

Isolamento de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo e β -sitosterol e avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante e tóxica sobre *Artemia salina* de *Casearia javitensis*

4-Hydroxyphenyl-6-caffeoyl- β -L-glycoside and β -sitosterol isolation and antibacterial, antioxidant activities and toxicity against *Artemia salina* by *Casearia javitensis*

DOI 10.5935/2446-4775.20160021

¹NUNEZ, Cecília Verônica*; ¹FACHIN-ESPINAR, M. Teresa; ¹SOUZA, Maria Carolina S.

¹INPA, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: cecilia@inpa.gov.br

Resumo

No Brasil, especialmente na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de plantas que ainda não foram estudadas química e biologicamente. Assim, o presente trabalho tem como objetivo realizar o fracionamento cromatográfico e a avaliação biológica dos extratos hexânicos e metanólicos dos galhos e das folhas de *Casearia javitensis*, bem como das fases obtidas dos extratos metanólicos. Os extratos e fases foram avaliados para determinar o seu potencial antibacteriano, antioxidante (DPPH e Fe³⁺/fenantrolina) e de toxicidade sobre *Artemia salina*. Quanto à atividade antibacteriana pelo método de difusão em poço, os extratos hexânicos dos galhos e das folhas apresentaram atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium glutamicum* e *Bacillus cereus* e os extratos metanólicos de folhas e galhos sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*. A fase acetato de etila, obtida do extrato metanólico das folhas, apresentou potencial antibacteriano sobre *Bacillus cereus* com uma concentração inibitória mínima de 250 μ g/mL e um alto potencial antioxidante, sendo isolado o 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo. O fracionamento do extrato hexânico das folhas permitiu o isolamento do β -sitosterol. Ambas as substâncias isoladas foram identificadas por meio da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C e de espectrometria de massas. Este é o primeiro relato da substância 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo no gênero *Casearia*.

Palavras-chave: Salicaceae. 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Fe³⁺/fenantrolina. Amazônia. Biodiversidade. *Casearia javitensis*

Abstract

In Brazil, especially in the Amazon region, there is a great biodiversity of plant species which have not been studied chemical and biologically yet. Therefore, the aim of the present study was to perform chemical and biological studies of *Casearia javitensis* extracts and phases. The extracts and phases were assayed to determine their antibacterial and antioxidant activities (DPPH and Fe^{3+} /phenanthroline) and toxicity against *Artemia salina*. The hexanic extract of branches and leaves showed activity against *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* bacteria. The methanolic extracts of leaves and branches were active against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens*. The ethyl acetate phase obtained from methanol extracts of the leaves showed a minimum inhibitory concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ to *Bacillus cereus* and a high antioxidant potential. Their fractionation yielded the substance 4-hydroxyphenyl-6-cafeoyl- β -L-glycoside. The fractionation of the hexane extract of leaves yielded the compound β -sitosterol. Both structures were identified by ^1H and ^{13}C -NMR analysis and mass spectrometry. This is the first report of the substance 4-hydroxyphenyl-6-cafeoyl- β -L-glycoside in *Casearia* genus.

Keywords: Salicaceae. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Fe^{3+} /phenanthroline. Amazônia. Biodiversity. *Casearia javitensis*.

Introdução

O gênero *Casearia* pertencente à família *Salicaceae*, está representado por mais de 180 espécies descritas na literatura, das quais 70 encontram-se distribuídas no continente americano e 37 estão presentes no Brasil (MARQUETE, 2007). Na medicina popular, as espécies do gênero *Casearia* são utilizadas para o tratamento de infecções e mordeduras de cobras (PRIETO et al., 2013; SILVA et al., 2008).

Quimicamente são conhecidas pelo fato de apresentarem na sua composição química, vários diterpenos, triterpenos e ácidos hexanóicos e caproicos (PRIETO et al., 2013; XIA et al., 2015), sesquiterpenos e monoterpenos, bem como outras classes de metabólitos secundários, incluindo glicosídeos fenólicos e flavonoides (RAYANIL, NIMNOUN e TUNTIWACHWUTTIKU, 2012). Wyrepkowski (2010) relatou a presença de β -sitosterol, indícios do triterpeno friedelina e o esteroide campesterol. Barbosa (2015) mostrou que os extratos aquosos de folhas e galhos de *Casearia javitensis* tem potencial inseticida sobre *Sitophilus zeamais*.

Neste contexto, a espécie *Casearia javitensis* foi escolhida para a realização do estudo fitoquímico, bem como a avaliação das atividades antioxidante, antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado em 16 de janeiro de 2013 na Reserva A. Ducke/INPA, localizado no Km 26 da rodovia AM-010, município de Manaus, AM. A exsiccata do material vegetal foi depositada sob o número

259224 e identificada por especialistas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Obtenção dos extratos vegetais

O material vegetal foi separado em folhas (261,00 g) e galhos (150,00 g), secos em estufa a 40°C e triturado em moinho de facas para o preparo dos extratos. O material seco e moído foi primeiramente extraído com hexano (2 L), usando ultrassom (UNIQUE, modelo USC-2800) por 20 min. Em seguida, o solvente foi filtrado e novamente extraído com hexano, sendo este procedimento repetido (totalizando 3 extrações). Após a extração com hexano, o material vegetal (torta) foi seco e extraído com metanol (MeOH, 2 L), também com auxílio de ultrassom por 20 min, filtrado e este procedimento repetido mais duas vezes. Os extratos filtrados foram concentrados utilizando evaporador rotativo (FISATOM, Modelo 802/Brasil), sob pressão reduzida, em temperatura <50°C, obtendo assim os extratos hexânico (2,63 g) e metanólico (15,24 g) das folhas e; hexânico (0,495 g) e metanólico (1,50 g) dos galhos.

