

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Terpenóides em espécies do gênero *Salvia*
(Lamiaceae)**

Paula Santos Pinto

Porto Alegre, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Terpenóides em espécies do gênero *Salvia*
(Lamiaceae)**

Dissertação apresentada por Paula
Santos Pinto para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser
Co-orientadora: Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.01.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Edna Sayuri Suyenaga
Universidade Feevale

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon
Centro Universitário La Salle

CIP - Catalogação na Publicação

Pinto, Paula Santos
Terpenóides em espécies do gênero *Salvia*
(Lamiaceae) / Paula Santos Pinto. -- 2012.
71 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.
Coorientadora: Miriam Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Terpenóides. 2. Gênero *Salvia*. 3. Família Lamiaceae. I. von Poser, Gilsane Lino, orient. II. Apel, Miriam Anders, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Agradecemos a CAPES pelo suporte financeiro e pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Gilsane von Poser, por seu estímulo e orientação.

À professora Dra. Miriam Apel, pela coorientação e pela grande ajuda durante a execução deste trabalho, principalmente nessa última fase.

Ao botânico Sérgio Bordignon, por sua amizade e pelas incansáveis e intermináveis coletas.

Aos amigos Manuel Falcão e Ismael Sauter, pela ajuda nos testes biológicos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da UFRGS pela amizade, companheirismo e por me acolherem durante esses três anos, em especial às grandes amigas que fiz e vou levar para toda a vida, Sati, Gabi e Sita. Adoro muito vocês! Muito obrigada pela ajuda, por me fazerem rir o tempo todo e por me acalmarem nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos da PUCRS, em especial ao Adroaldo, Taísa e Thanise, que o tempo todo me deram força e comemoraram todas as minhas conquistas durante essa jornada.

À minha irmã, meu cunhado e meu afilhado Leonardo, por compreenderem a minha ausência.

Aos meus pais, por me darem confiança, atenção e calma mesmo à distância e por me proporcionarem momentos especiais, de muitas risadas quando eu conseguia ir para casa. Amo muito vocês. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram em mais esta etapa de minha vida.

Resumo

O gênero *Salvia* L. (Lamiaceae), constituído de aproximadamente 900 espécies, possui 60 representantes no Brasil. Dentre suas propriedades medicinais destacam-se as atividades antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante e antibacteriana. Óleos essenciais e diterpenos de núcleos abietano, clerodano, primarano estão entre os principais constituintes químicos relatados para as espécies. O objetivo deste trabalho foi a caracterização química dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de seis espécies de *Salvia* nativas da região Sul do Brasil (*S. guaranitica*, da Seção *Coerulae*; *S. ovalifolia*, *S. cordata* e *S. borjensis*, da Seção *Rudes* e *S. procurrens* e *S. uliginosa*, da Seção *Uliginosae*), utilizando cromatografia à gás/espectrometria de massas. A análise química dos óleos essenciais mostrou que todas as espécies apresentaram apenas sesquiterpenos, além de compostos alifáticos como aldeídos e ácidos graxos de cadeia longa. Entre estes últimos, nonadecanal estava presente em todas as espécies, sendo abundante (13% a 56%) em *S. procurrens*, *S. ovalifolia* e *S. borjensis*. Em relação à composição dos sesquiterpenos, observou-se que espatulenol estava presente em quantidades relativamente grandes (10% - 40%) nas espécies *S. cordata*, *S. borjensis* e *S. ovalifolia*. Estas espécies também apresentaram β -cariofileno, sesquiterpeno encontrado, ainda, em *S. guaranitica*. *S. cordata* apresentou o sesquiterpeno *epi*-globulol (32,3%) e 2*E*, 6*Z*-farnesol (11,4%). O óleo essencial de *S. uliginosa* apresentou ácido hexadecanóico (30,1%), *n*-nonadecano (17,5%) e nonadecanal (4,5%) como componentes majoritários. Os óleos essenciais e os extratos diclorometano das espécies da Seção *Uliginosae* (*S. uliginosa* e *S. procurrens*) mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, quando testados pelo método de bioautografia. As análises preliminares sugerem a presença de diterpenos de núcleo abietano-quinona nos extratos orgânicos destas espécies. Os extratos diclorometano dessas duas espécies foram também avaliados quanto à atividade amebicida contra amebas de vida livre *Acanthamoeba polyphaga*. Entre estes, apenas o de *S. uliginosa* foi ativo, apresentando 100% de atividade nas concentrações de 7,5 e 5 mg/mL.

Palavras-chave: óleos essenciais, *Salvia* L., diterpenóides, atividade antimicrobiana, atividade amebicida.

Abstract

Terpenoids in the genus *Salvia* (Lamiaceae)

The genus *Salvia* L. (Lamiaceae) has about 900 species, 60 of them found in Brazil. Among the medicinal properties it is possible to highlight anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial activities. Essential oils and diterpenes with abietane, clerodane and primarane skeletons are the main components of these plants. In this sense, the purpose of this study was to characterize the essential oils obtained by hydrodistillation from *Salvia* species native to southern Brazil (*S. guaranitica*, Section *Coerula*; *S. ovalifolia*, *S. cordata* and *S. borjensis*, Section *Rudes* and *S. procurrens* and *S. uliginosa*, Section *Uliginosae*), using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Chemical analysis of the essential oils showed that all species had only sesquiterpenes, and aliphatic compounds such as aldehydes and long chain fatty acids. Among the latter, nonadecanal was present in all species, being abundant (13% to 56%) in *S. procurrens*, *S. borjensis* and *S. ovalifolia*. Regarding the composition of the sesquiterpenes, it was observed that spathulenol was present in relatively large amounts (10% - 40%) in *S. cordata*, *S. borjensis* and *S. ovalifolia* oils. These species also showed β -caryophyllene, a sesquiterpene also found in *S. guaranitica*. *S. cordata* showed the sesquiterpene *epi*-globulol (32.3%) and 2*E*, 6*Z*-farnesol (11.4%). *S. uliginosa* essential oil presented hexadecanoic acid (30.1%), *n*-nonadecane (17.5%) and nonadecanal (4.5%) as the main compound. The essential oils and the dichloromethane extracts of of the species from the Section *Uliginosae* (*S. uliginosa* and *S. procurrens*) demonstrated antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* when investigated by the bioautography method. Preliminary analyses indicated that the main compounds present in the organic extracts are diterpenes with the abietane type-diterpene quinone nucleous. The dichloromethane extracts of these two species were also evaluated for the activity against *Acanthamoeba polyphaga*. Only the extract of *S. uliginosa* was active, with 100% activity at concentrations of 7.5 and 5 mg/mL.

