



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA



CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE *Coleus blumei* Benth

THAIS HARUMI SATO

ARARAQUARA – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA



CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE *Coleus blumei* Benth

ALUNA: THAIS HARUMI SATO

ORIENTADOR: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico;

ARARAQUARA – SP

2011

Agradeço a toda minha família, a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado, aos Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos e aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, por me apoiarem nesse projeto e pela confiança, presteza e paciência.

"...E nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro." Albert Einstein

Sumário

1.	RESUMO.....	5
2.	ABSTRACT.....	7
3.	INTRODUÇÃO.....	9
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
5.	OBJETIVO.....	11
6.	MATERIAL E MÉTODOS	12
6.1.	MATERIAIS.....	12
6.2.	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	13
6.3.	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	13
6.4.	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	14
6.5.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	20
6.6.	ATIVIDADE ALELOPÁTICA	23
6.7.	AValiação DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	25
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7.1.	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	27
7.2.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	29
7.3.	AValiação DA ATIVIDADE ALOPÁTICA	41
7.4.	AValiação DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	45
8.	CONCLUSÕES.....	48
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. RESUMO

Coleus blumei Benth (Lamiaceae), popularmente conhecida no Brasil como “coração-magoado” ou “coléus-de-Java”, é uma planta ornamental amplamente utilizada devido ao colorido de suas folhas. Diversas espécies do gênero *Coleus* apresentam compostos com atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática devido à presença de compostos químicos como coleonol, forscolina e ácido rosmarínico. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico e realizar ensaios biológicos para avaliar a atividade antibacteriana, antioxidante e alopática do extrato etanólico 70% e de suas frações acetato de etila, diclorometano e fração aquosa final de folhas de *Coleus blumei* Benth. O extrato vegetal foi preparado por turbólise a partir do pó de folhas secas trituradas, utilizando como solvente para extração etanol 70%. O extrato etanólico foi fracionado com os solventes diclorometano e acetato de etila. O estudo fitoquímico identificou a presença de saponinas, antraquinonas livres, flavonoides e antocianidinas. Na avaliação antibacteriana a fração diclorometânica apresentou atividade frente a todos os micro-organismos testados tanto no teste de difusão em Ágar quanto no teste de microdiluição. O extrato etanólico 70% sem fracionamento apresentou atividade frente aos micro-organismos *S. aureus* e *S. epidermidis* no teste de difusão em Ágar e frente a todos os micro-organismos testados no teste de microdiluição. A fração acetato de etila apresentou atividade frente ao micro-organismo *S. aureus* no teste de difusão em Ágar e frente a todos os micro-organismos testados no teste de microdiluição. A fração aquosa final não apresentou atividade frente a nenhum micro-organismo testado. No teste da avaliação da atividade alopática a fração diclorometânica apresentou maior inibição de germinação e crescimento de sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), seguida pelo extrato etanólico 70%, pela fração acetato de etila e pela fração aquosa final. No teste de

atividade antioxidante com DPPH a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante seguida pela fração aquosa final e pela fração diclorometano. No teste de determinação da capacidade antioxidante com ânions peróxidos foi possível observar atividade antioxidante somente nas frações acetato de etila e fração aquosa final. No teste de redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} , a fração acetato de etila apresentou maior atividade, seguida pela fração aquosa final e fração diclorometânica. Portanto com o presente projeto foi possível observar que o extrato etanólico 70% e suas frações apresentam atividade antibacteriana, alopática e antioxidante, sendo a fração mais apolar a detentora de maior atividade antibacteriana e alopática e a fração polar com moderada atividade antioxidante. Desta forma torna-se interessante seu estudo como auxílio para futuras pesquisas.

Palavras-chave: *Coleus blumei* Benth, coração-magoado, coléus-de-Java, antimicrobiano, alelopatia, antioxidante, fitoquímica.

2. ABSTRACT

Coleus blumei Benth (Lamiaceae), popularly known in Brazil as "heart-hurt" or "coleus-of-Java" is an ornamental plant widely used due to the color of its leaves. Several species of the genus *Coleus* present compounds with antioxidant, antimicrobial and allopathic activities due to the presence of chemicals such coleonol, forskolin and rosmarinic acid. Therefore, this study aimed to carry out phytochemical study and biological tests to evaluate the antibacterial, antioxidant and allopathic activities of the 70% ethanol extract and its fractions ethyl acetate, dichloromethane and end aqueous fraction leaf of *Coleus blumei* Benth. The plant extract was prepared by turbolysis from the powder of dried leaves, as a solvent for extraction using 70% ethanol. The ethanol extract was fractionated with solvents dichloromethane and ethyl acetate. The phytochemical study identified the presence of saponins, free anthraquinones, flavonoids and anthocyanidins. In evaluating the antibacterial dichloromethane fraction showed activity against all microorganisms tested both in agar diffusion test and microdilution test. The 70% ethanol extract showed activity against the microorganisms *S. aureus* and *S. epidermidis* in agar diffusion test and against all microorganisms tested in microdilution test. The ethyl acetate fraction showed activity against the micro-organism *S. aureus* in the agar diffusion test and against all microorganisms tested in microdilution test. The end aqueous fraction showed no activity against any micro-organism tested. In the test of evaluation activity allopathic dichloromethane fraction showed greater inhibition of seed germination and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), followed by 70% ethanolic extract, the ethyl acetate fraction and the end aqueous fraction. In testing the antioxidant activity with DPPH ethyl acetate fraction showed higher antioxidant activity followed by the end aqueous fraction and the fraction of dichloromethane. In the test for determining the

antioxidant capacity with anion peroxides, antioxidant activity was observed only in the ethyl acetate fraction and end aqueous fraction. In the test of reduction of $Fe^{3+} + Fe^{2+}$ in the ethyl acetate fraction showed higher activity, followed by the final aqueous fraction and fractional dichloromethane. So with this project was possible to observe that the 70% ethanolic extract and its fractions have antibacterial, antioxidant and allopathic, more polar fraction being the largest holder of antibacterial activity and polar fraction of allopathic and moderate antioxidant activity. Thus it becomes interesting as a study aid for further research.

Keywords: *Coleus blumei*, heart-hurt, Coleus-of-Java, antimicrobial, allopathic, antioxidant phytochemical.

3. INTRODUÇÃO

A população brasileira faz uso frequente de plantas medicinais como forma de tratamento para diversas enfermidades. É possível utilizar diferentes tipos de plantas para o tratamento de doenças. Geralmente a transmissão de conhecimentos é intergeracional e regional o que explicam a utilização de uma mesma planta em diversas regiões, mas com nomes populares diferentes. É importante destacar o papel dos profissionais de saúde na orientação da população em relação ao uso fitoterápico, tendo em vista a peculiaridade de cada planta e sua utilização adequada (REZENDE & COCCO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população mundial utiliza ou já utilizou plantas como remédio por ser uma alternativa acessível para a população carente cujo acesso a medicina atual é difícil. Muitos dos produtos fabricados são obtidos a partir de extrações de plantas ou de estruturas químicas derivadas de vegetais (GARCIA, 1995).

Nesse contexto, considerando a ampla utilização de plantas do gênero *Coleus* por suas diversas propriedades, inclusive antimicrobianas, demonstrou ser interessante a realização de um estudo fitoquímico e a realização de ensaios biológicos para avaliar a atividade antibacteriana, antioxidante e alopática da planta, pois são fundamentais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, proporcionando maior segurança de suas utilizações para a população.

4. REVISÃO DA LITERATURA

Diversas espécies do gênero *Coleus* apresentam compostos com atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática, devido à presença de compostos químicos como a forskolina, coleonol e o ácido rosmarínico. A forskolina, por exemplo, é obtida de *Coleus barbatus* que apresenta efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e alguns tumores (DE SOUZA, 1993). O ácido rosmarínico é encontrado em *Coleus blumei* e muito utilizado em biotecnologia para a produção em maior escala do composto através de suspensões de células de *Coleus blumei* (ZENK et al., 1977).

A espécie *Coleus blumei* Benth (Figura 1) é uma planta ornamental cultivada devido à sua grande diversidade de coloração e formato das folhas. Atualmente, existem mais de 300 espécies que variam muito seus padrões morfológicos, além disso, a planta apresenta muitas mutações o que torna seu estudo genético inviável, mas interessante para o consumidor, pois apresentam cores e formatos diferentes (VELHO, 2009).



Figura 1: *Coleus blumei* Benth. Fotografada no Horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) por Thais Harumi Sato.

Em estudo de plantas medicinais utilizadas como anti-inflamatório NAMSA e colaboradores (2009) citam o uso de *Coleus blumei* preparado com água quente com suco de frutas cítricas para aplicação na pele contra picadas de escorpião. O mesmo

estudo apresenta também uma relação de plantas e suas atividades citando *Coleus blumei* com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória.

Segundo RAGASA e colaboradores (2001), *Coleus blumei* apresenta flavonoides e coleonol, um diterpeno que também está presente em outras espécies de *Coleus*, como *C. forskohlii* e que é responsável pela atividade biológica. Segundo DUBEY e colaboradores (2002), o diterpeno coleonol é utilizado na medicina em doenças cardíacas, dor espasmódica, micção dolorosa e em convulsões, pois diminui a pressão arterial de gatos e ratos anestesiados e dos ratos já hipertensos, devido a relaxamento da musculatura lisa vascular, além disso, em pequenas doses, apresenta efeito inotrópico positivo sobre o coração de coelhos e gatos. O coleonol também apresenta efeito espasmolítico sobre o músculo gastrointestinal e não sobre a musculatura brônquica e efeito depressor do sistema nervoso central em altas doses.

Em estudo realizado por HEPLER e colaboradores (1972) foi constatado a presença de peroxidases nas células de plantas do gênero *Coleus*, podendo esta ser responsável por sua atividade antioxidante.

5. OBJETIVO

- Realização de um estudo fitoquímico;
- Realização de ensaios biológicos para avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e alelopática de *Coleus blumei* Benth.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Materiais

O material botânico cultivado no Horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) foi submetido ao processo de secagem em estufa de ar circulante a 45°C durante oito dias, em seguida realizou-se pulverização em moinho de facas. Sua identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Milton Groppo Curador do Herbário SPFR de Ribeirão Preto.

Na caracterização fitoquímica foi utilizado solução de cloreto férrico a 1% e a 2% em metanol, ácido clorídrico concentrado e diluído a 2% (v/v), magnésio metálico, éter de petróleo, solução de gelatina a 2,5%, peróxido de hidrogênio 30%, ácido sulfúrico concentrado, metanol, etanol, acetona, cristais de ácido bórico, cristais de ácido oxálico, zinco metálico, cloreto de alumínio a 5% em etanol, água destilada, ácido acético 10%, solução de acetato de chumbo a 10%, éter etílico, amônia diluída, carbonato de sódio a 10%, clorofórmio, fosfato ácido de sódio a 10%, sulfato de sódio anidro, piridina, solução de hidróxido de sódio 10%, solução nitroprussiato de sódio a 10%, reagente de Pesez A e B, reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, papel de filtro, tubos de ensaio, béquer, funil de separação e pipetas.

Nos ensaios microbiológicos, foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 10536 IAL 2393, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 1851, *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 e *S. epidermidis* ATCC 12228, placas de Petri com papel de filtro, *templates*, meio n°1 para antibióticos, microplacas, meio caldo Muller Hinton e Paquímetro.

No teste de atividade alelopática foram utilizados placas de Petri, papel filtro, sementes de tomateiro adquiridas no comércio e água destilada.