Análises fitoquímicas

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel impregnado com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) (Alugram SIL G/UV₂₅₄). As amostras foram aplicadas em cromatoplaças e eluídas com sistemas como: hexano/diclorometano (DCM) 1:1, DCM, hexano/acetato de etila 7:3 e 1:1, DCM/acetona 8:2 e 1:1 e acetato de etila/metanol 7:3, de acordo com a polaridade das amostras. Para a revelação das substâncias presentes nas placas cromatográficas foram utilizados: luz ultravioleta (λ : 254 e 365 nm), iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio e anisaldeído sulfúrico. Os extratos metanólicos foram analisados usando como revelador também o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Os extratos que tiveram atividade significativa no teste qualitativo foram submetidos à partição líquido-líquido, obtendo-se as fases: hexânica, em DCM, em acetato de etila (AcOEt) e hidroalcoólica, que foram posteriormente avaliadas por separado.

Fracionamento e isolamento

O extrato hexânico das folhas (1,02 g) foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica aberta de vidro (Vidrolabor, Labor-Quim/Brasil) de 41 x 3 cm utilizando como fase estacionária 100 g de Florisil (Sigma-Aldrich, 100-200mesh) e eluída em gradiente de hexano/acetona (9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7,5:2,5; 7:3; 1:1), acetona e metanol o que rendeu 32 frações. Após análise por CCDC, as frações de 1 a 3 foram reunidas (0,047 g) e fracionadas em coluna de Florisil com os solventes hexano/DCM (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 3:7; 1:9), DCM, DCM/AcOEt (9:1; 7:3; 1:1), AcOEt, AcOEt/MeOH (9:1; 6:4) e MeOH, obtendo-se 79 frações. Destas as frações 32 a 43 foram reunidas (0,32 g) e fracionadas em coluna cromatográfica de vidro utilizando-se como fase estacionária alumina (Sigma, Grado: Super I, tipo: WN-6: Neutro) e sistema isocrático de hexano/AcOEt (1:1) como eluente, obtendo-se a fração 4 que continha a substância **1** (0,005 g).

O extrato metanólico das folhas (10,0 g) foi solubilizado inicialmente com uma mistura de MeOH/H₂O (80:20) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, DCM e AcOEt. A fase em AcOEt (0,30 g) foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20 (Sigma) utilizando-se sistema isocrático de MeOH como eluente, obtendo-se 23 frações. Após a análise por CCDC, as frações 10 a 12 foram reunidas (0,03g) e

fracionadas em coluna de Florisil com os solventes DCM/AcOEt (1:1; 3:7), AcOEt, AcOEt/acetona (9:1; 8:2; 7:3), acetona, obtendo-se 33 frações, sendo que a de número 18 (0,0015 g) continha a substância **2** em elevado grau de pureza.

As duas substâncias foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de 300 MHz, dissolvidas em CDCl_3 .

Avaliação da atividade antibacteriana

Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas de interesse clínico ou do agronegócio como: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Edwardsella tarda* (ATCC 15947), *Nocardia brasiliensis*, *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Salmonella enteritidis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). A avaliação dos extratos e das frações foi realizada pelo método de difusão em Ágar por meio de difusão em poço, de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002). Para isto, inicialmente os micro-organismos testes foram repicados em caldo Müeller-Hinton, sendo incubados durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação.

A turbidez da cultura foi ajustada em caldo a uma concentração de 0,5 da escala de McFarland, o que equivale a uma suspensão bacteriana, contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL.

Em placas de Petri esterilizadas, foram adicionados 20 mL de ágar Müeller Hinton e, após a solidificação, a superfície seca foi inoculada com as bactérias teste. Em seguida, confeccionou-se poços/orifícios de 6,0 mm, colocando-se neles 50 μL do extrato a uma concentração de 1 mg/mL, e como controle positivo foram adicionados 50 μL de oxitetraciclina a uma concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas em aerobiose a 30 ou 37°C por 18 h. Após esse período, foram observados os halos de inibição resultantes. Os diâmetros dos halos de inibição total (visualizados a olho nu) foram mensurados (mm), incluindo o diâmetro do poço usando uma régua.

A atividade antibacteriana também foi avaliada pelo método de micro diluição em caldo, seguindo orientações propostas por CLSI (2002). Os extratos e as frações foram primeiramente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, e em seguida realizadas diluições sucessivas até a obtenção das concentrações de 1000 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$.

Para a realização do ensaio, o inoculo foi previamente ajustado em espectrofotômetro, obtendo-se uma absorbância de 0,08 em 625 nm (o que equivale à escala 0,5 de McFarland), este então foi diluído 20 vezes. Assim, o volume final de bactéria aplicado em cada poço foi de aproximadamente 5×10^4 UFC.

