



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Maytenus ilicifolia*

A.O. Alves¹, R.M. Oliveira², G.C.C Weiss³, B.S.R. Bonadiman¹, A.A., R.C.V. Santos⁵,
I.B.M. Cruz¹

1- Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde - CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55)3220-8163 – e-mail: (audrei.alves77@gmail.com)

2- Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde - CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55)3220-8163 – e-mail: (raul.moreira.oliveira@gmail.com)

3- Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais – CEP: 97015-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55) 3220-8353 – grazielle.castagna@gmail.com

1- Departamento de Morfologia – Universidade federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde - CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55)3220-8163 – e-mail: (beadasilvarosa@gmail.com)

4- Departamento de Morfologia - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde – CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55)3220-8163 – e-mail: (robertochrist@gmail.com)

1- Departamento de Morfologia – Universidade federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde - CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55)3220-8163 – e-mail: (ibmcruz@hotmail.com)

RESUMO – A Organização Mundial da Saúde reconhece a relevância do uso popular de plantas medicinais. Entretanto, em alguns casos, ainda é comum o uso sem critérios e avaliação da eficácia e segurança. É o caso da *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente como espinheira-santa, indicada para gastrites e dispepsias, preparada na forma de infusão de folhas frescas ou secas. O objetivo deste estudo foi avaliar a de diferença entre extratos de folhas secas e frescas quanto à composição de moléculas bioativas, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana frente a 12 cepas bacterianas. Foram obtidos extratos hidroalcoólicos usando folhas frescas e secas e a quantificação de oito moléculas bioativas foi realizada por CLAE. Os extratos de folhas secas apresentaram a maior concentração de compostos bioativos, bem como uma atividade antibacteriana mais eficiente. A capacidade antioxidante foi maior no extrato de folhas frescas, mas ambos reduziram os níveis de EROs.

ABSTRACT - The World Health Organization recognizes the importance of the popular use of medicinal plants. However, in some cases, it is still common to use without and evaluation criteria of efficacy and safety. This is the case of *Maytenus ilicifolia*, popularly known as espinheira-santa, indicated for gastritis and dyspepsia, prepared in the form of infusion of fresh or dried leaves. The aim of this study was to evaluate the difference between extracts of dried and fresh leaves on the composition of bioactive molecules, antioxidant capacity and antimicrobial activity against 12 bacterial strains. Hydroalcoholic extracts were obtained using fresh and dried leaves and quantification of eight bioactive molecules was performed by HPLC. The dried leaf extracts had the highest concentration of bioactive compounds as well as more effective antibacterial activity. The antioxidant capacity was higher in the extract of fresh leaves, but both have reduced levels of ROS.

PALAVRAS-CHAVE: *Maytenus ilicifolia*; antioxidante; antimicrobianos; plantas medicinais.

KEYWORDS: *Maytenus ilicifolia*; antioxidant; antimicrobians, medicinal plants.



1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 80% da população mundial utiliza fitoterápicos e plantas medicinais para tratar condições clínicas, uma vez que um grande número de pessoas têm pouco acesso a medicamentos alopáticos (Veiga Junior et al., 2005). Por esta razão, no Brasil as plantas medicinais são utilizadas, seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde, para muitas condições patológicas (Alvim et al., 2006). Uma revisão realizada por Antonio e colaboradores (2014) compilou objetivos brasileiros e ações dos programas de saúde e mostrou que o uso combinado da fitoterapia com outros tratamentos podem reduzir custos, preservar conhecimentos tradicionais e a biodiversidade, além de promover o desenvolvimento social e o estímulo de ações intersetoriais.

No entanto, várias questões relacionadas com a utilização popular de plantas medicinais precisam ser esclarecidas a fim de aumentar a eficácia clínica e diminuir potenciais preocupações com segurança.

O modo de preparação da planta, decocções e ou infusões, pode mudar a matriz de compostos bioativos e afetar suas propriedades biológicas. Por exemplo, a *Camelia sinensis*, uma planta chinesa amplamente consumida no mundo, pode ser utilizada nas formas de chá verde, branco e preto de acordo com o tratamento pós-colheita realizado nas folhas, que afeta a composição química da infusão de chá e, potencialmente, seus efeitos sobre a saúde humana (Tenore et al., 2015).

Estas diferenças relacionadas com os tratamentos pós-colheita podem ser particularmente importantes quando a planta medicinal é utilizada para o tratamento de doenças ou sintomas agudos, tais como infecções microbianas. Na Região Sul do Brasil, as folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex *Reissek* (*Celastraceae*) popularmente conhecida como Espinheira-Santa, são utilizadas em infusões na forma fresca ou seca, no tratamento de distúrbios digestivos (Brandão et al., 2006).