Nos ensaios de atividade antioxidante, foram utilizados microplacas, solução de DPPH 60 μ M, etanol, ácido gálico a 0,5 mM, solução tampão fosfato, hexacianoferrato de potássio 1%, ácido tricloroacético 10%, cloreto férrico 0,1%, PMS (fenazina metassulfato), NBT (azul de nitrotetrazólio) e solução de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo).

6.2. Equipamentos utilizados

Agitador de tubos, autoclave (Phoenix/AV50), balança analítica (Bel Mark), câmara de fluxo laminar, espectrofotômetro UV/VIS (Hewlett Packard), estufa de secagem com ar circulante, moinho de facas, evaporador rotatório (Marconi-MA120), chapa de aquecimento (Marchesoni 1), estufa microbiológica, luz UV, liquidificador de aço inoxidável, Micropipeta 100-1000 μ L (Boeco), Micropipeta 20-200 μ L (Bolco), Ultrassom (Unique Ultrasonic Cleaner), Refrigerador, Freezer e Câmara de germinação BOD (Marconi).

6.3. Preparação dos extratos

Para o preparo do extrato etanólico, 100 g do material vegetal pulverizado foram intumescidos com 500 mL de etanol 70%. Em seguida foram submetidos à turbólise por 3 minutos, com 500 mL de etanol 70%, por 3 vezes. Após esta etapa, o extrato etanólico foi concentrado a 400 mL em evaporador rotatório em temperatura inferior a 40°C. Dos 400 mL, 100 mL foram levados à secura para cálculo do resíduo seco. Os 300 mL restantes foram submetidos a fracionamento com os solventes diclorometano e acetato de etila, sendo denominados FD, FAE e FF para a fração aquosa final obtida. Após o fracionamento, as frações foram levadas à secura para cálculo do rendimento e ressuspendidas em água destilada para a realização dos testes.

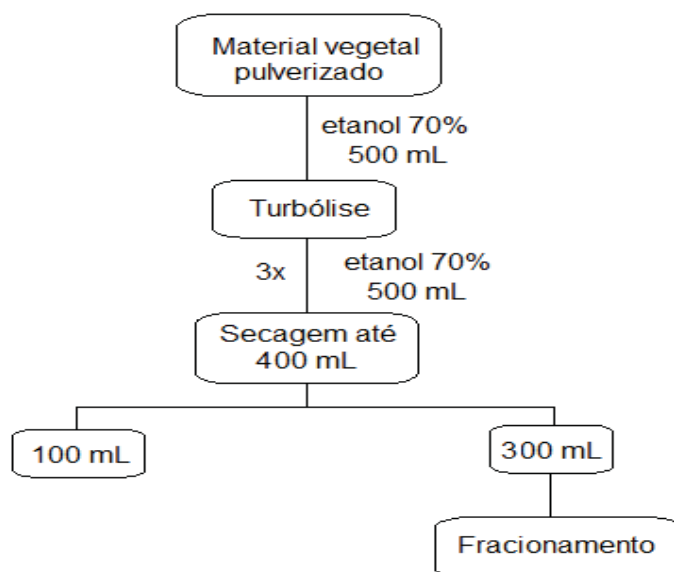


Figura2: Esquema do processo de extração por turbólise realizado com as folhas secas pulverizadas de *Coleus blumei* Benth.

6.4. Caracterização fitoquímica

Os testes de caracterização fitoquímica foram realizados segundo métodos estabelecidos por MATOS e colaboradores (1997) e pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). A caracterização fitoquímica foi realizada com as folhas da planta seca pulverizada.

6.4.1 Flavonoides: Para a realização dos testes de identificação, realizou-se o desengorduramento das folhas pulverizadas de *Coleus blumei* com 20 mL com éter de petróleo, em seguida extração com 30 mL de metanol em banho-maria. Por fim, o extrato metanólico obtido foi levado à secura e ressuspendido em 10 mL de etanol. A solução etanólica obtida foi utilizada nos testes a seguir:

Reação de cianidina

Colocou-se 1 mL do extrato obtido anteriormente em tubo de ensaio com magnésio metálico, em seguida foram adicionadas algumas gotas de ácido clorídrico concentrado.

O despreendimento de gás (H_2) e a presença de coloração rósea ou vermelha podem indicar a presença de flavonoides.

Reação oxalato-bórica

Em tubo de ensaio, evaporou-se, em banho-maria, 3 mL do extrato obtido, após a secura, adicionou-se 5 gotas de acetona e alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico, em seguida levou-se a solução à secura novamente, que foi ressuspensa em 5 mL de éter e observado em luz UV. A presença de fluorescência amarela-esverdeada pode indicar a presença de flavonoides.

Reação de Pew

Em um tubo de ensaio, evaporou-se em banho-maria 3 mL do extrato obtido, após a secura, adicionou-se 3 mL de metanol, zinco metálico e ácido clorídrico concentrado, respectivamente. A presença de coloração vermelha pode ser indicativo de flavonoides.

Reação com cloreto férrico

Em um tubo de ensaio com 1 mL do extrato obtido, foram adicionadas gotas de solução metanólica de cloreto férrico a 2%. A presença de flavonoides pode resultar em coloração verde, amarela ou violácea dependendo do tipo de flavonoide presente na amostra.

Reação com cloreto de alumínio

Em papel de filtro foi gotejado em áreas diferentes o extrato obtido, em seguida sobre estas áreas adicionou-se uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol e observou-se sob luz UV. A presença de fluorescência pode indicar presença de flavonoides.

Confirmação de flavonoides com cromatografia em camada delgada

Para confirmar a presença de flavonoides, foi realizado um cromatografia em camada delgada em cromatoplaça de sílica gel como fase estacionária e a mistura dos solventes

etil acetato fórmico, ácido glacial, ácido acético e água (100:11:11:27) como fase móvel, conforme descrito por WAGNER e colaboradores (1989)

6.4.2 Taninos: Antes de se iniciar os testes de identificação, preparou-se uma solução extrativa da seguinte maneira:

Em um béquer realizou-se decocção durante 15 minutos com 5 g das folhas secas pulverizadas e 100 mL de água destilada. Em seguida a decocção foi filtrada e utilizada nos testes a seguir:

Reação com gelatina

Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL do decocto, 2 gotas de ácido clorídrico diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado pode indicar a presença de taninos.

Reação com acetato de chumbo

Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL do decocto, 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de precipitado esbranquiçado pode indicar a presença de taninos hidrolisáveis.

Reação com sais de ferro

Em um tubo de ensaio adicionou-se 2 mL do decocto, 10 mL de água destilada e algumas gotas de solução de cloreto férrico a 1% em metanol. A formação de coloração azul pode indicar a presença de taninos hidrolisáveis e coloração verde de taninos condensados.

6.4.3 Antraquinonas:

Antraquinonas livres: Em béquer de 50 mL, adicionou-se 1 g das folhas pulverizadas e 10 mL de éter etílico, após filtrar, adicionou-se 1 mL de amônia diluída e agitou-se. A formação de uma camada rósea pode ser indicativa de presença de antraquinonas livres.

Glicosídeos antraquinônicos: 20 mL de água destilada foram adicionados ao pó residual da filtração do teste anterior aquecidos a ebulição por 5 minutos. Após filtrar a nova extração, adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30% e aqueceu-se à ebulição por 5 minutos. A solução extrativa filtrada obtida foi introduzida em funil de separação com éter etílico; a fase etérea obtida no funil de separação foi transferida para tubo de ensaio onde foram adicionados 3 mL de amônia diluída, seguido de agitação. A presença de coloração rósea pode indicar presença de glicosídeos antraquinônicos.

6.4.4 Alcaloides: As reações gerais para alcaloides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados). Na caracterização foram adicionadas, em um gral, algumas gotas de carbonato de sódio a 10% em 5 g das folhas pulverizadas, em seguida realizou-se extração com 25 mL de clorofórmio com o auxílio do pistilo. A solução extrativa obtida foi filtrada e submetida à separação em funil de separação com solução de ácido clorídrico 2%. A fase aquosa ácida obtida foi utilizada nas reações de caracterização com os reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand em lâminas de vidro. A formação de precipitado ou turvação pode indicar a presença de alcaloides.

6.4.5 Saponinas

Teste de formação de espuma

Em um béquer, foram adicionados 2 g da planta pulverizada e 10 mL de água destilada, em seguida a solução foi aquecida à ebulição por 5 minutos. Após filtrar a solução, agitou-se o tubo vigorosamente por 15 segundos. Pode ser indicativo de presença de saponinas a formação de espuma persistente após 15 minutos de agitação.

Determinação do índice de espuma

A determinação do índice de espuma é realizada quando o teste de formação de espuma é positivo. No teste adiciona-se 50 mL de água fervente a 1 g do material vegetal e mantém-se sob ebulição por 30 minutos. Após resfriada, a solução foi colocada em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

A solução do balão volumétrico foi distribuída de acordo com o esquema a seguir.

Número do tubo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Volume de decocoto (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de água (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Por fim, os tubos foram agitados por 15 segundos e após 15 minutos mediu-se a altura da espuma formada.

6.4.6 Glicosídeos cardiotônicos: Antes de se iniciar os testes de identificação, preparou-se uma solução extrativa da seguinte maneira:

Em um béquer com 5 g das folhas de *Coleus blumei* pulverizadas, adicionaram-se 50 mL de etanol 70% que foi submetido a aquecimento em banho-maria por 10 minutos, filtrado e completado com etanol 70% até o volume de 30 mL, em seguida foram adicionados 15 mL de solução de acetato de chumbo 10%, agitou-se e filtrou-se a solução. Ao filtrado adicionou-se 10 mL de solução de fosfato ácido de sódio 10%, agitou-se e filtrou-se a solução. O filtrado foi submetido à separação em funil de

separação com 15 mL de clorofórmio por duas vezes. À fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio anidro. Esta extração obtida foi utilizada nos testes a seguir:

Reação de Legal

Em um tudo de ensaio evaporou-se até securo, em banho-maria, 2 mL do extrato obtido anteriormente, e adicionou-se 1 mL de piridina, 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 10% e 0,5 mL de solução de nitroprussiato de sódio 10%. A formação de coloração vermelha intensa vinhosa pode indicar a presença de glicosídeos cardiotônicos.

Reação de Pesez

Em um tudo de ensaio evaporou-se até securo, em banho-maria, 2 mL do extrato obtido, em seguida adicionou-se 1 mL de reagente Pesez A. A solução foi aquecida a 100° C por 3 minutos e após resfriar, adicionou-se o reagente de Pesez B. A formação de coloração vermelha após aquecimento pode indicar a presença de glicosídeos cardiotônicos.

Reação de Keller-Killiani

Em um tudo de ensaio evaporou-se até securo 2 mL do extrato obtido, em seguida adicionou-se 1 mL de ácido acético, 2 gotas de solução de cloreto férrico 2% e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado com cuidado. A presença de um anel castanho avermelhado entre as camadas e a coloração verde-azulada da camada acética pode indicar a presença de glicosídeos cardiotônicos.

6.5. Ensaio Biológicos

6.5.1 Padronização da suspensão bacteriana

A padronização da suspensão bacteriana foi realizada segundo documento NCCLS. Realizou-se uma suspensão direta em solução salina 0,85% estéril com as cepas: *E. coli* ATCC 10536 IAL 2393, *S. aureus* ATCC 6538 IAL 1851, *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 e *S. epidermidis* ATCC 12228, obtidas de ágar Mueller-Hinton com crescimento de 24 horas, até obtenção, em espectrofotômetro, de absorvância de 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625 nm que correspondem a aproximadamente de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. Para os testes de difusão em Ágar procedeu-se uma diluição de 1:10.