Em seguida foram adicionados em cada um dos poços (microplaca de 96 poços) 5 μL desta solução de inoculo e 95 μL de cada concentração do extrato.

Para o controle negativo foram utilizados 95 μL de caldo Müeller Hinton contendo 5% de DMSO e 5 μL de inoculo. Para o controle positivo foram utilizados 95 μL do antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ e 5 μL de inoculo.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida, a placa foi incubada à temperatura e tempo adequados para cada micro-organismo (30 ou 37°C). Cada microplaca foi avaliada através da leitura espectrofotométrica em 625 nm. Os dados obtidos foram processados utilizando-se o programa estatístico Origin8.

Atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos e das frações foi avaliado pelas metodologias quantitativas de DPPH e Fe^{3+} /fenantrolina (MARTINS et al., 2014). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico (antioxidante padrão).

Curvas de calibração com ácido ascórbico

Inicialmente foram preparadas as soluções de: DPPH (28 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Fe^{3+} , 1,10-fenantrolina 0,25% e uma solução de ácido ascórbico com água deionizada em uma concentração de 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir da qual foram preparadas diluições, resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para obtenção da curva de calibração com DPPH, 990 μL deste reagente foram adicionados em seis microtubos e mais 10 μL da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Para a obtenção da curva de calibração de Fe^{3+} /fenantrolina foram adicionados em seis novos microtubos 10 μL da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, mais 10 μL da solução padrão de Fe^{3+} e 980 μL da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 508 nm.

Ensaio com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos e das frações foi realizada utilizando o método com DPPH, o qual é considerado um radical estável que permite avaliar a capacidade de substâncias como sequestradoras de radicais, tendo sua absorção máxima no comprimento de onda de 517 nm. Quando o DPPH recebe um elétron ou um radical hidrogênio torna-se um composto mais estável e sua absorção diminui. Para determinação da absorbância da reação entre o DPPH e os extratos foram utilizados 990 μL de DPPH (28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solubilizados em metanol) e 10 μL da solução de cada um dos extratos a uma concentração de 0,5 mg/mL, em triplicata. Como controle negativo, foram utilizados 990 μL de DPPH (28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solubilizados em metanol) e 10 μL de metanol. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Ensaio com Fe^{3+} /fenantrolina

O complexo vermelho-alaranjado produzido pela reação entre Fe^{2+} (produzido pela ação antioxidante do agente em estudo sobre a redução de Fe^{3+}) e 1,10-fenantrolina apresenta a sua absorbância máxima a 508 nm. Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos foram utilizados 980 μL da solução de 1,10-fenantrolina e adicionados 10 μL da solução de Fe^{3+} e 10 μL da solução dos extratos a uma concentração de 0,5 mg/mL. Sendo utilizado a 1,10-fenantrolina como controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia proposta por Meyer e colaboradores (1982). Foram utilizados para eclosão 10 mg de cistos de *Artemia salina*, os quais foram colocados numa solução salina (3,8%). As condições de crescimento utilizadas para a eclosão dos cistos foram de temperatura de 25 a 28°C e iluminação em lâmpada fluorescente durante 48 horas. Após o período de eclosão, as placas de 24 poços foram preenchidas com um total de 240 larvas, sendo estas distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Em cada placa, foram realizados os controles da solução salina, do solvente e o controle positivo (dicromato de potássio, 0,1%), todos em triplicata. Os extratos foram adicionados nos poços do teste, na concentração inicial de 500 μ g/mL. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avaliou-se o número de larvas sobreviventes.

Resultados e Discussão

Análise fitoquímica

Os extratos hexânicos das folhas e galhos, assim como o extrato metanólico das folhas, quando submetidos à análise por CCDC mostraram a possível presença de terpenos ao serem revelados com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, pois apresentaram uma coloração lilás característica desta classe química. Observou-se também a presença de substâncias fluorescentes sob a luz UV indicando a presença de substâncias aromáticas. Os extratos metanólicos das folhas e galhos, assim como as frações destas quando revelados com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes, o que foi confirmado com os resultados obtidos através da análise quantitativa da atividade antioxidante.

A partir do fracionamento sucessivo realizado do extrato hexânico e metanólico das folhas de *C. javitensis* foi possível a obtenção de duas substâncias identificadas como β -sitosterol (**1**) e um fenol-glicosídeo denominado 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo (**2**).

A substância **1** obtida na forma de cristais, revelando coloração lilás com anisaldeído e eluída em hexano/AcOEt (1:1) e fator de retenção (R_f) de 0,63, foi identificada através da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H o qual mostra sinais característicos desta substância, quando comparados com os dados na literatura (ARAGÃO et al., 1990), observando-se uma concentração de sinais com deslocamentos químicos (δ_{H}) entre 0,67 e 1,0 ppm correspondentes às metilas presentes neste composto, assim como vários sinais entre δ_{H} 1,1 e 2,3 ppm correspondentes aos hidrogênios metilênicos. Também foram observados um *dl* com deslocamento em δ_{H} 5,3 ppm ($J = 5,3$ Hz) e *m* em δ_{H} 3,5 ppm, sendo estes sinais correspondentes ao hidrogênio olefínico (H-5) e ao hidrogênio carbinólico (H-3), respectivamente. O β -sitosterol é um dos esteroides comumente encontrados em várias espécies de *Casearia* (WANG et al., 2009).