Registros etnofarmacológicos descrevem que tribos Mbyá-Guarani do Sul do Brasil, usavam *M. ilicifolia* como antitumoral. Posteriormente esta planta foi incorporada na farmacopeia de agricultores para tratar outras condições, incluindo distúrbios gastrointestinais (Brandão et al., 2006).

A *Maytenus M.*, que está incluída na Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2002) apresenta um grande número de moléculas bioativas, incluindo vários compostos fenólicos, tais como os flavonóides, taninos fenólicos, bem como alcalóides, terpenos e outras substâncias com potencial papel terapêutico (Carlini e Frochtengarten, 1988; Estevam et al., 2009). Evidências científicas descrevem várias atividades biológicas de *M. ilicifolia* incluindo antibiótica, antibiofilme, anti protozoários, anti úlcera, antiinflamatória e analgésica (Queiroga et al., 2000; Nakamura et al., 1994). A indução de apoptose de células HT-29 do carcinoma colo retal por extratos de *M. ilicifolia*, sem efeito citotóxico sobre as células saudáveis, também foi relatada na literatura (Araújo Júnior, 2013).

Sendo assim, o presente estudo quantificou e comparou compostos químicos e atividades antioxidantes e antibacterianas de extratos de *M. ilicifolia* obtidos a partir de folhas frescas e secas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Preparação dos Extratos



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

As amostras de espinheira-santa foram coletadas na zona urbana da cidade de São Sepé (Rio Grande do Sul) e uma amostra do material foi anexada como um espécime voucher (número HDCF 6749) no Herbário do Departamento Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Para obter folhas secas, as amostras foram limpas e permaneceram durante seis dias à temperatura ambiente e, em seguida, em estufa a 45° C durante 48 horas.

Extratos etanólicos foram preparados a partir de folhas frescas e folhas secas. A preparação seguiu o mesmo protocolo para ambos: as folhas foram maceradas em etanol a 95% (EtOH) (100g / 1L) e mantidas à temperatura ambiente durante quatro dias sob agitação eventual.

2.2. Análise Fitoquímica

Foi utilizado um sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas alternadas conectados a um detector por arranjo de diodos. Para a análise dos extratos, foram injetadas soluções padrão de ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido caféico, rutina, quercitrina, quercetina e kaempferol. A identificação se deu por meio dos tempos de retenção.

O teor de flavonóides totais dos extratos foi determinado utilizando o ensaio de cloreto de alumínio (AICI₃) (Boroski et al., 2015).

Polifenóis totais dos extratos foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, com metodologia adaptada de Kim e colaboradores (Kim et al., 2003).

A capacidade antioxidante dos extratos foi quantificada por determinação da capacidade de eliminação de radicais, utilizando o radical estável, DPPH (Mensor et al., 2001; Choi et al., 2002; Zhang et al., 2007). Este ensaio baseia-se na medição da capacidade antioxidante de substâncias para sequestrar o radical estável DPPH que pode ser avaliada medindo a diminuição da sua absorbância por espectrofotometria.

2.6. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da espinheira-santa foi testada contra estirpes microbianas obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados clínicos e ambientais fornecidos pelo Departamento de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), armazenados em ágar nutriente a 4° C. Foram testadas quatro bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus sp.* (Isolado clínico), meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (Isolado clínico) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039); e oito bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323A), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA01).

2.7. Ensaio Picrogreen para Avaliação de Citotoxicidade

Essa técnica é utilizada para a quantificação do DNA liberado no meio devido a apoptose celular, com o objetivo de detectar citotoxicidade. O reagente de PicoGreen® apenas emite



fluorescência quando se liga com o DNA dupla fita. Se esse reagente não está ligado à molécula de DNA não apresenta coloração e, conseqüentemente, não é detectada fluorescência.