6.5.2 Ensaio microbiológico por difusão em ágar (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010)

Em placas de Petri estéreis, foram adicionados 20 mL de ágar nº1 para antibióticos como camada basal e 5 mL de ágar nº1 para antibióticos com 2% do inóculo preparado como camada superficial para as bactérias. Após solidificação do meio, foram adicionados *templates* estéreis às placas. Aos orifícios dos templates, foram adicionados 100 µL da solução extrativa teste. A concentração inicial utilizada foi de 10 mg/mL, aos demais orifícios, realizou-se diluição seriada de 1:2 em tubos de ensaio com água destilada estéril até concentração de 0,63 mg/mL, conforme a Figura 2.

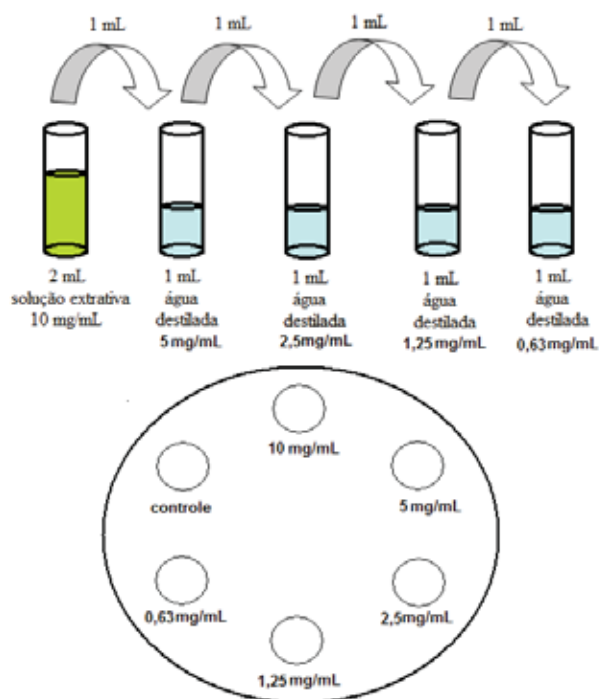


Figura 3: Esquema da diluição seriada e do ensaio microbiológico por difusão em ágar.

O controle utilizado foi o ciprofloxacino na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A concentração deste fármaco utilizado como controle nos testes foi estipulada através de ensaio de difusão com diferentes concentrações.

As placas foram incubadas por 24 horas em estufas a 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Após incubação as medidas dos halos de inibição de crescimento formados foram realizadas com paquímetro digital.

6.5.3 Método de diluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo NCCLS.

Vinte miligramas de cada fração de extrato e do extrato etanólico 70% foram ressuspendidos em 2 mL de água destilada, obtendo-se concentração inicial de 10 mg/mL. Em seguida as soluções extrativas foram diluídas seriadamente até concentração de 0,039 mg/mL (Figura 3).

No teste com as bactérias utilizou-se o meio caldo Muller Hinton. Na primeira coluna (1) adicionaram-se 200 μL de meio de cultura como controle do meio e a partir da segunda coluna foram adicionados 100 μL de meio de cultura. Na quarta coluna (4), adicionaram-se 100 μL do extrato preparado com concentração inicial de 10 mg/mL, a partir desta coluna, realizou-se a diluição seriada 1:2 homogeneizando-se e transferindo-se 100 μL do primeiro poço para os poços subsequentes. Após diluição, foram adicionados, a partir da segunda coluna, 100 μL do inóculo preparado. A terceira coluna (3) foi utilizada como controle negativo, sendo o ciprofloxacino na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

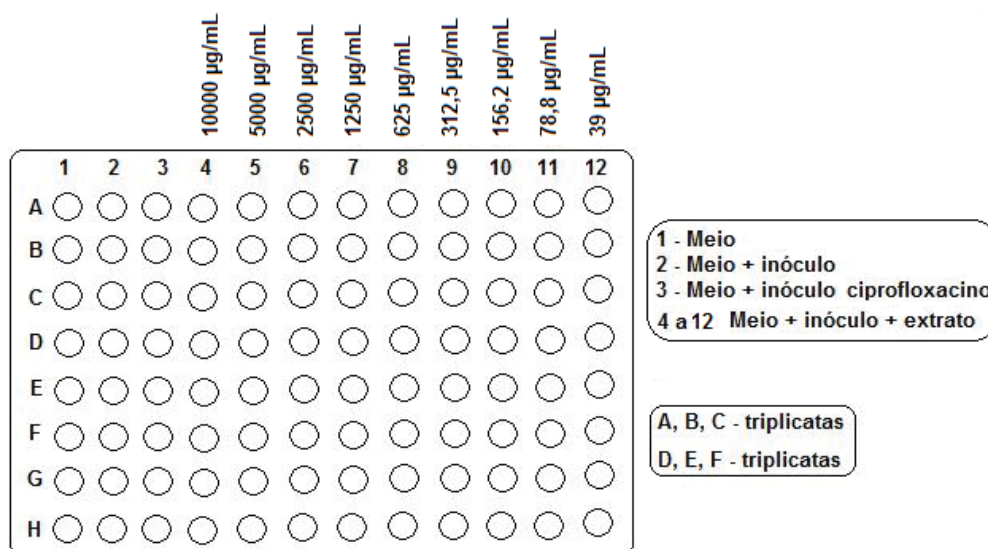


Figura 4: Esquema para a realização do teste em microplacas.

6.5.4 Revelação dos testes de diluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

6.5.4.1 Preparo da solução de resazurina

A solução de resazurina foi preparada pesando-se 2 mg de resazurina que foram diluídos até obtenção de concentração de 0,1 mg/mL em água destilada, em seguida

realizou-se uma diluição de 1:10. A resazurina é um indicador de óxido-redução utilizado para revelar o crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

6.6. Atividade alelopática

6.6.1 Teste de inibição da germinação de sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Os testes de germinação foram realizados em placa de Petri com papel de filtro. Em cada placa de Petri foram colocadas 25 sementes de tomate em quadruplicata, totalizando 100 sementes para cada fração extrativa testada. O teste foi realizado com as frações diclorometano, acetato de etila e a fração final aquosa que foram suspensas em água destilada até concentração de 1 mg/mL. O controle foi realizado com água destilada (Figura 4).

Teste de germinação

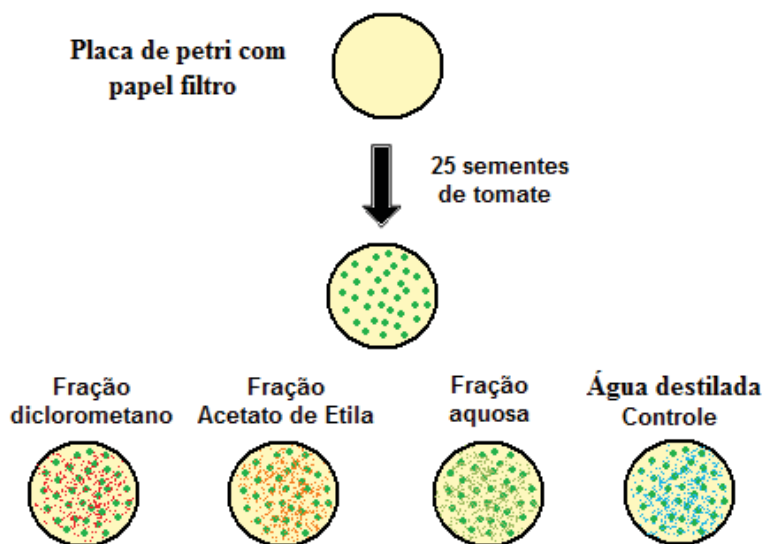


Figura 5: Esquema para a realização do teste de germinação realizado em quadruplicata.

O teste foi realizado em quadruplicata. Foram adicionados 4 mL de cada extrato por placa, que foram mantidas em estufa própria para germinação (BOD), com

temperatura de 35°C. O número de sementes germinadas foi determinado a cada 24 horas por sete dias.

6.6.2 Teste de crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Em placa de Petri com papel filtro foram adicionadas 25 sementes de tomateiro e 2 mL de água destilada esterilizada, após germinarem foram adicionadas às placas 2 mL da solução extrativa ressuspensas em água destilada em concentrações de 2 mg/mL, conforme a Figura 5.

Teste de crescimento

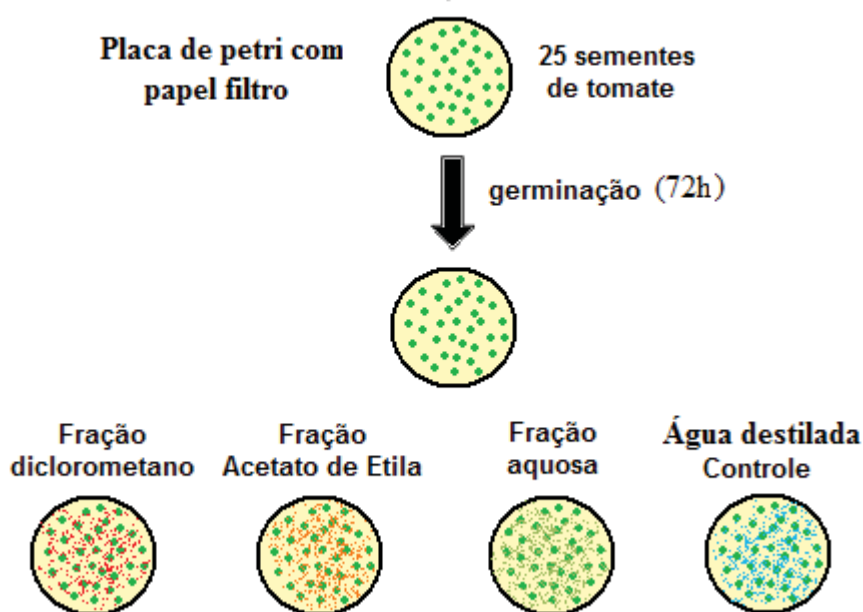


Figura 6: Esquema para a realização do teste de crescimento realizado em quadruplicata.

Este teste foi realizado em quadruplicata. Para cada fração, foram preparadas 4 placas com 25 sementes cada totalizando 100 sementes por fração testada e controle.

6.7. Avaliação da capacidade antioxidante

6.7.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH-2,2-difenil-1-picril-hidrazila

O DPPH é um radical livre estável de coloração violeta. O ensaio baseia-se na capacidade da substância teste em sequestrar os radicais DPPH ocorrendo a mudança de coloração de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010). Para isso preparou-se a solução de DPPH pesando-se 2,4 mg de DPPH diluído em 50 mL de etanol absoluto em balão volumétrico. As frações obtidas foram suspensas em água destilada a concentração de 0,5 mg/mL para as frações acetato de etila e fração final aquosa e 1 mg/mL para a fração diclorometano.

O teste foi realizado em microplaca adicionando-se a amostra, etanol e DPPH. Para a fração acetato de etila o volume testado foi de 4 a 16 μ L, para a fração aquosa final o volume testado foi de 5 a 35 μ L, ambas com concentração de 0,5 mg/mL, e para a fração de diclorometano o volume testado foi de 4 a 16 μ L com concentração de 1 mg/mL. Estas concentrações foram estabelecidas através de testes prévios até se obter uma faixa de volume de amostras onde houvesse aumento crescente da atividade antioxidante.

A absorvância das soluções foram medidas a 515 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo, utilizou-se 150 μ L de etanol e 150 μ L da solução de DPPH e como branco 300 μ L de etanol. Os testes foram realizados em triplicata e a análise dos resultados foram determinados através do IC₅₀ utilizando-se o programa Origin 8, com o qual construiu-se gráficos de % Atividade antioxidante x concentração em μ g/mL. Para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH, utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y por 50.