A substância **2** foi isolada como cristais, apresentando R_f de 0,50 quando eluída em AcOEt/acetona (8:2), revelada coloração azul escuro com FeCl_3 e foi identificada pela análise dos espectros de RMN de ^1H e gCOSY (*gradient-selected correlation spectroscopy*), e comparada com os dados da literatura (RAJU et al., 2010; LIU et al., 2013) os quais estão mostrados na (TABELA 1) e (FIGURA 1). O espectro de RMN de ^1H mostrou os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados em dois anéis benzênicos substituídos, um anel dissustituído na posição *para*, caracterizado pela presença de quatro hidrogênios com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,94 (2H, *dd*, $J = 6,7$; 2 Hz, H- 2, 6) e 6,64 (2H, *dd*, $J = 6,7$; 2 Hz, H-3, 5) e um segundo anel

aromático trissubstituído na posição *para* e *meta*, sendo observados três hidrogênios em δ_H 6,79 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-2''), 6,95 (1H, *dd*, $J = 8,2; 2$ Hz, H-3''), 7,06 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-5''). Também foram observados sinais da presença de uma dupla ligação *trans* em δ_H 7,57 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H-7'') e 6,30 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H-8''). Os demais sinais foram atribuídos ao açúcar presente com sinais em δ_H desde 3,52 até 5,07 ppm (hidrogênio anomérico). Os dados do espectro de massas de alta resolução tipo *Ion trap*, utilizando o modo positivo e negativo, determinou a massa molecular em 434 m/z , condizente com a fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_{10}$.

A substância 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo (**2**) está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Casearia*, porém esta molécula já foi isolada de *Vitex leucoxydon* (Lamiaceae) (RAJU et al., 2010). Esta substância é um fenil-glicosídeo, classe química característica de espécies pertencentes a família Salicaceae, o que corrobora a nova classificação botânica (MOSADDIK et al., 2006; LIU et al., 2013; BELYANIN, STEPANOVA e OGORODNIKOV, 2012).

FIGURA 1. Estrutura química da 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo (substância **2**) e correlações observadas no espectro bidimensional de RMN $^1H \times ^1H$ (gCOSY)

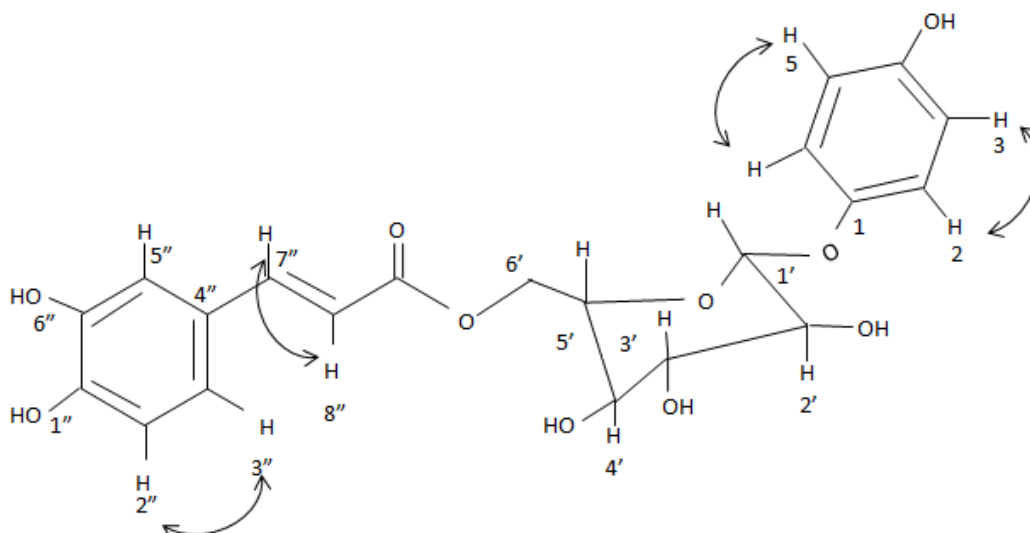


TABELA 1. Dados de RMN de 1H de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo, em CD_3OD e comparação com a literatura (RAJU et al., 2010)

Posição	1H multiplicidade (300 MHz para 1H)	1H multiplicidade (600 MHz para 1H)
1	-	-
2	6,94 (2H, <i>dd</i> , $J = 6,7; 2$ Hz)	6,94 (2H, <i>d</i> , $J = 9$ Hz)
3	6,64 (2H, <i>dd</i> , $J = 6,7; 2$ Hz)	6,65 (2H, <i>d</i> , $J = 9$ Hz)
4	-	-
5	6,64 (2H, <i>dd</i> , $J = 6,7; 2$ Hz)	6,65 (2H, <i>d</i> , $J = 9$ Hz)
6	6,94 (2H, <i>dd</i> , $J = 6,7; 2$ Hz)	6,94 (2H, <i>d</i> , $J = 9$ Hz)
1'	5,07 (1H, <i>d</i> , $J = 7,64$ Hz)	4,74 (1H, <i>d</i> , $J = 7,2$ Hz)
2'	4,10 (1H, <i>d</i> , $J = 7,64$ Hz)	3,41 – 3,51 (3H, <i>m</i>)
3'	3,52 – 3,61 (<i>m</i>)	3,41 – 3,51 (3H, <i>m</i>)