Keywords: essential oil, *Salvia* L., diterpenoids, antimicrobial activity, amebicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Biossíntese dos monoterpenos..... | 15 |
| Figura 2: Biossíntese dos sesquiterpenos..... | 16 |
| Figura 3: Biossíntese dos diterpenos..... | 16 |
| Figura 4: Exemplos de monoterpenos utilizados na terapêutica..... | 17 |
| Figura 5: Algumas estruturas químicas de sesquiterpenóides encontrados em espécies de <i>Salvia</i> | 18 |
| Figura 6: Diterpenos labdanos isolados de espécies de <i>Salvia</i> | 19 |
| Figura 7: Diterpeno clerodano isolado de <i>Salvia splendens</i> | 20 |
| Figura 8: Diterpeno neo-clerodano isolado de <i>Salvia melissodora</i> | 20 |
| Figura 9: Diterpenos abietanos presentes em <i>Salvia heldrichiana</i> | 20 |
| Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de <i>S. guaranitica</i> obtido por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)..... | 37 |
| Figura 11: Cromatogramas do óleo essencial de A. <i>Salvia cordata</i> , B. <i>S. ovalifolia</i> e C. <i>S. borjensis</i> obtidos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)..... | 40 |
| Figura 12: Cromatograma do óleo essencial de A. <i>Salvia procurrens</i> e B. <i>S. uliginosa</i> , obtido por cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)..... | 43 |
| | |
| Figura 13: Bioautografia do óleo essencial de <i>Salvia procurrens</i> demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano..... | 50 |
| Figura 14: Bioautografia do óleo essencial de <i>S. uliginosa</i> demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano..... | 50 |
| Figura 15: Bioautografia do extrato diclorometano de <i>S. procurrens</i> demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano..... | 51 |
| Figura 16: Bioautografia do extrato diclorometano de <i>S. uliginosa</i> demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano..... | 51 |
| Figura 17: Atividade amebicida do extrato de <i>Salvia uliginosa</i> frente a <i>A. polyphaga</i> (AP2 - ATCC 30461). As colunas representam as médias da atividade de cada concentração de extrato testada, em relação ao controle (p<0,05 vs controle)..... | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Dados de coletas das espécies de <i>Salvia</i> L. (Lamiaceae)..... | 29 |
| Tabela 2: Composição química do óleo essencial de <i>S. guaranitica</i> , pertencente à seção <i>Coerulea</i> | 38 |
| Tabela 3: Composição química do óleo essencial de <i>S. cordata</i> , <i>S. ovalifolia</i> e <i>S. borjensis</i> , pertencentes à seção <i>Rudes</i> | 41 |
| Tabela 4: Composição química do óleo essencial de <i>S. procurrens</i> e <i>S. uliginosa</i> , pertencentes à seção <i>Uliginosae</i> | 44 |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 2.1 Objetivos Gerais..... | 7 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 7 |
| 3. REVISÃO DO TEMA | 9 |
| 3.1 Gênero <i>Salvia</i> L..... | 11 |
| 3.2 Óleos Essenciais..... | 12 |
| 3.3 Terpenóides..... | 13 |
| 3.3.1 Origem Biossintética..... | 14 |
| 3.3.2 Monoterpenos..... | 16 |
| 3.3.3 Sesquiterpenos..... | 17 |
| 3.3.4 Diterpenos..... | 18 |
| 3.4 Atividade Antibacteriana..... | 21 |
| 3.5 Atividade Antiparasitária de Óleos Essenciais e Diterpenos..... | 22 |
| 3.6 Gênero <i>Acanthamoeba</i> | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 Material Vegetal..... | 29 |
| 4.2 Extração de Óleos Essenciais..... | 30 |
| 4.3 Análise Química dos Óleos Essenciais..... | 30 |
| 4.3.1 Cromatografia Gasosa..... | 30 |
| 4.3.2 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)..... | 31 |
| 4.3.3 Identificação dos Constituintes..... | 31 |
| 4.4 Extração Via Solvente..... | 31 |
| 4.5 Análise dos Extratos..... | 32 |
| 4.6 Método de Bioautografia..... | 32 |
| 4.7 Avaliação da Atividade Amebicida..... | 33 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 5.1 Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de <i>Salvia guaranitica</i> (Seção <i>Coerulea</i>)..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 5.2 Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de <i>Salvia cordata</i> , <i>Salvia ovalifolia</i> e <i>Salvia borjensis</i> (Seção <i>Rudes</i>)..... | 39 |
| 5.3 Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de <i>Salvia procurrens</i> e <i>Salvia uliginosa</i> (Seção <i>Uliginosae</i>)..... | 43 |
| 5.4 Extração Via Solvente e Análise Preliminar dos Extratos..... | 47 |
| 5.5 Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Extratos Diclorometano de <i>Salvia procurrens</i> e <i>Salvia uliginosa</i> | 49 |
| 5.6 Atividade Amebicida do Extrato Diclorometano de <i>Salvia procurrens</i> e <i>Salvia uliginosa</i> | 52 |
| 6. CONCLUSÕES | 55 |
| 7. REFERÊNCIAS | 59 |
| ANEXOS | 71 |

1. Introdução

O uso de plantas medicinais pela população mundial é muito significativo. No Brasil, 20% da população respondem por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos. Os fitoterápicos têm sido o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional e de pequeno porte (Yunes *et al.*, 2001).

Ensaio estão sendo realizados na busca de novos compostos ativos em extratos vegetais. Uma abordagem promissora é a etnofarmacológica, orientada pelos usos populares da flora medicinal, que facilita a escolha das espécies submetidas a seleção química e farmacológica e aumenta as chances de descoberta de novos princípios ativos (Cordell e Colvard, 2005).

Entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores para a pesquisa em busca de novos compostos ativos estão os óleos voláteis ou essenciais. Estes, segundo definição da ANVISA (Brasil, 1999) “são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico e podem apresentar-se isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados”. Estes óleos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais, sendo mais frequentes em frutos, flores, folhas e raízes. Ocorrem em diversos gêneros de plantas superiores, inferiores e microrganismos (Brenna *et al.*, 2003).

Neste âmbito, um gênero que tem recebido grande atenção é *Salvia* L. Este pertence à família Lamiaceae (Labiatae), sendo um dos maiores dessa família, com aproximadamente 900 espécies. Os representantes, com vasta e extraordinária variação de formas e cores florais, são encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, principalmente em áreas montanhosas (Amabeoku *et al.*, 2001).

No Brasil existem aproximadamente 60 espécies deste gênero, sendo 19 delas distribuídas nas regiões sudeste e sul do país. As espécies encontradas na região sul estão divididas em oito seções: Seção *Angulatae* Epl., *Uliginosae* Epl., *Rudes* (Benth.)

Epl., *Coerulea* Epl., *Secundae* Epl., *Farinaceae* Epl., *Skeptostachys* Epl. e *Curtiflorae* Epl.

Estudos realizados analisando a composição química de algumas espécies de *Salvia* demonstraram que muitas delas são utilizadas pelo mundo todo por possuírem diversas propriedades tais como antibacteriana, antioxidante, antidiabética, antiplasmódica, antiinflamatória, antitumoral e antituberculose. Muitas delas também são usadas como inseticidas (Lin *et al.*, 1989; Ulubelen *et al.*, 1992; Ulubelen *et al.*, 1997; Topcu *et al.*, 1997; Baricevic *et al.*, 2001; Haznedaroglu *et al.*, 2001).

Neste trabalho, investigou-se a composição química dos óleos essenciais de *S. guaranítica* (seção *Coerulea*), *S. ovalifolia*, *S. cordata* e *S. borjensis* (seção *Rudes*), *S. uliginosa* e *S. procurrens* (seção *Uliginosae*), nativas do Rio Grande do Sul. Os óleos essenciais e extratos diclorometano de *S. procurrens* e *S. uliginosa*, da seção *Uliginosae*, foram avaliados quanto a atividade antibacteriana utilizando método de bioautografia. Os extratos diclorometano dessas duas espécies foram também avaliados quanto a atividade amebicida.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal analisar a composição química de óleos essenciais de algumas espécies do gênero *Salvia* L., nativas do Rio Grande do Sul, e realizar ensaios biológicos com os óleos e extratos obtidos.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair óleos essenciais de seis espécies de *Salvia* L. encontradas no estado do Rio Grande do Sul utilizando o método de hidrodestilação;
- Identificar e quantificar os compostos presentes nos óleos essenciais através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM);
- Obter extratos das espécies *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa* através de maceração com solventes orgânicos;
- Investigar a ação amebicida e antibacteriana dos óleos essenciais e extratos diclorometano de *S. procurrens* e *S. uliginosa*.

3. Revisão do Tema

3.1 Gênero *Salvia* L.

O gênero *Salvia* L. (família Lamiaceae, tribo Mentheae) representa um conjunto cosmopolita de aproximadamente 900 espécies com vasta e extraordinária variação de formas e cores florais. De acordo com Claben-Bockhoff *et al.* (2003), os atuais centros de diversidade são Eurásia, incluindo o Mediterrâneo (ca. 210 espécies), Centro e Leste da Ásia (ca. 90 espécies), Leste e Sul da África (ca. 60 espécies), América do Norte (ca. 40 espécies), América Central (ca. 350 espécies) e América do Sul (ca. 210 espécies). Este grupo ocorre desde o nível do mar até 4.000 m, em vasta gama de ambientes, como florestas tropicais e temperadas, regiões semi-áridas e também bordas florestais e campos degradados (Claben-Bockhoff *et al.*, 2004). As formas de crescimento podem variar de ervas perenes a arbustos anuais, além de trepadeiras, lianas e árvores (Alziar, 1993).

As flores são principalmente bilabiadas e tubulosas. O gênero é separado dos outros grupos da Tribo Mentheae com base na sua estrutura estaminal singular. Enquanto muitos grupos desta tribo apresentam quatro estames, *Salvia* tem apenas dois, sendo que as duas tecas de cada estame são separadas por um conectivo alongado.

O gênero é bem conhecido pelo mecanismo específico nototribico (dorsal) de transferência de pólen. A morfologia da alavanca estaminal foi inicialmente reconhecida por Claben-Bockhoff *et al.* (2004), que indicaram que a alavanca é formada pela extensão do conectivo que separa as duas tecas. A extensão superior do conectivo sustenta dois sacos de pólen, que muitas vezes estão sob o lábio superior, enquanto a extensão inferior do conectivo é muitas vezes estéril, funcionando como barreira para acesso ao néctar. Dentre as mais de 900 espécies descritas de *Salvia*, o mecanismo de alavanca é modificado em vários caminhos, sendo encontrado muitas vezes nas mais de 200 espécies polinizadas por pássaros.

