZNER (2012), apenas com os tecidos do fígado, rim e pâncreas, através da coloração H.E. (hematoxila/eosina), utilizando apenas parte do tecido total coletado dos animais. Para técnica histopatológica, as amostras de tecidos hepático, renal e pancreático foram coletadas e cortadas em tamanho equivalente a um terço do tamanho total de cada órgão. O acondicionamento em fixador ALFAC foi mantido por 16 horas, em um volume equivalente a 5 vezes o volume das peças histológicas. No dia seguinte, retirou-se o fixador e a conservação foi feita em álcool 70% até o preparo para início das análises. O fixador ALFAC foi preparado uma hora antes de ser utilizado, sendo composto de 85ml de álcool 80%, 10ml de formaldeído P.A. e 5ml de ácido acético glacial, para um rendimento de 100ml.

As peças histológicas foram mantidas em álcool 70% até o dia anterior ao processamento das mesmas, neste momento o álcool 70% foi removido dos frascos e substituído por álcool 80%, dando início ao processo de desidratação.

Consequentemente, após 1 hora em álcool 80%, as peças permaneceram por mais 1 hora em álcool 85%, posteriormente, substituído por álcool 90% pelo mesmo período de 1h e finalmente mantido em álcool 95% overnight. No dia seguinte, o álcool 95% foi substituído pelo álcool P.A., permanecendo por 1h e substituído novamente por álcool P.A. para então dar início ao processo de processamento do material analisado.

Os tecidos foram mantidos por 30 minutos em xilol e transferidos por mais 15 minutos para outro banho de xilol, até ser possível observar as extremidades das peças translúcidas, processo conhecido como diafanização, ou seja, remoção das impurezas.

A etapa seguinte consistiu em manter as amostras teciduais em parafina (em estado líquido) por 60 minutos na estufa a 60°C, para então incluir novamente parafina e manter por mais 90 minutos em estufa a 60 °C. Para inclusão das amostras, foram utilizadas formas de papel previamente identificadas com a marcação de cada peça e completadas com parafina até um terço de sua capacidade, os tecidos foram retirados dos recipientes em que foram mantidos na estufa e transferidos, com o auxílio de uma pinça, para as formas de papel, posicionados no centro e com a maior superfície voltada para cima.

Para secar a parafina, as formas de papel com as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o dia seguinte. Para Prismar, os cubos enrijecidos de parafina contendo as amostras, foi utilizada uma faca para retirar as bordas e o restante da parafina ao redor do tecido foi derretido utilizando uma chapa de metal aquecida por lamparina.

A microtomia foi realizada após a fixação dos cubos de parafina já prismados em madeira, para dar suporte ao micrótomo e segurar a peça para o corte. A fixação do cubo na madeira foi feita com o derretimento da superfície inferior do cubo, com uma lamparina, e fixado ainda quente na madeira, mantido em geladeira para enrijecer novamente. O micrótomo foi ajustado para corte na espessura de 5 micrómetros e a fita contendo a amostra foi fixada na lâmina

utilizando albumina 10%. Finalmente, para concluir o preparo das lâminas para análise, foi realizada a bateria de coloração.

Primeiramente as lâminas foram posicionadas no suporte de coloração, e mapeadas conforme sua localização no suporte, para posterior identificação, que inevitavelmente é apagada durante o processo de coloração.

Ao finalizar a bateria de coloração, que utiliza concentrações variadas de imersão em álcool e xilol, as lâminas foram retiradas uma a uma e identificadas novamente conforme o mapeamento prévio. A lamínula foi posicionada sobre as amostras, com adição de uma gota do meio de montagem Permount (Fisher Scientific®).

O preparo das lâminas e sua coloração foram realizadas no laboratório de biologia celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. A análise das lâminas foi realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através de microscopia óptica.

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas deste estudo. Os resultados foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA em duas vias) com comparação de médias através do teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os resultados experimentais de monitoramento semanal de peso e glicemia, foi realizado o teste ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ($p < 0,05$).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL

Os resultados da análise da umidade (perda de água por dessecação) e das cinzas (determinação de resíduo por incineração) estão demonstrados na TABELA 6 e apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A importância da determinação da perda por dessecação está relacionada à estabilidade microbiológica da matéria-prima vegetal, como expressão da sua suscetibilidade ao desenvolvimento de fungos e bactérias e à estabilidade química, representada, especialmente, pelos processos de hidrólise (COSTA, et al., 2009).

Já para o extrato aquoso, o teor de sólido obtido para as folhas foi de 5,1% e para o caule foi de 3,2%.

TABELA – 6 PERDA POR DESSECAÇÃO, DE CINZAS TOTAIS E TEOR DE SÓLIDOS DE *C. althaeifolia*

ANÁLISE	MATERIAL VEGETAL FOLHAS	MATERIAL VEGETAL CAULE
Umidade (% e DP)	8,39 $\pm$ 0,55	7,94 $\pm$ 0,87
Cinzas totais (%DP)	4,11 $\pm$ 0,27	2,49 $\pm$ 0,62
Teor de sólidos (%DP)	0,08 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,04
Teor de sólidos EA (%DP)	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,07

Nota: EA – extrato aquoso; DP – desvio padrão.

FONTE: a autora (2017).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o teor de umidade fica em torno de 8 – 14% aproximadamente, limite máximo recomendado para vegetais, corroborando com os resultados acima citados referente a espécie de *C. althaeifolia*. A determinação da perda por secagem impedindo que o material permaneça úmido devido a uma secagem ineficiente ou que haja degradação de compostos por secagem excessiva (MACIEL, et al., 2002). A finalidade da secagem é impedir reações de hidrólise e contaminação microbiana, além de reduzir volume e peso facilitando a moagem do material (LACERDA, et al., 2009).

Estudos sobre a constituição química e teores de cinzas das plantas cultivadas são importantes como etapa de identificação das espécies, entretanto muitas plantas não possuem monografias farmacopeias e necessitam de estudos

visando estabelecer alguns parâmetros de qualidade, tais como os marcadores químicos e valores de cinzas totais (ALVES, et al., 2007).

Neste trabalho, foram determinados os parâmetros para as análises do teor de umidade e cinzas totais para a espécie *C. althaeifolia*, pela primeira vez. A determinação destas análises é muito importante para o controle de qualidade, uma vez que, auxilia na confirmação da identidade botânica e permite a identificação de adulterações e materiais estranhos (pureza inorgânicas) na matéria-prima vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA 6ª edição, 2019). Estes dados são considerados parâmetros de qualidade, e são amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos.

O teor de sólidos oferece parâmetros para que a amostra esteja dentro das especificações de uma maneira padronizada, foi executado com a finalidade de garantir que os volumes (mg/mL) das amostras sejam suficientes para executar as análises definidas para este estudo.

9.1.2 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica oferece parâmetros de qualidade.

Pela análise térmica, constatou-se que as folhas de *C. althaeifolia* apresentaram boa estabilidade térmica até 124 °C, e o caule até 152 °C, o que garante confiabilidade térmica nos processos de extração à quente, como em aparelhos de Soxhlet.

A perda percentual de massa da matéria orgânica, obtida através da análise térmica, assim como as temperaturas iniciais e finais de cada etapa, são apresentadas na TABELA 7. O percentual de degradação é maior quando a análise ocorre em atmosfera de ar sintético, isso porque o oxigênio desempenha um papel dominante e a degradação oxidativa prossegue mais rapidamente do que a pirólise em nitrogênio (SHAFIZADEH; BRADBURY, 1979) resultando em um resíduo denominado de cinzas, visto que, a análise foi desempenhada em atmosfera de nitrogênio, esse resíduo é chamado de resíduo carbonífero, pois nem todo o carbono foi degradado, por não possuir oxigênio. Comparando com a

análise feita em mufla, o residual de cinzas é bem inferior ao demonstrado pelo TG, assegurando e corroborando com resultados das duas análises testadas.

O perfil de degradação térmica das folhas de *C. althaeifolia* está identificado através da curva TG no GRÁFICO 1, e apresentaram um comportamento semelhante, ao perfil de degradação térmica do caule, com quatro perdas de massa em atmosfera de nitrogênio.

TABELA 7 - PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS E CAULE DE *C. althaeifolia*

ATMOSFERA DE N ₂					
Etapas		Folha	%	Caule	%
1	T _I (°C)	20	9	20	5,0
	T _F (°C)	124		152	
2	T _I (°C)	124	48,6	152	55,6
	T _F (°C)	388		392	
3	T _I (°C)	388	22,6	392	18,2
	T _F (°C)	600		600	
4	T _I (°C)	600	19,8	600	21,2
	T _F (°C)				

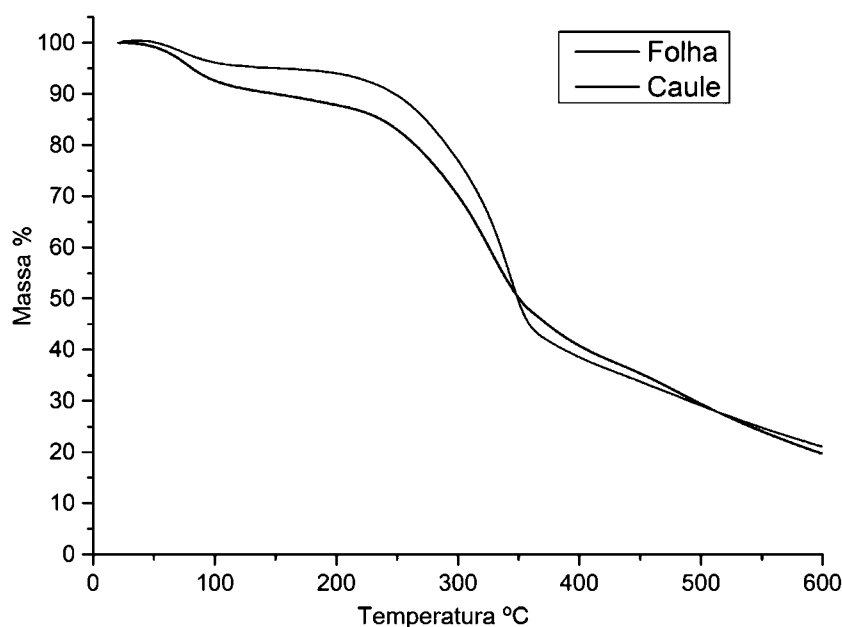
Nota: TI: Temperatura inicial da etapa; TF: Temperatura final da etapa; %: percentual de massa degradada em cada etapa.

FONTE: a autora (2019).

A perda de água ocorreu entre a temperatura inicial do experimento, em torno de 20 °C até aproximadamente 124 °C para as folhas e 152 °C para o caule (GRÁFICO 1). A perda de massa no primeiro momento foi de 9% para as folhas e 5% para o caule em atmosfera de nitrogênio, resultados um pouco acima do obtido pelo método gravimétrico convencional para determinação da umidade (8,39% e 7,94% respectivamente para folhas e caule), com prevalência de umidade nas folhas.

O processo referente à etapa 2, onde foi observado a mais acentuada perda de massa, pode ser atribuído à oxidação e decomposição da matéria orgânica, como taninos e flavonoides (SOUZA, 2015), degradação térmica dos triglicerídeos, principalmente os constituídos por ácidos graxos poli-insaturados (BENÍCIO, et al., 2009), assim como carboidratos e demais compostos orgânicos (ARAÚJO, et al., 2006). Martins et al. (2009) comentam que até cerca de 250 °C, pode ocorrer simultaneamente reações de oxidação, reticulação e cisão de cadeias.

GRÁFICO 1 - PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DAS FOLHAS E CAULE DE *C. althaeifolia*



FONTE: a autora (2019)

No processo de degradação que ocorre acima de 250 °C, em atmosfera de ar sintético, predomina a degradação oxidativa, com perda de massa acentuada e formação de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. A oxidação a baixa temperatura pode ser considerada como sendo realizada em três estágios: iniciação, propagação e produção de produtos de degradação. A propagação da reação é através da produção de hidroperóxidos que rapidamente alcançam uma concentração estável a baixas temperaturas. As taxas de produção de dióxido de carbono e monóxido de carbono aumentam gradualmente, indicando a natureza autocatalítica da reação (SHAFIZADEH; BRADBURY, 1979). Pereira et al. (2013),

relatam que a perda de massa que ocorre de 250 a 300 °C, pode também ser atribuída à degradação das hemiceluloses.

Em atmosfera de gás nitrogênio com o intervalo de temperatura até 600 °C, não houve nova etapa de degradação vegetal, obtendo-se massa equivalente a 22,6% nas folhas e 18,2% no caule, correspondendo a resíduos carbonados e polímeros. Em atmosfera sob fluxo de ar sintético os resíduos carbonizados se transformam em cinzas, representados através da etapa 4, nesta etapa, obtivemos os valores de resíduos carboníferos de 19,8% para as folhas e 21,2% para o caule. Elementos minerais como cálcio, ferro, magnésio ou outros que supostamente sejam encontrados na amostra, constituem as cinzas, que se apresentam na forma de sulfatos, carbonatos, fosfatos, silicatos e cloretos, dependendo das condições de incineração e da composição química do vegetal (CECCHI, 2003). Os teores de cinzas foram obtidos diretamente da porcentagem do produto de decomposição térmica na temperatura de 600 °C.

Obteve-se através do método gravimétrico convencional, um teor de cinzas equivalente a 2,49% para as folhas e 4,11% para o caule, que divergem, ao serem comparados com os resíduos obtidos por análise térmica. Essa diferença pode estar relacionada a maior precisão da termogravimetria e pela temperatura de varredura a qual as amostras foram submetidas, sendo decompostas em seus respectivos óxidos (SOUZA, 2010).

9.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia*

Foi realizada uma extração do óleo essencial de *C. althaeifolia* das folhas da planta seca. O óleo obtido apresentou uma coloração amarelada e com odor similar, forte e característico, com rendimento calculado sobre a massa do material seco, de 0,8358% (v/m).

Foram determinadas as análises químicas do óleo essencial das folhas, sendo que, sua composição química está expressa na TABELA 8.

TABELA 8 - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

AI	AI _{TEÓRICO}	COMPOSTO	[] %
1020	1024	Limoneno	1,94
1036	1044	(E)- β -Ocimeno	0,60
1158	1174	Terpineno-4-ol	0,85
1196	1215	Carveol	0,38
1212	1239	Carvona	0,40
1343	1350	α -longipineno	1,10
1364	1373	α -Ylangeno	0,33
1369	1374	α -Copaeno	0,36
1375	1387	β -Bourboneno	0,17
1382	1389	β -Elemeno	0,45
1392	1400	Sibireno	0,43
1402	1409	α -Gurjuneno	0,33
1409	1417	(E)-Cariofileno	9,21
1428	1439	Aromadendreno	1,73
1436	1442	6,9-guaiadieno	0,50
1441	1452	α -Humuleno	2,45
1465	1478	γ -Muuroleno	0,64
1471	1481	γ-Himachaleno	11,62
1473	1489	β -Selinene	0,48
1483	1500	Biciclogermacreno	3,48
1488	1502	Trans- β -Guaieno	0,91
1498	1500	α -Muuroleno	0,94
1509	1522	δ -Cadineno	1,94
1520	1544	α -Calacoreno	0,32
1557	1577	Espatulanol	10,08
1561	1582	Oxido de cariofileno	9,93
1583	1608	Humulene epoxide	1,65
1609	1627	1-epi-cubenol	1,21
1610	1632	α -acorenol	0,38
1613	1639	Aromadendreno epoxido	0,54
1618	1635	cis-Cadin-4-en-7-ol	2,49
1622	1636	β -acorenol	2,80

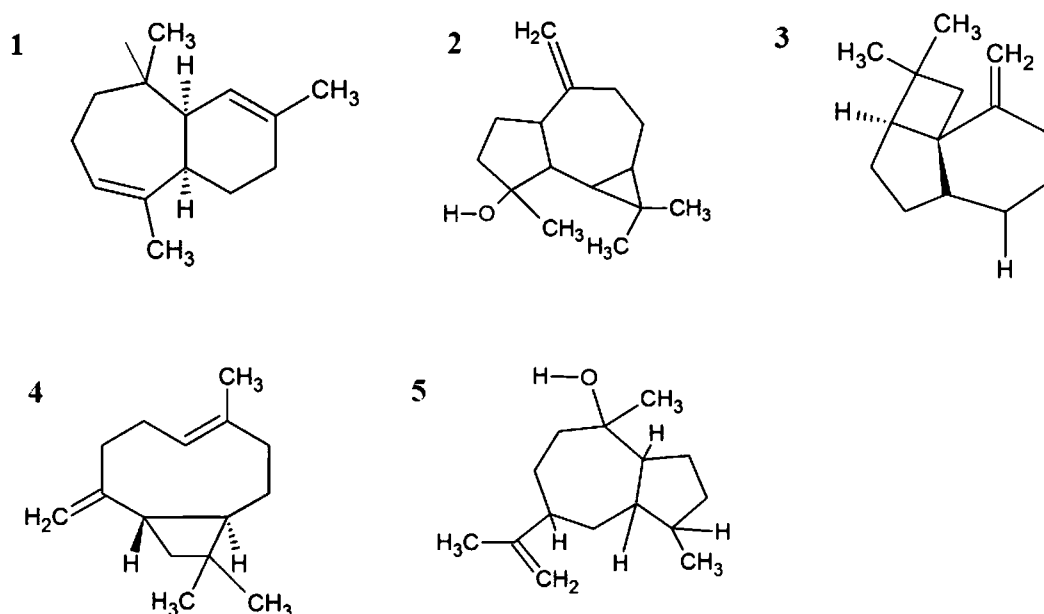
			continuação
1630	1651	Pogostol	6,31
1645	1666	14-hidroxi-(Z) Cariofileno	3,43
1657	1685	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	0,91
1690	1690	6-Isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	0,54

FONTE: a autora (2017).

Foram identificados cerca de 5 (cinco) compostos majoritários representado pelos compostos químicos: γ Himachaleno (11,62%), Espatuleno (10,08%), Óxido de Cariofileno (9,93%), (E) Cariofileno (9,21%) e Pogostol (6,31%) (FIGURA 12).

De acordo com o site PubChem, o γ Himachaleno possui uma fórmula molecular correspondente a $C_{15}H_{24}$ e uma estrutura molecular demonstrada na FIGURA 12. Este composto identificado é de extremo interesse pois ainda não foi identificado na família Lamiaceae e se tem poucas informações deste composto na literatura.

FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM *C. althaeifolia*



Nota: 1- estrutura molecular do γ Himachaleno, 2- estrutura molecular do Espatuleno, 3- estrutura molecular do óxido de Cariofileno, 4- estrutura molecular do (E) Cariofileno e 5- estrutura molecular do Pogostol.

FONTE: a autora (2019).

O segundo composto identificado com maior concentração foi o Epatulenol cuja sua fórmula molecular é representada por $C_{15}H_{24}O$ e sua massa molecular é de 220,359g/mol.

É encontrado em bebidas alcoólicas e reportado em diversas famílias, especialmente nas Lamiaceae. Na literatura, possui atividades comprovadas em atividade antimicrobiana (TADIC, et al., 2017), toxicidade e atividade antitumoral (ROLIM, et al., 2017), antinociceptiva e anti-inflamatória (BARRETO, et al., 2016).

A seguir, o terceiro composto majoritário encontrado no óleo essencial foi o Óxido de Cariofileno, que segundo o Pubchem, é um composto sesquiterpênico que possui a fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ e uma massa molar equivalente a 220,356g/mol.

É amplamente usado como flavorizante e é encontrado em diversas famílias, incluindo a de interesse. Tem estudos comprovando sua eficiência em atividade alelopática (ABD EL-GAWAD, et al., 2018), antiparasitária (ESTEVAM, et al., 2017), anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica e atividade citotóxica (COTE, et al., 2017).

O quarto composto de maior concentração identificado foi o (E) Cariofileno, como o composto citado acima, é um sesquiterpeno amplamente utilizado como flavorizante para alimentos e possui a fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ e massa molar de 204,36g/mol. Completando as informações do site Pubchem, este sesquiterpeno possui um ponto de ebulição de 268°C e densidade de 905 Kg/m³. Tem atividade comprovada como anticâncer, antioxidante e antimicrobiana (ESTEVAM, et al., 2017).

Por fim, o quinto composto identificado de maior concentração foi o Pogostol que possui fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ com massa molecular de 222,372g/mol.

Tem ação comprovada na literatura com atividade antimicrobiana (COTE, et al., 2017).

9.3 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

A seguir, na TABELA 9, denota os rendimentos referente a todas as amostras obtidas por extração de *C. althaeifolia*.

TABELA 9 – RENDIMENTOS OBTIDOS A PARTIR DE *C. althaeifolia*

RENDIMENTOS			
FOLHAS		CAULE	
EB	28,7%	EB	8,6%
H	25,8%	H	31,0%
C	24,5%	C	29,3%
AE	3,5%	AE	5,8%
R	17,5%	R	25,3%
EA	97%	EA	98%
PREP	80 g	-	-

Nota: EB – extrato bruto; H – hexano; C – clorofórmica; AE – acetato de etila; R – remanescente; EA – extrato aquoso; PREP – precipitado obtido da fração hexânica das folhas.