Partes da planta	Extratos e Fases	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
Galhos	Hexano	1,8 cm	2,2 cm	-	2,4 cm	-
Galhos	MeOH	-	-	1,2 cm	1,1 cm	-
Galhos	MeOH - Fase DCM	1,0 cm	1,3 cm	1,1 cm	1,5 cm	-
Galhos	MeOH - Fase AcOEt	1,8 cm	-	0,9 cm	1,1 cm	1,1 cm
Folhas	Hexano	1,6 cm	-	-	-	-
Folhas	MeOH	1,0 cm	-	1,1 cm	1,1 cm	1,2 cm
Folhas	MeOH - Fase DCM	1,0 cm	1,0 cm	0,9 cm	0,9 cm	-
Folhas	MeOH - Fase AcOEt	1,3 cm	1,1 cm	1,9 cm	1,6 cm	1,1 cm
Folhas	MeOH - Fase MeOH/H ₂ O	0,8 cm	1 cm	1,1 cm	1,1 cm	0,9 cm
Controle positivo*		2,7 cm	2,4 cm	1,1 cm	2,8 cm	1,1 cm

4'	3,52 – 3,61 (m)	3,41 – 3,51 (3H, m)
5'	3,52 – 3,61 (m)	3,65 (1H, m)
6'	4,50 (1H, d, J = 12 Hz) 4,32 (1H, dd, J = 12; 6,7 Hz)	4,52 (1H, dd, J = 12; 2,4 Hz) 4,35 (1H, dd, J = 12; 7,2 Hz)
1"	-	-
2"	6,79 (1H, d, J = 8,2 Hz)	6,78 (1H, d, J = 8,4 Hz)
3"	6,95 (1H, dd, J = 8,2; 2 Hz)	6,92 (1H, dd, J = 8,4; 1,8 Hz)
4"	-	-
5"	7,06 (1H, d, J = 2 Hz)	7,05 (1H, d, J = 1,8 Hz)
6"	-	-
7"	7,57 (1H, d, J = 16 Hz)	7,56 (1H, d, J = 15,6 Hz)
8"	6,30 (1H, d, J = 16 Hz)	6,27 (1H, d, J = 15,6 Hz)
9"	-	-

Avaliação da atividade antibacteriana

Estão mostrados (**TABELA 2**) os resultados dos halos de inibição obtidos para os extratos e as fases de *C. javitensis* avaliados. Os diâmetros dos halos de inibição foram comparados com a escala de atividade antimicrobiana adotada no laboratório (**TABELA 3**), baseada em Alves (2008). Os extratos hexânicos dos galhos apresentaram halos de inibição de 2,2 cm frente a *C. glutamicum* e de 2,4 cm frente à *S. aureus*, sendo considerados muito ativos. Os extratos hexânicos das folhas e galhos foram ativos frente à bactéria *B. cereus* com halos de inibição de 1,6 e 1,8 cm, respectivamente. Para os extratos metanólicos dos galhos e das folhas, os halos de inibição frente às bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram de 1,1 cm para ambos os extratos, e o extrato metanólico das folhas apresentou atividade antibacteriana frente à *S. marcescens* com halo de inibição de 1,2 cm, sendo, portanto, considerados com atividade moderada.

TABELA 2. Halos de inibição obtidos para os extratos e as fases de *C. javitensis*, pelo método de difusão em poço.

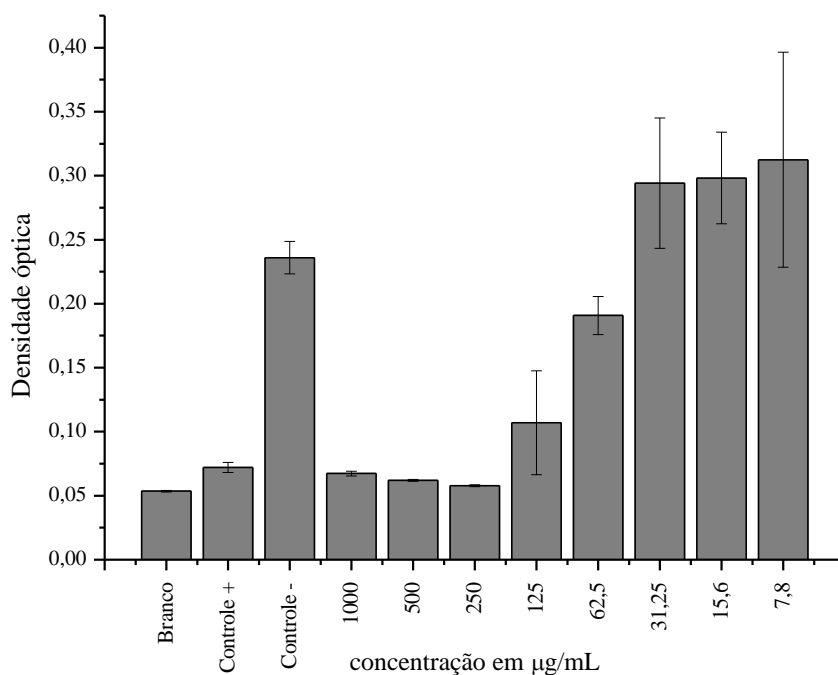
TABELA 3. Escala para interpretação dos resultados da atividade antibacteriana (ALVES, 2008).