2.8. Análise Estatística

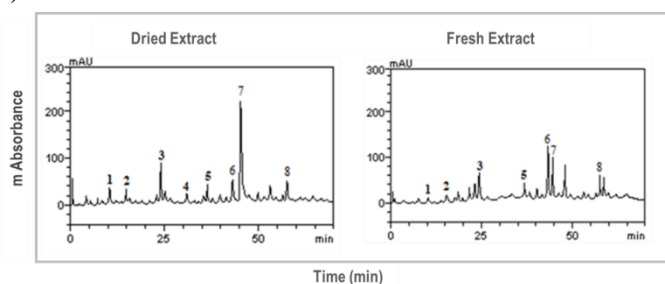
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 6.0), os resultados obtidos são expressos como média desvio \pm padrão (SD). A análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida por Bonferroni *pos hoc* test foi aplicada a diferenças comparadas entre os dois extratos em diferentes concentrações. Testes com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de compostos fenólicos foi significativamente mais baixa em extratos de folhas secas (4.861 ± 0.78 mg Ác. Gálico/g peso seco) quando comparados com extratos de folhas frescas (8.096 ± 1.23 mg Ác. Gálico/g peso seco). Entretanto, a concentração de flavonóides totais foi similar entre os extratos (Extrato folhas secas = 4.371 ± 0.78 ; Extrato folhas frescas = 4.159 ± 0.88 mg catequina/g peso seco).

A análise cromatográfica mostrou oito compostos bioativos principais que podem ser vistos na figura 1. Houve diferença estatística significativa entre os extratos, sendo que o extrato de folhas secas apresentou maiores concentrações de ácido gálico, catequina, ácido cafeico, rutina e quercetina, enquanto que o extrato de folhas frescas apresentou maiores níveis de quercitrina e kaempferol. Epicatequina foi presente somente em extrato de folhas secas.

Figura 1 – Perfil cromatográfico de Espinheira-santa. Ácido Gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido cafeico (pico 3), epicatequina (pico 4), rutina (pico 5), quercitrina (pico 6), quercetina (pico 7) e kaempferol (pico 8).



O composto com maior concentração no extrato seco foi a quercetina, seguida pelo ácido cafeico. No extrato fresco, foi a quercitrina seguido pela quercetina. Apesar de observar diferenças nas concentrações, ambos os extratos apresentaram importantes moléculas bioativas, como compostos fenólicos e taninos condensados e hidrolisados, que possuem efeitos positivos na saúde humana (Koleckar et al., 2008; Sroka et al., 2005).

A capacidade antioxidante foi avaliada e comparada entre os extratos, utilizando rutina como controle. Os resultados mostraram maior e similar capacidade antioxidante dos extratos frescos e rutina. Além disso, apesar dos extratos secos apresentarem maiores concentrações de compostos bioativos sua capacidade antioxidante foi mais baixa que extratos de folhas frescas e rutina.

A atividade antimicrobiana foi testada frente a 12 microrganismos. Os extratos secos apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas. Em contrapartida, extratos frescos não foram



efetivos contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. *Salmonella enteritidis* e *Klebsiella pneumonia* foram os microrganismos mais suscetíveis a ação dos extratos. Entretanto, a ação antimicrobiana da espinheira-santa em relação a *Klebsiella pneumonia* foi fortemente influenciada pelo modo de preparação dos extratos. Importante salientar que este é o primeiro estudo que descreve a ação desta planta sobre este microrganismo.

Em relação a análise de dsDNA, a determinação convencional pode ter muitos interferentes. Por esse motivo, Jobim e colaboradores (2014) adaptaram a técnica e validaram o uso para estimar a citotoxicidade de extratos de plantas frente a microrganismos. Esses autores desenvolveram um protocolo para dsDNA a partir de ensaio fluorimétrico a partir do estudo de Batel e colaboradores (1999) e Georgiou e colaboradores (2009) para células eucarióticas.

Sendo ricos em moléculas antioxidantes, os efeitos dos extratos sobre as bactérias poderiam envolver algum nível de desbalanço Redox. Para testar esta hipótese os níveis de ROS foram medidos nas 12 cepas expostas em diferentes concentrações. Houve redução nos níveis de ROS em todas as bactérias testadas. No entanto, houve variação de acordo com as bactérias, concentrações e tipo de extratos testados. Estes resultados sugerem a existência de um efeito interativo antioxidante/antibacteriano de plantas que atuam sobre os microrganismos. No entanto, cada microrganismo, provavelmente, tem algumas adaptações bioquímicas específicas, que se tornam mais ou menos susceptíveis cada um de vários tipos de extratos de plantas e as suas diversas formas de preparação.

4. CONCLUSÃO

Os resultados aqui descritos sugerem que a eficácia antioxidante e antimicrobiana da espinheira-santa é diretamente influenciada pela forma de preparação dos extratos, semelhante ao que ocorre com outras plantas medicinais exóticas, como a *Camelia sinensis*. Extratos de *M. ilicifolia* produzidos a partir de folhas secas apresentaram maior concentração de compostos bioativos, assim como uma atividade antibacteriana mais eficaz, apesar da capacidade antioxidante a ser maior nos extratos produzidos a partir de folhas frescas. A atividade anti-bacteriana e anti-oxidante concomitante foi observada em ambos os extratos e estes resultados sugerem que a diminuição dos níveis de ROS poderia provocar citotoxicidade por stress redutivo ou para atuar como sinalização na inibição da proliferação de bactérias.