Há também espécies polinizadas por pequenos insetos voadores, como abelhas e borboletas (Aximoff, 2008).

Os produtos mais abundantes isolados das plantas desse gênero, aos quais vêm sendo atribuídas diversas atividades biológicas, são óleos essenciais (óleos voláteis) ricos em tujano, cineol e pineno; alguns ácidos, como rosmarínico, flavonóides; triterpenos como oleanano e ursano e, especialmente, diterpenóides (Aximoff, 2008; Kamatou *et al.*, 2008).

3.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais ou voláteis, são compostos basicamente por moléculas denominadas isoprenóides e fenilpropanóides, que são produtos da interação genética da planta com o seu habitat.

Óleos essenciais ou voláteis correspondem aos principais componentes odoríferos encontrados nas plantas. São denominados óleos voláteis ou essenciais pelo fato de evaporarem quando expostos ao ar. Os óleos essenciais são originários do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (Silva *et al.*, 2003). Estes constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa da planta contra microrganismos (Siqui *et al.*, 2000).

O conteúdo do óleo pode variar consideravelmente de espécie para espécie. Uma planta produtora de óleo essencial pode apresentar mais de um produto de interesse comercial na sua composição, dependendo de alguns fatores extrínsecos e outros intrínsecos à espécie vegetal, dependentes do processo de extração empregados ou até mesmo do meio ambiente. A localização do óleo em diferentes estruturas da planta pode ocasionar o predomínio de diferentes classes de compostos voláteis. Em algumas estruturas, por exemplo, há o predomínio de compostos

monoterpênicos, já em outras os compostos que aparecem em maior quantidade são os sesquiterpenos (Tellez *et al.*, 1999).

Muitas plantas existem sob vários fenótipos, isto é, diferindo na sua aparência e diversidade qualitativa e quantitativa, geralmente detectada na composição do óleo essencial obtido (Kerrola *et al.*, 1994). A concentração de óleo essencial presente em espécies vegetais é muito baixa, normalmente inferior a 1%.

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos sulfurados. Em geral, os óleos essenciais não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Silva *et al.*, 2003).

3.3 Terpenóides

Terpenóides constituem um dos mais conhecidos grupos de metabólitos secundários encontrados nos vegetais. Esses compostos possuem diferentes funções, dentre elas: fotoproteção, resistência ao estresse oxidativo, hormônios, termotolerância, pigmentos fotossintéticos, compostos de defesa e regulação subcelular (Peñuelas e Llusià, 2002; Peñuelas e Munné-Bosch, 2005). Os terpenos são formados pela união de um número inteiro de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas do 2-metilbutadieno. Em 1887, Wallach considerava que os terpenos eram constituídos a partir de unidades isoprênicas. Ruzicka, dezenas de anos mais tarde (1953), após muitos estudos, transformou esta hipótese em regra geral, cujo princípio teria sido comprovado experimentalmente. Cada grupo de terpenos é o resultado da condensação “cabeça-cauda” de um número variável de unidades isoprênicas.

Esta regra formal postula que a diversidade estrutural não é mais que aparente: em cada grupo de terpenos, um único precursor conduz aos diferentes

constituintes conhecidos por uma sucessão de reações clássicas. Os precursores dos principais tipos de terpenos, formados mediante reações catalizadas por enzimas, são os ésteres pirofosfóricos de alcoóis em $(C_5)_n$, formados pela adição seqüencial de uma unidade C_5 , o pirofosfato de isopentenila (IPP) sobre uma molécula de partida.

- Geranylpirofosfato (GPP), precursor dos monoterpenos em C_{10} ;
- Farnesilpirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos em C_{15} ;
- Geranylgeranylpirofosfato (GGPP), precursor dos diterpenos em C_{20} .

A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (Dubey *et al.*, 2003). Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (Steinegger e Hansel, 1992). O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8.000 (Breitmaier, 1999); como componentes descritos em óleos essenciais, é estimado um número próximo de 150 monoterpenos e de 1000 sesquiterpenos (Wagner, 1993; Nagegowda, 2010).

3.3.1 Origem biossintética

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas séries: a série terpênica, representada pela via do Acetil/CoA/ácido mevalônico e a série aromática, constituindo os fenilpropanóides através da via do ácido chiquímico.

Todos os compostos da série terpênica são formados a partir do difosfato de isopentenila (IPP). Este precursor pode ser originado a partir de duas rotas biossintéticas diferentes, porém ambas oriundas da rota da glicose. Na primeira rota, o IPP é gerado a partir do ácido mevalônico, essa é conhecida como a via clássica de formação dos terpenos. Na segunda via de formação, considerada como uma rota alternativa, o IPP é formado a partir do piruvato e gliceraldeído-3- fosfato. Ambas as rotas podem ocorrer simultaneamente num mesmo exemplar vegetal (Adam e Zapp, 1998).

A biossíntese dos terpenos a partir do ácido mevalônico inicia-se pela condensação aldólica de três unidades de Acetil coenzima A, formando o composto (3S) 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A, que pela sua redução irreversível forma o ácido mevalônico e seu isômero, precursores dos terpenos.

Após, ocorre a conversão do ácido mevalônico em pirofosfato de isopentenila (IPP) através de sua fosforilação seguida de uma descarboxilação. Este composto, que apresenta cinco carbonos na sua estrutura, é chamado de isopreno ativo e a partir dele serão formados os vários tipos de terpenos encontrados.

O IPP, então, isomeriza-se reversivelmente em pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) com subsequente condensação cabeça-cauda de duas unidades C₅ (IPP + DMAPP), originando assim o pirofosfato de geranila (GPP) (C₁₀) (figura 1), precursor dos monoterpenos (Guignard *et al.*, 1985).

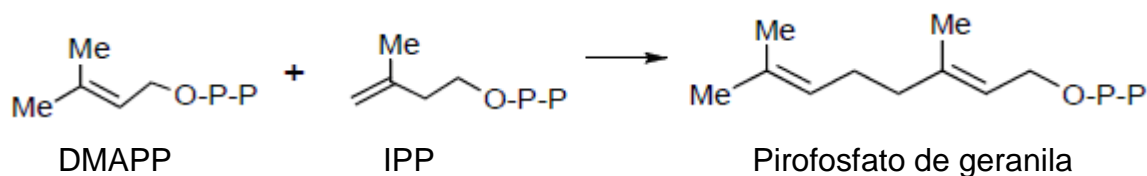


Figura 1. Biossíntese dos monoterpenos.

Através da alquilação do pirofosfato de geranila pelo pirofosfato de dimetilalila, ocorre o alongamento da cadeia com uma seqüencial adição de IPP, ligação do tipo cabeça-cauda, formando o pirofosfato de farnesila (FPP) (C₁₅) (figura 2), que é o precursor dos sesquiterpenos (Guignard, 1996)

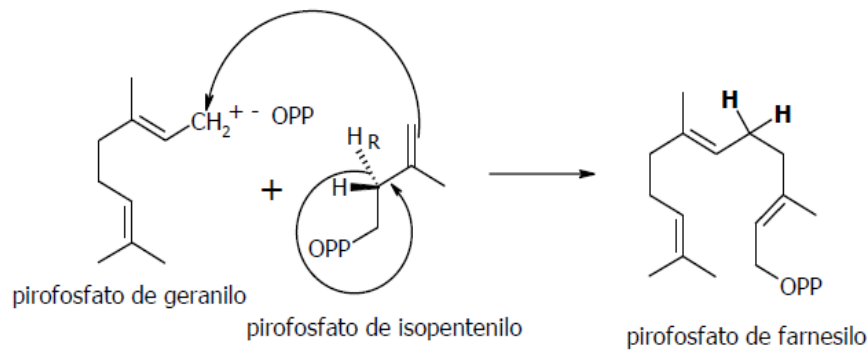


Figura 2. Biossíntese dos sesquiterpenos.

E, através da condensação do pirofosfato de farnesilo com o pirofosfato de isopentenila, ocorre a formação do pirofosfato de geranylgeranila (figura 3), que é o precursor dos diterpenos (C_{20}).