Tamanho do halo de inibição	Escala de comparação
Menor que 0,89 cm	Inativo
Entre 0,90 e 1,29 cm	Atividade moderada
Entre 1,30 e 1,79 cm	Ativo
Maior que 1,80 cm	Muito ativo

Por meio dos resultados obtidos foram observados que os extratos hexânicos de folhas e galhos apresentaram atividade antibacteriana somente frente às bactérias gram-positivas, já os extratos metanólicos apresentaram atividade frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas. Silva e colaboradores (2008) demonstraram que substâncias presentes nos extratos etanólicos das folhas de *C. sylvestris* apresentaram importante atividade antibacteriana frente a ambos os tipos de bactérias, sendo as bactérias gram-positivas as mais sensíveis a esses extratos. Estudos realizados por Mosaddik e colaboradores (2004) demonstraram através de ensaios de concentração mínima inibitória, que espécies de *C. multinervosa* e *C. grayi* apresentam uma alta atividade antibacteriana frente à *S. aureus*.

Para determinação da concentração inibitória mínima, os extratos e as fases foram avaliados nos microorganismos para os quais haviam apresentado atividade no ensaio de difusão em poço. Assim, os extratos hexânicos dos galhos e das folhas foram testados frente a *B. cereus* e *S. aureus*, a fase diclorometânica obtida a partir do extrato metanólico dos galhos frente a *S. aureus*; a fase acetato de etila obtida a partir do extrato metanólico dos galhos foi testada frente a *B. cereus* e a fase acetato de etila, obtida a partir do extrato metanólico das folhas, foi testada frente a *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Destes, a fase mais ativa foi à fase acetato de etila, obtida a partir do extrato metanólico das folhas, que apresentou uma porcentagem de inibição de 75% do crescimento bacteriano até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, conforme apresentado (**GRÁFICO 1**).

GRÁFICO 1. Valores obtidos para o crescimento bacteriano (média e desvio padrão) em diferentes concentrações para a fase acetato de etila obtida a partir do extrato metanólico das folhas de *C. javitensis* frente a *B. cereus*.



Já os demais extratos e fases testadas pelo método de microdiluição não apresentaram porcentagens de inibição significativas quando comparados com o controle positivo.

Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada medindo a capacidade de sequestro de radicais livres do DPPH e de redução de Fe^{3+} . Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico (TABELA 4) e interpretados conforme a escala apresentada (TABELA 5).

TABELA 4. Resultados da avaliação da capacidade antioxidante de extratos e fases de *C. javitensis* obtidos pelas metodologias de DPPH e Fe³⁺/fenantrolina.

Parte da planta	Extrato/fase	Ensaio com DPPH			Ensaio com Fe ³⁺ /fenantrolina		
		Valores médios			Valores médios		
		\Delta ABS ₅₁₇	[AA] _{eq}	Equiv. (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)	\Delta ABS ₅₀₈	[AA] _{eq}	Equiv. (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)
Galhos	Hexano	0,115 ± 0.027	0,989 ± 0.215	5,204 ± 1.016	0,059 ± 0.015	0,126 ± 0.024	40,684 ± 8.038
Galhos	MeOH	0,610 ± 0.059	4,898 ± 0.467	1,027 ± 0.097	2,025 ± 0.298	3,503 ± 0.482	1,447 ± 0.217
Folhas	Hexano	0,116 ± 0.002	1,002 ± 0.012	4,991 ± 0.060	0,062 ± 0.013	0,322 ± 0.022	15,589 ± 1.013
Folhas	MeOH	0,610 ± 0.008	4,895 ± 0.060	1,022 ± 0.013	2,050 ± 0.278	3,543 ± 0.450	1,427 ± 0.193
Folhas	MeOH - Fase diclorometânica	0,106 ± 0.011	0,781 ± 0.097	6,466 ± 0.788	0,570 ± 0.037	0,893 ± 0.063	5,619 ± 0.386
Folhas	MeOH - Fase em acetato de etila	0,550 ± 0.010	4,666 ± 0.088	1,072 ± 0.020	2,704 ± 0.101	3,984 ± 0.146	1,256 ± 0.047
Folhas	MeOH - Fase hidrometanólica	0,262 ± 0.018	2,242 ± 0.153	2,237 ± 0.158	0,899 ± 0.230	1,360 ± 0.334	3,857 ± 1.102

TABELA 5. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (MARTINS et al., 2014).