6.7.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe³⁺ em Fe²⁺ (KOKSAL et al., 2011)

As frações obtidas foram diluídas para as concentrações de 10 a 50 µg/mL em água destilada. Em seguida, em tubos de ensaio, adicionou-se 750 µL de amostra, 1 mL de solução tampão fosfato e 1 mL de hexacianoferrato de potássio 1%. As misturas foram incubadas a 50 °C por 20 minutos, depois adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 250 µL de cloreto férrico 0,1%, por fim observou-se as soluções em espectrofotômetro a 700 nm. Quanto maior a absorvância, maior é o poder de redução.

6.7.3 Determinação da capacidade antioxidante com peróxido de hidrogênio

Em microplaca, adicionaram-se 150 µL de solução tampão as frações testadas, 10 µL de PMS e 25 µL de NBT, em seguida, a solução foi incubada por 2 minutos. Após incubação, adicionaram-se 15 µL de solução de NADH e incubou-se a solução por 5 minutos. Por fim, completou-se o volume para 300 µL com água destilada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro 535nm.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Caracterização fitoquímica

7.1.1 Flavonoides

As reações de cianidina, reação de Pew, reação com cloreto férrico e a reação com cloreto de alumínio apresentaram resultados positivos para a presença de flavonoides. Somente a reação oxalato-bórica apresentou-se negativa. Para confirmar a presença de flavonoides, realizou-se cromatografia em camada delgada em placa de sílica gel como fase estacionária e etil acetato fórmico, ácido glacial, ácido acético e água (100:11:11:27), conforme descrito por WAGNER e colaboradores (1989), constatando a presença de flavonoides. A placa foi revelada e observada sob luz UV.

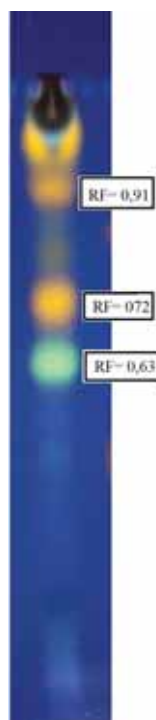


Figura 7: Placa cromatográfica preparada para a detecção de flavonoides.

Foram calculados os valores de Rf das três primeiras manchas, sendo o primeiro Rf de 0,63, o segundo Rf de 0,72 e o terceiro Rf de 0,91, conforme demonstrado na Figura 6.

7.1.2 Taninos

Tanto o teste de reação com gelatina quanto o teste de reação com acetato de chumbo, apresentaram resultados negativos para a presença de taninos. Somente o teste com sais de ferro apresentou resultado positivo, porém a presença de flavonoides ou antocianidinas pode resultar em falso positivo. Portanto, conclui-se que as folhas de *Coleus blumei* não apresentam taninos em sua composição, já que os testes para flavonoides e antocianidinas apresentaram-se positivos.

7.1.3 Antraquinonas

O teste de antraquinonas livres apresentou coloração avermelhada rósea, enquanto que o teste de glicosídeos antraquinônicos não apresentou coloração rósea; portanto conclui-se que as folhas de *Coleus blumei* apresentam antraquinonas livres, mas não possui glicosídeos antraquinônicos.

7.1.4 Alcaloides

No teste de identificação de alcaloides não houve a formação de precipitados, o que indica a ausência de alcaloides.

7.1.5 Saponinas

Teste de formação de espuma:

Houve formação de espuma persistente após 15 minutos da realização do teste indicando a presença de saponinas nas folhas de *C. blumei*. Em seguida, realizou-se o teste do índice de espuma. Como a altura de espuma formada em todos os tubos foi inferior a 1 cm, conclui-se que o índice de espuma formado é menor que 100.

7.1.6 Glicosídeos cardiotônicos

As reações de Pesez, Legal e Keller-Killiani não apresentaram resultado positivo para a presença de glicosídeos cardiotônicos.

A Tabela 1 mostra os resultados gerais obtidos das análises fitoquímicas realizadas nas folhas de *Coleus blumei*.

Tabela 1: Análises fitoquímicas em folhas de *Coleus blumei*

Classes Metabólicas	Resultados
Saponinas	+
Antraquinonas Livres	+
Glicosídeos Antraquinônicos	-
Taninos	-
Flavonoides	+
Antocianidinas	+
Alcaloides	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-

7.2. Ensaio Biológicos

7.2.1 Ensaio microbiológico por difusão em ágar (Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010)

As Tabelas 2 a 5 apresentam os diâmetros dos halos de inibição medidos com paquímetro digital dos resultados obtidos no teste de difusão em ágar.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e suas frações acetato de etila, diclorometano e fração final aquosa frente ao micro-organismo *S. aureus*, pelo método de difusão em ágar

Halos de inibição (mm) - <i>S. aureus</i>						
	C+					
Concentrações (µg/mL)	50	10000	5000	2500	1250	625
Extrato bruto – 1*	27,62	15,68	11,99	0	0	0
Extrato bruto - 2	27,19	14,26	11,70	0	0	0
Extrato bruto - 3	26,31	13,55	11,44	0	0	0
Fração diclorometano – 1*	28,42	20,25	17,79	14,52	12,40	0
Fração diclorometano - 2	26,05	17,76	15,76	12,59	10,54	0
Fração diclorometano - 3	27,48	19,35	17,47	14,29	13,12	0
Fração acetato de etila – 1*	27,15	13,76	10,34	0	0	0
Fração acetato de etila - 2	25,31	14,40	11,19	0	0	0
Fração acetato de etila - 3	27,44	17,36	13,22	0	0	0
Fração aquosa final – 1*	28,63	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 2	29,97	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 3	29,09	0	0	0	0	0

C+ = ciprofloxacino 50 µg/mL

*Replicata

Tabela 3: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e suas frações acetato de etila, diclorometano e fração final frente ao micro-organismo *S. epidermidis*, pelo método de difusão em ágar

Halos de inibição (mm) - <i>S. epidermidis</i>						
	C+					
Concentrações (µg/mL)	50	10000	5000	2500	1250	625
Extrato bruto – 1*	24,86	10,90	0	0	0	0
Extrato bruto - 2	24,11	11,40	0	0	0	0
Extrato bruto - 3	25,40	11,52	0	0	0	0
Fração diclorometano – 1*	23,63	15,12	13,33	11,66	0	0
Fração diclorometano - 2	22,03	13,86	11,95	0	0	0
Fração diclorometano - 3	23,01	13,37	10,81	0	0	0
Fração acetato de etila – 1*	24,00	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 2	23,28	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 3	24,79	0	0	0	0	0
Fração aquosa final – 1*	30,56	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 2	30,80	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 3	29,45	0	0	0	0	0

C+ = ciprofloxacino 50 µg/mL

*Replicata

Tabela 4: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e suas frações acetato de etila, diclorometano e fração final frente ao micro-organismo *E. coli*, pelo método de difusão em ágar

Halos de inibição (mm) - <i>E. coli</i>						
	C+					
Concentrações (µg/mL)	50	10000	5000	2500	1250	625
Extrato bruto – 1*	30,02	0	0	0	0	0
Extrato bruto - 2	28,98	0	0	0	0	0
Extrato bruto - 3	29,72	0	0	0	0	0
Fração diclorometano – 1*	31,15	14,46	13,90	12,84	10,82	9,78
Fração diclorometano - 2	32,11	19,64	17,10	16,26	13,79	12,17
Fração diclorometano - 3	29,61	13,65	13,11	11,25	0	0
Fração acetato de etila – 1*	31,73	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 2	28,88	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 3	29,43	0	0	0	0	0
Fração aquosa final – 1*	30,05	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 2	31,50	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 3	29,34	0	0	0	0	0

C+ = ciprofloxacino 50 µg/mL

*Replicata

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e suas frações acetato de etila, diclorometano e fração final frente ao micro-organismo *B. subtilis*, pelo método de difusão em ágar

Halos de inibição (mm) - <i>B. subtilis</i>						
	C+					
Concentrações (µg/mL)	50	10000	5000	2500	1250	625
Extrato bruto – 1*	33,51	0	0	0	0	0
Extrato bruto - 2	32,88	0	0	0	0	0
Extrato bruto - 3	30,98	0	0	0	0	0
Fração diclorometano – 1*	34,15	18,53	17,20	14,92	13,25	11,89
Fração diclorometano - 2	31,27	14,91	13,15	12,07	11,00	10,30
Fração diclorometano - 3	34,15	18,96	17,40	15,28	13,38	10,55
Fração acetato de etila – 1*	29,70	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 2	30,68	0	0	0	0	0
Fração acetato de etila - 3	28,56	0	0	0	0	0
Fração aquosa final – 1*	31,55	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 2	31,29	0	0	0	0	0
Fração aquosa final - 3	29,98	0	0	0	0	0

C+ = ciprofloxacino 50 µg/mL

*Replicata

As Figuras 7 a 22 demonstram os testes de difusão em ágar com o extrato etanólico e suas frações frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *S. epidermidis*.

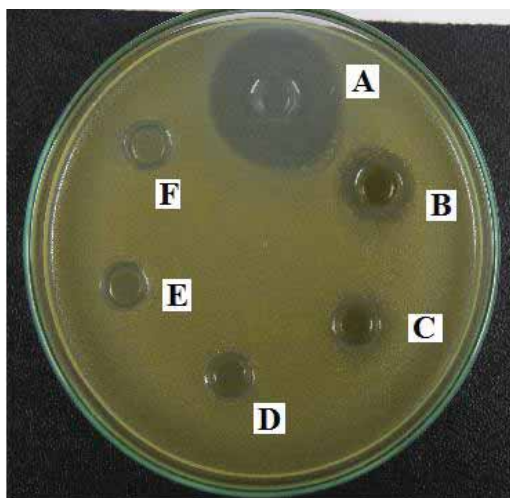


Figura 8: Teste de Difusão em Ágar com *S. aureus*, com extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

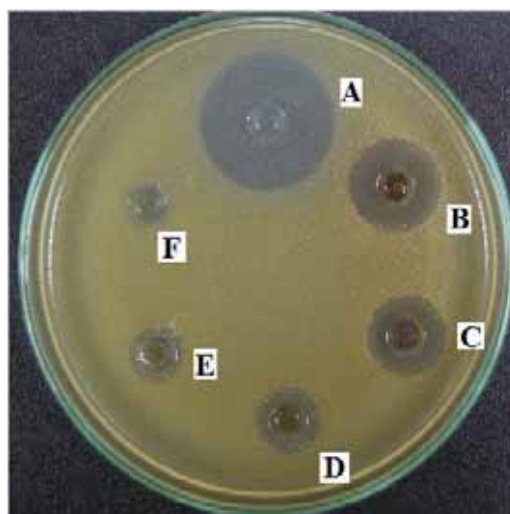


Figura 9: Teste de Difusão em Ágar com *S. aureus*, com a fração diclorometano do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

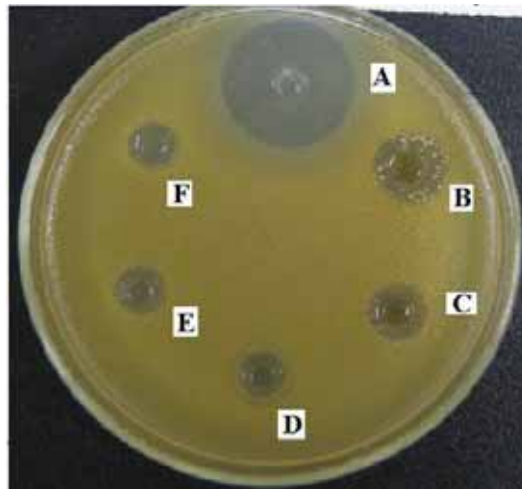


Figura 10: Teste de Difusão em Ágar com *S. aureus*, com a fração acetato de etila do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