FONTE: a autora (2018).

9.3.1 Screening fitoquímico por cromatografia de camada delgada (CCD)

A análise fitoquímica por CCD do extrato e frações demonstrou a presença de alguns grupos de substâncias como os esteroides/terpenos e taninos mais expressivos, em todas as amostras e cumarinas nas amostras clorofórmio e acetato de etila no caule e folhas, flavonoides no extrato bruto e acetato de etila no caule e folhas. Não foram observados alcaloides. Os resultados obtidos para as folhas foram similares aos resultados obtidos para os caules. Os resultados obtidos através do screening fitoquímico do extrato bruto e frações por CCD estão apresentados na (TABELA 10).

TABELA 10 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS IDENTIFICADOS EM FOLHAS E CAULE DE *C. althaeifolia*, EM ANÁLISE POR CCD

	Amostra	Esteróides e Terpenos	Flavonóides	Alcalóides	Cumarinas	Taninos
CAULE	Hexano	+	-	-	-	+
	Clorofórmio	+	-	-	+	+
	Acetato de etila	+	+	-	+	+
	Remanescente	+	-	-	-	+
	Extrato bruto	+	+	-	-	+
FOLHA	Hexano	+	-	-	-	+
	Clorofórmio	+	-	-	+	+
	Acetato de etila	+	+	-	+	+
	Remanescente	+	-	-	-	+
	Extrato bruto	+	+	-	-	+

FONTE: a autora (2019).

O screening fitoquímico por CCD é imprescindível para o conhecimento dos grupos de metabólitos secundários em extratos vegetais, sendo utilizados normalmente como precursores dos processos de separação, como a CC, para obtenções de compostos isolados, purificados e identificados.

Após agitação das amostras, foi observada a formação de espuma intensa e persistente em todos os extratos, indicando a presença de saponinas na droga vegetal. As saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), o que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes (SOARES, 2013), e que caracteriza a formação da espuma.

Na família das Lamiaceae, as saponinas podem ser citotóxicas atuando sobre células tumorais, além de apresentarem atividade hemolítica, anti-inflamatória, antifúngica e antiparasitária (URITU, et al., 2018).

9.3.2 Isolamento e identificação de compostos por coluna Sephadex

Foi feito inicialmente uma coluna aberta de separação (Sephadex) (FIGURA 13) do precipitado da fração hexânica das folhas. Foi utilizado cerca de 1,5 litros de fase móvel, a fase móvel utilizada foi o metanol, totalizando 99 frascos, onde, o frasco de número 34 foi levado para RMN.

FIGURA 13 – COLUNA ABERTA DE SEPARAÇÃO SEPHADEX

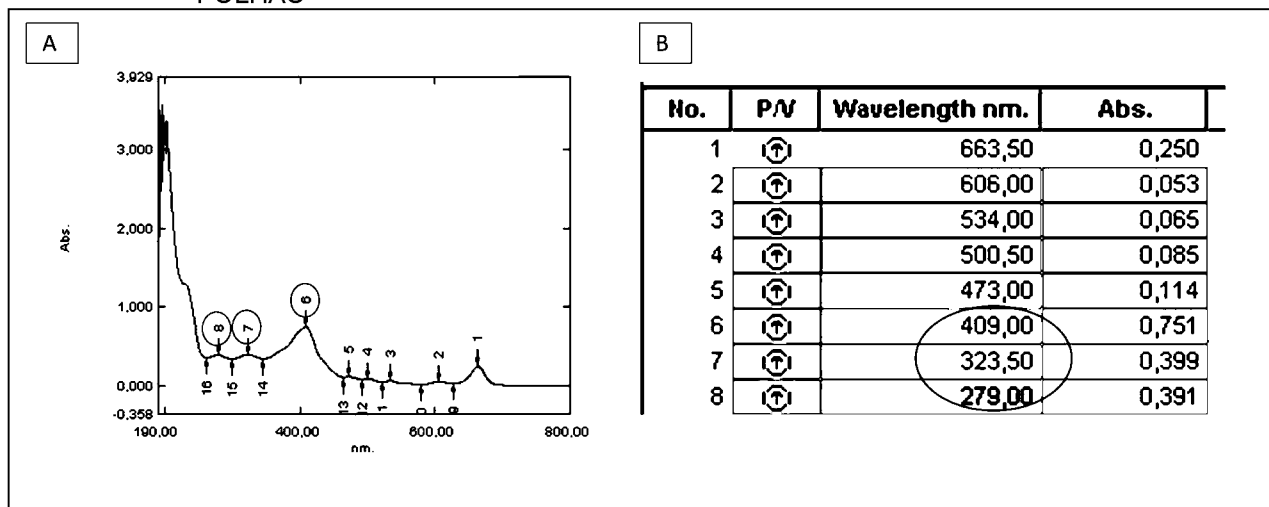


FONTE: a autora (2019).

9.3.3 Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente foi feita uma coluna no espectrofotômetro de ultravioleta para determinar as bandas de absorção do precipitado da fração hexânica das folhas. A amostra foi diluída em acetonitrila (1:5), foi escolhido então, 3 comprimentos de onda para a análise: 409, 323,5 e 270 como mostra a FIGURA 14.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS



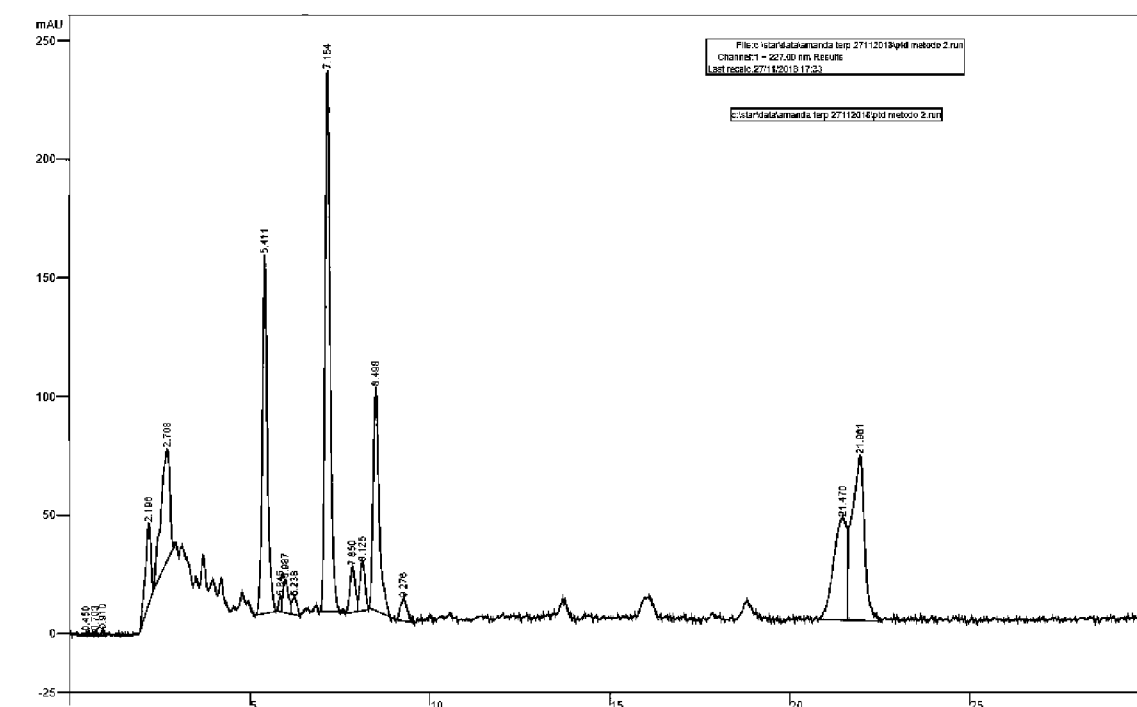
Nota: Fig. A – Screening cromatográfico da amostra do precipitado da fração hexânica das folhas; Fig. B Resultado do Screening para a escolha do melhor comprimento de onda.

FONTE: a autora (2020).

O cromatograma com a melhor metodologia e comprimento de onda foi com a condição gradiente acetonitrila:água 70:30 e 83:17 com o comprimento de onda de 277 nm como demonstrado na FIGURA 15.

Os círculos mostrados no cromatograma, confirmam a presença de Terpeno, mas precisa de análise mais detalhada para a confirmação do composto presente no precipitado.

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA APÓS SCREENING



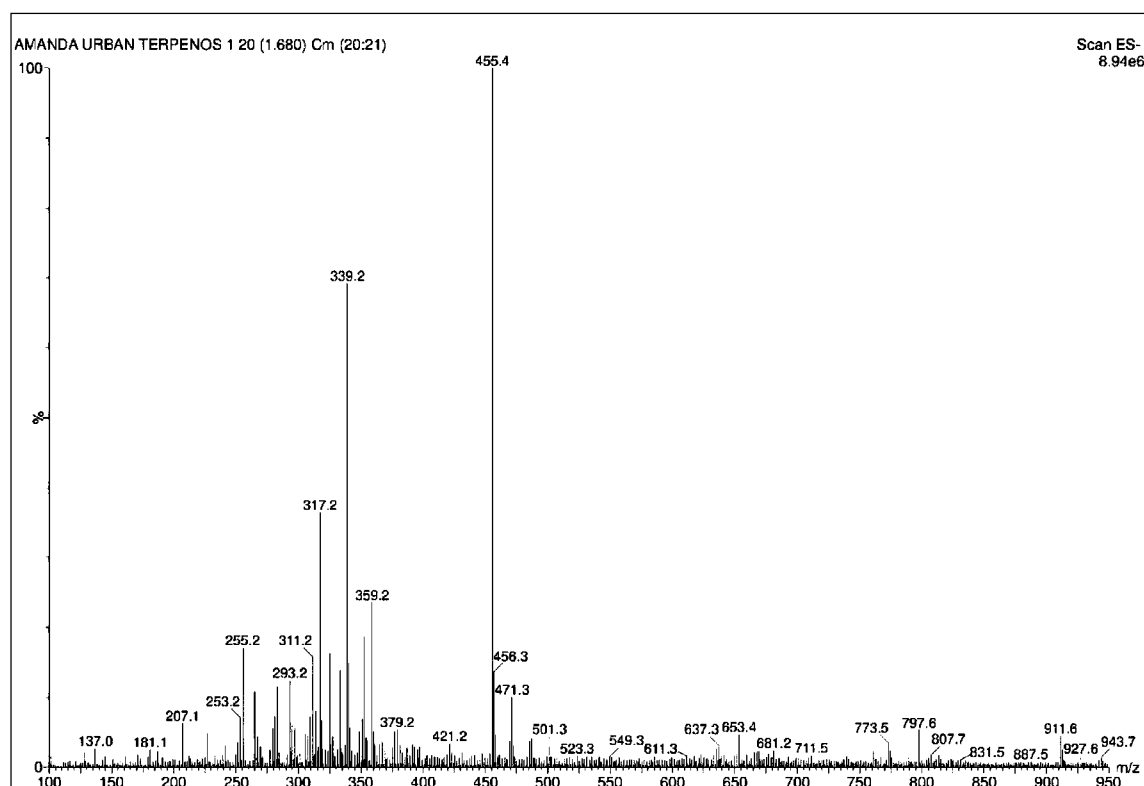
FONTE: a autora (2020).

De acordo com Camina e colaboradores, as espécies pertencentes à família das Lamiaceae, são bem conhecidas pela presença de aromas em seus tricomas glandulares que são fonte de óleos aromáticos voláteis e terpenos, corroborando com os resultados acima citados (CAMINA, et al., 2018).

9.3.4 Isolamento e identificação de compostos por espectroscopia de massas

A amostra do precipitado da fração hexânica das folhas foi dissolvida em metanol como citado acima, na FIGURA 16 mostra os dois principais fragmentos identificados. Os principais íons de fragmentos em m/z que foram detectados foram os 455 e 339 no modo negativo, que de acordo com a literatura, referem-se ao ácido oleanólico (CHEN, et al., 2011), composto que é amplamente encontrado na família das Lamiaceae (HARLEY; PASTORE, 2012).

FIGURA 16 - ESPECTRO DA AMOSTRA DO PRECIPITADO POR ESI-MS NO MODO DE ÍON NEGATIVO POR INJEÇÃO DIRETA EM LOOP NA MASSA DE CAPTURA DE ÍONS.

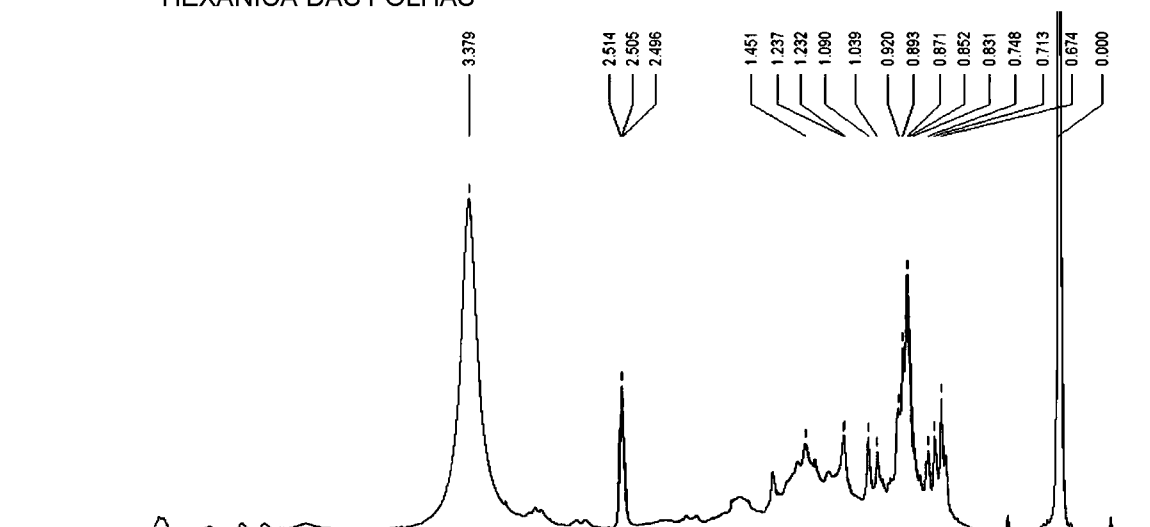


FONTE: a autora (2020).

9.3.5 Isolamento e identificação de compostos por RMN

Foi feita análise de ressonância magnética nuclear (RMN) (FIGURA 17) para confirmar as análises de cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia de massas. Após a coluna de Sephadex do precipitado da fração hexânica das folhas, o frasco de número 34 foi submetido à análise de RMN para identificar e verificar se houve o isolamento de algum composto químico. Foi utilizado como solvente o DMSO d6 deuterado e levado para análise de Próton e Carbono (^1H e ^{13}C respectivamente).

FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS



FONTE: a autora (2020).

O espectro de RMN de ^1H mostrou três singletos em δ 0,748, δ 0,920 e δ 1,451, integrando para três hidrogênios cada, característicos de hidrogênios de grupos metílicos de triterpenos. Apresentou ainda, um duplo dubleto, um em δ 2,514 e um singlete largo em δ 3,379, todos integrando para um hidrogênio. O espectro de RMN de ^{13}C não foi possível obter leitura, pois, como o precipitado apresentou uma coloração verde bem escura, a concentração ideal para leitura não dispunha da concentração para a leitura do ^{13}C . Por apresentar difícil leitura, foi proposta a leitura direta em espectrômetro de massas.

As informações acima permitiram propor que a substância encontrada é um terpeno, e é confirmada pelo espectro de massas acima citado. Os dados de RMN estão corroborando com os dados da literatura para a substância identificada pelo espectrofotômetro de massas (MAHATO; KUNDO, 2003).

9.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia Salina*

Artemia salina é um micro crustáceo de água salgada empregado como alimento vivo para peixes, com facilidade de ser encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da sua concentração média letal (CL_{50}). Este bioensaio tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está

sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção de toxicidade e fototoxicidade. Vários estudos tentam correlatar a toxicidade sobre o crustáceo com atividades antifúngicas, antimicrobianas, parasiticida, viruscida e tripanossomicida (MEYER, et al., 1982b).

Para o cálculo da CL₅₀, os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probitos e estão expressos na TABELA 10 (FINNEY, 1971).

TABELA 11 – TAXA DE MORTALIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES FRENTE À *Artemia salina*

CONCENTRAÇÃO AMOSTRA	MORTALIDADE (µG/ML)					CL ₅₀ (µG/ML)	IC ₅₀ DE 95% (µG/ML)
	75	200	500	750	1000		
	FOLHAS						
EB	0	1	2	4	6	>1000	---
EA	0	1	2	2	3	>1000	---
OE	1	1	3	3	4	>1000	---
PREP	2	3	3	4	4	>1000	---
FH	0	2	3	3	4	>1000	---
FC	1	0	3	3	5	>1000	---
FAC	3	4	9	10	11	>1000	---
FR	0	3	3	4	6	>1000	---
	CAULE						
EB	0	0	1	1	2	>1000	---
EA	1	2	3	4	6	>1000	---
FH	0	1	1	3	6	>1000	---
FC	1	2	3	3	10	>1000	---
FAC	0	1	5	10	13	>1000	---
FR	0	3	4	4	7	>1000	---
	50	75	100	125	150		
	QUINIDINA						
	13	16	25	26	28	142,27	122,48-186,91

Nota: Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA), Óleo Essencial (OE), Precipitado (PREP), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAC) e Fração Remanescente (FR), CL₅₀ – concentração letal média, IC₅₀ – concentração inibitória necessária para inibir 50% de uma determinada concentração.

FONTE: a autora (2018).

Contemplando os dados acima, é possível verificar que nenhuma das amostras testadas se mostraram ativa contra o micro crustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram um resultado de CL₅₀ superior a 1000 µg/mL, que segundo (MEYER, et al., 1982a), é a concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa.

Os controles feitos com o solvente etanol não apresentaram interferência sobre os resultados, sendo que, nenhuma larva morreu em sua presença, do mesmo modo que, o controle realizado com água salgada. Deste modo, os extratos e frações da planta em estudo, não apresentam toxicidade frente ao teste realizado.

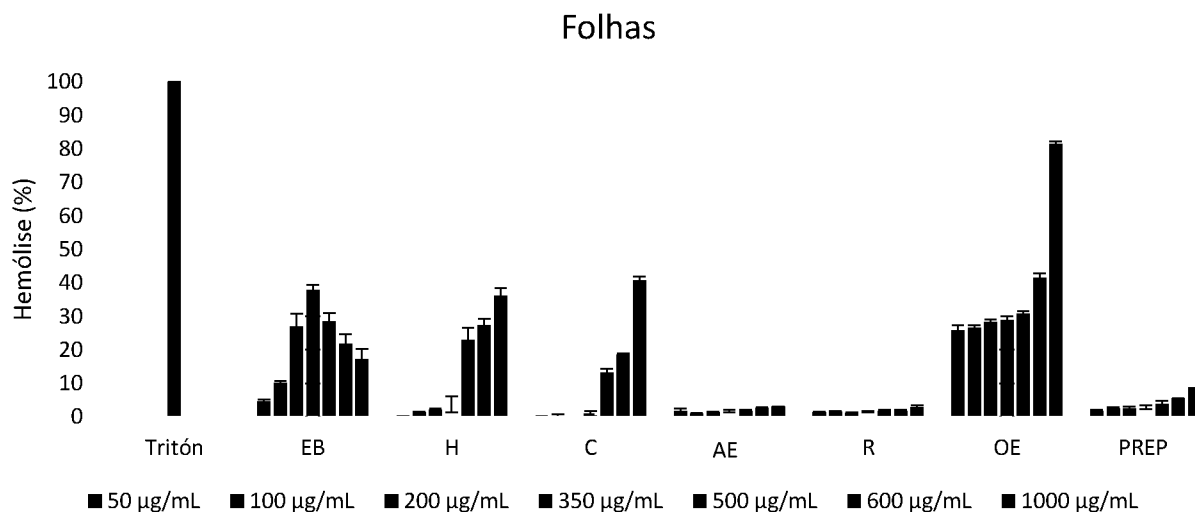
9.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliação da atividade hemolítica proposta por (BANERJEE, et al., 2008), foram testados os extratos, frações e precipitado das folhas e caule obtidos da *C. althaeifolia*, com o objetivo de verificar hemólise produzida pelas amostras, sendo que, não foi observado hemólise total para nenhuma amostra em nenhuma diluição, sempre sendo considerado 100% do Triton que foi utilizado como controle positivo, demonstrando que as amostras não foram capazes de promover hemólise total *in vitro*. Já a avaliação da atividade hemolítica na amostra do óleo essencial proposto por (ASLAM, et al., 1995), demonstrou uma atividade hemolítica de 81% para a maior concentração testada.

A avaliação da atividade hemolítica é apontada como um indicador de toxicidade geral e bioatividade, de grande importância na averiguação da ação de extratos de plantas sobre o sangue humano. Estes testes *in vitro*, tem sido utilizados como um método de triagem para diferentes agentes tóxicos (KUBLIK et al., 1996), principalmente na verificação de toxicidade em plantas (GANDHI; CHERIAN, 2000). Essa atividade é bastante encontrada em espécies da família Lamiaceae (KHANI, et al., 2019; SAMBER, et al., 2015).