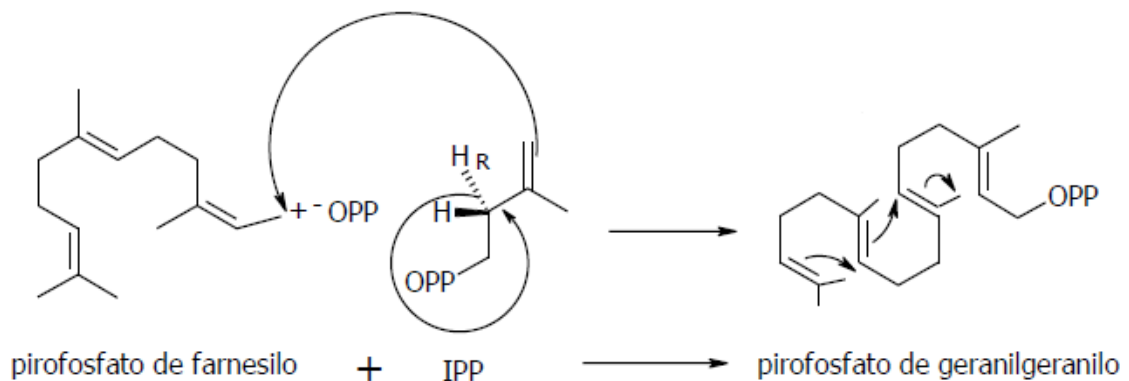


Figura 3. Biossíntese dos diterpenos.

3.3.2 Monoterpenos

Os monoterpenos são os constituintes mais simples do grupo dos terpenos. Resultam do acoplamento de duas unidades isoprênicas. São conhecidos mais de mil monoterpenos com estruturas regulares, que são os constituintes mais frequentes dos óleos voláteis (Castro *et al.*, 2004; Dudareva *et al.*, 2004; Nagegowda, 2010).

Na terapêutica, os monoterpenos são empregados como analgésicos, anestésicos locais, expectorantes, antitussígenos, antipruriginosos, carminativos e antipiréticos, dando destaque para cânfora, borneol, 1,8-cineol, mentol e timol (figura 4) (Silva, 2002).

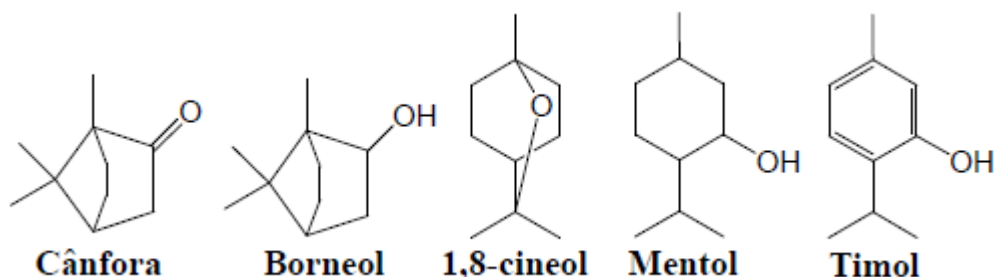


Figura 4. Exemplos de monoterpenos utilizados na terapêutica.

Embora se conheçam cerca de quarenta esqueletos monoterpênicos, a maior parte das estruturas descritas se relaciona com um pequeno número de encadeamentos básicos procedentes do acoplamento cabeça-cauda das unidades C_5 dando pirofosfato de geranila (GPP), o qual é o ponto de partida para a formação dos monoterpenos regulares (Krammer *et al.*, 1991).

3.3.3 Sesquiterpenos

Sesquiterpenos são terpenóides C_{15} que ocorrem na natureza como hidrocarbonetos ou em formas oxigenadas, como álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos ou lactonas (Merfort, 2002).

O número de moléculas de sesquiterpenos tem crescido desde o isolamento do cadineno e do cariofileno, descrito por Wallach no final do século XIX. Os compostos descritos atualmente apresentam mais de 300 esqueletos diferentes. Esta diversidade encontra sua origem na capacidade da reação de seu precursor comum, o pirofosfato de farnesilo (FPP) (Felicetti e Cane, 2004; Nagegowda, 2010).

A biossíntese dos sesquiterpenos é semelhante a dos monoterpenos e inicia-se com a condensação dos pirofosfatos de dois isoprenóides, o pirofosfato de geranilo com o pirofosfato de isopentenilo originando o pirofosfato de farnesilo (Verlang, 2000).

O pirofosfato de farnesilo é o precursor de todos os sesquiterpenos. Pode hidrolizar a farnesol ou isomerizar a pirofosfato de nerodilo o qual por seu lado é o substrato de várias enzimas da família das ciclases, que vão originar os sesquiterpenos monocíclicos (Verlang, 2000).

Nas espécies de *Salvia* relatadas em alguns estudos, verificou-se a presença de muitos sesquiterpenos, sendo eles α -humuleno, β -cariofileno, β -cubebeno, β -elemeno (figura 5), entre outros.

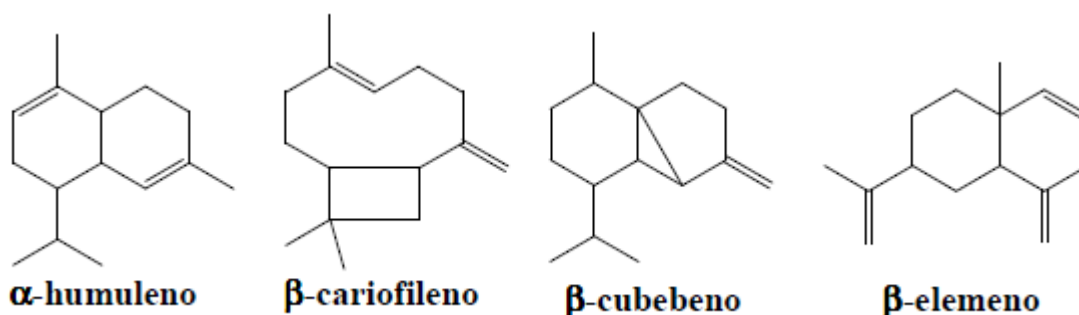


Figura 5. Algumas estruturas de sesquiterpenos encontrados em espécies de *Salvia*.

3.3.4 Diterpenos

Diterpenos (C_{20}) constituem a segunda maior classe de terpenóides, com mais de 2200 componentes e cerca de 130 tipos de esqueletos (Sukh Dev, 1989; Deprê e Brocksom, 2010).

Estes compostos, derivados do geranilgeraniol pirofosfato, são constituídos por quatro unidades isoprênicas, possuindo, portanto, 20 átomos de carbono. São de origem fúngica ou vegetal e são encontradas nas resinas, exsudatos de goma, e nas

frações remanescentes após a destilação dos óleos essenciais. Exemplos de diterpenos são cafestol, cembreno, labdanos, pimaranos, sclereno, esteviol, ferruginol e taxadieno (precursor do taxol), entre outros.

Os diterpenos também formam a base para compostos biologicamente importantes, como o retinol, retinal e fitol. Apresentam, ainda, atividades antimicrobiana e antiinflamatória (Jefferies *et al.*, 1981), sendo os principais compostos responsáveis por muitos efeitos biológicos verificados para espécies de *Salvia*. Outros estudos revelaram diterpenos com atividades antituberculose (*S. blepharochlyna* e *S. prionitis*) e antifúngica (*S. multicaulis*) (Lin *et al.*, 1989; Ulubelen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Ulubelen *et al.*, 2001). Em ensaios realizados com as espécies *S. albocaerulea* (Pereda-Miranda *et al.*, 1992), *S. forskhalei* (Ulubelen *et al.*, 1996), *S. lanigera* (El-Lakany *et al.*, 1995) e *S. officinalis* (Darias *et al.*, 1990) foi verificada atividade antibacteriana, a qual foi atribuída aos diterpenos. Além destes efeitos, os diterpenos isolados de muitas outras espécies de *Salvia* também apresentam atividades antioxidante, antiviral, antitumoral, efeitos cardioativos, entre outros (Rodriguez-Hahn *et al.*, 1992; Bisio *et al.*, 2004; Kabouche e Kabouche, 2008).

A maioria das espécies de *Salvia* apresenta na sua composição diterpenos bicíclicos como os labdanos, clerodanos e neo-clerodanos Figuras (6, 7 e 8).