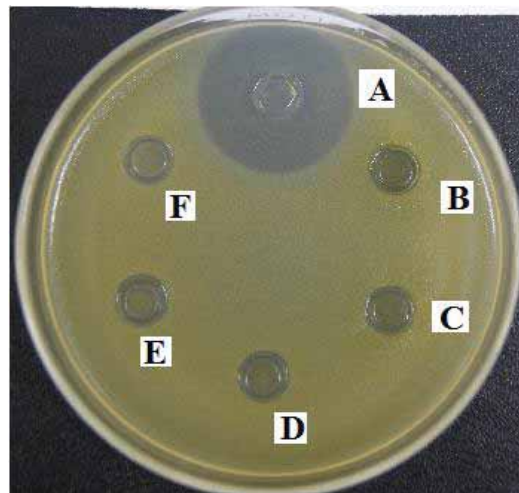


Figura 11: Teste de Difusão em Ágar com *S. aureus*, com a fração aquosa final do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

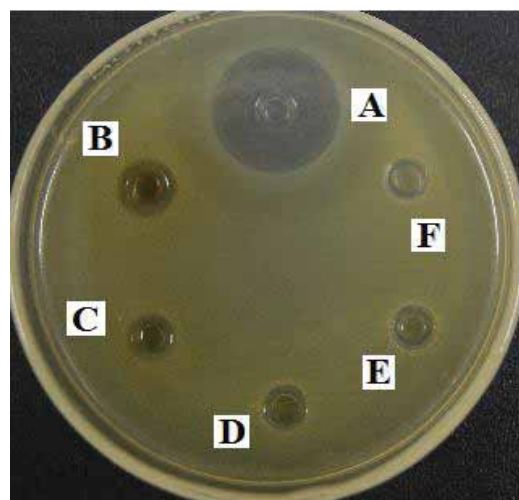


Figura 12: Teste de Difusão em Ágar com *S. epidermidis*, com extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

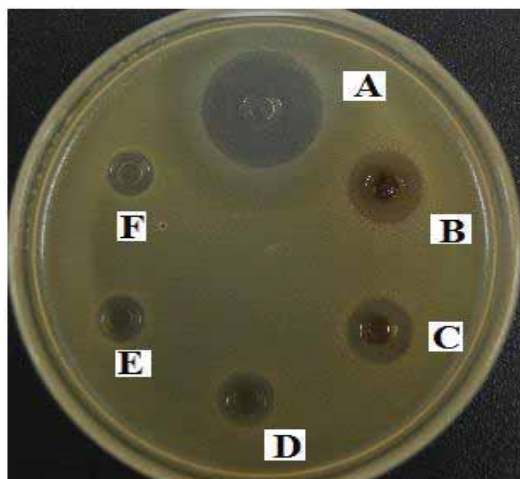


Figura 13: Teste de Difusão em Ágar com *S. epidermidis*, com a fração diclorometano do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

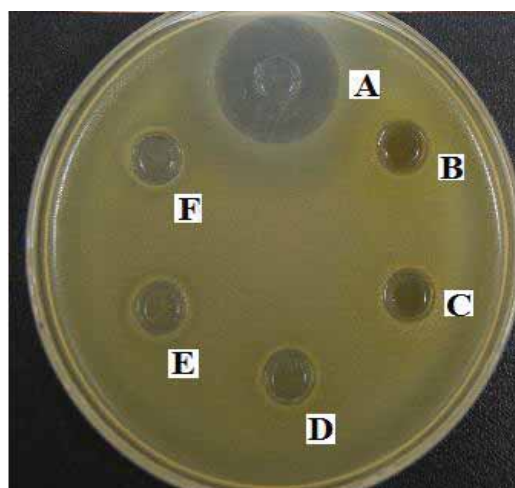


Figura 14: Teste de Difusão em Ágar com *S. epidermidis*, com a fração acetato de etila do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

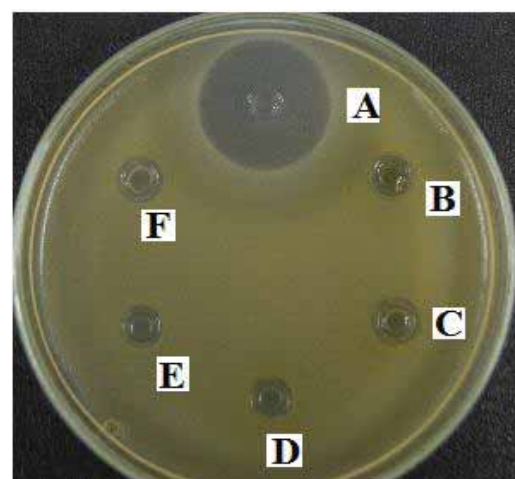


Figura 15: Teste de Difusão em Ágar com *S. epidermidis*, com a fração aquosa final do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

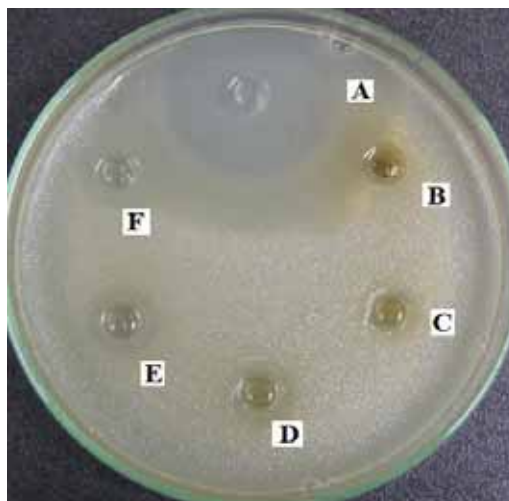


Figura 16: Teste de Difusão em Ágar com *E. coli*, com extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

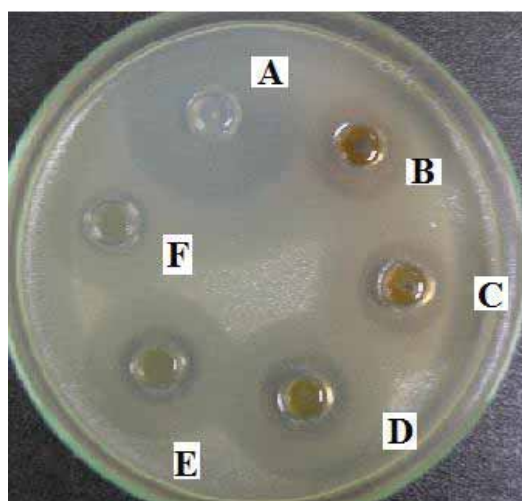


Figura 17: Teste de Difusão em Ágar com *E. coli*, com a fração diclorometano do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

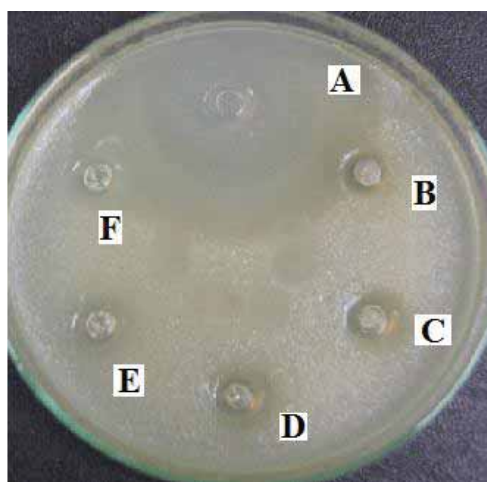


Figura 18: Teste de Difusão em Ágar com *E. coli*, com a fração acetato de etila do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

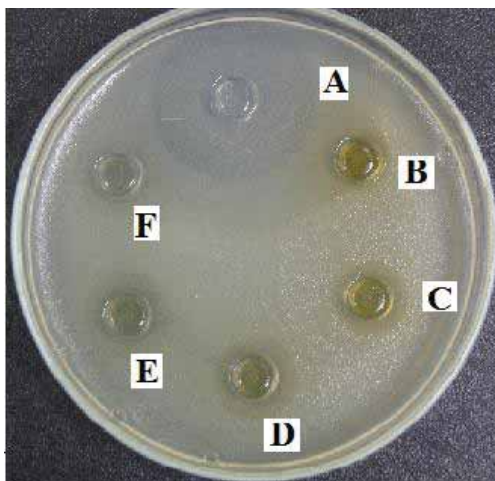


Figura 19: Teste de Difusão em Ágar com *E. coli*, com a fração aquosa final do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

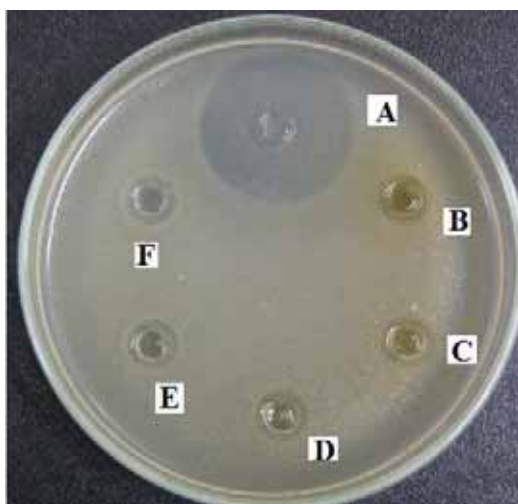


Figura 20: Teste de Difusão em Ágar com *B. subtilis*, com extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

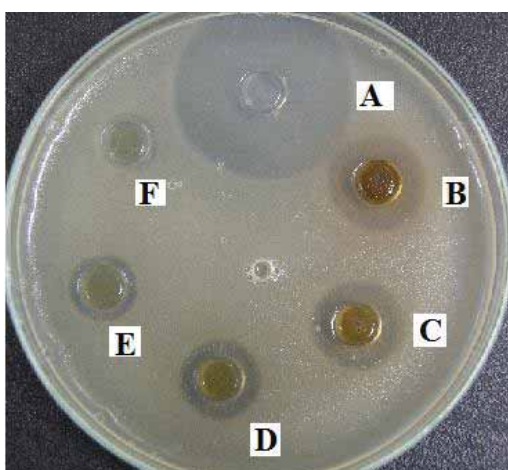


Figura 21: Teste de Difusão em Ágar com *B. subtilis*, com a fração diclorometano do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

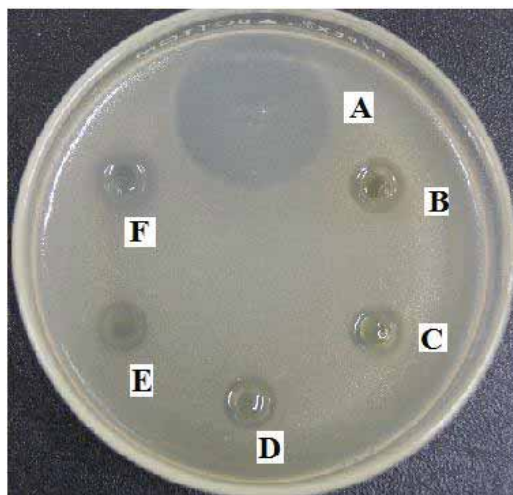


Figura 22: Teste de Difusão em Ágar com *B. subtilis*, com a fração acetato de etila do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

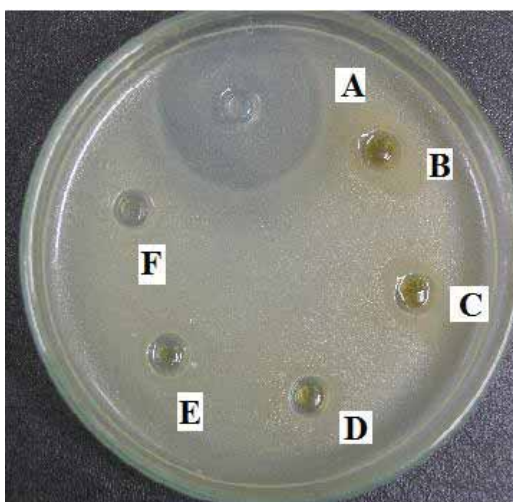


Figura 23: Teste de Difusão em Ágar com *B. subtilis*, com a fração aquosa final do extrato etanólico 70% dissolvidos em água destilada estéril em concentração de 10 mg/mL (B), 5 mg/mL (C), 2,5 mg/mL (D), 1,25 mg/mL (E) e 0,625 mg/mL (F). Controle positivo ciprofloxacino 50 µg/mL (A).