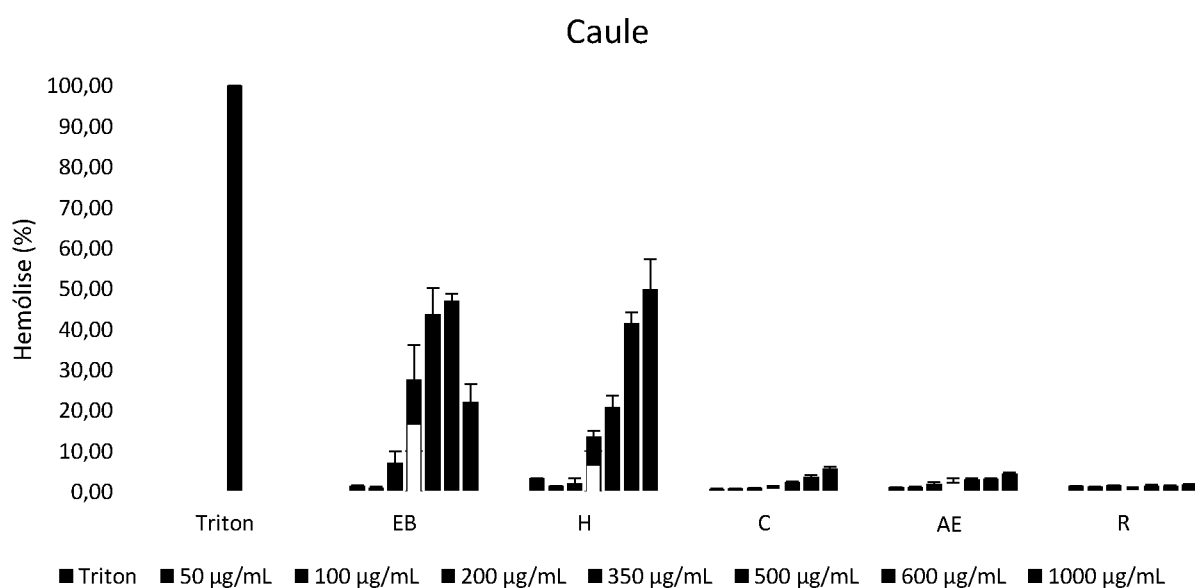
Os resultados estão expressos nos Gráficos 2 e 3.

GRÁFICO 2 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *C. althaeifolia*



Nota: Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (AE), Fração Remanescente (FR), Óleo Essencial (OE) e Precipitado (PREP).
 FONTE: a autora (2017).

GRÁFICO 3 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE *C. althaeifolia*



Nota: Extrato Bruto (EB), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (AE) e Fração Remanescente (FR).
 FONTE: a autora (2017).

As amostras deste trabalho apresentaram uma espécie de espuma quando agitadas, possivelmente por possuir grandes quantidades de saponinas, comprovadas após teste fitoquímico para saponinas com os extratos hidroalcoólico, foi possível também detectar grande concentração de compostos

fenólicos nas amostras, o que pode justificar o efeito hemolítico obtido nas amostras do EB e H, no entanto devem ser realizados novos estudos para encontrar novas substâncias e mecanismos específicos para a atividade hemolítica de *C. althaeifolia*.

9.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

No presente estudo, quando se avaliou o processo de germinação das sementes de *L. sativa* sem qualquer tipo de interferência aleloquímica, obteve-se um percentual de 90% de sementes germinadas. Esse índice pode ser atribuído ao nível de vigor das sementes utilizadas (PÁDUA; VIEIRA, 2001) adquiridas do comércio local, de um mesmo lote, sendo que este resultado foi considerado quando se realizou as demais análises. Não houve diferença no percentual de germinação de sementes quando se utilizou os extratos de *C. althaeifolia* em comparação aos controles.

As plantas produzem substâncias por meio de metabólitos secundários, quando liberados no meio ambiente interferem na capacidade de germinação e no desenvolvimento de outras plantas. (BORELLA; PASTORINI, 2010). A aplicação do estudo da alelopatia é qualificado para avaliar a eficiência de um vegetal em influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrônômicos através da liberação de compostos químicos no meio ambiente, denominados como aleloquímicos (REIGOSA et al., 2013). Após liberação dos aleloquímicos, os organismos e o meio ambiente sofrem, interferindo no crescimento e desenvolvimento das plantas, com modificações a nível celular, função de membrana, fito-hormônios, fotossíntese e absorção de nutrientes. Este teste é um modelo de estudo preliminar da divisão celular vegetal, servindo como base para o direcionamento de possíveis atividades farmacológicas e imunológicas. (FRANCO et al., 2015).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo, *L. sativa* (FERREIRA; AQUILA, 2000), que além disso, é a planta mais comum como espécie alvo para examinar

alelopatia entre as hidrófitas, devido tanto ao pequeno período requerido para sua germinação (24 a 48 h), quanto para seu crescimento (ELAKOVICH, 1999).

No ensaio de atividade fitotóxica foi avaliada a influência do extrato bruto das folhas e do caule, frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente das folhas e do caule e do óleo essencial das folhas, na germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TBR, demonstrados nas TABELAS 12 e 13.

TABELA 12 – RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTE DO CAULE DE *C. althaeifolia*

AMOSTRA	Concentração µg/mL	% Germinação		IVG	
		Média e DP	Scot-knott ¹	Média	Scot-knott ¹
C1	-	-	a1	4,8325	a2
C2	-	100 ± 0	a1	4,8325	a2
EBF	100	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	250	95 ± 0	a1	4,5825	a2
	500	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	750	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	1000	95 ± 0	a1	4,7500	a2
FHF	100	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	250	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	500	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	750	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8750	a2
FCF	100	100 ± 0	a1	4,5000	a2
	250	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	500	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	750	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8750	a2
FAEF	100	100 ± 0	a1	4,8125	a2
	250	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	500	100 ± 0	a1	4,8125	a2

					continuação
	750	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	1000	95 ± 0	a1	4,7500	a2
FRF	100	100 ± 0	a1	4,8325	a2
	250	100 ± 0	a1	4,8325	a2
	500	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	750	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8325	a2
PREP	100	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	250	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	500	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	750	95 ± 0	a1	4,7500	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8750	a2
OE*	100	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	250	100 ± 0	a1	4,6875	a2
	500	100 ± 0	a1	4,6650	a2
	750	100 ± 0	a1	4,8325	a2
	1000	100 ± 0	a1	5,0000	a2

C1 – controle negativo água; C2 – controle positivo metanol; EBF – extrato bruto folhas, FHF – fração hexano folhas, FCF – fração clorofórmio folhas; FAEF – Fração acetato de etila folhas; FRF – fração remanescente folhas; PREP – precipitado; OE – óleo essencial

*usado a técnica proposto por ASLAM, et al., 1995).

FONTE: a autora (2017).

De acordo com a análise estatística, para a porcentagem de germinação não foram significativos. Sendo assim, pode se dizer que nenhuma das amostras testadas influenciou na germinação tanto para as folhas, quanto para o caule.

TABELA 13 – RESULTADOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTE DO CAULE DE *C. althaeifolia*

AMOSTRA	Concentração µg/mL	% Germinação		IVG	
		Média e DP	Scot-knott ¹	Média	Scot-knott ¹
C1	-	-	a1	4,7500	a2
C2	-	95 ± 0	a1	4,7500	a2
EBC	100	100 ± 0	a1	4,6250	a2
	250	100 ± 0	a1	4,3750	a2

					continuação
	500	100 ± 0	a1	4,5000	a2
	750	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8750	a2
FHC	100	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	250	95 ± 0	a1	5,0000	a2
	500	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	750	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8325	a2
FCC	100	100 ± 0	a1	4,4167	a2
	250	100 ± 0	a1	4,7500	a2
	500	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	750	100 ± 0	a1	4,8325	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,8325	a2
FAEC	100	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	250	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	500	100 ± 0	a1	4,7075	a2
	750	95 ± 0	a1	4,7500	a2
	1000	100 ± 0	a1	4,6250	a2
FRC	100	100 ± 0	a1	4,8750	a2
	250	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	500	100 ± 0	a1	4,8325	a2
	750	100 ± 0	a1	5,0000	a2
	1000	100 ± 0	a1	5,0000	a2

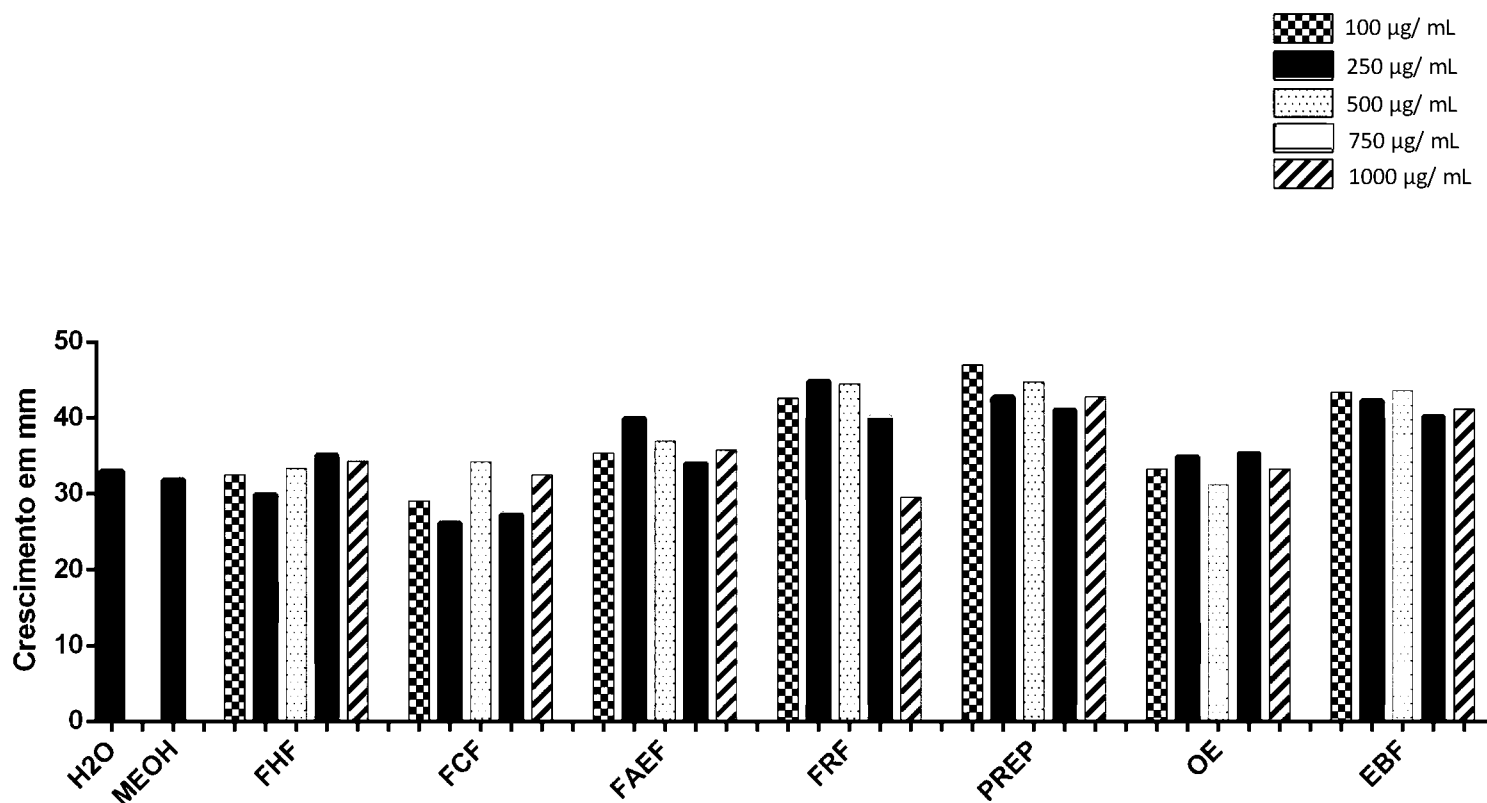
Nota: C1 – controle negativo água; C2 – controle positivo metanol; EBC – extrato bruto caule, FHC – fração hexano caule, FCC – fração clorofórmio caule; FAEC – Fração acetato de etila caule; FRC – fração remanescente caule.

FONTE: a autora (2017).

A espécie *C. althaeifolia* é geralmente encontrada em campo aberto (HARLEY, 1971) onde encontra-se diversas outras espécies de plantas, corroborando com os resultados de alelopatia, onde denota que não houve alteração no índice de velocidade de germinação.

A influência causada pelos extratos e frações no crescimento do hipocótilo, para as folhas está demonstrado no GRÁFICO 4.

GRAFICO 4 - INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids

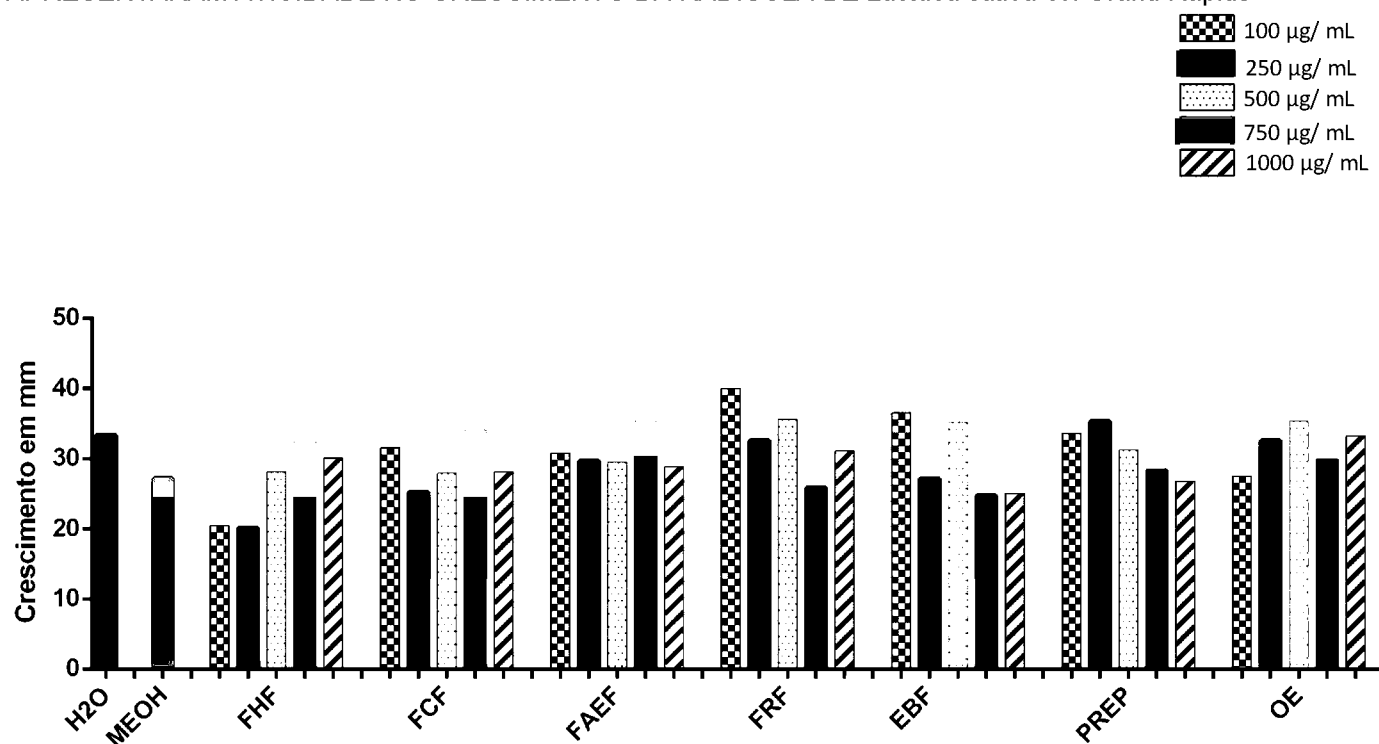


Nota: H2O – água; MEOH – Metanol; FHF – fração hexano das folhas; FCF – fração clorofórmio das folhas; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FRF – fração remanescente das folhas; PREP – precipitado; OE – óleo essencial; EBF – extrato bruto das folhas.

FONTE: a autora (2017).

A influência causada pelos extratos e frações no crescimento da radícula, para as folhas de *C. althaeifolia* está demonstrado no GRÁFICO 5.

GRAFICO 5 - INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids

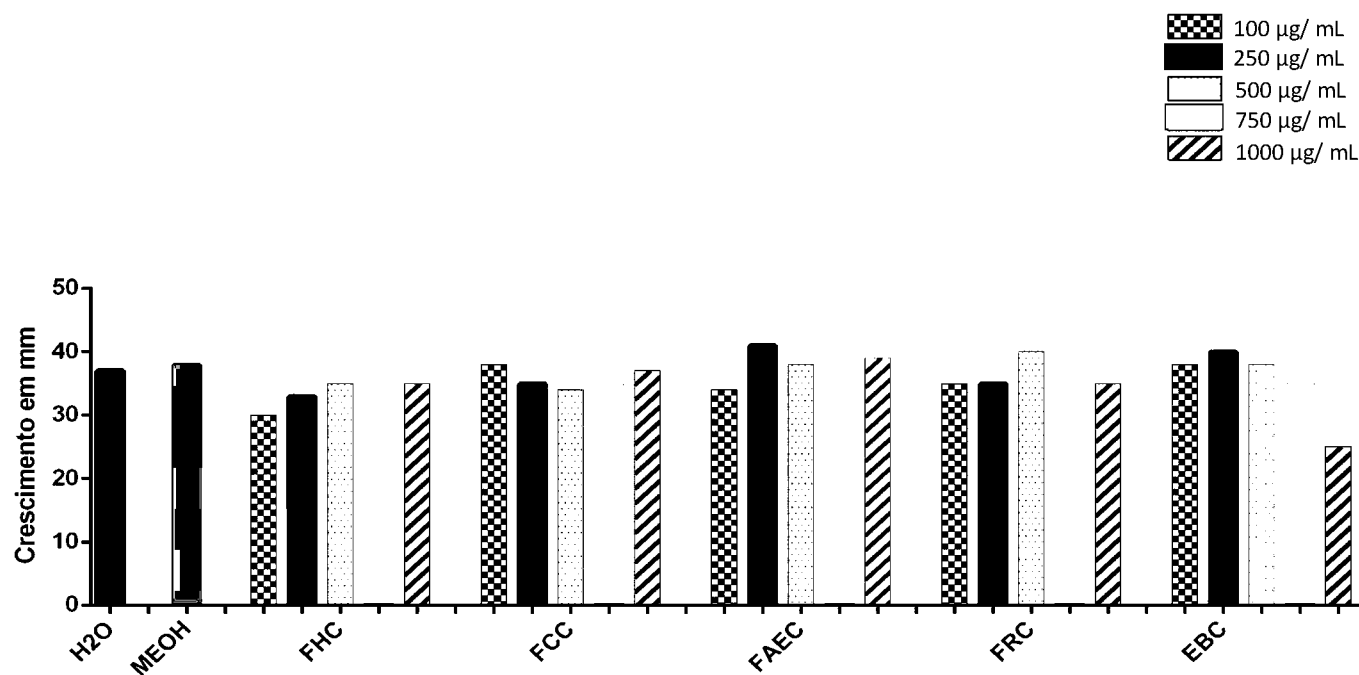


Nota: H2O – água; MEOH – Metanol; FHF – fração hexano das folhas; FCF – fração clorofórmio das folhas; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FRF – fração remanescente das folhas; PREP – precipitado; OE – óleo essencial; EBF – extrato bruto das folhas.

FONTE: a autora (2017).