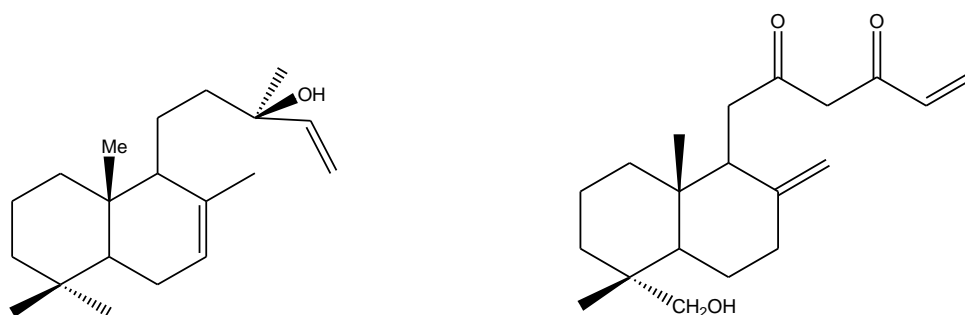


Figura 6. Diterpenos labdanos isolados de espécies de *Salvia*.

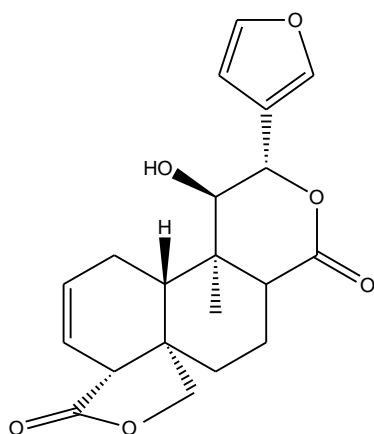


Figura 7. Diterpeno clerodano isolado de *Salvia splendens*.

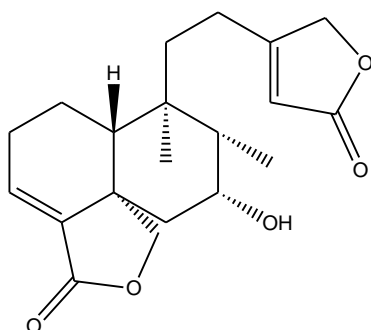


Figura 8. Diterpeno neo-clerodano isolado de *Salvia melissodora*.

Algumas espécies tais como *Salvia canariensis*, *S. texana*, *S. heldrichiana* e *S. cardiophylla* apresentam na sua composição diterpenos tricíclicos como os abietanos (figura 9) (González *et al.*, 1990; Cárdenas e Rodríguez-hahn, 1992).

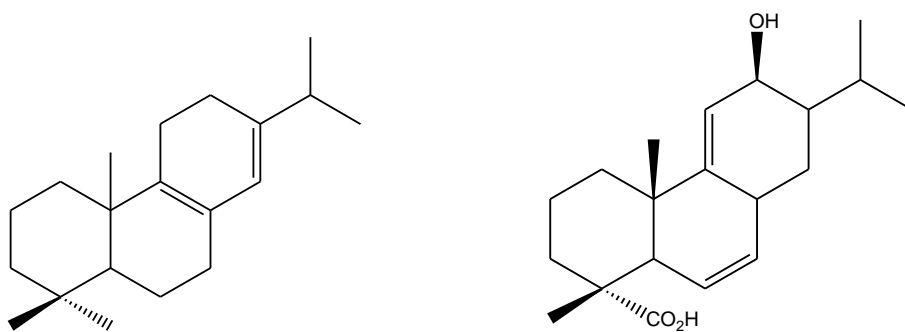


Figura 9. Diterpenos abietanos presentes em *Salvia heldrichiana*.

3.4 Atividade antibacteriana

Alguns estudos mostram o efeito antibacteriano de óleos essenciais e extratos de algumas espécies de *Salvia*. Hussain *et al.* (2011) investigaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de algumas espécies de gêneros da família Lamiaceae. Esse estudo mostrou que em *Salvia officinalis* os compostos linalol e acetato de linalila foram os que apresentaram maior atividade.

Outro estudo mostrou que do extrato bruto de *Salvia bracteata* foram isolados dois novos diterpenos, salvibracteona e bractealina. Esses diterpenos mostraram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (Ulubelen *et al.*, 1999).

Diterpenos com relevante atividade frente a algumas cepas de bactérias anaeróbias e aeróbias são os do tipo pimarano e labdano, mostrando forte ação bactericida contra bactérias Gram-positivas. Diterpenos isolados de *S. canariensis*, *S. cardiophylla* e *S. texana* mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), mas não mostraram atividade contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella* sp) (González *et al.*, 1990).

Assim, verifica-se que pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição.

A atividade antibacteriana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). A determinação da CIM de extratos vegetais é muito relevante devido a

preocupação em relação aos aspectos microbiológicos, toxicológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (Pinto *et al.*, 2003).

As variações referentes à determinação da CIM, nos extratos vegetais, devem-se a muitos fatores. Dentre eles está o microrganismo, a cepa utilizada no teste, a origem da planta, o modo de cultivo, a época da coleta, a técnica utilizada para a preparação dos extratos e teste, quantidade de extratos e se esses extratos foram preparados a partir de plantas secas ou frescas. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antibacterianos de produtos naturais (Fennel *et al.*, 2004).

O método de bioautografia consiste na aspersão de uma suspensão de microrganismos, sobre um cromatograma, no qual se avalia a zona de inibição, se houver, à luz natural ou após a aplicação de um corante. A escolha deste método para testes se deve a sua maior facilidade e rapidez de respostas, muito embora os resultados sejam qualitativos.

3.5 Atividade antiparasitária de óleos essenciais e diterpenos

Poucos são os estudos que investigam a utilização de óleos essenciais e outros compostos presentes nas plantas frente ao tratamento de doenças parasitárias, mas com o passar dos anos, pesquisas nessa área vem adquirindo maior importância (Siqueira *et al.*, 2011). Cerca de 50% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (Koehn e Carter, 2005).

Óleos essenciais podem ser eficazes no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias, visto que propriedades como baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares em decorrência da sua lipossolubilidade podem melhorar a inserção intracelular dos componentes ativos do óleo essencial nos parasitas (Anthony *et al.*, 2004).

A *curcuma longa* L., família Zingiberaceae além de largamente utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças, é também muito citada na literatura pela variedade de atividades que apresenta, dentre elas atividade antiparasitária. Os principais compostos responsáveis pelas atividades da planta são os óleos essenciais extraídos dela e seus derivados (Filho *et al.*, 2009).

Matos (1994) comprovou que mentona e 1,2-epoxipulegona presentes em *Mentha x villosa* Huds., uma espécie de menta europeia, tem ação antiparasitária muito eficaz no tratamento das infestações por ameba e por giardia, apresentando índices de cura de 90% e 70% respectivamente.

O hidrolato, presente nos óleos essenciais de *Mentha villosa* apresentou efeito ovicida sobre nematóides gastrintestinais de bovinos em testes *in vitro*. As concentrações de hidrolato a 80% e 100% mostraram eficácia acima de 98%, valor considerado altamente efetivo segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (Nascimento *et al.*, 2009).

Dados da literatura mostram que óleos essenciais de diferentes plantas têm mostrado promissora atividade antiparasitária contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (Machado *et al.*, 2010).

Estudos em culturas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* revelaram que o nerolidol, um composto muito comum em óleos essenciais, possui atividade leishmanicida (Costa *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* realizados com *Trypanosoma cruzi*, comprovaram que diterpenos isolados de algumas espécies da família Asteraceae possuem atividade antiparasitária (Da Costa *et al.*, 1996; Ambrósio *et al.*, 2008).

Recentemente foi comprovado que diterpenos presentes em espécie *Salvia cilicica*, nativa da Turquia, apresentaram atividade antileishmania (Tan *et al.*, 2002), mas ainda são escassos os trabalhos que relatam a ação antiparasitária dessa classe de terpenos.

3.6 Gênero *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* compõe juntamente com *Naegleria fowleri* e *Balamuthia mandrillaris* as Amebas de Vida Livre (AVL) (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Sua forma é variável e possuem um núcleo definido e um grande nucléolo, possuem diversos vacúolos citoplasmáticos que fagocitam leveduras, bactérias, algas e partículas orgânicas para manutenção da vida celular. Além dos vacúolos citoplasmáticos, apresentam também um vacúolo contrátil envolvido no controle osmótico celular. Esse organismo possui microprojeções (acantopódios), que são responsáveis pela adesão a superfícies biológicas ou inertes, captura de presas e também movimento celular (Khan, 2006).

Algumas espécies de amebas de vida livre comportam-se como parasitos facultativos de animais domésticos e seres humanos e constituem um grupo de protozoários amplamente dispersos na natureza. Atualmente, as espécies de interesse clínico são *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e espécies do gênero *Acanthamoeba*.