7.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM (norma NCCLS)

Foram realizados testes de microdiluição para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) do extrato etanólico e das frações obtidas do extrato etanólico, frente às cepas de *E. coli* ATCC 10536 IAL 2393, *S. aureus* ATCC 6538 IAL 1851, *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

As concentrações variaram de 10 mg/mL a 20 µg/mL. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima do extrato etanólico 70% e suas frações acetato de etila, diclorometano e fração aquosa final frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. subtilis* em µg/mL.

Extrato	Micro-organismos			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>
Extrato etanólico	10000	5000	2500	5000
Fração acetato de etila	2500	5000	2500	10000
Fração diclorometano	156,2	156,2	625	312,5
Fração aquosa final	>10000	>10000	>10000	>10000

As Figuras 23 a 30 demonstram os testes de Concentração Inibitória Mínima com o extrato etanólico e suas frações frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *S. epidermidis*.

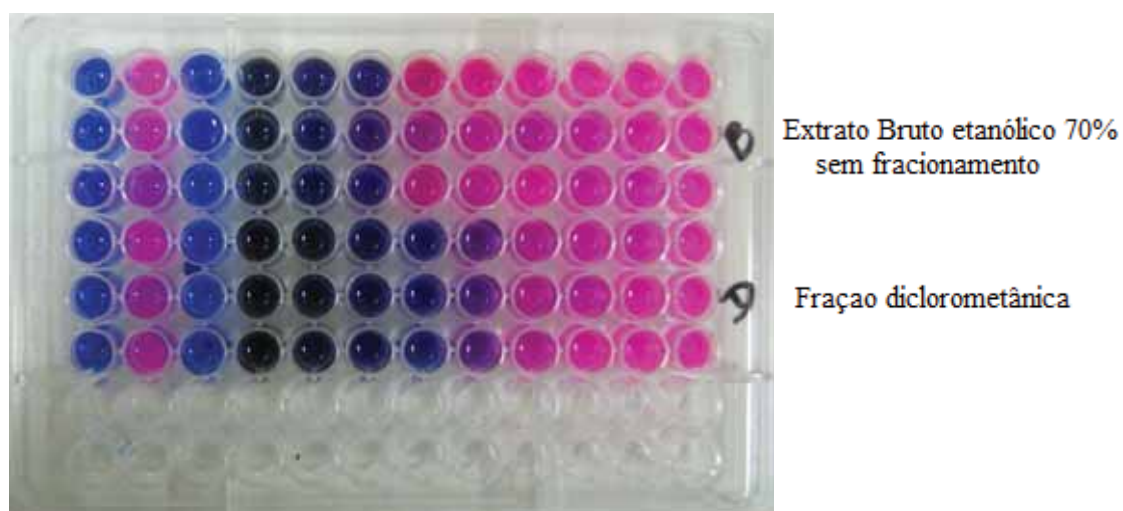


Figura 24: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *S. epidermidis* com os extratos etanólico 70% e a fração diclorometano do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

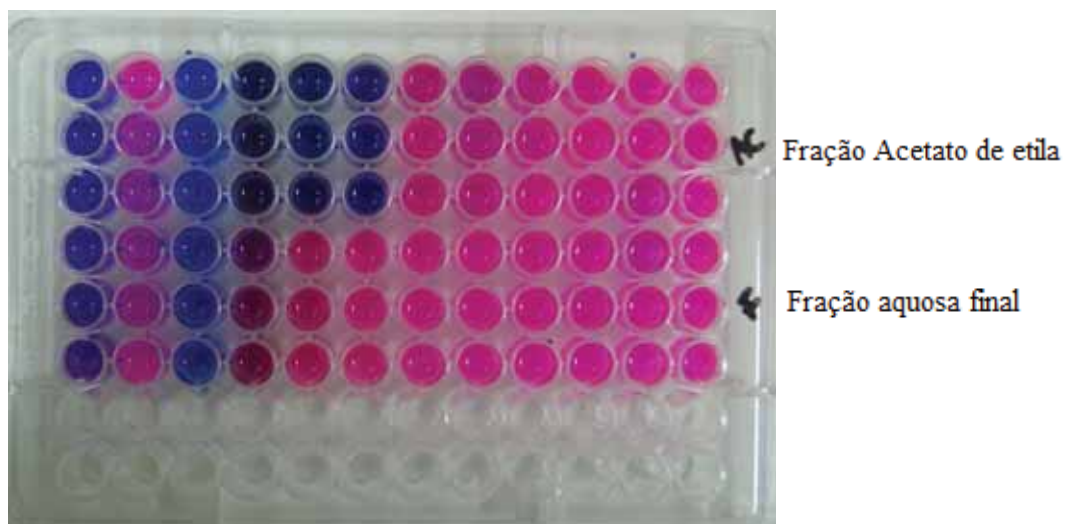


Figura 25: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *S. epidermidis* com as frações acetato de etila e fração aquosa final do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

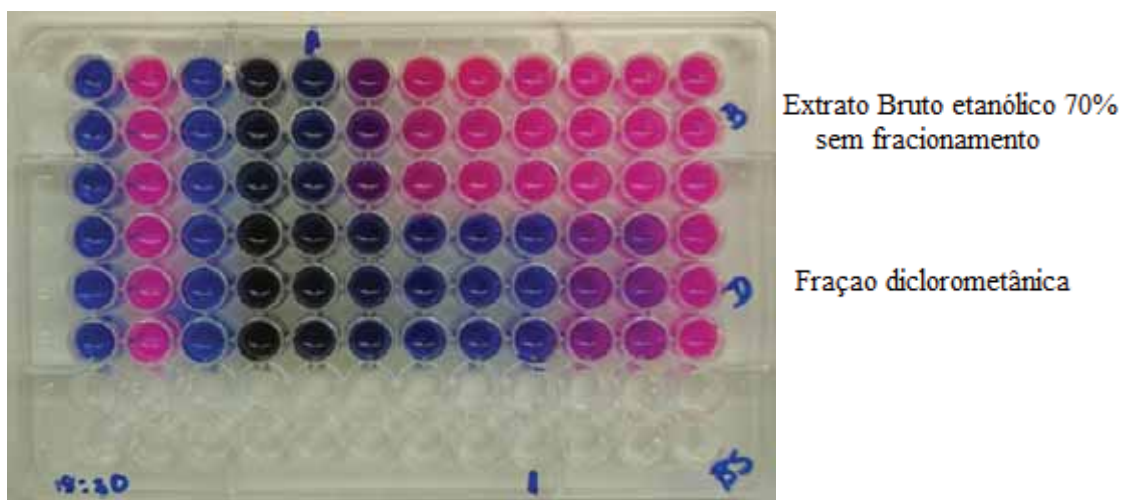


Figura 26: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *B. subtilis* com os extratos etanólico 70% e a fração diclorometano do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

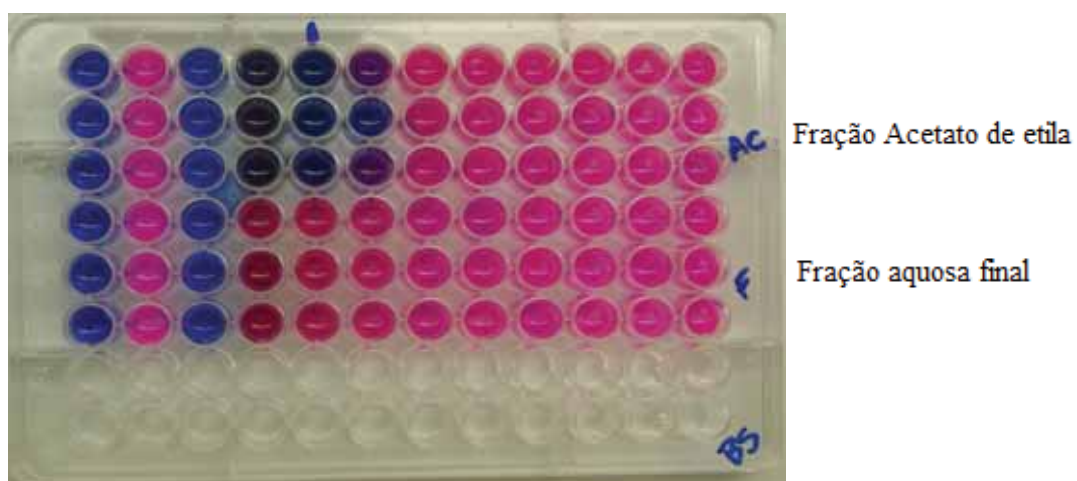


Figura 27: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *B. subtilis* com as frações acetato de etila e fração aquosa final do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

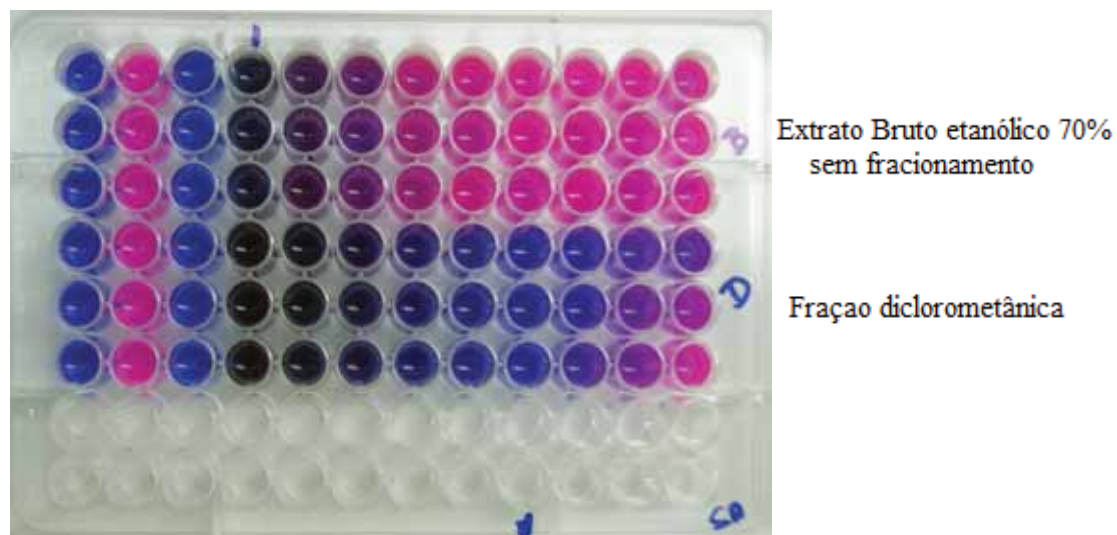


Figura 28: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *S. aureus* com os extratos etanólico 70% e a fração diclorometano do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