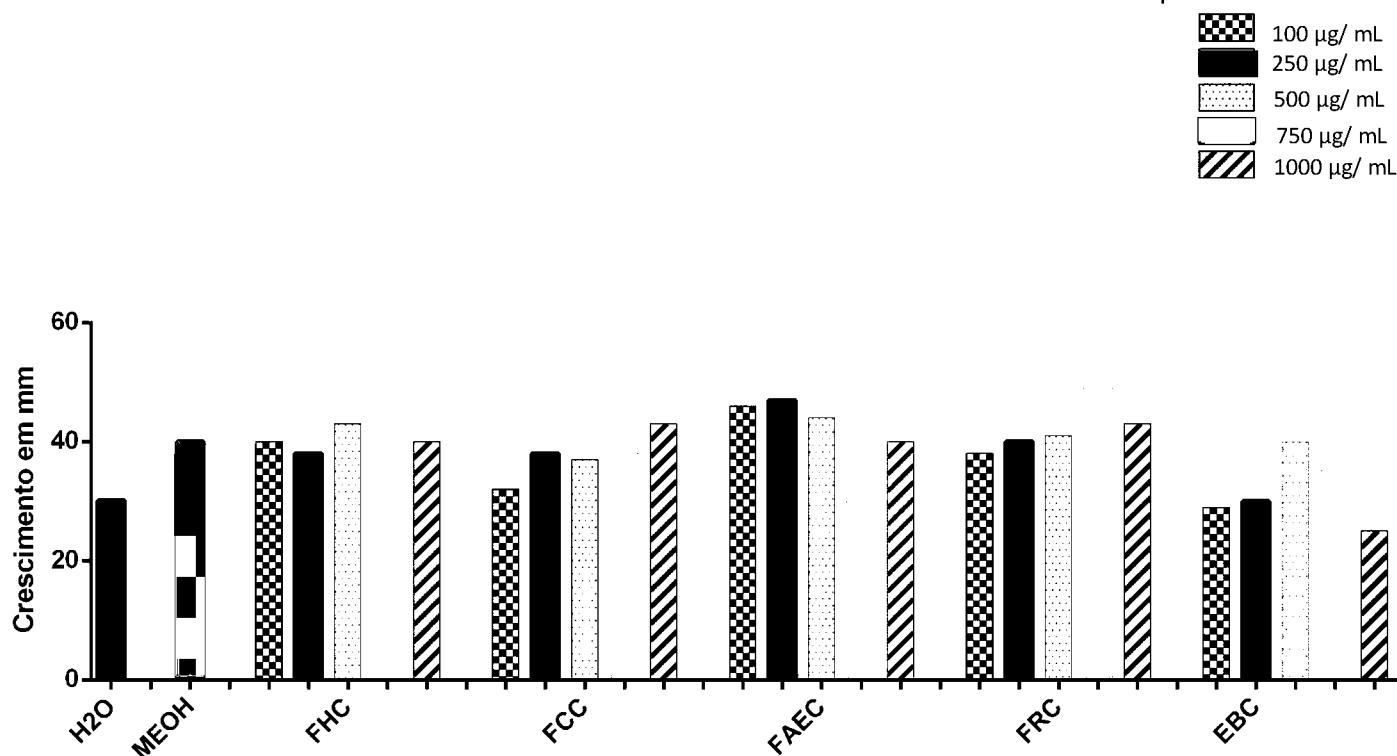
A influência causada pelos extratos e frações no crescimento do hipocótilo e da radícula para o caule, estão demonstrados nos GRÁFICOS 6 e 7.

GRAFICO 6 - INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO CAULE DE *C. althaeifolia* QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids



Nota: H2O – água; MEOH – Metanol; FHC – fração hexano do caule; FCC – fração clorofórmio do caule; FAEC – fração acetato de etila do caule; FRC – fração remanescente do caule; EBC – extrato bruto do caule.
 FONTE: a autora (2017).

GRAFICO 7 - INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DO CAULE DE *C. althaeifolia* QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids



Nota: H2O – água; MEOH – Metanol; FHC – fração hexano do caule; FCC – fração clorofórmio do caule; FAEC – fração acetato de etila do caule; FRC – fração remanescente do caule; EBC – extrato bruto do caule.

FONTE: a autora (2017).

A partir dos resultados acima mostrados, pode – se observar que em todas as amostras não houve influência na inibição do crescimento das radículas. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura para a família das Lamiaceae e corroboram também com o resultado descrito anteriormente sobre toxicidade frente a *Artemia salina*, onde as amostras também não apresentaram potencial citotóxico.

9.7 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS – TESTE DE FOLIN-CIOCALTEU

Como pode-se observar na TABELA 13, das amostras testadas, a que apresentou maior teor de compostos fenólicos foi a fração FAE tanto para as folhas quanto para o caule, representando um valor de $82,32 \pm 0,74$ e $108,18 \pm 3,46$ respectivamente.

A fração FR das folhas também demonstrou um teor de fenóis alto, pois de acordo com (CHEW, et al., 2011), a quantidade de fenóis totais das plantas podem ser classificados em quatro estágios: alta ($< 50 \text{ mg. EAG.g}^{-1}$), média-alta (30-50 mg. EAG.g^{-1}) e baixa ($<10 \text{ mg. EAG.g}^{-1}$).

De acordo com (BLAINSKI, et al., 2013), os compostos fenólicos incluem fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas. São compostos secundários onde se são amplamente encontrados no reino vegetal, contribuintes para a pigmentação da planta, ação antioxidante e agentes de proteção contra os raios ultravioletas.

A quantidade de fenólicos totais encontrado nas amostras da *C. althaeifolia*, em comparação com o ácido gálico, é indicativo de médio-alto potencial antioxidante pelo fato de que os constituintes fenólicos podem reagir com espécies reativas de oxigênio (ODABASOGLU et al., 2004).

TABELA 14 - QUANTIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO - EAG) NOS EXTRATOS BRUTO, AQUOSO, PRECIPITADO E FRAÇÕES DA ESPÉCIE *C. althaeifolia*

CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (MG EAG/G DE AMOSTRA DP)		
AMOSTRAS	FOLHAS	CAULE
FH	$19,69 \pm 0,66^a$	$15,07 \pm 0,35^a$
FC	$27,99 \pm 0,56^b$	$15,87 \pm 0,29^a$
FAE	$82,34 \pm 0,74^c$	$108,18 \pm 3,46^b$
FR	$53,25 \pm 0,80^d$	$3,93 \pm 0,52^c$
EB	$7,15 \pm 0,69^e$	$20,03 \pm 0,29^d$
EA	$3,03 \pm 0,43^f$	$6,78 \pm 0,52^c$
PREP	0 ± 0^h	-----

Nota: Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA), Precipitado (PREP) e desvio padrão (DP). * Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) na mesma coluna não difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

FONTE: a autora (2018).

9.8 REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

A atividade antioxidante de cada amostra foi calculada em relação ao BHT, Vitamina C e Rutina, todas com atividade definida como 100% de atividade.

Na TABELA 14, estão apresentados os resultados da avaliação da atividade antioxidante pelo método de complexação do fosfomolibdênio para as amostras das folhas obtidas a partir da espécie *C. althaeifolia*.

De acordo com os resultados, todas as amostras testadas apresentaram uma coloração verde característica, que demonstra sua atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio confirmadas pelas leituras no aparelho espectrofotômetro.

TABELA 14 – RESULTADOS DO ENSAIO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES, ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO AO BHT – AA (%) $\pm$ DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C – AA (%) $\pm$ DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA – AA (%) $\pm$ DP
BHT	100 ^a	-----	-----
VIT. C	-----	100 ^a	-----
RUTINA	-----	-----	100 ^a
FH	279,39 $\pm$ 3,75 ^b	145,8 $\pm$ 0,5 ^b	309,39 $\pm$ 1,67 ^b
FC	236,75 $\pm$ 2,61 ^c	121,32 $\pm$ 1,52 ^c	261,17 $\pm$ 0,97 ^c
FAE	366,28 $\pm$ 2,16 ^d	178,43 $\pm$ 2,84 ^d	388,56 $\pm$ 2,17 ^d
FR	246,52 $\pm$ 2,20 ^e	128,16 $\pm$ 1,18 ^e	270,16 $\pm$ 1,84 ^e
EB	179,45 $\pm$ 1,72 ^f	69,67 $\pm$ 1,14 ^f	137,55 $\pm$ 2,02 ^e
EA	206,64 $\pm$ 1,57 ^g	103,32 $\pm$ 2,68 ^a	222,21 $\pm$ 2,07 ^f
OE	472,66 $\pm$ 3,36 ^h	243,93 $\pm$ 1,14 ^g	524,98 $\pm$ 2,46 ^g
PREP	125,24 $\pm$ 3,62 ⁱ	75,20 $\pm$ 3,08 ^h	152,49 $\pm$ 2,21 ^h

Nota: Butil-hidroxi-tolueno (BHT), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA), Óleo Essencial (OE) e Precipitado (PREP).). * Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) na mesma coluna não difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.
FONTE: a autora (2018).

De acordo com os resultados apresentados acima, todas as amostras são diferentes estatisticamente em relação aos padrões testados, BHT, Vitamina C e Rutina, mas todas apresentam altas concentrações de atividades antioxidantes por redução do complexo fosfomolibdênio.

Na TABELA 16, estão expressados os valores obtidos para as amostras do caule da planta em estudo. Todas amostras também apresentaram uma coloração verde característica, que também demonstra sua atividade antioxidante por

redução do complexo fosfomolibdênio confirmadas pelas leituras no aparelho espectrofotômetro.

TABELA 16 – RESULTADOS DO ENSAIO DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDAS DO CAULE DE *C. althaeifolia* PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO AO BHT – AA (%) $\pm$ DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C – AA (%) $\pm$ DP	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA – AA (%) $\pm$ DP
BHT	100 ^a	-----	-----
VIT. C	-----	100 ^a	-----
RUTINA	-----	-----	100 ^a
FH	33,99 $\pm$ 2,50 ^b	20,83 $\pm$ 1,19 ^b	120,95 $\pm$ 0,78 ^b
FC	50,84 $\pm$ 1,00 ^c	32,06 $\pm$ 1,14 ^c	164,13 $\pm$ 0,71 ^c
FAE	249,58 $\pm$ 0,72 ^d	129,03 $\pm$ 1,48 ^d	818,67 $\pm$ 0,16 ^d
FR	110,86 $\pm$ 2,92 ^e	62,03 $\pm$ 1,02 ^e	363,42 $\pm$ 0,94 ^e
EB	249,96 $\pm$ 0,29 ^d	126,63 $\pm$ 1,83 ^d	814,45 $\pm$ 1,90 ^d
EA	148,90 $\pm$ 1,16 ^f	76,91 $\pm$ 0,10 ^f	495,69 $\pm$ 1,03 ^f

Nota: Butil-hidroxi-tolueno (BHT), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA). *Resultados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

FONTE: a autora (2018).

As espécies da família Lamiaceae apresentam uma grande quantidade de compostos fenólicos em sua estrutura química (MIRAJ, et al., 2017), o que favorece a propriedade antioxidante dessas espécies.

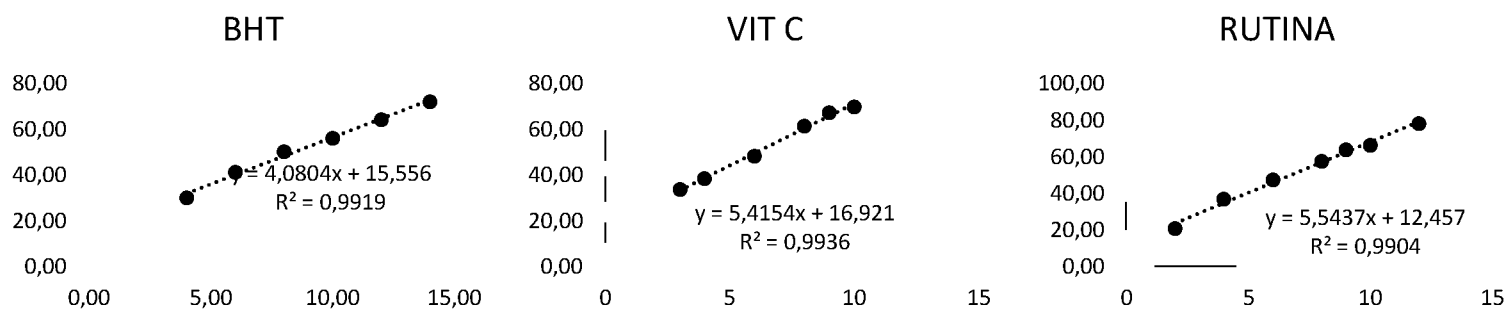
9.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

As concentrações dos controles e das amostras obtidas através das folhas de *C. althaeifolia* que são capazes de reduzir 50% da CI_{50} do DPPH são apresentadas na TABELA 17. Para cada amostra testada, foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC_{50} , representados pela FIGURA 18 os padrões testados (BHT, Vitamina C e Rutina) e 19 e 20 apresentam as retas médias obtidas para cada teste.

Analizando os dados obtidos através do teste estatístico, observou-se que, as frações FC, FAE, FR e EB tem atividade antioxidante igual aos padrões

testados, BHT, Vitamina C e Rutina, pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre seus resultados. Dentre essas amostras, a fração FAE apresentou o menor resultado com IC_{50} de $3,35 \pm 0,04$, podendo ser considerada, a mais ativa pois é necessária uma menor quantidade de amostra para reduzir a concentração inicial do DPPH* pela metade. Nas figuras, o eixo X representa a concentração e o eixo y a absorbância.

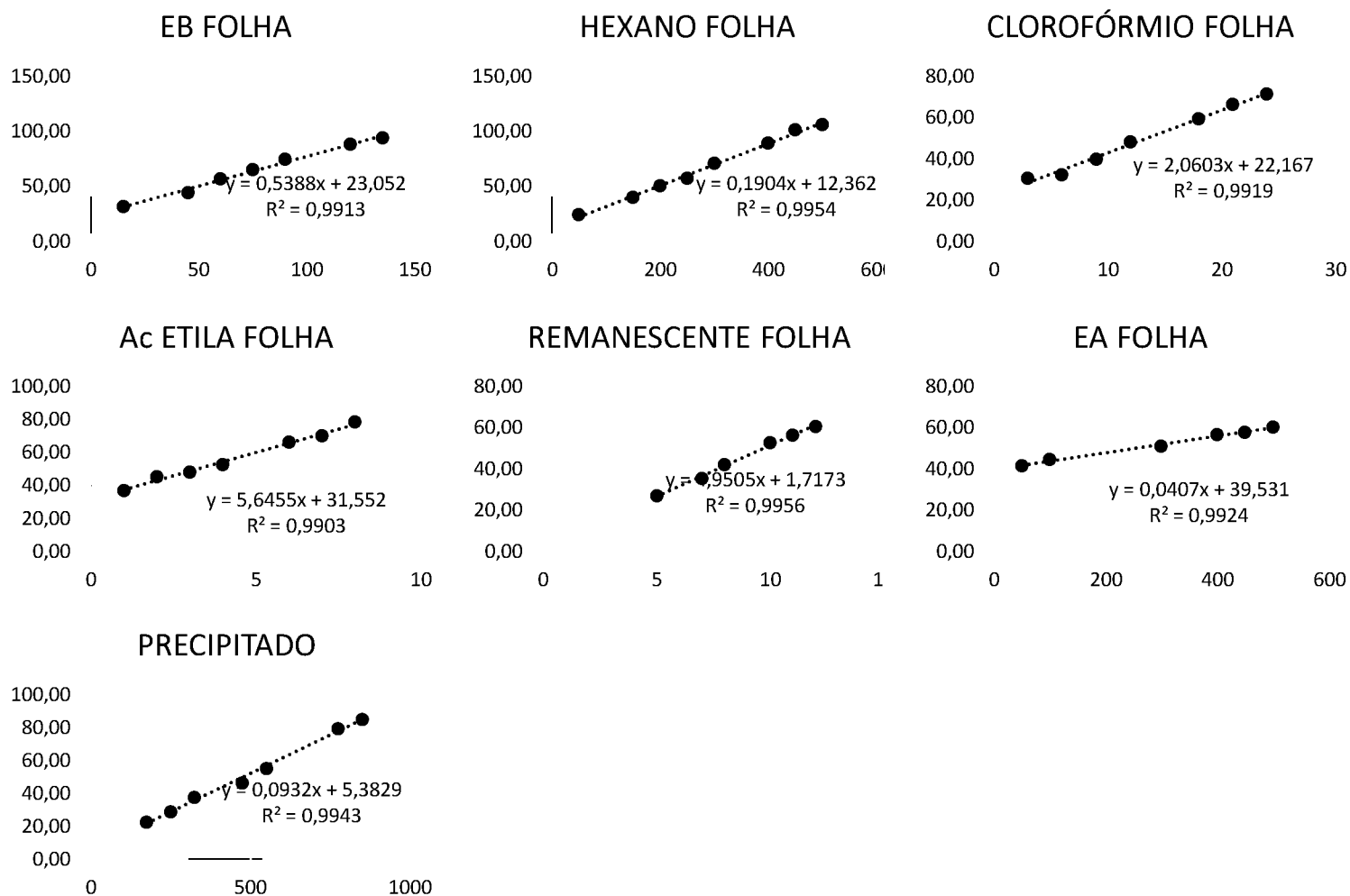
FIGURA 18 – CURVA DOS PADRÕES BHT, VITAMINA C E RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH



Nota: BHT – hidroxitolueno butilado; VIT C – vitamina C.

FONTE: a autora (2017).

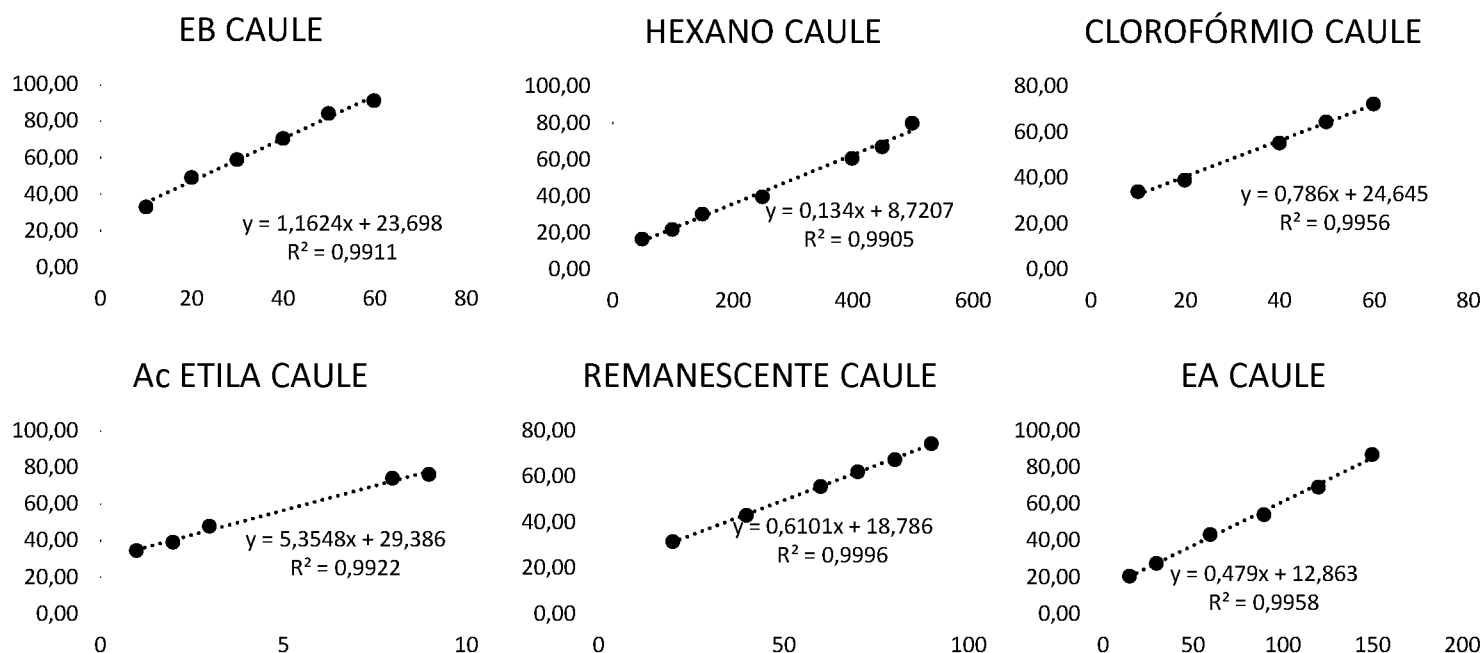
FIGURA 19 – CURVA DAS FRAÇÕES EXTRATO BRUTO, HEXANO, CLOROFÓRMIO, AC. DE ETILA, REMANESCENTE, EXTRATO AQUOSO E PRECIPITADO DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* PELA REDUÇÃO DO DPPH



Nota: EB – extrato bruto; EA – extrato aquoso.

FONTE: a autora (2017).

FIGURA 20 – CURVA DAS FRAÇÕES EXTRATO BRUTO, HEXANO, CLOROFÓRMIO, AC. DE ETILA, REMANESCENTE E EXTRATO AQUOSO DO CAULE DE *C. althaeifolia* PELA REDUÇÃO DO DPPH



Nota: EB – extrato bruto; EA – extrato aquoso.

FONTE: a autora (2017).

As outras amostras que não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos padrões, também mostram uma atividade antioxidante considerável, pois também apresentaram uma redução de 50% na concentração do radical DPPH. As amostras FH, EA e PREP, foram obtidos valores de concentrações mais elevadas com valores de $197,44 \pm 7,26$, $246,32 \pm 66,82$ e $478,53 \pm 66,42$ respectivamente (TABELA 16), indicando menor ação antioxidante dessas amostras, quando avaliada a capacidade de redução do DPPH*. Isso indica que, essas frações são menos ativa do que aos padrões analisados e das demais amostras, pois é preciso uma maior quantidade para reduzir 50% da concentração inicial do DPPH*.

TABELA 16 – RESULTADOS DE CI_{50} PARA A REDUÇÃO DO DPPH* DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO, FRAÇÕES E PRECIPITADO OBTIDAS DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia*.