Esses protozoários já foram identificados no ar, solo, água doce e do mar, poeira e também na orofaringe de humanos saudáveis. *Acanthamoeba* pode ocorrer sob as formas trofozoítica (metabolicamente ativa) e cística durante seu ciclo de vida. Elas não requerem um hospedeiro em seu ciclo vital e as infecções são consideradas acidentais ou oportunistas como é o caso da Encefalite Amebiana Granulomatosa e Ceratite Crônica Amebiana, mas também podem estar associadas com lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos (Alvarenga *et al.*, 2000).

A ceratite amebiana é uma inflamação da córnea ocasionada pela infecção por *Acanthamoeba*. Seu tratamento é longo e os medicamentos utilizados não possuem uma ótima eficiência e ainda há resistência ao tratamento pela forma cística deste organismo. Esta doença atinge principalmente usuários de lentes de contato, que

cada vez mais vem aumentando o número destes adeptos em todo o mundo (Saravanan *et al.*, 2008).

Por esta razão, pesquisas na busca de novos fármacos são de fundamental importância. Diversos antimicrobianos podem ser usados contra *Acanthamoeba*. Contudo, os agentes farmacológicos ideais seriam aqueles capazes de eliminar não somente os trofozoítos, mas também os cistos, que são mais resistentes.

4. Materiais e métodos

4.1. Material vegetal

Exemplares de espécies do gênero *Salvia* L. foram coletadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, conforme dados de coleta da Tabela 1. Exsicatas foram depositadas no herbário na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN). Licença para as coletas foi dada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis / Ministério do Meio Ambiente do Brasil (IBAMA / MMA, de autorização n. 29.915-1).

Tabela 1 - Dados de coleta das espécies de *Salvia* L. (Lamiaceae).

| Nome da espécie | Local de coleta | Data de coleta |
|---|---|----------------|
| Seção Coerulea Epl. | | |
| <i>S. guaranítica</i> A. St.-Hill ex Benth. | Picada Café | 08/10/2010 |
| Seção Rudes (Benth.) Epl. | | |
| <i>S. cordata</i> Benth. | Amaral Ferrador | 26/10/2010 |
| <i>S. borjensis</i> E.P. Santos | Passo do Felício, município de Julio de Castilhos | 08/12/2010 |
| | Jarí | 08/12/2010 |
| <i>S. ovalifolia</i> A. St. Hill ex Benth. | São Francisco de Paula | 11/10/2010 |
| Seção Ulisinosae Epl. | | |
| <i>S. procurrens</i> Benth. | Amaral Ferrador | 04/11/2010 |
| | Passo do Felício, município de Julio de Castilhos | 08/12/2010 |
| <i>S. uliginosa</i> Benth. | BR 116, Canoas | 29/11/2010 |

A obtenção dos óleos essenciais foi realizada a partir de partes aéreas frescas. Para a obtenção dos extratos, o material vegetal (partes aéreas se *S. procurrens* e *S. uliginosa*) foi seco em ambiente arejado ao abrigo da luz direta. Após, foi moído e armazenado até o momento da utilização.

4.2. Extração de óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos a partir das plantas frescas, reduzidas com o auxílio de triturador mecânico e submetidas à hidrodestilação em processo contínuo com aparelho de Clevenger, durante 4 horas. A quantificação foi realizada por leitura do volume coletado no frasco florentino do aparelho de Clevenger (Farmacopéia, 2001; OMS, 1992). Após, os óleos obtidos foram armazenados sob refrigeração, em frascos de vidro âmbar, até a análise dos constituintes.

4.3. Análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram diluídos em uma razão 2:100 (V/V) em éter etílico. O material diluído foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para a identificação dos constituintes presentes nas amostras e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC) para a quantificação.

4.3.1. Cromatografia gasosa

A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17 A equipado com coluna capilar de sílica fundida DB₅ (com 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5 % de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura) para a separação dos constituintes. O injetor foi programado para 220 °C (com divisão de fluxo – split/splitless – 1:20) e o programa de temperatura para a coluna operou de 60 a 300°C a 3°C/min. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 kPa e velocidade linear de 1 mL/min. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente. A composição

percentual foi obtida por integração eletrônica utilizando o software CR10 (Shimadzu) e detector de ionização de chama (DIC, 250 °C).

4.3.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Todas as amostras foram analisadas por CG/EM, utilizando aparelho Shimadzu QP 5000 com quadrupolo cilíndrico operando com energia de ionização de 70 eV e uma temperatura de interface de 250 °C. Foi utilizada coluna DB₅ (com 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5% de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura). O programa de temperatura operou de 60 a 300 °C a 3 °C/min, utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min.

4.3.3. Identificação dos constituintes

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais obtidos foi conduzida por comparação de seus respectivos espectros de massas e índices de retenção com amostras autênticas e dados obtidos na literatura (Adams, 2001), ou ainda por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 62 e NIST 12 (National Institute of Standards and Technology).

4.4 Extração via solvente

As espécies *S. procurrens* e *S. uliginosa* foram submetidas à extração com diclorometano por maceração estática, renovando-se o solvente até não verificar-se acúmulo de massa.

4.5 Análise dos extratos

Os diferentes extratos obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada utilizando-se diversos sistemas eluentes.

4.6 Método de Bioautografia

As amostras de óleos essenciais e extratos diclorometano foram testadas quanto à atividade antibacteriana contra a bactéria *Staphylococcus aureus* usando o método de bioautografia. A metodologia da bioautografia pode ser dividida em três partes, duas preparativas (cromatografias em camada delgada a preparação dos meios de cultura e microrganismos) e a própria bioautografia (Farmacopeia Brasileira, 1988). Os testes foram realizados na Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

Primeiramente foram realizadas cromatografias em camada delgada (CCD) com os óleos essenciais de *Salvia uliginosa* e *S. prucurrens* utilizando o sistema hexano: acetato de etila (97:3). Para o desenvolvimento do cromatograma dos extratos diclorometano das duas espécies foi utilizado o sistema hexano: diclorometano (1:1). Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram analisados em luz UV (254 nm) onde foram marcadas as bandas mais aparentes.

Posteriormente, as CCD foram colocadas em placas de Petri juntamente com o meio inoculado com as bactérias e, após isso, as placas foram colocadas em uma estufa a 37 °C onde permaneceram por 24 horas.

Após 24 horas, os cromatogramas foram retirados da estufa e analisados. A análise foi feita a luz natural ou utilizando uma solução aquosa de cloreto de p-iodonitrotetrazolio (0,01 g/100 mL) que marca com coloração vermelha onde estão

presentes os microrganismos vivos. As bandas que apresentaram atividade positiva para as bactérias permanecem incolores. Logo, essas bandas foram raspadas e analisadas em CG-EM para verificar a identidade do(s) composto(s) ativo(s).

4.7 Avaliação da Atividade Amebicida

Este teste foi realizado apenas com os extratos diclorometano das espécies da seção Uliginosae devido ao baixo rendimento de óleos essenciais das outras espécies e das mesmas. Os extratos foram solubilizado com 1% de Tween 20 e água para obtenção de uma solução com concentração de 20 mg/mL. Para realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL das culturas de *Acanthamoeba* (na concentração de $1,6 \times 10^4$ trofozoítos/mL) e 100 µL de cada solução teste foram inoculadas em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi selada com parafilme e incubada a 30 °C, sendo monitorada em microscópio invertido. Após 24 e 48 horas, os trofozoítos viáveis foram contados utilizando uma câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal, verificando assim também os cistos. A viabilidade foi verificada utilizando azul de tripan. Como controle negativo foi utilizado água estéril contendo 1% de Tween 20 e como controle positivo foi utilizado metronidazol na concentração de 32 µg/mL (Ondarza *et al.*, 2006), testado contra a cepa de origem clínica. Os experimentos foram realizados em triplicata com ao menos duas repetições.

5. Resultados e discussão

Espécies do gênero *Salvia* encontradas no Rio Grande do Sul subdividem-se em oito seções, sendo que as seis espécies coletadas e analisadas nesse trabalho são representantes das seções *Coerulea* Epl., *Rudes* (Benth.) Epl. e *Uliginosae* Epl. Assim, os resultados das análises cromatográficas dessas espécies foram agrupados de acordo com as três diferentes seções as quais as espécies pertencem.