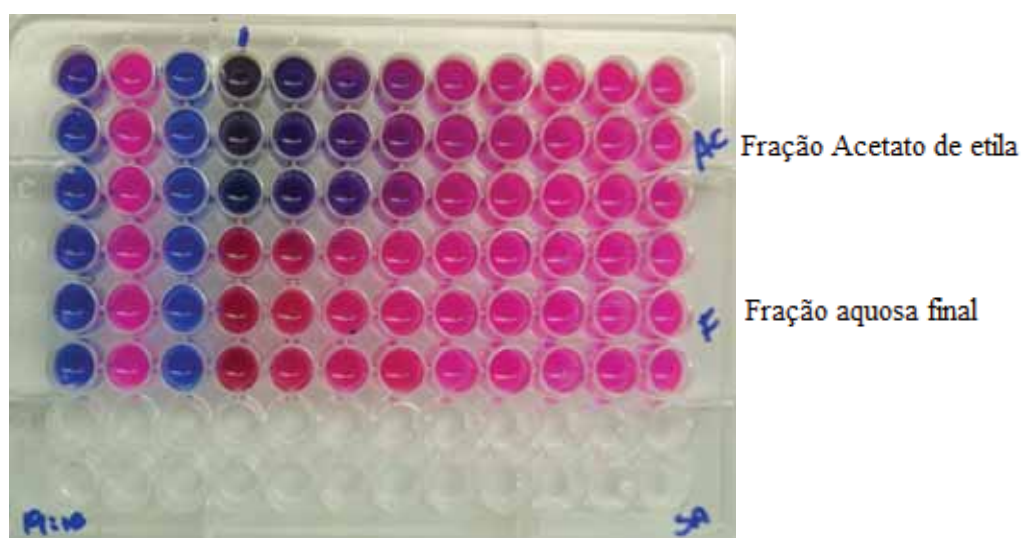


Figura 29: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *S. aureus* com as frações acetato de etila e fração aquosa final do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

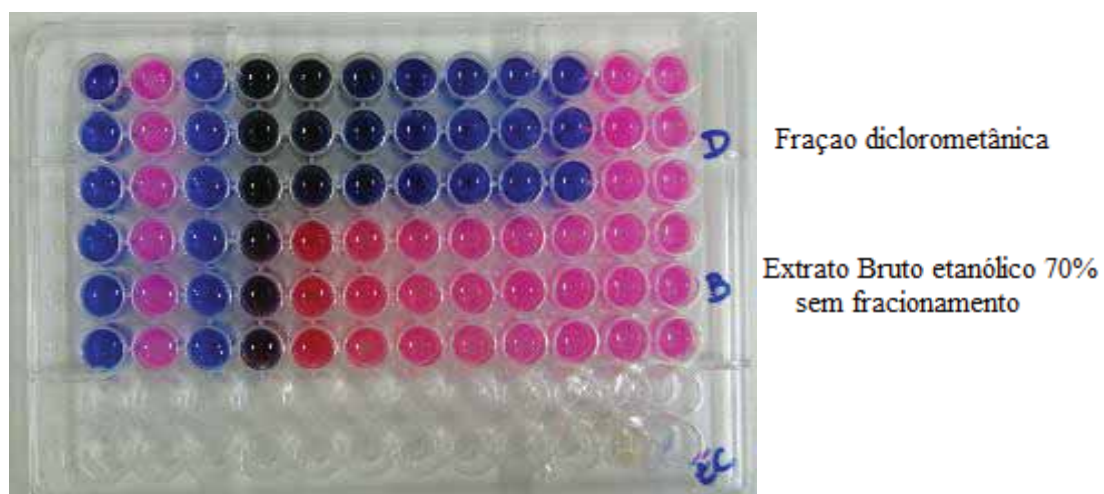


Figura 30: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *E. coli* com os extratos etanólico 70% e a fração diclorometano do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

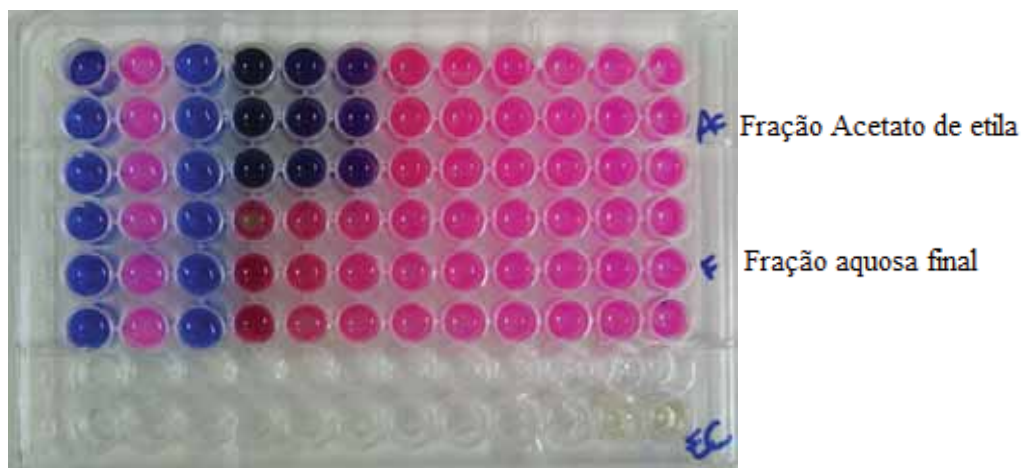


Figura 31: Teste de Concentração Inibitória Mínima com *E. coli* com as frações acetato de etila e fração aquosa final do extrato etanólico 70%, realizado em triplicata.

7.3. Avaliação da atividade alopática

7.3.1 Testes de germinação

As Figuras 31 a 34 mostram os resultados do teste de germinação realizado com sementes de tomateiro com água destilada, que foi utilizada como controle, com as frações acetato de etila, fração diclorometano e fração aquosa final do extrato etanólico 70%, suspensas em água destilada em concentrações de 1 mg/mL.



SFigura 32: Teste de Germinação de Sementes de Tomateiro com água destilada de Controle.



Figura 33: Teste de Germinação de Sementes de Tomateiro com a fração aquosa final do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *Coleus blumei* a 1 mg/mL.



Figura 34: Teste de Germinação de Sementes de Tomateiro com a fração acetato de etila do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *Coleus blumei* a 1 mg/mL.

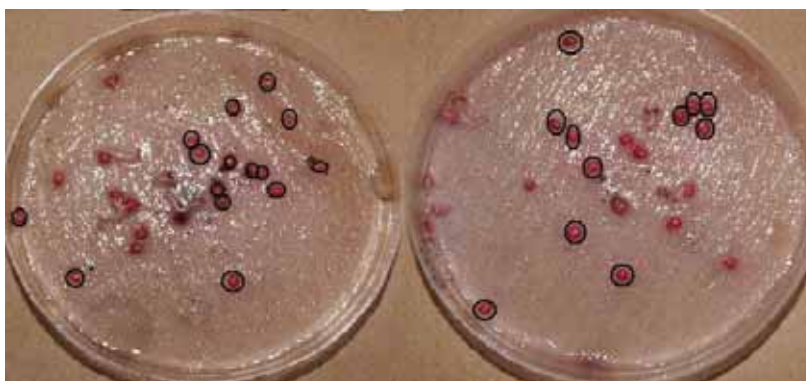


Figura 35: Teste de Germinação de Sementes de Tomateiro com a fração diclorometano do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *Coleus blumei* a 1 mg/mL.

A solução da fração diclorometano apresentou maior porcentagem de inibição de germinação, seguida da fração acetato de etila e fração aquosa final, conforme expresso em porcentagem na Tabela 7.

Tabela 7: Média e porcentagem de sementes de tomateiro que germinaram

Fração extrativa	Média de sementes que germinaram	Porcentagem de sementes que germinaram
Controle (água)	90	100
Fração diclorometano	48	53,34
Fração acetato de etila	76	84,45
Fração aquosa final	84	93,33

A inibição da germinação das sementes de tomateiro é indicativa de atividade alelopática, pois compostos alelopáticos pode interferir na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas na planta (RODRIGUES, 1999).

7.3.2 Teste de crescimento de plantas de tomateiro

As Figuras 35 a 38 demonstram os testes de crescimento realizado com sementes de tomateiro com água destilada, que foi utilizada como controle, com as frações acetato de etila, fração diclorometano e fração aquosa final do extrato etanólico 70% de folhas de *C. blumei*.



Figura 36: Teste de crescimento de sementes de tomateiro com água destilada como controle.



Figura 37: Teste de crescimento de sementes de tomateiro com a fração aquosa final do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *C. blumei* a 2 mg/mL.

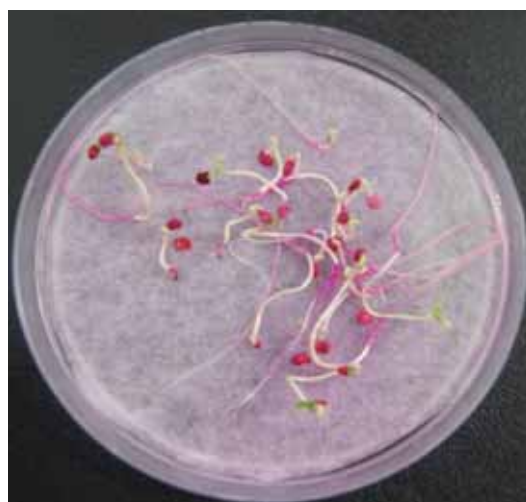


Figura 38: Teste de crescimento de sementes de tomateiro com a fração acetato de etila do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *C. blumei* a 2 mg/mL.



Figura 39: Teste de crescimento de sementes de tomateiro com a fração diclorometano do fracionamento do extrato etanólico 70% de folhas de *C. blumei* a 2 mg/mL.

Neste teste foi possível observar a inibição de crescimento após germinação das sementes de tomateiro. A fração diclorometano foi a que apresentou maior inibição de crescimento seguida pela fração acetato de etila.

7.4. Avaliação da capacidade antioxidante

7.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH-2,2-difenil-1-picril-hidrazila

A melhor atividade antioxidante obtida, comparada com o padrão ácido gálico, foi a fração acetato de etila, seguida pela fração final e fração diclorometano que apresentou menor atividade antioxidante para este teste. A Figura 39 demonstra de forma comparativa a concentração de amostra necessária para se obter IC_{50} , ou seja, a concentração necessária de amostra que inibe 50% dos radicais de DPPH. A fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante com IC_{50} de 0,0145, seguida pela fração final com IC_{50} de 0,027 e pela fração diclorometano com IC_{50} de 0,031.

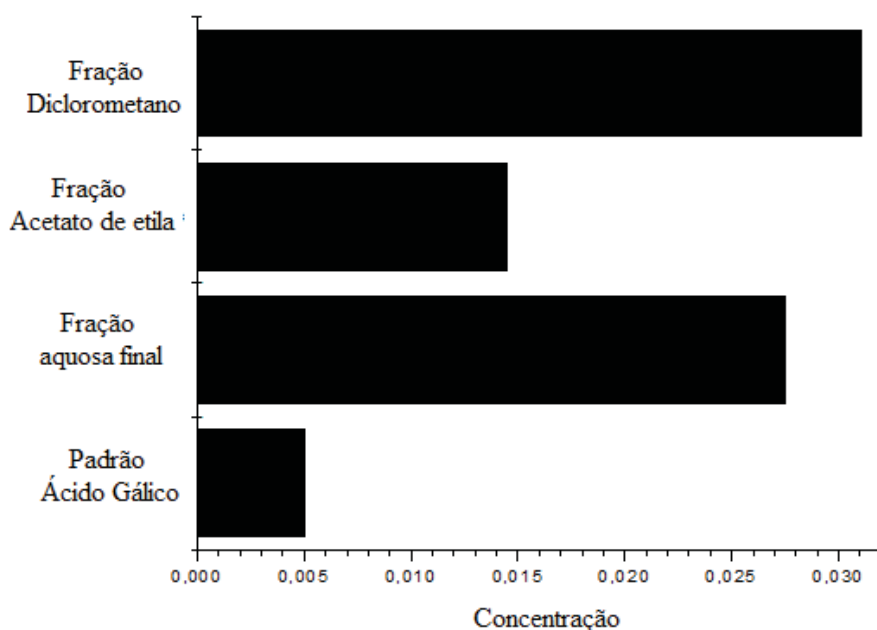


Figura 40: Gráfico comparativo da atividade antioxidante do padrão ácido gálico, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração final medido através do sequestro do radical DPPH.