AMOSTRA	CI_{50} (ML) $\pm$ DP
BHT	$8,44 \pm 0,04^a$
RUTINA	$6,77 \pm 0,03^a$
VITAMINA C	$6,09 \pm 0,03^a$
FH	$197,44 \pm 7,26^b$

FC	13,14 ± 0,36 ^a
FAE	3,35 ± 0,04 ^a
FR	9,76 ± 0,21 ^a
EB	49,5 ± 5,63 ^a
EA	246,32 ± 66,82 ^b
PREP	478,53 ± 66,82 ^c

Nota: Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA), Óleo Essencial (OE) e Precipitado (CLO). CI₅₀ (µg) ± DP = concentração inibitória ± desvio padrão. * Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) não difere estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Tukey. FONTE: a autora (2018).

As concentrações dos controles e das amostras obtidas através do caule de *C. althaeifolia* que são capazes de reduzir 50% da CI₅₀ do DPPH são apresentadas na TABELA 17.

Averiguando os dados obtidos, verificou-se que, apenas a fração, FAE tem atividade antioxidante igual aos padrões testados, BHT, Vitamina C e Rutina, pois não apresentou diferença estatisticamente significativa entre seus resultados. A fração FAE apresentou o menor resultado com IC₅₀ (3,35 ± 0,04) dentre todas as amostras testadas, podendo ser considerada, a mais ativa pois é necessária uma menor quantidade para reduzir a concentração inicial do DPPH* pela metade como citado acima. As outras amostras que não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos padrões, pois foram obtidos valores de concentrações mais elevadas, indicando menor ação antioxidante dessas amostras, quando avaliada a capacidade de redução do DPPH*. Isso indica que, essas frações são menos ativa do que aos padrões analisados e da FAE, pois é preciso uma maior quantidade para reduzir 50% da concentração inicial do DPPH*.

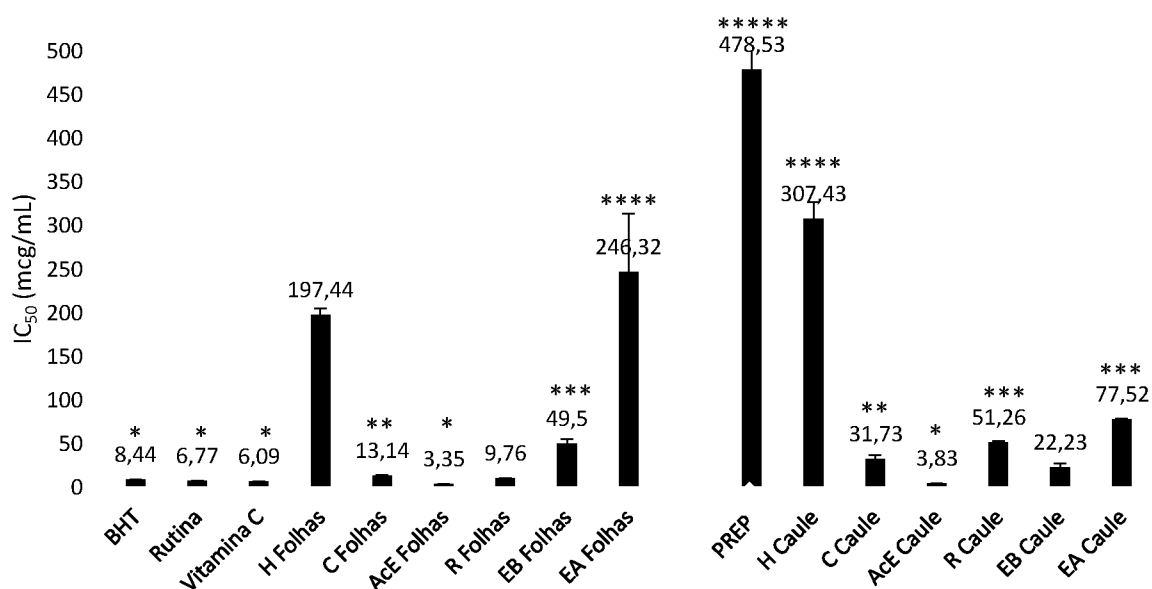
TABELA 17 – RESULTADOS DE CI_{50} PARA A REDUÇÃO DO DPPH* DO EXTRATO BRUTO, AQUOSO E FRAÇÕES OBTIDAS DO CAULE DE *C. althaeifolia*.

AMOSTRA	CI_{50} (ML) $\pm$ DP
BHT	8,44 $\pm$ 0,04 ^a
RUTINA	6,77 $\pm$ 0,03 ^a
VITAMINA C	6,09 $\pm$ 0,03 ^a
FH	307,43 $\pm$ 19,28 ^f
FC	31,73 $\pm$ 4,38 ^c
FAE	3,83 $\pm$ 0,36 ^a
FR	51,26 $\pm$ 1,48 ^d
EB	22,23 $\pm$ 4,98 ^b
EA	77,52 $\pm$ 0,54 ^e

Nota: Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB) e Extrato Aquoso (EA). CI_{50} (μ g) $\pm$ DP = concentração inibitória $\pm$ desvio padrão. * Resultados seguidos pela (s) mesma (s) letra (s) não difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.
 FONTE: a autora (2018).

Na FIGURA 21, estão expressos os resultados de CI_{50} de todas as amostras testadas das folhas e caule em comparação com os controles.

FIGURA 21 – GRÁFICO COMPARATIVO DOS DIFERENTES VALORES DE IC_{50} DE *C. althaeifolia* OBTIDOS PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH



Nota: BHT – hidroxitolueno butilado; H – hexano, C – clorofórmio; AcE – acetato de etila; R – remanescente; EB – extrato bruto; EA – extrato aquoso e PREP – precipitado.
 FONTE: a autora (2017).

9.10 MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICOS (TBARS)

A formação de TBARS em homogeneização de gema de ovo é uma consequência da peroxidação lipídica, sendo sensível a danos oxidativos por ser rico em material lipídico, onde consome uma quantidade significativa de oxigênio, e por esse consumo ser relativamente deficiente em defesas antioxidantes, é rico em substratos oxidáveis como ácidos graxos poli-insaturados e catecolaminas (MIRAJ, et al., 2017).

Os resultados obtidos no ensaio com as amostras das folhas de *C. althaeifolia* estão ilustrados na TABELA 19, expressos em % (porcentagem) de redução da peroxidação lipídica (RP%).

TABELA 19 - REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PRECIPITADO OBTIDOS DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia*

AMOSTRA	REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO (RP%) (MÉDIA ± DP)
BHT	70,54 ± 1,78 ^e
FH	40,67 ± 6,69 ^c
FC	46,92 ± 9,10 ^d
FAE	10,88 ± 4,24 ^a
FR	37,54 ± 11,63 ^b
EB	42,30 ± 6,21 ^c
EA	26,57 ± 9,29 ^b
PREP	23,76 ± 7,63 ^b

Nota: DP – desvio padrão; Butil-hidroxi-tolueno (BHT), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB), Extrato Aquoso (EA) e Precipitado (PREP). *Resultados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

FONTE: a autora (2019).

De acordo com os dados acima, as amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão BHT (70,54 ± 1,78), mesmo mostrando ser diferentes, também promoveram redução da peroxidação lipídica, porém com uma porcentagem inferior ao do padrão.

TABELA 20 - REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PROMOVIDA PELOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DO CAULE DE *C. althaeifolia*

AMOSTRA	REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO (RP%) (MÉDIA ± DP)
BHT	70,54 ± 1,78 ^a
FH	16,94 ± 4,08 ^{bc}
FC	45,35 ± 1,06 ^{ab}
FAE	45,32 ± 6,89 ^{ab}
FR	34,47 ± 1,80 ^{abc}
EB	32,47 ± 1,36 ^{abc}
EA	15,19 ± 2,74 ^c

Nota: DP – desvio padrão; Butil-hidroxi-tolueno (BHT), Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Remanescente (FR), Extrato Bruto (EB) e Extrato Aquoso (EA). *Resultados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

FONTE: a autora (2019).

Os ensaios de redução do complexo do fosfomolibdênio e de redução do radical DPPH são métodos de propriedade antioxidante em meio hidrofílico, enquanto o ensaio do método do ácido tiobarbitúrico - espécies reativas (TBARS) é um método de antioxidantes lipofílicos, agindo por mecanismos de ações diferentes dentro do organismo. Neste estudo, os melhores resultados foram obtidos pelos métodos em meio hidrofílico.

9.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Todos os extratos, frações, óleo essencial e precipitado, tanto do caule quanto da folha, apresentaram potencial atividade antimicrobiana (CIMs até 1000 µg/mL), especialmente contra *C. albicans* ATCC 40175, exceto o extrato aquoso de ambos. E as menores CIMs foram observadas contra esse microrganismo. O extrato bruto do caule, as frações FH e FC, do caule e da folha, e a fração precipitado apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados. O extrato bruto da folha foi ativo somente contra *C. albicans* ATCC 40175. E ambas FR foram ativas contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. albicans* ATCC 40175. Os resultados da CIMs dos extratos, frações, óleo essencial e precipitado podem ser observados na TABELA 21.

continuação

<i>C. tropicalis</i> ATCC (clínica)	-	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-
<i>C. auris</i> 01 (clínica)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-
<i>C. auris</i> 02 (clínica)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-
<i>C. auris</i> 03 (clínica)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-

Nota: CIM - concentração inibitória mínima; FH - fração hexânica; FAE - fração acetato de etila; EA - extrato aquoso; EB - extrato bruto; FC - fração clorofórmica; FR - fração remanescente; PREP – precipitado; (-) - maior que 1000 µg/mL.

FONTE: a autora (2019).

Para os microrganismos das espécies de *Candida*, a amostra que se destacou foi a fração remanescente, onde também apresentou boa atividade antioxidante, das folhas de *C. althaeifolia*, apresentou CIM em todos os microrganismos testados, as amostras FH, EB, FC e FR do caule, não apresentaram concentração inibitória mínima considerável ($\leq 1000 \mu\text{g/mL}$) (SANITÁRIA, 2019). O efeito inibitório dos compostos fenólicos pode ser explicado pela sua interação com as proteínas da membrana bacteriana por meio da ligação de hidrogênio, o que pode resultar em alterações na sua permeabilidade, causando destruição celular ou coagulação do seu conteúdo. A literatura informa que a atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode estar relacionada às condições de cultivo da planta, uma vez que os componentes ativos, geralmente substâncias fenólicas, são sintetizados como resposta ao estresse, como ataques de micro-organismos ou radiação UV forte (SMITH-PALMER, et al., 1998).

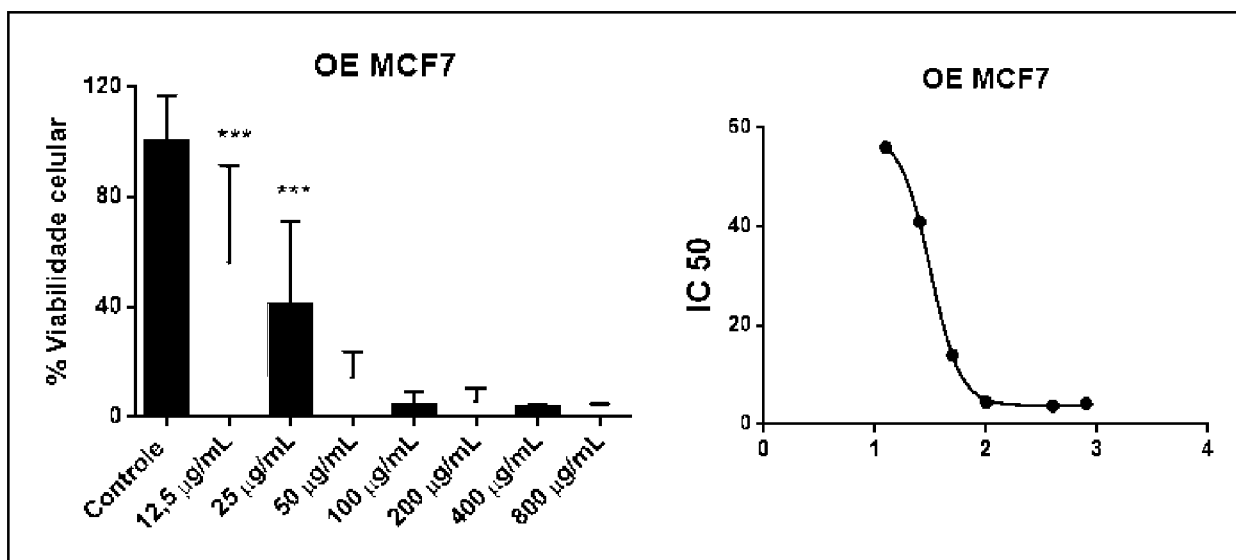
O microrganismo *C. glabrata* apresentou sensibilidade nas amostras FAE (62,5 µg/mL), EA (500 µg/mL) do caule e FAE (125 µg/mL), EA (62,5 µg/mL), EB (62,5 µg/mL) e FR (500 µg/mL) das folhas. Na amostra FAE do caule, os microrganismos *C. krusei* (250 µg/mL), *C. parapsilosis* (250 µg/mL), *C. glabrata* (62,5 µg/mL) e *C. guilliermondii* (125 µg/mL) apresentaram sensibilidade frente a esta amostra. Na amostra EA do caule, os microrganismos que apresentaram sensibilidade foram, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* (500 µg/mL).

Sesquiterpenos como δ -cadineno, α humuleno e cariofileno tiveram sua atividade bactericida comprovada (PEREIRA, et al., 2008). Porém, quando essas substâncias são testadas juntas, essa atividade pode ser reduzida pela inibição antagonista e sinérgica (DASMACHENO, et al., 2017).

9.12 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR REDUÇÃO MITOCONDRIAL DE MTT

A viabilidade celular da amostra de óleo essencial em relação às concentrações testadas é mostrada nas FIGURAS 22, 23 e 24. Os três gráficos representados por essa figura, mostram a sensibilidade das amostras em relação às cepas aderentes testadas. No primeiro gráfico, a linha MCF7 mostrou que as duas concentrações iniciais testadas não são estatisticamente significativas e, a partir de 25 µg / mL, já obteve o CI_{50} de 31,40, o que significa a concentração da amostra que induz 50% da lise ou morte celular e como consequência Inibição da incorporação de vermelho neutro, já em B16F10, o CI_{50} já apareceu na primeira concentração testada que era de 12,5 µg / mL com o valor de CI_{50} de 99,39. Em relação a linhagem 3T3, foi mais resistente ao OE, apresentando um IC_{50} a partir da concentração de 50 µg / mL com o valor de IC_{50} de 83,62, podendo ser considerado mais seletivo em relação a essa amostra. Para este teste, nenhuma análise foi realizada com o extrato aquoso.

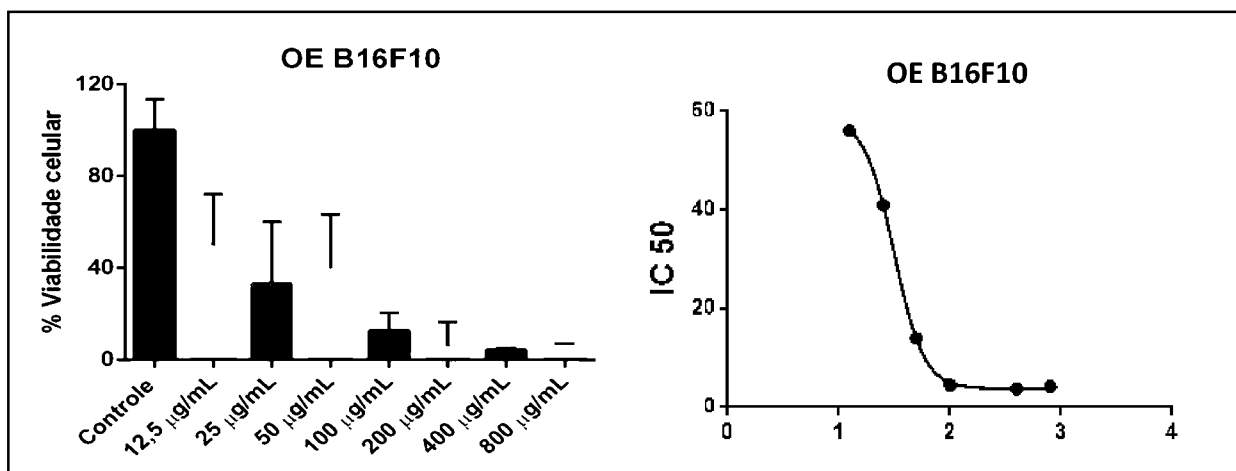
FIGURA 22 – VIABILIDADE CELULAR E IC_{50} DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7



Nota: OE – óleo essencial.

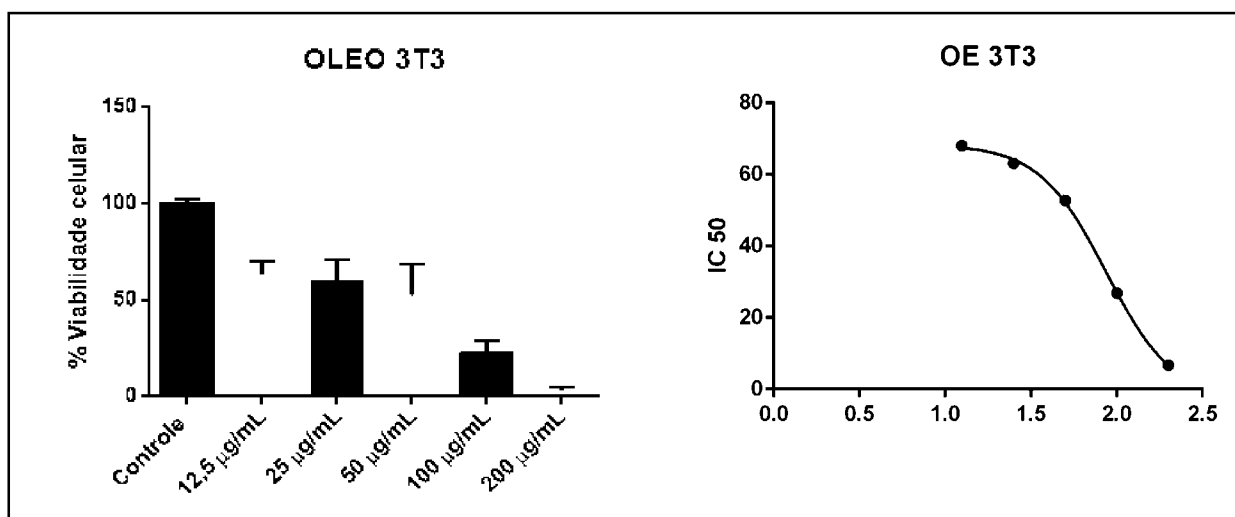
FONTE: a autora (2019).

FIGURA 23 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10



Nota: OE – óleo essencial.
FONTE: a autora (2019).

FIGURA 24 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3

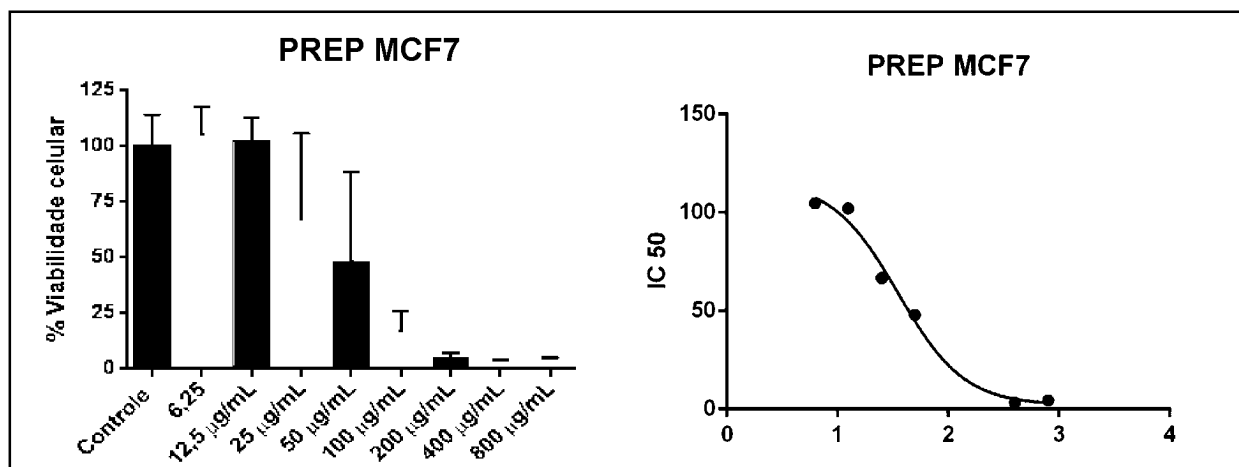


Nota: OE – óleo essencial.
FONTE: a autora (2019).

O índice de seletividade (IS) para o óleo essencial nas linhas MCF7 e B16F10 foi de 2,66 e 0,84, respectivamente.