Análise da atividade antioxidante (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)	Escala de comparação
Menor que 0,99	Muito ativo
Entre 1,0 e 1,99	Ativo
Entre 2,0 e 2,99	Atividade moderada
Maior que 3,0	Inativo

Os resultados obtidos nos ensaios quantitativos mostraram que os extratos metanólicos dos galhos e folhas possuem um alto potencial antioxidante (**TABELA 4**), visto que a equivalência com ácido ascórbico foi observada no intervalo de 1-1,99 (ativo). Por tal motivo esses extratos foram submetidos a uma partição líquido-líquido e avaliados, observando-se que a fase acetato de etila do extrato metanólico das folhas apresentou um alto potencial antioxidante de 1-1,99.

Esses resultados confirmam o observado na análise em CCDC, onde se verificou o potencial antioxidante qualitativo com DPPH. O reagente FeCl₃ revelou a presença de substâncias aromáticas, na amostra analisada, sendo que a intensidade da coloração foi mais evidente na fase acetato de etila obtida do extrato metanólico das folhas. Resultados similares foram relatados numa triagem realizada para avaliar o potencial antioxidante dos extratos metanólicos de quatro espécies de *Casearia* pela metodologia de ABTS (MOSADDIK et al., 2004), o que evidencia que as espécies deste gênero possuem um alto potencial como antioxidantes *in vitro*.

Estudos realizados por Raju e colaboradores (2010) demonstraram, através da metodologia do DPPH, que a substância 4-hidroxifenil-6-cafeoil-β-L-glicosídeo possui uma importante capacidade antioxidante, sendo esta superior à apresentada pelos antioxidantes comerciais como BHT (di-*tert*-butil-hidroxitolueno) e o ácido ascórbico.

Os extratos hexânicos de folhas e galhos, assim como as fases diclorometânicas dos extratos metanólicos não apresentaram atividade antioxidante para ambas as metodologias utilizadas. Este resultado pode ser devido ao fato de que nos extratos vegetais as moléculas com maior atividade antioxidante são as substâncias fenólicas, os quais se encontram principalmente nos extratos metanólicos (DEWICK, 2002). E indica também que estes extratos não possuem carotenoides, que são as substâncias apolares que também costumam ter atividade antioxidante.

Toxicidade frente à *Artemia salina*

Os extratos e as fases de *C. javitensis* foram testados para avaliar o seu potencial tóxico frente às larvas de *Artemia salina* na concentração inicial de 500 µg/mL. Nesta concentração, os extratos e as fases avaliados não apresentaram atividade tóxica (**TABELA 6**), por esse motivo não foram avaliados em concentrações menores.

O extrato hexânico das folhas apresentou uma taxa de mortalidade de 23% das larvas de *A. salina*, sendo o maior valor observado entre os extratos e as fases testadas. O valor para um extrato ser considerado como tóxico é de 50% de mortalidade das larvas na concentração de 500 µg/mL. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos extratos foi considerado tóxico (LAGARTO et al., 2001).

TABELA 6. Resultados da porcentagem de toxicidade dos extratos de *C. javitensis*.

Parte vegetal	Extrato/fase	Mortalidade (%)
Galhos	Hexano	20
Galhos	MeOH	20
Folhas	Hexano	23
Folhas	MeOH - Fase acetato de etila	10
Folhas	MeOH - Fase diclorometânica	7

Conclusão

O estudo fitoquímico das folhas de *C. javitensis* permitiu o isolamento de duas substâncias, o 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo (um fenil-glicosídeo) e o β -sitosterol (um esteroide). O fenil-glicosídeo está sendo relatado pela primeira vez no gênero, o que contribui com os conhecimentos sobre a composição química desta espécie.

As análises em CCDC mostram que os extratos hexânicos e metanólicos são potencial fonte de terpenos.

A avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em poço, do extrato hexânico dos galhos apresentou uma alta atividade frente às bactérias *Corynebacterium glutamicum* e *Staphylococcus aureus*. Já os extratos hexânicos das folhas e dos galhos foram ativos sobre *Bacillus cereus*. Os extratos metanólicos de folhas e galhos foram ativos frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, enquanto a fase obtida a partir do extrato metanólico das folhas foi ativo sobre *B. cereus*, quando testado pelo método de microdiluição em caldo.

Quando analisados quanto a sua toxicidade frente *A. salina*, nenhum dos extratos testados foi tóxico.

Os extratos metanólicos das folhas e dos galhos e a fase acetato de etila obtida do extrato metanólico das folhas apresentaram atividade antioxidante. O fracionamento dessa fase acetato de etila permitiu o isolamento da substância 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo que possui atividade antioxidante relatada na literatura.

Com base nos resultados obtidos nas atividades antibacterianas e antioxidantes, a espécie em questão apresenta um forte potencial como fonte de substâncias bioativas, portanto o fracionamento dos extratos ativos continuará com a finalidade de obter outras substâncias que, também, possam ser responsáveis por essas atividades, ou que contribuam parcialmente com ela.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (projetos PPBio/CNPq, REPENSA/CNPq, CT-Agro/CNPq, CT-Amazônia/CNPq) e CAPES (projeto Pro-Amazônia/CAPES) pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

Referências

ALVES, E.G.; CHICHARO, V.A.H.; ASSIRATI, C.L.; CARDOSO, F.N.A.J.; ANDRADE, M.L.; CUNHA, W.L.; GOMES, M.C.H. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p.1224-1229, São Paulo. 2008. ISSN 1678-7064. [[CrossRef](#)]

ARAGÃO, P.C.A.; TOLEDO, J.B.; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, v. 13, n. 4, p.254-259, São Paulo. 1990. ISSN 1678-7064. [[Link](#)]

BARBOSA, E.A.S. *Efeitos de extratos de Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Entomologia), INPA. Manaus. 2015.