No entanto, estudos complementares devem ser executados para confirmar esta hipótese. Apesar das limitações metodológicas relacionadas com os protocolos *in vitro*, os resultados aqui apresentados podem ser considerados relevantes, uma vez que as plantas medicinais tem sido amplamente utilizadas na população mundial, em especial *M. ilicifolia*, que está incluída como planta medicinal prescrita para cuidados primários de saúde.

5. REFERÊNCIAS

- Alvim, N.A.T., Ferreira, M.A., Cabral, I.E., & Almeida, A.J. (2006). The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. *Rev Latino-Am Enfermagem*, 14(3), 316–323.
- Antonio, G.D., Tesser, C.D., & Moretti-Pires, R.O. (2014). Phytotherapy in primary health care. *Rev Saude Publica*, 48(3), 541-53.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

- Araújo Júnior, R.F., Oliveira, A.L., Pessoa, J.B., Garcia, V.B., Guerra, G.C., Soares, L.A., Souza, T.P., Petrovick, P.R., & Araújo, A.A. (2013). *Maytenus ilicifolia* dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(11), 1251-8.
- Batel, R., Jaksić, Z., Bihari, N., Hamer, B., Fafandel, M., Chauvin, C., Schröder, H.C., Müller, W.E., & Zahn, R.K. (1999). A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Anal Biochem*, 270(2), 195-200.
- Boroski, M., Visentainer, J.V., Cottica, S.M., & Morais, D.R. (2015). *Antioxidantes: princípios e métodos analíticos*. Curitiba: Editora Appris.
- Brandão, M.G.L., Cosenza, G.P., Moreira, R.A., & Monte-Mor, R.L.M. (2006). Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn*, 16(1), 408-420.
- Brasil. (2002). *Farmacopéia Brasileira*. (4. ed.). São Paulo: Editora Atheneu.
- Carlini, E.A., Frochtengarten, M.L. (1988). *Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (Maytenus ilicifolia)*. (2. ed.). Brasília: CEMEPPM.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., & Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci*, 163(1), 1161-1168.
- Estevam, C.S., Cavalcanti, A.M., Cambui, E.V.F., Araújo Neto, V., Leopoldo, P.T.G., Fernandes, R.P.M., Araujo, B.S., Porfírio, Z., & Sant'ana, A.E.G. (2009). Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn*, 19(1), 299 – 302.
- Georgiou, C.D., Papapostolou, I., & Grintzalis, K. (2009). Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). *Nat Protoc*, 4(2), 125-31.
- Jobim, M.L., Santos, R.C., dos Santos Alves, C.F., Oliveira, R.M., Mostardeiro, C.P., Sagrillo, M.R., de Souza Filho, O.C., Garcia, L.F., Manica-Cattani, M.F., Ribeiro, E.E., & da Cruz, I.B.M. (2014). Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res.*, 169(4), 314-23.
- Kim, D-O., Jeong, S.W., & Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*, 81(1), 321-326.
- Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., & Opletal, L. (2008). Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev Med Chem.*, 8(5), 436-47.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., & Coube, C.S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*, 15(2), 127-30.
- Nakamura, M., Kakasumi, T., Minagawa, Y., & Yoshizawa, T. (1994). *Maytenus ilicifolia* extracts, especially quercetin-3-O-glucoside, as analgesic and anti-inflammatory agents. *Japan Kokal Tokkyo Koho*, 96(1), 981-988.
- Queiroga, C.L., Silva, G.F., Dias, P.C., Possenti, A., & de Carvalho, J.E. (2000). Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *J Ethnopharmacol*, 72(3): 465-8.
- Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Naturforsch*, 60(11-12), 833-43.
- Tenore, G.C., Daglia, M., Ciampaglia, R., & Novellino, E. (2015). Exploring the nutraceutical potential of polyphenols from black, green and white tea infusions - an overview. *Curr Pharm Biotechnol*, 16(3), 265-71.
- Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., & Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3), 519-528.



Zhang, X., Xu, J.K., Wang, J., Wang, N-L., Kurihara, H., Kitanaka, S., & Yao, X-S. (2007). Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*. *Journal of Natural Products*, 70(1), 24-28.