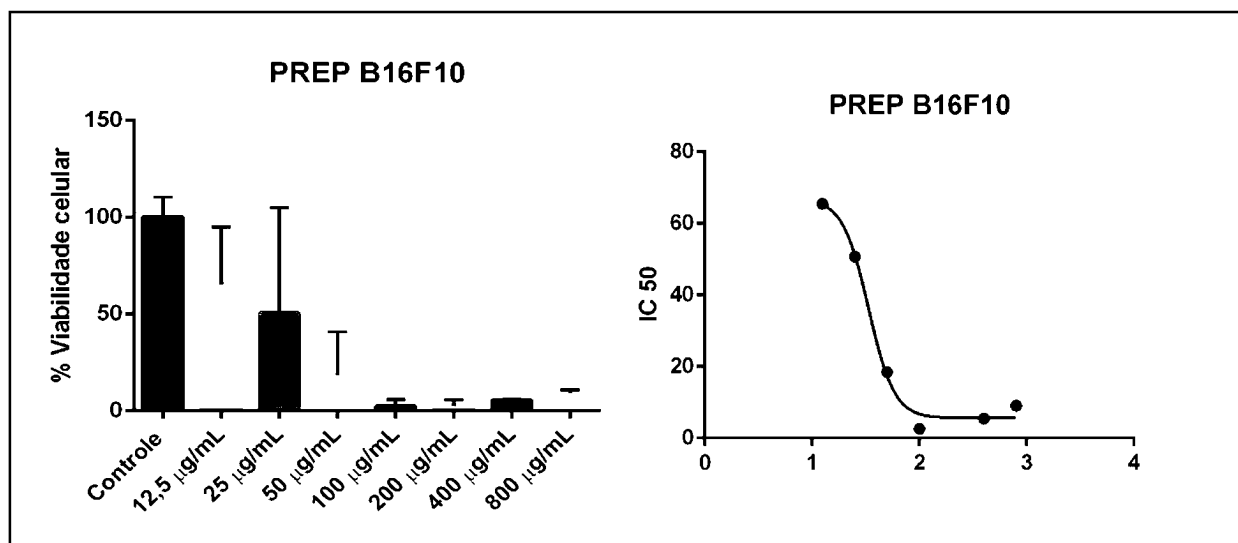
Já no Precipitado (PREP) mostrado nas FIGURAS 25, 26 e 27, a linha MCF7 apresentou IC₅₀ na concentração de 50 µg / mL. Para a linha B16F10, o precipitado obteve um melhor resultado, o IC₅₀ apresentado na concentração de 25 µg / mL. Na linha 3T3, o IC₅₀ também apareceu em uma concentração de 25 µg / mL, não sendo seletivo para esta amostra testada. Para o Precipitado, o IS é 0,45 e 1,29 para as linhagens MCF7 e B16F10.

FIGURA 25 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7



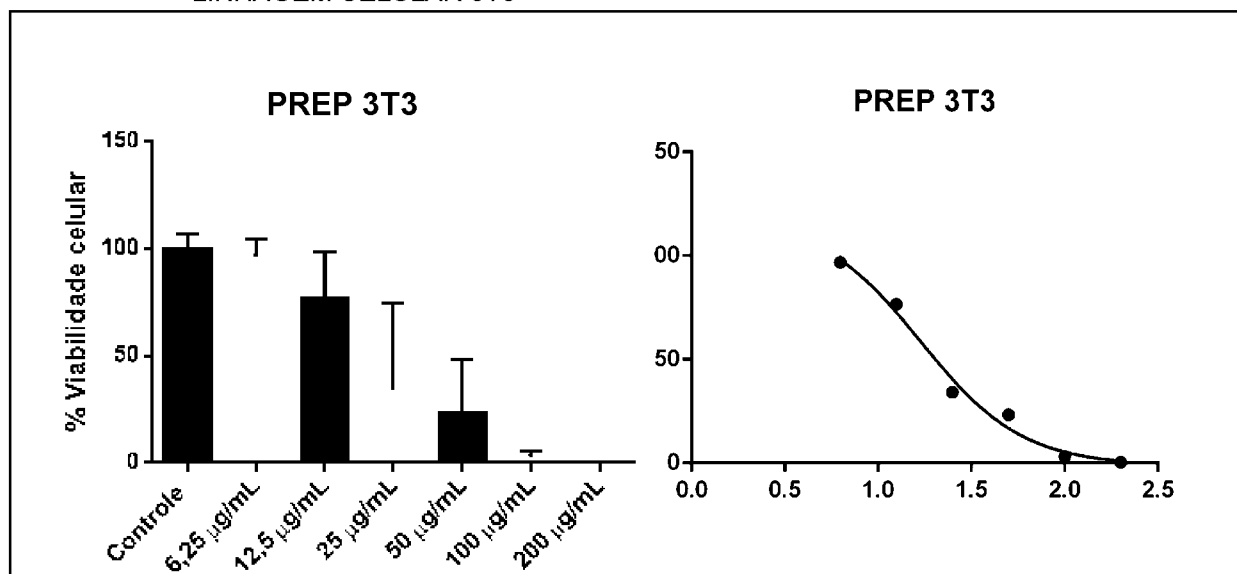
Nota: PREP – precipitado.
FONTE: a autora (2019).

FIGURA 26 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10



Nota: PREP – precipitado.
FONTE: a autora (2019).

FIGURA 27 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3

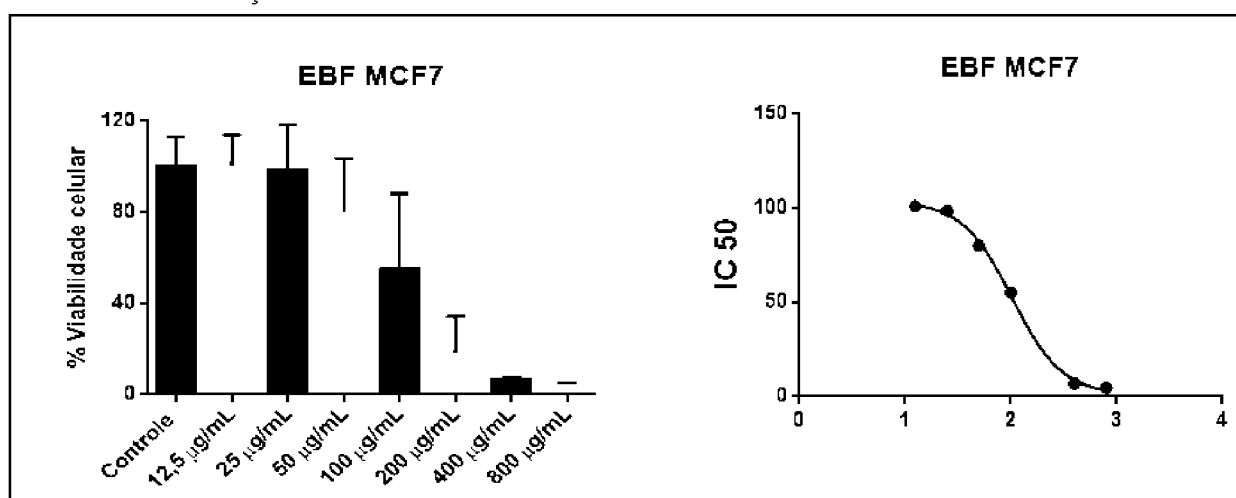


Nota: PREP – precipitado.

FONTE: a autora (2019).

A amostra do extrato bruto das folhas apresentou maior resistência em relação à linhagem MCF7, demonstrada na FIGURA 28, onde a viabilidade celular de 50% foi em torno da concentração de 90 µg / mL. Para a cepa B16F10, mostrada na FIGURA 29, o extrato bruto das folhas apresentou viabilidade celular de 50% em 50 µg / mL e para a linhagem 3T3, mostrada na FIGURA 30, esse valor ficou em torno de 95 µg / mL. Para extração de folhas, o IS é 0,91 e 6,44 para as linhas MCF7 e B16F10, respectivamente.

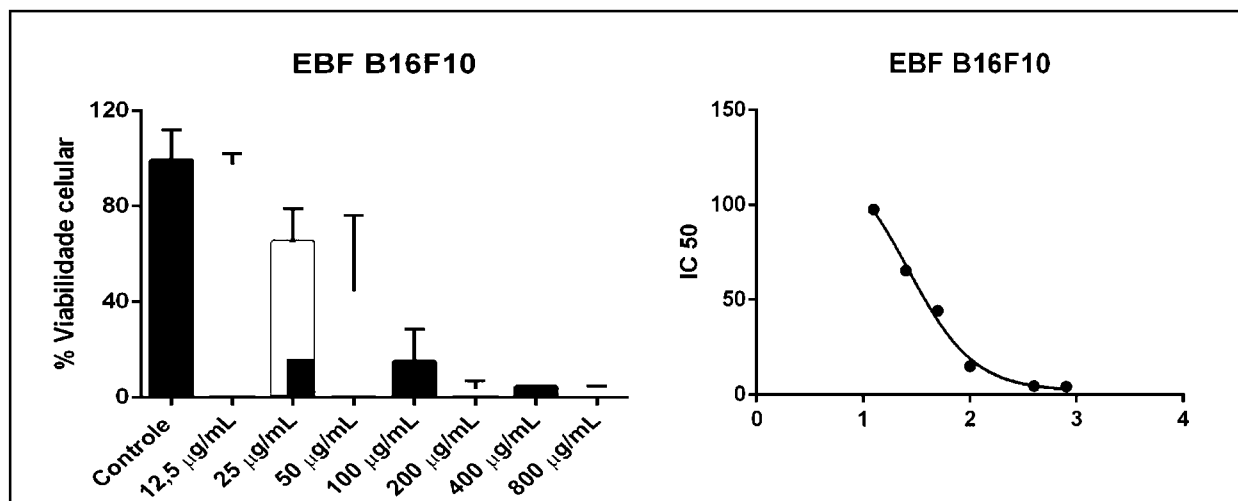
FIGURA 28 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7



Nota: EBF – extrato bruto das folhas.

FONTE: a autora (2019).

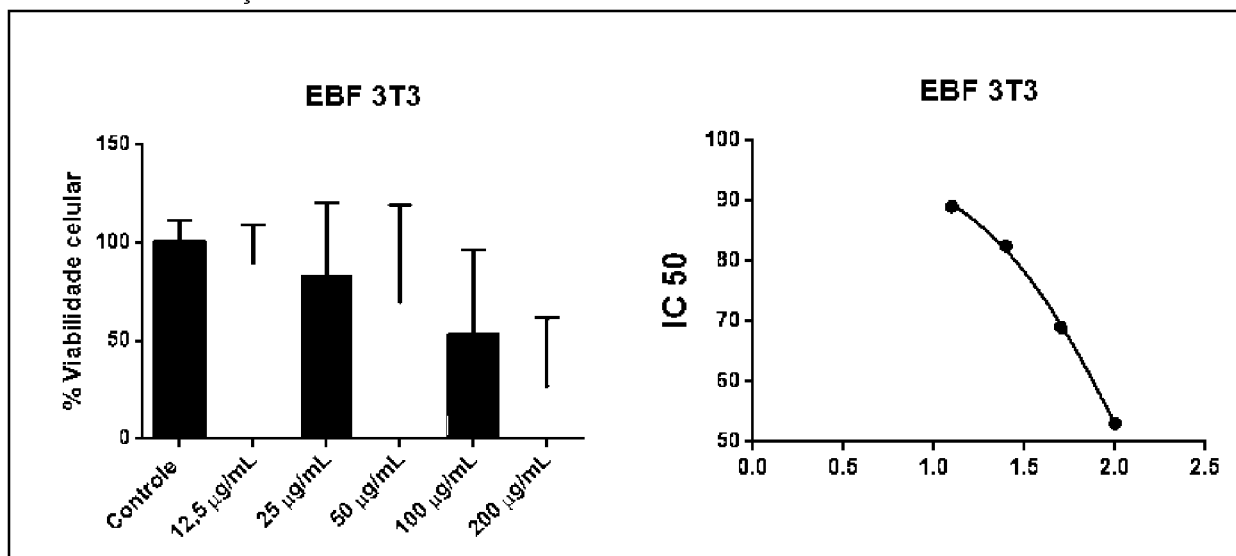
FIGURA 29 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10



Nota: EBF – extrato bruto das folhas.

FONTE: a autora (2019).

FIGURA 30 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3

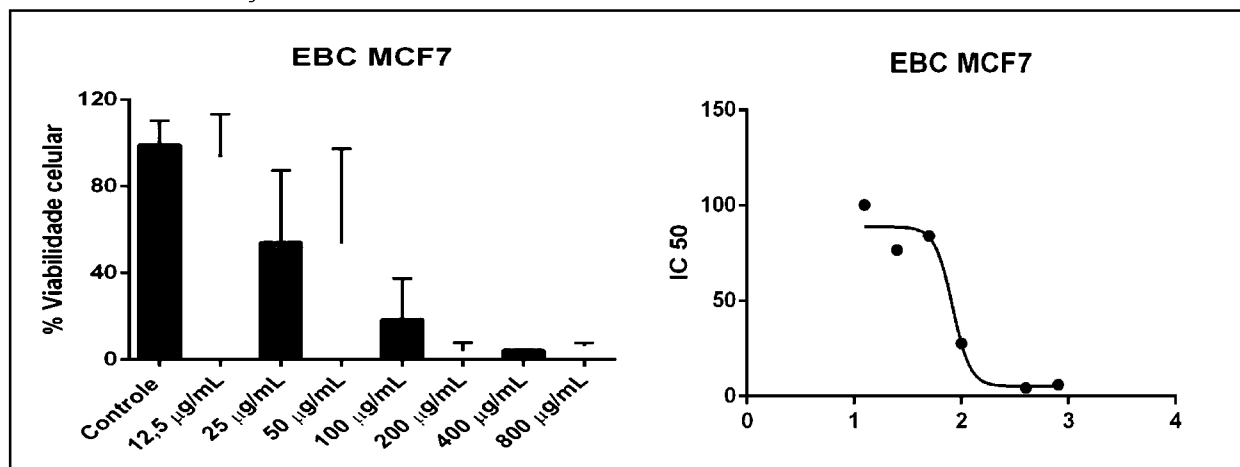


Nota: EBF – extrato bruto das folhas.

FONTE: a autora (2019).

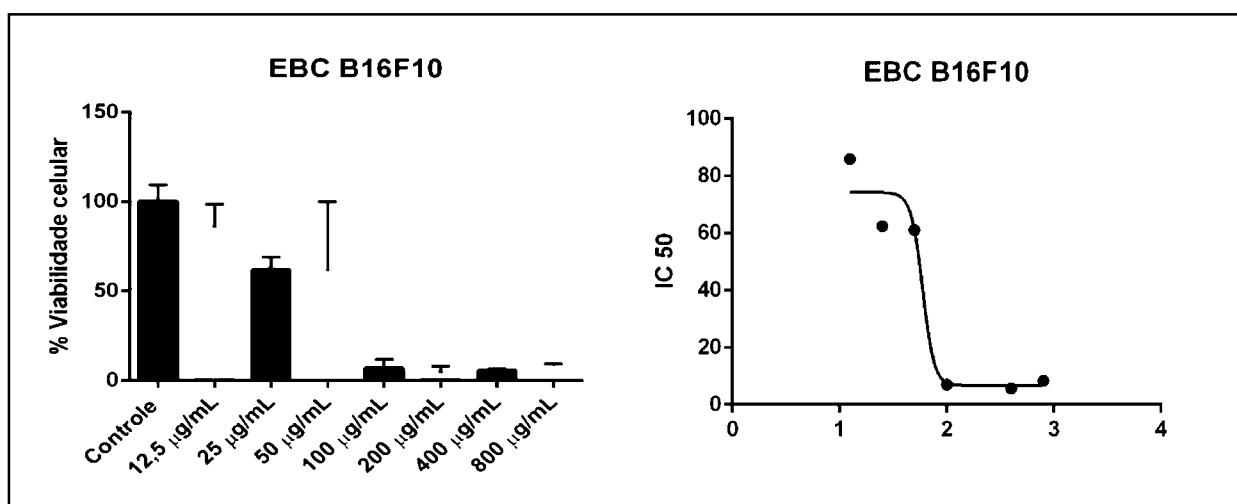
O extrato bruto do caule apresentou viabilidade celular de aproximadamente 50% na concentração de 20 µg / mL para a linha MCF7, mostrada na FIGURA 31 e as linhagens, B16F10 e 3T3, estão representadas pelas FIGURAS 32 e 33, respectivamente e apresentaram viabilidade celular de 50% na concentração de 50 µg / mL. O IS do extrato bruto do caule é de 0,67 e 0,65 para as linhagens MCF7 e B16F10 respectivamente.

FIGURA 31 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR MCF7



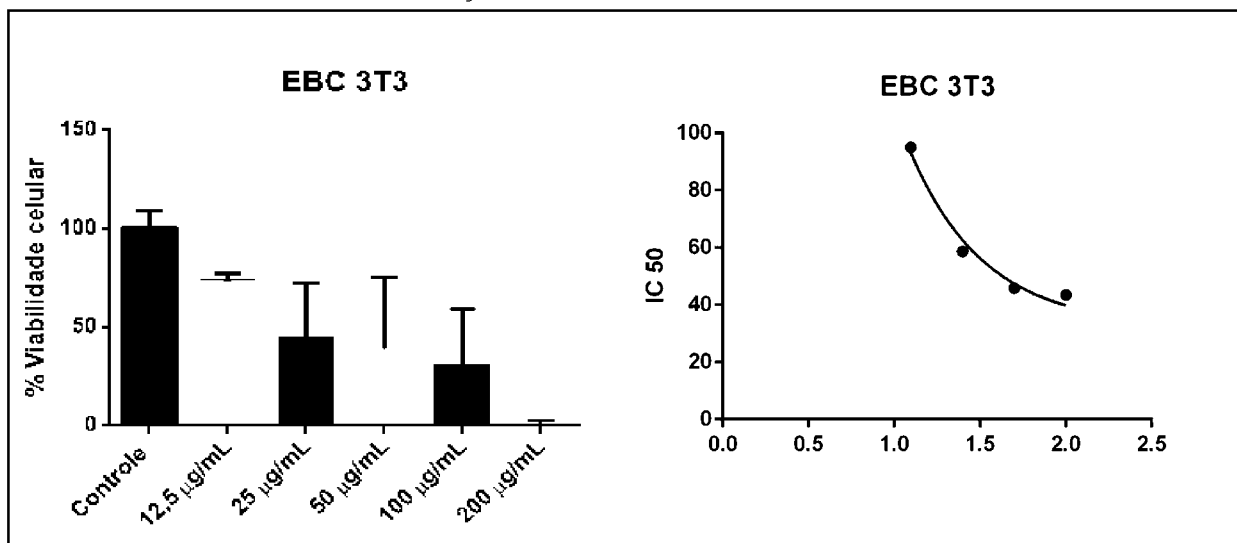
Nota: EBC – extrato bruto do caule.
Fonte: a autora, 2019

FIGURA 32 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR B16F10



Nota: EBC – extrato bruto do caule.
FONTE: a autora (2019).

FIGURA 33 – VIABILIDADE CELULAR E IC₅₀ DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DE *C. althaeifolia* EM RELAÇÃO A LINHAGEM CELULAR 3T3



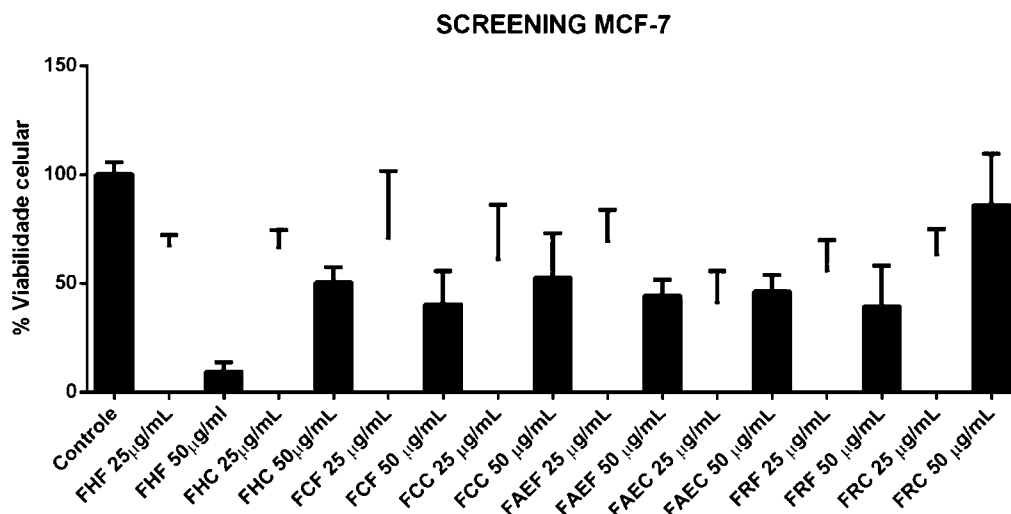
Nota: EBC – extrato bruto do caule.

FONTE: a autora (2019).

Como as concentrações testadas foram efetivas para as amostras testadas inicialmente, e de acordo com o National Cancer Institute (NCI), apenas os valores citotóxicos de DE₅₀ (dose efetiva 50) $\leq 30 \mu\text{g} / \text{mL}$ para extratos vegetais e $\leq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$ para compostos puros, são considerados ativos. Depois disso, examinamos apenas duas concentrações: $25 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $50 \mu\text{g} / \text{mL}$.