7.4.2 Capacidade total de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+}

O teste foi feito segundo KOKSAL e colaboradores (2011). A presença de compostos antioxidantes na amostra reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} ; a adição de FeCl_3 à forma ferrosa (Fe^{2+}) irá ocasionar a formação de coloração esverdeada de forma que quanto mais forte for esta coloração maior sua capacidade antioxidante. Ao ler em espectrofotômetro quanto maior for a absorvância, maior o poder redutor da amostra frente ao ferro.

Conforme mostrado na Figura 40, o aumento da concentração das amostras e do padrão ácido gálico evidenciou o aumento do poder redutor frente ao ferro.

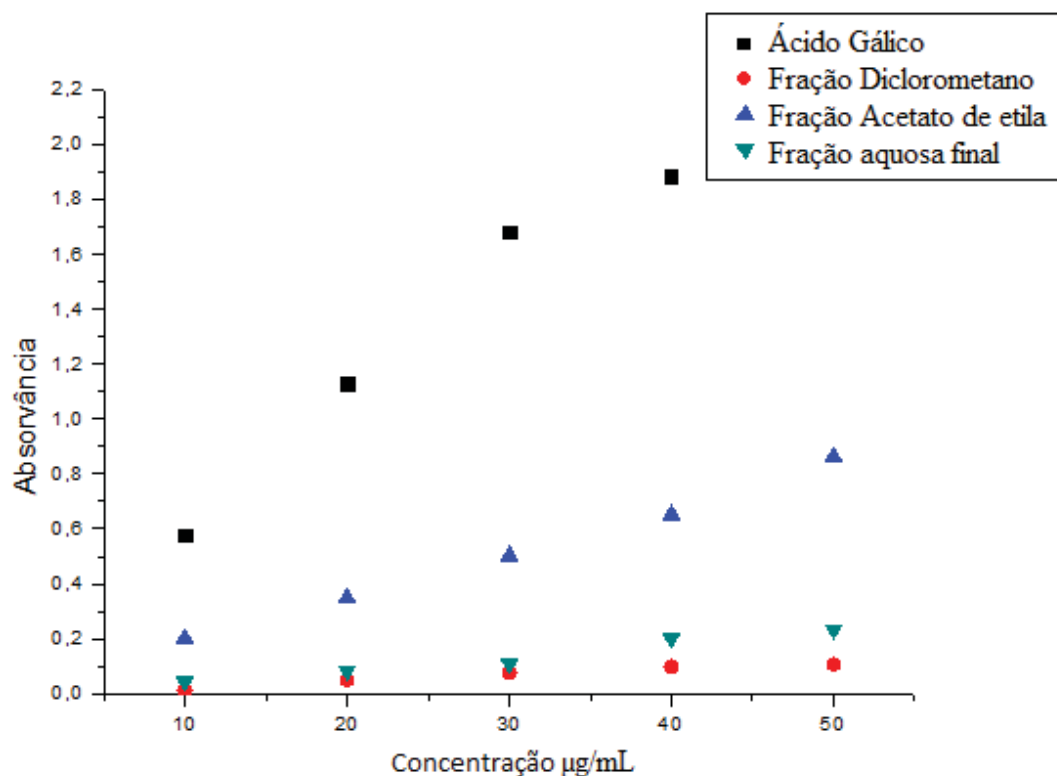


Figura 41: Avaliação da capacidade antioxidante pelo aumento da redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} das folhas de *Coleus blumei* Benth.

A fração acetato de etila foi a que apresentou maior poder de redução seguida pela fração final e pela fração diclorometano.

7.4.3 Determinação da capacidade antioxidante com peróxido de hidrogênio

No teste de determinação da capacidade antioxidante com peróxido de hidrogênio, a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante, seguida pelo padrão ácido gálico e pela fração aquosa final conforme demonstrado pela Figura 41.

A fração acetato de etila apresentou IC_{50} de 0,0168, o padrão ácido gálico de 0,0186 e a fração aquosa final de 0,671.

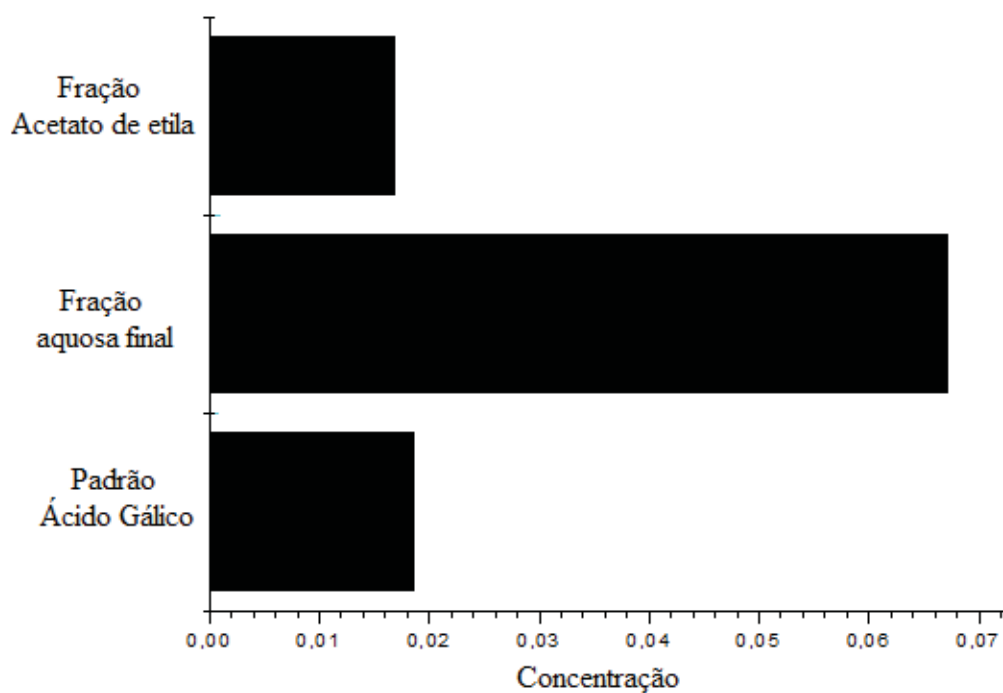


Figura 42: Gráfico comparativo da atividade antioxidante do padrão ácido gálico, fração acetato de etila e fração aquosa final com peróxido.

8 CONCLUSÕES

- Os testes fitoquímicos realizados com folhas de *Coleus blumei* identificaram a presença de saponinas, antraquinonas livres, flavonoides e antocianidinas.
- Na avaliação antibacteriana a fração diclorometânica apresentou atividade frente a todos os micro-organismos testados no teste de difusão em Ágar e de microdiluição. Para o extrato etanólico 70% sem fracionamento, nos testes de difusão em ágar houve inibição frente aos micro-organismos *S. aureus* e *S. epidermidis*, já no teste de microdiluição, observou-se inibição frente a todas as bactérias testadas. Nos testes realizados com a fração acetato de etila, houve inibição de multiplicação bacteriana de *S. aureus* no teste de difusão em ágar; no teste de microdiluição houve inibição frente a todos os micro-organismos testados. A fração aquosa final não apresentou atividade frente a nenhum micro-organismo testado.
- Na avaliação da atividade alelopática a fração diclorometano apresentou maior atividade de inibição de germinação, seguida da fração acetato de etila e da fração aquosa final. No teste de crescimento de plantas de tomateiro a fração diclorometânica foi a que apresentou maior inibição de crescimento, seguida pelas frações acetato de etila e fração aquosa final.
- Nos testes de atividade antioxidante foi possível evidenciar que as frações obtidas das folhas de *Coleus blumei*, apresentam atividade antioxidante e que sua capacidade antioxidante irá depender do radical. No teste com DPPH a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante seguida pela fração aquosa final e pela fração diclorometano. No teste de determinação da capacidade antioxidante com ânions peróxidos, foi possível observar atividade antioxidante somente nas frações acetato de etila e fração aquosa final. No teste de redução de

Fe^{3+} em Fe^{2+} , a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante, seguida pelas frações aquosa final e diclorometânica.

Portanto com o presente projeto foi possível observar que o extrato etanólico 70% e suas frações apresentam atividade antibacteriana, alopática e antioxidante, sendo a fração mais apolar a detentora de maior atividade antibacteriana e alopática e a fração polar com moderada atividade antioxidante. Desta forma torna-se interessante seu estudo como auxílio para futuras pesquisas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202 – 2210, 2010.
- BAUER, A. W.; KIRBY, E.; SHERRIS, E. M., TURK, M. Antibiotic by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493 - 496, 1966.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1982, v.3.
- DE SOUZA, N. J. Industrial development of traditional drugs: the forskolin example a mini-review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p.167-175. 1993.
- DUBEY M. P.; SRIMAL, R. C.; NITYANAND, S.; DHAWAN, B. N.; Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p. 1-13, 1981.
- Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, ANVISA, 2010.
- GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. Cadernos de Saúde Pública, v. 11, n.3, p.495-500, 1995.
- HEPLER, P. K.; RICE R. M.; TERRANOVA W. A. Cytochemical localization of peroxidase activity in wound vessel members of *Coleus*. **Canadian Journal of Botany**, v.50, n.5, 1972.
- KOKSAL, E.; BURSAL, E.; DIKICI, E.; TOZOGLU, F.; GULCIN, I. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p. 217-222, 2011. <http://www.academicjournals.org/JMPR>. Acessado em 20/08/2011.
- MATOS, F. J. A. **As plantas das farmácias vivas**. Fortaleza: BNB, 1997.

NAMSA, N.D.; TAG, H.; MANDAL, M.; KALITA, P.; DAS, A.K. An ethnobotanical study of traditional anti-inflammatory plants used by the Lohit community of Arunachal Pradesh, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p.234–245, 2009.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 6. ed. **NCCLS documento M7-A6**, v.23, n.2, 2003.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, 8. ed. **NCCLS documento M2-A8**, v.23, n.1, 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Rezazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PELCZAR Jr., M.; REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw Hill do Brasil, 1997, v.1, p.566.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. **A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural**. 2002 – Disponível em: <http://www.ee.usp.br/reecusp/upload/html/666/body/v36n3a10.htm>. Acesso em 06/08/2011.

RAGASA, C.Y.; TEMPLORA, V.F.; RIDEOUT, J.A. Diastereomeric diterpenes from *Coleus blumei*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p. 927 - 929, 2001.

RODRIGUES, L. R. de A.; RODRIGUES, T. de J. D.; REIS, R. A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Guaíba: FCAVJUNESP/ FUNEP, Jaboticabal. 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

VELHO, F. F. **Seleção de novos tipos e propagação rápida em *Solenostemon scutellarioides*, Lamiaceae**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSK, E. M. **Plant Drug Analysis – A thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1989. p. 303.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ULBRICH, B. Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. **Naturwissenschaften**, v.64, n. 11, p.585-586, 1977.