5.1 Rendimento e Composição química do Óleo Essencial de *Salvia guaranitica* (Seção *Coerulea*)

O rendimento do óleo essencial, baseado no seu peso fresco (v/p), foi de 0,05%. A composição do óleo extraído de *S. guaranitica*, junto com o índice de retenção e porcentagem dos componentes identificados foi encontrado utilizando CG-EM (figura 10) e estão sumarizados na tabela 2. Foram detectados 54 compostos para esta espécie. O composto beta-cariofileno foi o principal componente do óleo, representando 18,94% do mesmo. Este sesquiterpeno não é comumente encontrado em óleos essenciais de espécies de *Salvia*, mas já foi identificado no óleo essencial obtido das partes aéreas de *S. officinalis* e *S. triloba*, ambas espécies exóticas cultivadas no Rio Grande do Sul. A partir do óleo essencial dessas duas espécies, 13 componentes foram identificados sendo α -tujona e 1,8-cineol os principais componentes (Delamare *et al.*, 2007).

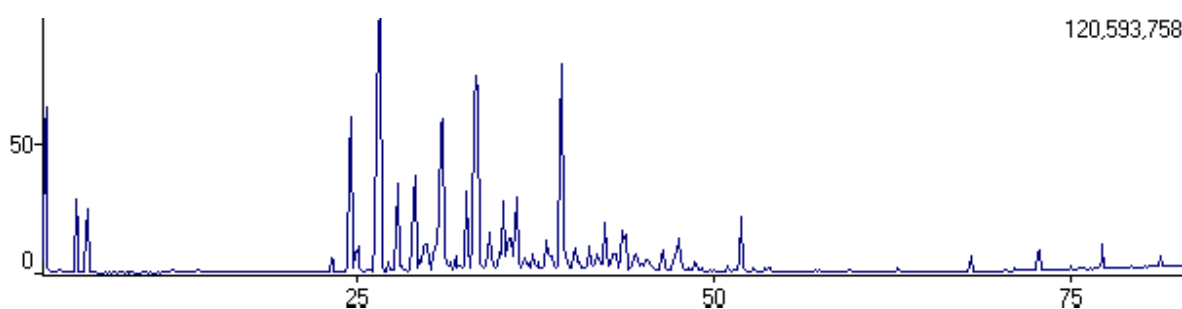


Figura 10. Cromatograma do óleo essencial de *S. guaranitica* obtido por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de *S. guaranitica*, pertencente à seção *Coeruleae*.

| N° do Pico | IR* | Componentes | % |
|------------|------|------------------------------|------|
| 1 | 1346 | α -cubebeno | 0,3 |
| 2 | 1373 | α -copaeno | 6,4 |
| 3 | 1379 | β -bourbuneno | 0,4 |
| 4 | 1385 | β -cubebeno | 0,5 |
| 5 | 1387 | β -elemeno | TR |
| 6 | 1418 | β -cariofileno | 18,9 |
| 7 | 1423 | β -gurjuneno | 0,1 |
| 8 | 1432 | α -guaieno | 0,2 |
| 9 | 1448 | α -humuleno | 2,6 |
| 10 | 1471 | γ -muuroleno | 0,8 |
| 11 | 1475 | Germacreno D | 3,3 |
| 12 | 1479 | Ni | 0,2 |
| 13 | 1484 | Trans-muurola-4(14), 5-dieno | 0,3 |
| 14 | 1489 | Valenceno | 0,6 |
| 15 | 1491 | α -selineno | 0,3 |
| 16 | 1493 | α -muuroleno | 0,6 |
| 17 | 1497 | Germacreno A | 0,3 |
| 18 | 1506 | γ -cadineno | 0,4 |
| 19 | 1511 | Cubebol | 1,2 |
| 20 | 1521 | δ -cadineno | 7,7 |
| 21 | 1527 | Cadina-1,4-dieno | 0,4 |
| 22 | 1533 | α -cadineno | 0,1 |
| 23 | 1536 | α -calacoreno | 0,2 |
| 24 | 1545 | Ni | 0,4 |
| 25 | 1548 | Elemol | TR |
| 26 | 1565 | <i>E</i> -nerolidol | 2,2 |
| 27 | 1580 | Oxido de cariofileno | 9,6 |
| 28 | 1583 | Globulol | 4,8 |
| 29 | 1605 | Epóxido de humuleno II | 1,0 |
| 30 | 1609 | Ni | 0,3 |
| 31 | 1624 | 1- <i>epi</i> -cubebol | 0,4 |
| 32 | 1631 | Ni | 2,2 |
| 33 | 1634 | Cariofiladienol II | 0,4 |
| 34 | 1638 | T-cadinol | 1,3 |
| 35 | 1641 | T-muurolol | 0,8 |

Tabela 2- Composição química do óleo essencial de *S. guaranitica*, pertencente à seção *Coeruleae*

| N° do Pico | IR* | Componentes | % |
|------------|------|--------------------|------|
| 36 | 1645 | α -muurolol | 0,9 |
| 37 | 1648 | β -eudesmol | 0,3 |
| 38 | 1655 | α -cadinol | 2,6 |
| 39 | 1666 | Ni | 0,2 |
| 40 | 1670 | Ni | 0,3 |
| 41 | 1684 | Khusinol | 0,4 |
| 42 | 1688 | Ni | 0,2 |
| 43 | 1695 | Tridecanona | 0,1 |
| 44 | 1710 | Pentadecanal | 0,7 |
| 45 | 1718 | Ni | 0,3 |
| 46 | 1740 | 2E, 6Z-farnesol | 11,4 |
| 47 | 1747 | Ni | 0,1 |
| 48 | 1763 | Ni | 0,5 |
| 49 | 1770 | Ni | 0,2 |
| 50 | 1790 | Ni | 0,5 |
| 51 | 1806 | Ni | 0,3 |
| 52 | 1822 | Ni | 1,3 |
| 53 | 1838 | Ni | 0,3 |
| 54 | 1842 | Ni | 0,3 |

IR* - índice de retenção na coluna DB-5; Ni - não identificado; TR – traços.

5.2. Rendimento e Composição química do Óleo Essencial de *Salvia cordata*, *S. ovalifolia* e *S. borjensis* (Seção *Rudes*)

O rendimento dos óleos essenciais foi calculado em função do volume obtido e do peso de material vegetal extraído, sendo em torno de 0,02% (v/p) para todas as espécies.

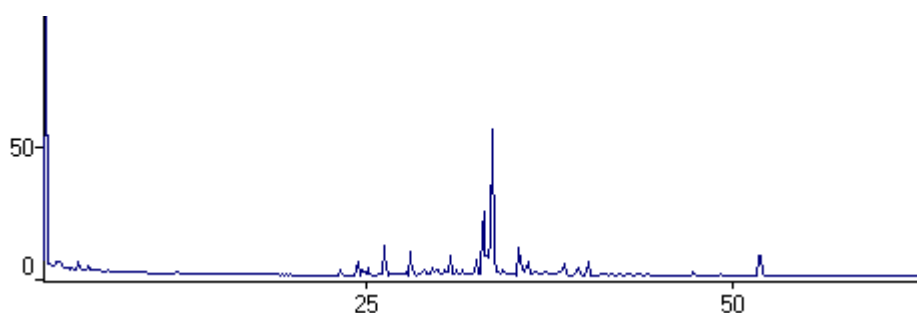
A composição dos óleos extraídos das espécies, junto com os índices de retenção e porcentagem dos componentes identificados, foi determinada utilizando CG/EM (figura 11) e está sumarizada na tabela 3. Foram detectados 41 compostos em *S. cordata*, 28 em *S. ovalifolia* e 52 compostos em *S. borjensis*. Na composição química dos óleos essenciais das três espécies analisadas verificou-se a presença de

sesquiterpenos e alguns ácidos graxos de cadeia longa. Para *S. cordata*, *epi*-globulol foi o composto majoritário (32,3%); em *S. ovalifolia* houve a presença de nonadecanal (14,0% e 56,7%) nas duas amostras, coletadas nos municípios de Caçapava do Sul e em São Francisco de Paula, respectivamente. No caso da espécie *S. borjensis*, o composto majoritário foi espatulenol para as duas amostras (38,1% e 18,7%), de coletas diferentes. Essa diferença na concentração dos compostos majoritários pode ocorrer em função das condições edafoclimáticas sob as quais as plantas se desenvolveram. Tais condições incluem a insolação, a umidade, o solo e também a altitude. Todos estes fatores podem influenciar na composição dos óleos essenciais, não somente de forma quantitativa quanto qualitativa.