O GRÁFICO 8 mostra a triagem realizada com cada amostra nas concentrações de $25 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ para as linhas celulares MCF7.

GRÁFICO 8 – TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR MCF7 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE *C. althaeifolia*

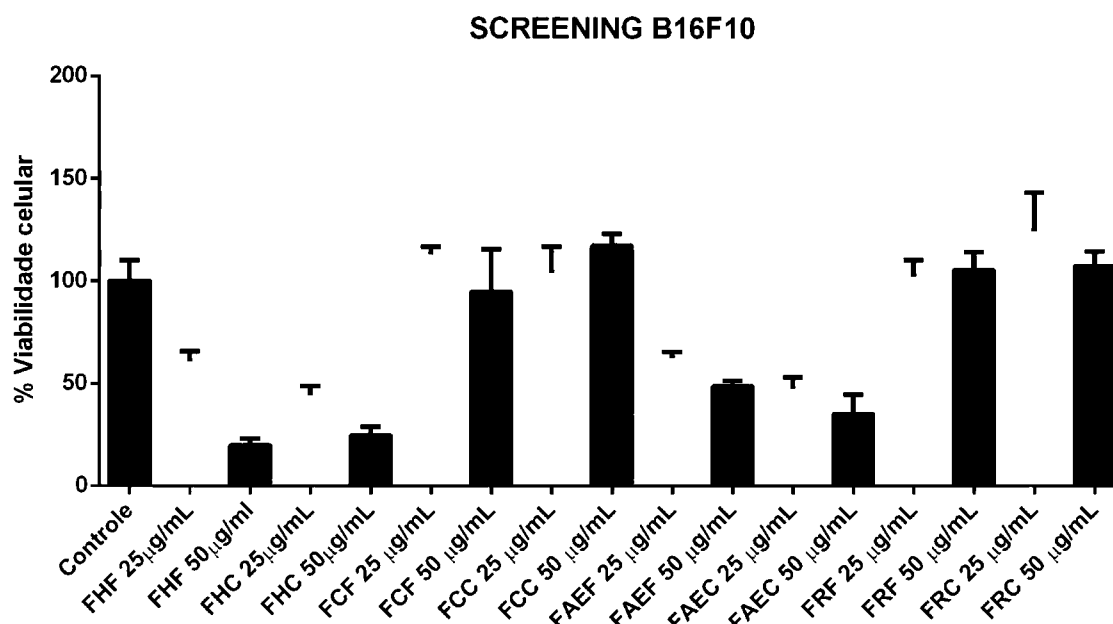


Nota: FHF – fração hexano das folhas; FHC – fração hexano caule; FCF – fração clorofórmio das folhas; FCC – fração clorofórmio caule; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FAEC – fração acetato de etila caule; FRF – fração remanescente das folhas; FRC – fração remanescente caule. FONTE: a autora (2019).

Como mostra o GRÁFICO 8, todas as amostras apresentaram boa atividade em relação à viabilidade celular, mostrando excelente viabilidade na concentração de 50 µg / mL.

Para a linhagem B16F10, as amostras que apresentaram melhor viabilidade celular nas concentrações de 25 µg / mL foram: FHF, FCC e FAEC. Os que apresentaram melhor viabilidade celular nas concentrações de 50 microgramas por ml foram: FHF, FCC, FAEF e FAEC, como mostra o GRÁFICO 9.

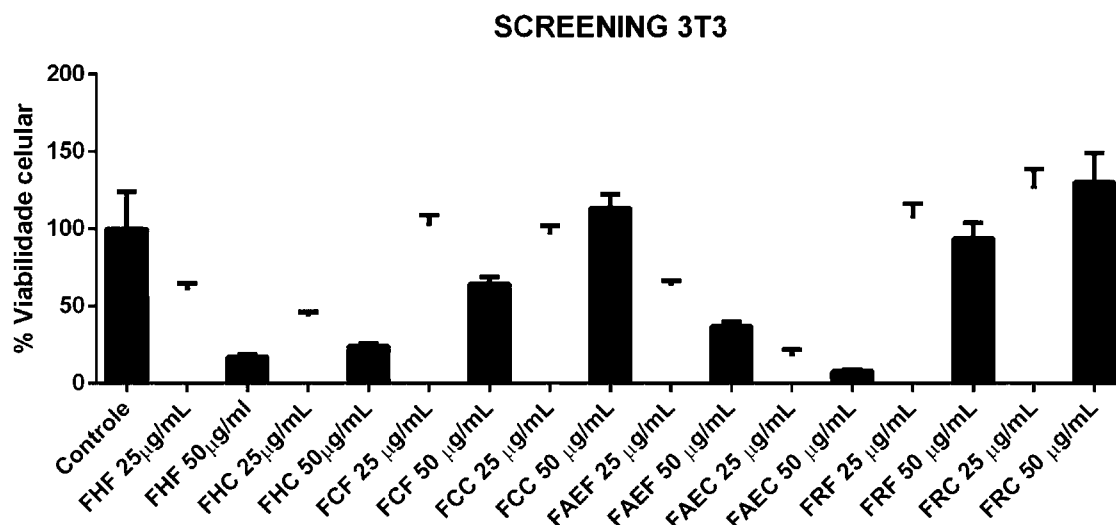
GRÁFICO 9 – TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR B16F10 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE *C. althaeifolia*



Nota: FHF – fração hexano das folhas; FHC – fração hexano caule; FCF – fração clorofórmio das folhas; FCC – fração clorofórmio caule; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FAEC – fração acetato de etila caule; FRF – fração remanescente das folhas; FRC – fração remanescente caule.
 FONTE: a autora (2019).

A triagem da linhagem 3T3 foi realizada, embora não tenhamos calculado a concentração inibitória máxima, testando apenas duas concentrações, para verificar se as amostras testadas apresentam um alto percentual de viabilidade celular, porque quanto maior a viabilidade celular, maiores as chances de a amostra não ser seletiva. As amostras que apresentaram viabilidade celular próxima a 50% na concentração de 25 µg / mL foram a FHC e das folhas e o FAEC apresentou uma porcentagem de viabilidade celular bem abaixo da concentração de 25 µg / mL e as frações FAEF, FHF, FHC, FAEF e FAEC apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular de aproximadamente 50% na concentração de 50 µg / mL, como mostrado no GRÁFICO 10.

GRÁFICO 10 – TRIAGEM DA LINHAGEM CELULAR 3T3 COM DIVERSAS AMOSTRAS DE *C. althaeifolia*



Nota: FHF – fração hexano das folhas; FHC – fração hexano caule; FCF – fração clorofórmio das folhas; FCC – fração clorofórmio caule; FAEF – fração acetato de etila das folhas; FAEC – fração acetato de etila caule; FRF – fração remanescente das folhas; FRC – fração remanescente caule.
 FONTE: a autora (2019).

9.12.1 Análise Morfológica

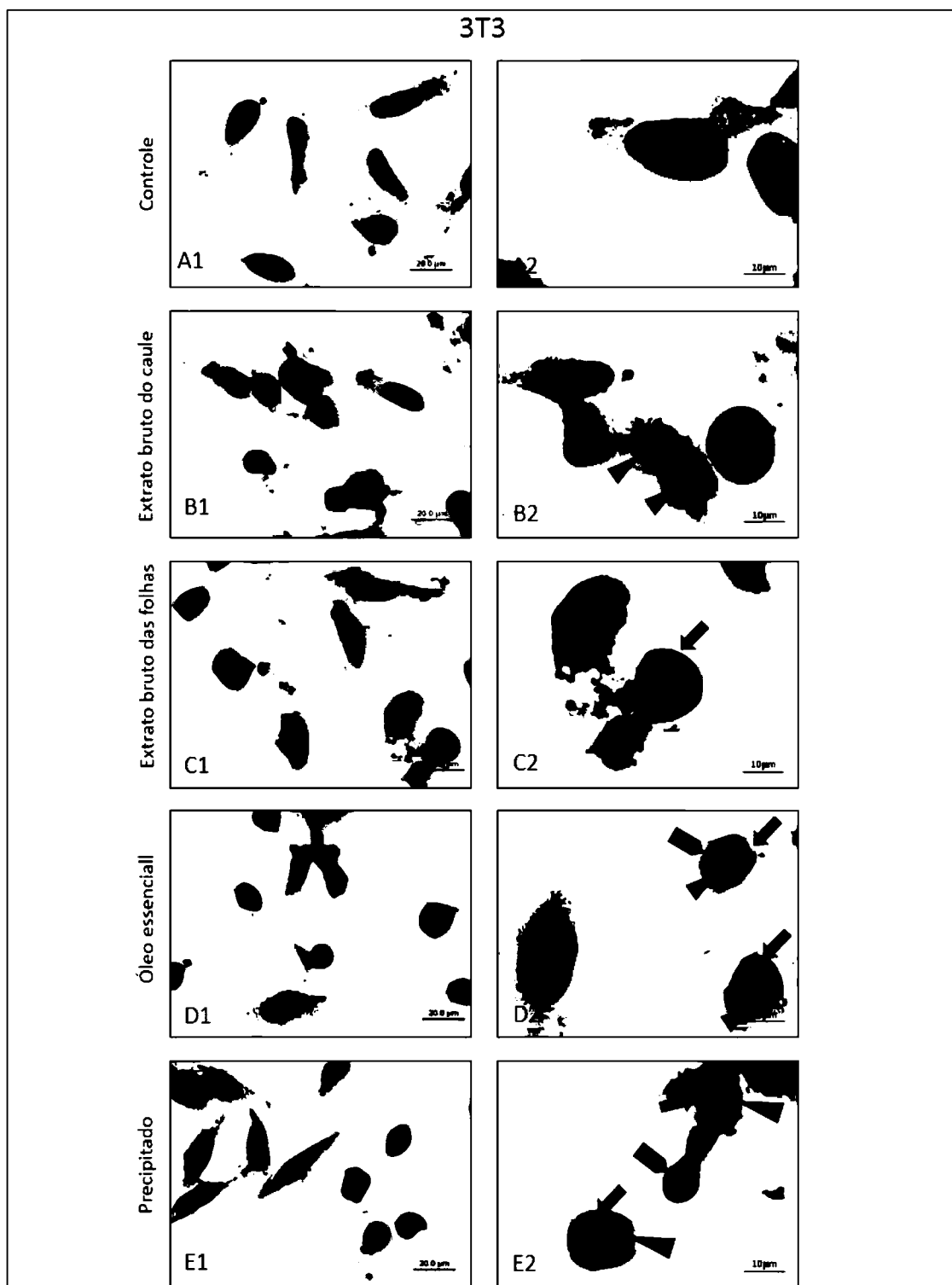
A FIGURA 34 mostra as alterações morfológicas encontradas nos fibroblastos murinos não tumorais, 3T3, incubados com 50 µg / mL dos extratos bruto (folhas e caule), óleo essencial e precipitado de *C. althaeifolia*. A análise morfológica foi realizada após 24 horas de tratamento e as fotos foram feitas com aumento de 1000 e 2000 vezes usando a coloração de May Grunwald-Giemsa. Foi possível notar importantes alterações morfológicas como condensação da cromatina (▲), arredondamento celular (➡) e possível corpo apoptótico (▀).

Como mostrado na FIGURA 35, eles mostraram alterações morfológicas encontradas na linhagem MCF7 de adenocarcinoma de mama humano, incubadas com 50 µg / mL dos extratos bruto (folhas e caule), óleo essencial e precipitado de *C. althaeifolia* por 24 horas. Também foi possível observar alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina (▲), arredondamento celular (➡) (▀) e formação de bolhas, alterações essas encontradas também na linhagem 3T3.

Na FIGURA (36) seguinte, foram encontradas, as mesmas alterações morfológicas que na linhagem 3T3, na linhagem de tumor de melanoma murinho B16F10, incubada com 50 µg / mL dos extratos bruto (folhas e caule), óleo

essencial e precipitado de *C. althaeifolia* após 24 horas de tratamento. É possível detectar alterações morfológicas importantes, como condensação da cromatina (▲), arredondamento (➡), (➤) e formação de bolhas.

FIGURA 34 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NAS LINHAS CELULARES NÃO TUMORAIS DE FIBROBLASTOS MURINOS, 3T3, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* POR 24 HORAS

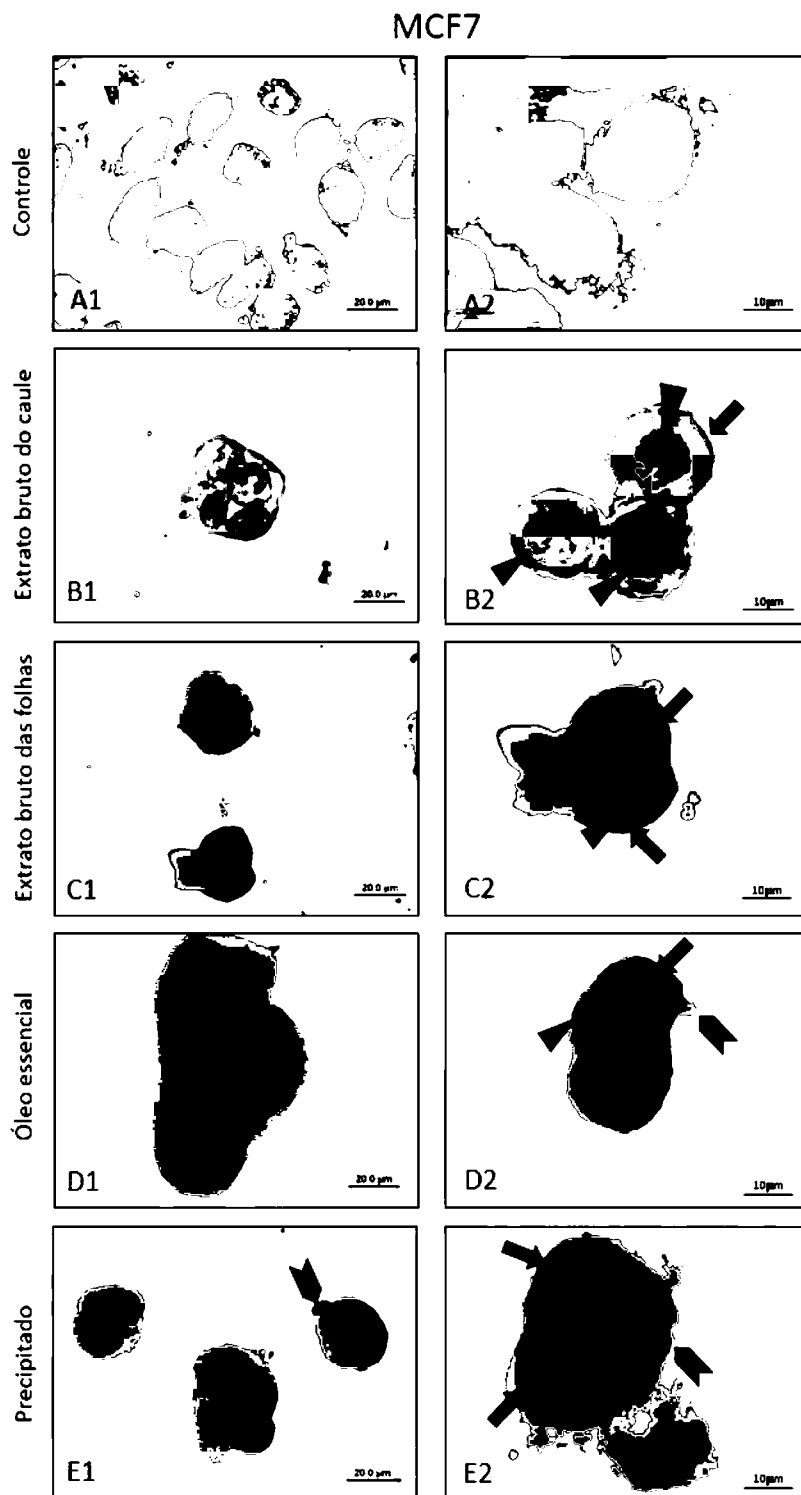


Nota: alterações morfológicas importantes como condensação de cromatina (▲), arredondamento celular (➡) e possível corpo apoptótico (■).

FONTE: a autora (2019).

FIGURA 35 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NA LINHAGEM MCF7 DE ADENOCARCINOMA DE MAMA, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* POR 24 HORAS

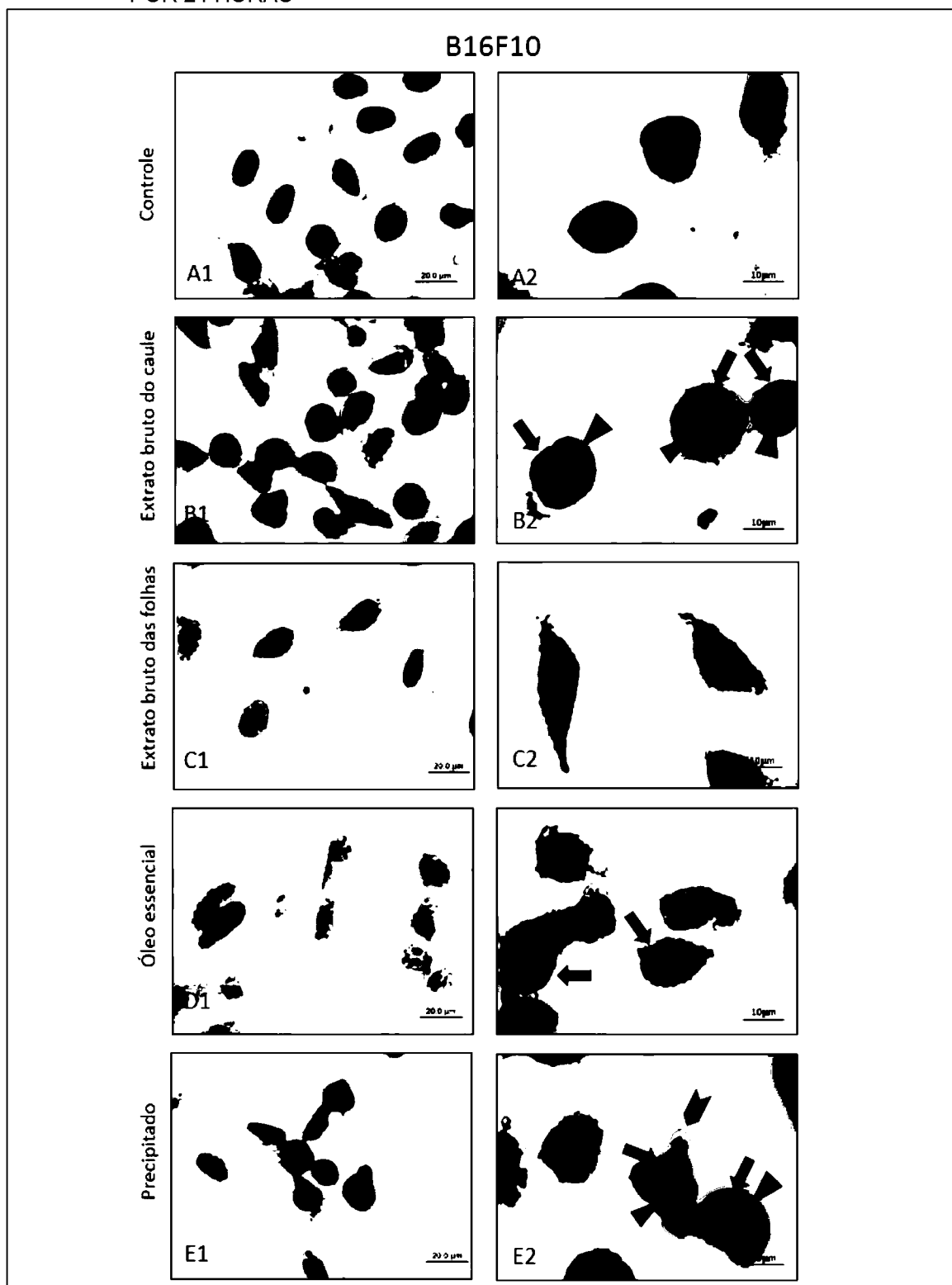
Nota: alterações morfológicas como condensação da cromatina (▲), arredondamento celular



(→) e formação de bolhas (▲).

FONTE: a autora (2019).

FIGURA 36 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS NA LINHAGEM DE TUMOR DE MELANOMA MURINHO B16F10, INCUBADAS COM 50 MG / ML DOS EXTRATOS BRUTO (FOLHAS E CAULE), ÓLEO ESSENCIAL E PRECIPITADO DE *C. althaeifolia* POR 24 HORAS



Nota: alterações morfológicas como condensação da cromatina (▲), arredondamento celular (➡) e formação de bolhas (●).

FONTE: a autora (2019).

10 TESTES PRELIMINARES FARMACOLÓGICOS

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem variar entre linhagens de uma dada espécie e também em função do método de coleta de sangue. Foi avaliado o perfil hematológico (leucócitos: total e diferencial, hemácias, hemoglobina, hematócrito, alguns índices hematimétricos e plaquetas. Desta forma, os valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa foram confirmados abaixo.