BELYANIN, M.L.; STEPANOVA, E.V.; OGORODNIKOV, V.D. First total chemical synthesis of natural acyl derivatives of some phenolglycosides of the family Salicaceae. Elsevier, *Carbohydrate Research*, v. 363, p. 66-72. USA. 2012. ISSN 0008-6215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. - Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. NCCLS/CLSI. *Approved Standard. M2-A8*, v. 23, n. 1. USA. 2002.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2ª ed. John Wiley & Sons Ltd., 487p. New York. 2002. ISBN 0 471 49640 5. [[Link](#)]

LAGARTO, P.A.; SILVA, Y.R.; GUERRA, S.I.; IGLESIAS, B.L. - Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Elsevier, *Phytomedicine*, v.8, n.5, p. 395–400. USA. 2001. ISSN 0944-7113. [[PubMed](#)]

LIU, L.; GUO Z.Q.; CHAI, X.Y.; ZHAO, M.B.; LU, Y.N.; TU, P.F. - Phenolic glycosides from the stems of *Homalium ceylanicum* (Gardner) Bentham (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*). Elsevier, *Biochemical Systematics and Ecology*, n. 46, p. 55-58. USA. 2013. ISSN 0305-1978. [[CrossRef](#)]

MARQUETE, R. O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Escola Nacional de Botânica Tropical*, v. 58, n. 4, p. 705-738. Rio de Janeiro. 2007. [[Link](#)]

MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M.T.; OLIVEIRA, T.A.; LIMA, C.S.K.; CAVALCANTI, M. R.; TELES, R.B.; NUNEZ, C.V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). Asociación Académica de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta (ASOCIFA). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, v. 6, n. 2, p. 158-171. Antofagasta, Chile. 2014. ISSN 0719-4250. [[Link](#)]

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSON, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. - Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Elsevier. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 45, p. 31-34. USA. 1982. ISSN 1996-0875. [[PubMed](#)]

MOSADDIK, M.A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D., WATERMAN, P.G. MOSADDIK, M. A. et al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. Biochemical systematics and ecology, Elsevier, *Phytomedicine*, n. 5, v. 11, p. 461-466. USA. 2004. ISSN 0944-7113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

MOSADDIK, M.A.; FLOWERS, A.; KARAGIANIS, G.; WATERMAN, P. G. - New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. Taylor & Francis, *Natural Product Research*, v. 20 n. 6, p. 641-647. USA. 2006. ISSN 1478-6419. [[CrossRef](#)]

PRIETO, A.M.; SANTOS, A.G.; OLIVEIRA, A.P.S.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; VARANDA, E.A.; SOARES, C.P. - Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). Elsevier, *Food and Chemical Toxicology*, v. 53, p. 153-159. USA. 2013. ISSN 0278-6915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

RAJU, G.G.; RAJU, G.R.; SUBBARAJU, G.V.; VENKATESWARLU, S. - Pharmaceutically active extracts of *Vitex leucoxydon*, a process of extracting the same and a method of treating diabetes and inflammatory diseases therewith. USPTO. *United States Patent US007780997B2*. USA. 2010. [[Link](#)]

RAYANIL, K.; NIMNOUN, C.; TUNTIWACHWUTTIKU, P. New phenolics from the wood of *Casearia grewiifolia*. Elsevier, *Phytochemistry Letters*, v. 5, p. 59-62, USA. 2012. ISSN 0278-6915. [[CrossRef](#)]

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; DAMICO, D.C.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology*, Taylor & Francis, v. 46, n. 5, p. 347–351, USA. 2008. ISSN 1388-0209. [[CrossRef](#)]

WANG, W.; ZHAO, J.P.; WANG, Y.H.; SMILLIE, T.A.; LI, X.C.; KHAN, I.A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Planta Medica*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, n. 75, p.1436–1441, New York. 2009. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

WYREPKOWSKI, C.D.C. *Estudo fitoquímico e bioatividade de extratos de Casearia javitensis kunth*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação multi-institucional em biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM. Manaus. 2010.

XIA, L.; GUO, Q.; TU, P.; CHAI, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. Springer, *Phytochemistry Reviews*, v. 14, p.99–135, USA. 2015. ISSN 1568-7767. [[CrossRef](#)]

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesses.

Histórico do artigo: Submissão:10/03/2016 | Aceite:26/06/2016 | Publicação: 23/02/2017

Como citar este artigo: NUNEZ, Cecília Veronica; FACHIN-ESPINAR, Maria Teresa; SOUZA, Maria Carolina Scheffer de. Isolamento de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- β -L-glicosídeo e β -sitosterol e avaliação das atividades antibacteriana, antioxidante e tóxica sobre *Artemia salina* de *Casearia javitensis*. *Revista Fitos Eletrônica*, [S.l.], fev. 2017. ISSN 2446-4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/321>>. Acesso em: 23 fev. 2017.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