De acordo com a TABELA 23, o perfil hematológico e os índices hematimétricos estão em acordo com os valores de referência encontrados na literatura (Melo et al, 2012), confirmando o hemograma saudável e na TABELA 24, mostra o perfil de glicemia e hemoglobina glicada dos animais.

TABELA 23 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS DOS GRUPOS TESTADOS EM RATOS WISTARS

	AMOSTRA					
CONTAGEM	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Leucócitos totais	2,700 L/mm ³	5,100 L/mm ³	2,533 L/mm ³	2,230 L/mm ³	3,200 L/mm ³	2,03 L/mm ³
Eritrócitos totais	5,455 mm ³	4.300 mm ³	4.157 mm ³	4.130 mm ³	3.775,000 mm ³	4.0866,666 mm ³
Hemoglobina	22,17 g/dL	8,15 g/dL	7,93 g/dL	8 g/dL	7,35 g/dL	7,6 g/dL
Hematócrito	37,7 %	24,7 %	24,03 %	23,7 %	21,35 %	23,23 %
Plaquetas	320,000 mm ³	289,500 mm ³	282,333 mm ³	368,000 mm ³	361,000 mm ³	302,333 mm ³
V.C.M	74,7 L µm ³	57,5 µm ³	58 µm ³	57,3 µm ³	56,5 µm ³	56,7 µm ³
HCM	24,6 L pg	19 pg	19,1 pg	19,33 pg	19,5 pg	18,6 pg
CHCM	43,9 g/dL	33,05 g/dL	33,07 g/dL	33,73 g/dL	34,5 g/dL	32,57 g/dL
RDW	16,3 %	12,1%	12,3 %	12,47 %	12,35 %	12,96 %
V. Plaquetário	16,8 µm ³	8,85 µm ³	8,9 µm ³	8,9 µm ³	8,9 µm ³	9,2 µm ³
%Linfócitos	71,6 %	74,5 %	60,7 %	74 %	70,5 %	75 %
%GRA	9,75 %	34 %	17,2 %	10,6 %	17,2 %	19,1 %
Eosinófilos	2,5 %	3 %	2,5 %	2,5 %	1,5 %	1 %
Basófilos	0	0	0	0	0	0
Monócitos	4,7 %	4,5 %	5,7 %	2,3 %	5 %	3 %
Metamielócitos	0	0	0	0	0	0
Bastonetes	0	0	0	0	0	0
Segmentados	13,7 %	4,5 %	29 %	22 %	23 %	19 %

Nota: Grupo I: saudáveis não intervenção; Grupo II: diabéticos não intervenção; Grupo III: diabéticos intervenção (metformina); Grupo IV: diabéticos intervenção (dose 1 precipitado); Grupo V: diabéticos intervenção (dose 2 precipitado); Grupo VI: diabéticos intervenção (dose 1 FAEF); Grupo VII: diabéticos intervenção (dose 2 FAEF) e Grupo VIII: Diabéticos intervenção (dose 1 FRC).
 FONTE: a autora (2020).

TABELA 24 – PARÂMETROS GLICÊMICOS E HEMOGLOBINA GLICADA DOS ANIMAIS

AMOSTRA	GLICEMIA M.A.T.	GLICEMIA M.P.T.S.	GLICEMIA M.P.T.A	HEMOGLOBINA GLICADA	GLICEMIA M. ESTIMADA
Grupo I	79 ± 0,04*	64 ± 0,01*	69 ± 0,17*	4,3 ± 0,02*	76 mg/dL ± 0,11*
Grupo II	92 ± 0,15*	≥ 200 ± 0,22*	131 ± 0,02*	8,2 ± 0,08*	188,5 mg/dL ± 0,23*
Grupo III	91 ± 0,07*	≥ 200 ± 0,03*	189 ± 0,01*	6,2 ± 0,94*	133 mg/dL ± 1,02*
Grupo IV	86 ± 0,11*	≥ 200 ± 0,09*	235 ± 0,28*	7,4 ± 0,37*	166 mg/dL ± 0,22*
Grupo V	84 ± 0,04*	≥ 200 ± 0,21*	199 ± 0,02*	7,7 ± 0,02*	173 mg/dL ± 0,10*
Grupo VI	76 ± 0,02*	≥ 200 ± 0,17*	229 ± 0,01*	7,2 ± 0,09*	159 mg/dL ± 0,12*

Nota: M.A.T.: média antes do tratamento; M.P.T.S.: média pós tratamento streptozotocina; M.P.T.A.: média pós tratamento amostra.

FONTE: a autora (2020).

Dois dos sintomas do diabetes descompensado são fome e sede exageradas, consequências do esforço do organismo para eliminar o excesso de açúcar, a insulina abre a porta da célula para a glicose entrar, como falta insulina, a glicose não entra na célula e sua quantidade aumenta no sangue. Quando isso ocorre, o organismo precisará jogar o açúcar fora por outro caminho. Nesse momento, o rim entra em ação, o corpo tenta eliminar o açúcar por meio do rim, causando à paciente poliúria, desidratação e muita sede. No entanto, ainda não há insulina para carregar o açúcar para dentro da célula, mas ela continua precisando de combustível. O corpo, então, sente mais fome para que o indivíduo se alimente e supra suas necessidades (ZIEGLER, 2018).

Como mostra a TABELA 25, os animais tiveram um aumento significativo de ingestão de água após a indução do Diabetes.

O Grupo I como era o grupo controle, manteve o consumo de água e o consumo de ração, corroborando com os resultados esperados. Já o Grupo II, teve um aumento de 88,5% na ingestão de água após indução da estreptozotocina e de 21,3% no consumo da ração. O grupo III, teve um aumento no consumo de água de 72,4% e de 29,7% no consumo da ração. O grupo IV, obteve um aumento de 113,6% de água e 14,5% na ração. No grupo V, o consumo de água teve um aumento de 84,4% e de 24,3% no consumo da ração. Já o grupo VI, obteve um aumento de 71,8% no consumo de água e de 29,2% de ração.

TABELA 25 – CONSUMO MENSAL DE INGESTÃO DE ÁGUA E DE RAÇÃO

AMOSTRA	ÁGUA A. S.	ÁGUA P.S.	RAÇÃO A. S.	RAÇÃO P.S
Grupo I	184 mL	186 mL	72 g	69 g
Grupo II	130 mL	245 mL	80 g	97 g
Grupo III	105 mL	181 mL	74 g	96 g
Grupo IV	110 mL	235 mL	78 g	89 g
Grupo V	109 mL	201 mL	70 g	87 g
Grupo VI	110 mL	189 mL	65 g	84 g

Nota: A.S. – antes da indução com estreptozotocina; P.S. – após indução com estreptozotocina; Grupo I: saudáveis não intervenção; Grupo II: diabéticos não intervenção; Grupo III: diabéticos intervenção (metformina); Grupo IV: diabéticos intervenção (dose 1 precipitado); Grupo V: diabéticos intervenção (dose 2 precipitado); Grupo VI: diabéticos intervenção (dose 1 FAEF); Grupo VII: diabéticos intervenção (dose 2 FAEF) e Grupo VIII: Diabéticos intervenção (dose 1 FRC).

FONTE: a autora (2020).

O estudo preliminar será posteriormente concluído e publicado.

CONCLUSÃO

As folhas e caule de *C. althaeifolia* Pohl ex Benth Harley & J. F. B. Pastore (Lamiaceae) coletadas na cidade de Curitiba – PR foram analisadas e as amostras encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira quanto ao teor de umidade e cinzas totais.

Nas análises fitoquímica preliminares realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), foram identificados a presença de esteroides e terpenos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e cumarinas.

Foi identificado por CLAE-MS o composto ácido oleanóico e confirmado por RMN.

No bioensaio da germinação da avaliação da atividade alelopática foi observado que nenhuma amostra apresentou toxicidade.

Na análise da hemólise, foi observado toxicidade nas concentrações maiores e na amostra do óleo essencial.

Nos ensaios com a substância ácido gálico e TBARS, verificou-se que as amostras estão dentro dos padrões de pureza, apresentando atividade antioxidante.

Já nos testes da concentração inibitória mínima, embora não exista atividade bactericida acentuada nas folhas e caule dos óleos essenciais, extratos, frações e precipitado de *C. althaeifolia*, a positividade para a atividade antioxidante e a toxicidade acentuada podem ser direcionadas para estudos *in vivo*, onde essas características podem ser testadas.

O estudo microbiológico mostrou sensibilidade considerável em todas as bactérias testadas e de *Candida albicans*, provando que esta planta também pode ser promissora para o tratamento de várias infecções.

O estudo *in vitro* demonstrou que a planta do estudo tem efeitos citotóxicos contra as linhas celulares de câncer testadas, principalmente contra a linha celular B16F10 (melanoma). A diminuição do número de células, alterações morfológicas nas características celulares e aumento da fase sub-G0 pode sugerir que o mecanismo envolvido nesse efeito possa estar relacionado à apoptose. Os resultados do índice de seletividade demonstraram que as amostras testadas se mostraram menos tóxicas para as células sanguíneas, sugerindo que esse

composto poderia ser uma droga mais promissora no tratamento de melanoma e câncer de mama humano.

Mais estudos, especialmente experimentos *in vivo*, são necessários para provar que esta planta pode ser um agente promissor para fortalecer as terapias antineoplásicas.

O diabetes por ser uma doença que a longo prazo causa alterações e complicações crônicas, deve ser investigado e desenvolvidos novos medicamentos para amenizar ou erradicar esta doença. Atualmente, o diabetes foi confirmado como comorbidade para a Covid-19, desencadeando o agravamento da doença e consequentemente o óbito.

É uma doença muito importante a ser estudada e este trabalho contribuiu para o esclarecimento melhor de terapia com planta medicinal, podendo trazer mais estudos para completar este trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A., OLIVEIRA, G. F. L., JORGE, C. A., BARROS, G. C., SILVA, E. M., PAULA, J. R. , BARA, M. T. F. Prospecção fitoquímica e ensaios de pureza de sete plantas medicinais usadas na fitoterapia ayurvédica. **Revista Eletronica de Farmácia**. v. 4, n. 2, p. 118-120, 2007.
- ARAÚJO, A. A. S., MERCURI, L. P., SEIXAS, S. R. S., STORPIRTIR, S. , MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 269-276, 2006.
- ASLAN M.; FREEMAN B.A. REDOX. Dependent impairment of vascular function insickle cell disease. **Free Radic Biol Med**. 1995.
- Banerjee T, Kuypers FA. **Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells**. Br J Haematol. 2008.
- BENÍCIO, D. A., QUEIROGA NETO, V. , SOUSA, J. G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos - Paraíba. **Anais eletrônicos do VI congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande**. v. Paraíba, n. p. 2009.
- BHATIA, A., SINGH BUTTAR, H., ARORA, R., SINGH, B., SINGH, A., KAUR, S. , ARORA, S. Antiproliferative Effects of *Roylea cinerea* (D. Don) Baillon Leaves in Immortalized L6 Rat Skeletal Muscle Cell Line: Role of Reactive Oxygen Species Mediated Pathway. **Frontiers in pharmacology**. v. 11, n. p. 322, 2020.
- BLAINSKI, A., LOPES, G. C. , DE MELLO, J. C. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**. v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.
- BORELLA, J.; PASTORINI, L.H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. *Rev Biot*, v.22, n.3, p.67-75, 2009.
- BRAGANÇA, L.A.R. Plantas Medicinais Antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Editora da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1996.
- BRILL, Z. G., CONDAKES, M. L., TING, C. P. , MAIMONE, T. J. Navigating the Chiral Pool in the Total Synthesis of Complex Terpene Natural Products. **Chemical reviews**. v. 117, n. 18, p. 11753-11795, 2017.
- CALIXTO, J. B. et. al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261- 279, 2001.
- CAMINA, J., L., DAMBOLENA, J., S., ZYGADLO, J. A. , ASHWORTH, L. Chemical composition of essential oils of peltate glandular trichomes from leaves and flowers of *Lepechinia floribunda* (Lamiaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. v. 53, n. 3, p. 375-384, 2018.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2. ed. Campinas: 2003.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1996.

CHEN, Q., ZHANG, Y., ZHANG, W. , CHEN, Z. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Biomedical chromatography : BMC**. v. 25, n. 12, p. 1381-1388, 2011.

CHEW, Y. L., CHAN, E. W., TAN, P. L., LIM, Y. Y., STANSLAS, J. , GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC complementary and alternative medicine**. v. 11, n. p. 12, 2011.

COSTA, R. S., OZELA, E. F., BARBOZA, W. L. R., PEREIRA, N. L. , JUNIOR, C. O. J. J. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

DASMACENO, C. S., OLIVEIRA, L. F., SZABO, E. M., SOUZA, A. M., DIAS, J. F. G., MIGUEL, M. D. , MIGUEL, O. G. Chemical composition, antioxidant and biological activity of *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (LAURACEAE) essential oil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 53, n. 4, p. 2017.

DZAMIC, A. M., NIKOLIC, B. J., GIWELI, A. A., MITIC-CULAFIC, D. S., SOKOVIC, M. D., RISTIC, M. S., KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. B. , MARIN, P. D. Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. **Journal of applied microbiology**. v. 119, n. 2, p. 389-399, 2015.

GANDHI, V. M. , CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**. v. 14, n. 6, p. 513-516, 2000.

HARLEY, R. M. An Explosive Mechanism in *Eriope crassipes*, a Brazilian Labiatae. **Biological Journal of the Linnean Society** 3. v. n. p. 159-164, 1971.

HARLEY, R. M. , PASTORE, J. F. B. A genetic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**. v. 58, n. 1, p. 2012.

HARLEY, R.M.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P. & SANTOS, J.S. in: Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Andrea Jakobson Estúdio, **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2010. Vol. 2. p. 1.141.

HARLEY, R.M. An Explosive Mechanism in *Eriopecrassipes*, a Brazilian Labiatae. **Biological Journal of the Linnean Society** 3: 159-164. 1971.

HARLEY & FRANÇA. Lamiaceae. In: Plantas Raras do Brasil, Giulietti, A.M., A. Rapini, M.J.G. Andrade, L.P. Queiroz e J.M.C. Silva (Eds.). Conservação Internacional/Universidade Estadual de Feira de Santana, Belo Horizonte, 2009. p. 192-200.

HARLEY & PASTORE, J.F.B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58: 1-55. 2012.

HEYWOOD, V.H. Flowering Plants of the World. Oxford: Oxford university press. 1979. p.335.

[HTTP://www.google.com.br/search?q=Cantinoa+althaeifolia&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwihqbb26vXLAhXJGJAKHVp2CZ4Q_AUICCgC&biw=1366&bih=667#imgsrc=SZenL45X60KKrM%3A](http://www.google.com.br/search?q=Cantinoa+althaeifolia&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwihqbb26vXLAhXJGJAKHVp2CZ4Q_AUICCgC&biw=1366&bih=667#imgsrc=SZenL45X60KKrM%3A), acessado em março de 2016.

[HTTP://www.who.int/inf-fs/en/fact138.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact138.html), acessada em janeiro de 2016.

HOU, C. C.; LIN, S. J.; CHENG, J. T.; HSU, F. L. Antidiabetic dimeric gua nolidess and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 625-629, 2003.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. 1. ed. New York: BOOK, M. H., 1940. KHANI, S., SEYEDJAVADI, S. S., ZARE-ZARDINI, H., HOSSEINI, H. M., GOUDARZI, M., KHATAMI, S., AMANI, J., IMANI FOOLADI, A. A. , RAZZAGHI-ABYANEH, M. Isolation and functional characterization of an antifungal hydrophilic peptide, Skh-AMP1, derived from *Satureja khuzistanica* leaves. **Phytochemistry**. v. 164, n. p. 136-143, 2019.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. DONOGHUE, M.G. Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético. Porto Alegre, Artmed. 3ª ed. p. 492-494, 2009.

LACERDA, M. J. R., FREITAS, K. R. , DA SILVA, J. W. Determinação da matéria seca de forrageiras pelos métodos de microondas e convencional. **Bioscience Journal**. v. 25, n. 3, p. 2009.

LAMBA, S. S.; BUCH, K.Y.; LEWIS, H.; LAMBA, H. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. Studies in Natural Products Chemistry, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 21, p. 457-495, 2000.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 92, p. 1-21, 2004.

LIN, K., XU, Y., PEI, J. , LAI, L. Automatic retrosynthetic route planning using template-free models. **Chemical Science**. v. n. 12, p. 2020.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. , JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHATO, S. B. , KUNDO, A. P. Review: ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A compilation and Some Saliente Features. 6. ed. **Phytochemistry**, 2003.

MAIMONE, T. J. , BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature chemical biology**. v. 3, n. 7, p. 396-407, 2007.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomedicine**, v.2, p. 137-189, 1995.

MIRAJ, S., RAFIEIAN, K. , KIANI, S. Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**. v. 22, n. 3, p. 385-394, 2017.

MOUMNI, S., ELAISSI, A., TRABELSI, A., MWERGHNI, A., CHRAIEF, I. , JELASSI, B. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some Lamiaceae species essencial oils from Tunisia. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. v. 20, n. 103, p. 2020.

NIAZIAN, M. **Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants**. v. 249. n.4. p. 953-973, 2019.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Genebra, 2002. 67 p.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.255-262, 2001.

PATON, A. & RYDING, O. Hanceola, Siphocranion and Isodon and their position in the Ocimeae (Labiatae). **Kew Bulletin**. 53(3): 723-731. 1998.

PEREIRA, G. A., PIMENTA, F. P., SANTOS, F. R., DAMASCO, P. V., HIRATA JUNIOR, R. , MATTOS-GUARALDI, A. L. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, n. 5, p. 507-510, 2008.

RADENKOVIC, M., STOJANOVIC, M. , PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of pharmacological and toxicological methods**. v. 78, n. p. 13-31, 2016.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, Livro de Farmacologia. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, n.5, p.577-608, 1999.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, p. 251-265, 2002.

SAMBER, N., KHAN, A., VARMA, A., MANZOOR, N. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. **Pharmaceutical biology**. v. 53, n. 10, p. 1496-1504, 2015.

SANITÁRIA, A. N. D. V. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - Oitava Edição. **Organização Pan-Americana da Saúde**. v. 23, n. 1, p. 58, 2019.

SAXENA, A.; VIKRAM, N. K. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 10, p. 369-378, 2004.

SEN, T., SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. v. 147, n. p. 59-110, 2015.

SHAFIZADEH, F., BRADBURY, G. W. Thermal Degradation of Cellulose in Air and Nitrogen at Low Temperatures. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 23, n. p. 1431-1442, 1979.

SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in applied microbiology**. v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOBEH, M., REZQ, S., CHEURFA, M., ABDELFAH, M. A. O., RASHIED, R. M. H., EL-SHAZLY, A. M., YASRI, A., WINK, M., MAHMOUD, M. F. *Thymus algeriensis* and *Thymus fontanesii*: Chemical Composition, *In vivo* Antiinflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. **Biomolecules**. v. 10, n. 4, p. 2020.

SOUZA, A. S. L. Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos. 2010. 110f. **Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa**. v. n. p. 2010.

SOUZA, P. H. S. Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Para desenvolvimento de produtos odontológicos. 2015. 137f. **Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande**. v. n. p. 2015.

SUDDE, S. A taxonomic revision of tribe Ocimeae Dumort. (Labiatae) in continental South East Asia. (capítulo 8). 2000; 2003. Disponível em: http://www.forest.go.th/botany/main/Research/SS_thesis/Chapter1/Chapter1.htm. Acessado em 02 mar. 2016.

TADIC, M., CUSPIDI, C., SALA C. Diabetes: Is there enough evidence?. **Journal of Clinical Hypertension**. v.1, n. 6, 2020.

URITU, C. M., MIHAI, C. T., STANCIU, G. D., DODI, G., ALEXA-STRATULAT, T., LUCA, A., LEON-CONSTANTIN, M. M., STEFANESCU, R., BILD, V., MELNIC, S., TAMBA, B. I. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae in Pain Therapy: A Review. **Pain research & management**. v. 2018, n. p. 7801543, 2018.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 4, p.35-45, 2002. YANG, Y.; ISLAM M.S.; WANG J.; LI Y.; CHEN X. **Tradicional Chinese Medicine in the Treatment of Patients Infected with 2019-New Coronavirus (SARS-CoV-2): A Review and Perspective**. v. 16, n. 10. p. 1708-1717, 2020.

ZIANI, B. E. C., HELENO, S. A., BACHARI, K., DIAS, M. I., ALVES, M. J., BARROS, L. , FERREIRA, I. Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. **Food research international**. v. 116, n. p. 312-319, 2019.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas



DECLARAÇÃO

Declaro que a aluna do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (nível doutorado) (UFPR), AMANDA MIGLIORINI URBAN, RG 43.962.895-7 e CPF 358.298.618-79 participou do curso de extensão "Curso Técnico sobre Manipulação na Experimentação Animal" realizada nos dias 25 e 26 de março de 2019 no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. A participante foi APROVADA com frequência 100% e nota 85.

E por ser verdade, firmo (o)a presente.

Curitiba, 06 de junho de 2019.

Márcia Kiyoe Shimada
Coordenadora do Curso de Extensão
Matric. 201829
Departamento de Patologia Básica – UFPR