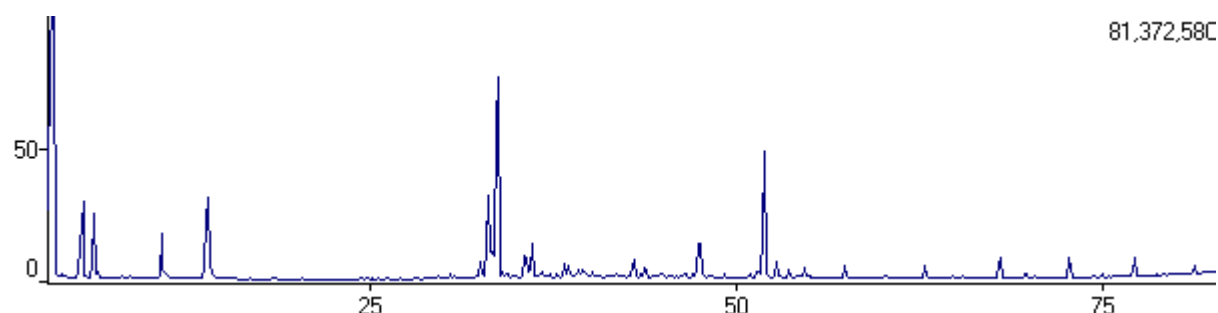
Espatulenol foi previamente encontrado em outras espécies de *Salvia* tais como *S. candidissima*, *S. fruticosa*, *S. hydrangea*, *S. officinalis*, *S. purpurea* e *S. rubifolia* (Savelev *et al.*, 2004; Pitarokili *et al.*, 2006; Kotan *et al.*, 2008; Cardile *et al.*, 2009).

Os compostos majoritários das outras duas espécies representantes dessa seção, como nonadecanal e *epi*-globulol, não foram relatados para nenhuma espécie de *Salvia* estudada anteriormente.

A.



B.



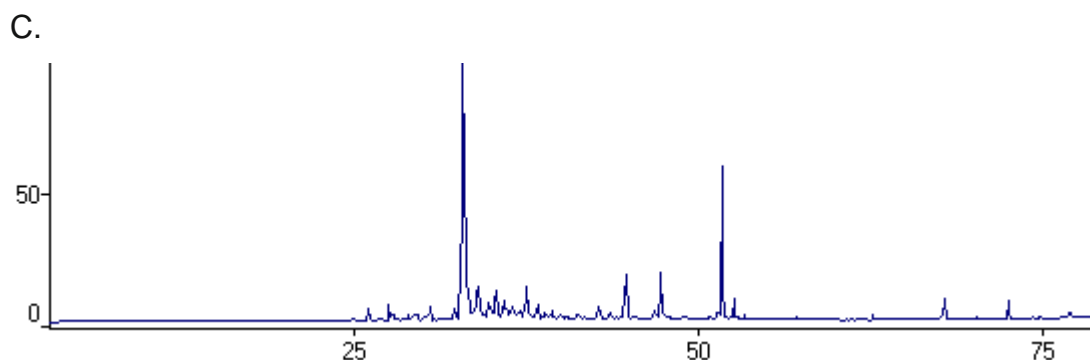


Figura 11. Cromatogramas do óleo essencial de **A.** *Salvia cordata*, **B.** *S. ovalifolia* e **C.** *S. borjensis* obtidos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *S. cordata*, *S. ovalifolia* e *S. borjensis*, pertencentes à seção *Rudes*.

| Pico | IR* | Componentes | <i>S. ovalifolia</i> | | <i>S. borjensis</i> | | <i>S. cordata</i> |
|------|------|---------------------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|-------------------|
| | | | % (1) | % (2) | % (1) | % (2) | % |
| 1 | 872 | 3- <i>cis</i> -hexenol | | | | | 0,8 |
| 2 | 880 | <i>n</i> -hexanol | | | | | 0,4 |
| 3 | 1343 | α -cubebeno | | | | 0,6 | 0,8 |
| 4 | 1345 | α -copaeno | | | | 1,9 | 2,0 |
| 5 | 1368 | β -bourboneno | | | | 1,2 | 0,6 |
| 6 | 1376 | β -cubebeno | | | | 0,5 | |
| 7 | 1382 | β -elemeno | | | | 0,2 | 1,0 |
| 8 | 1384 | β -cedreno | | | | 0,5 | |
| 9 | 1403 | β -cariofileno | | | 0,7 | 15,5 | 4,5 |
| 10 | 1413 | β -copaeno | | | | 0,5 | |
| 11 | 1420 | β -gurjuneno | | | | 0,4 | |
| 12 | 1435 | α -humuleno | | | 1,2 | 1,1 | |
| 13 | 1440 | Aromadendreno | | | | | 4,0 |
| 14 | 1443 | Allo-aromadendreno | | | | 2,2 | |
| 15 | 1450 | γ -muuroleno | | | | 4,4 | TR |
| 16 | 1470 | Germacreno D | | | | 7,0 | 0,5 |
| 17 | 1473 | β -selineno | | | | 0,9 | 0,3 |
| 18 | 1475 | Viridifloreno | | | | | 1,2 |
| 19 | 1477 | Fenil etil 3-metil butanoato | | | | 0,6 | |
| 20 | 1479 | Biciclogermacreno | | | | 7,9 | |
| 21 | 1481 | α amorfeno | | | | | 0,9 |
| 22 | 1484 | Cupareno | | | | | 0,8 |
| 24 | 1488 | α -muuroleno | | | | 0,8 | |

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *S. cordata*, *S. ovalifolia* e *S. borjensis*, pertencentes à seção *Rudes*.

| Pico | IR* | Componentes | <i>S. ovalifolia</i> | | <i>S. borjensis</i> | | <i>S. cordata</i> |
|------|------|---|----------------------|-------|---------------------|-------|-------------------|
| | | | % (1) | % (2) | % (1) | % (2) | % |
| 25 | 1491 | Germacreno A | | | | 0,5 | |
| 26 | 1494 | γ -cadineno | 0,3 | | | 0,2 | 0,9 |
| 27 | 1503 | Cubebol | | | | | 0,4 |
| 28 | 1506 | δ -cadineno | TR | | 1,1 | 5,8 | 3,1 |
| 29 | 1515 | Espatuleno | 9,9 | 0,4 | 38,2 | 18,7 | 11,6 |
| 30 | 1552 | <i>E</i> -nerolidol | 1,9 | | 0,7 | | 2,5 |
| 31 | 1569 | Óxido de cariofileno | 2,4 | 1,8 | TR | | 3,3 |
| 32 | 1576 | Globulol | 3,8 | | 5,9 | 1,5 | 3,7 |
| 33 | 1579 | <i>Epi</i> -globulol | | | 1,0 | 1,2 | 32,3 |
| 34 | 1586 | Guaiol | | | | 0,7 | |
| 35 | 1592 | 5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol | 0,6 | | | 1,4 | 0,5 |
| 36 | 1621 | Eudesmol | | | | 0,3 | |
| 37 | 1628 | Iso-espatuleno | | | 1,6 | 1,8 | 4,6 |
| 38 | 1633 | T-cadinol | | | 3,4 | | 1,4 |
| 39 | 1634 | Cubenol | | | | 2,7 | 0,4 |
| 40 | 1635 | T-muurolo | | | | | 2,0 |
| 41 | 1637 | α -muurolo | 0,5 | | | 0,3 | 2,2 |
| 43 | 1640 | α -cadinol | 3,5 | | 1,4 | 2,1 | |
| 44 | 1664 | Khusinol | | | | 0,1 | |
| 45 | 1684 | Pentadecanona | | | 2,8 | 1,4 | |
| 46 | 1734 | 2 <i>E</i> , 6 <i>Z</i> -farnesol | 0,6 | | | | |
| 47 | 1839 | 2-heptadecanona | 1,6 | 3,7 | | | |
| 48 | 1891 | Heptadecanona | | | 3,7 | 1,6 | |
| 49 | 1970 | Ácido hexadecanóico | 4,8 | 6,3 | 6,3 | 1,5 | |
| 50 | 2092 | Heneicosano | 0,6 | 0,3 | | | |
| 51 | 2110 | Nonadecanal | 14,0 | 56,7 | 15,9 | 5,0 | 3,3 |
| 52 | 2203 | Docosano | 0,9 | | | | |
| 53 | 2302 | Tricosano | 1,0 | 2,0 | | | |
| 54 | 2472 | 1-pentacoseno | | 0,3 | | | |
| 55 | 2498 | Pentacosano | 1,2 | 2,9 | | | |
| 56 | 2702 | Heptacosano | 1,9 | 4,6 | 1,8 | | |
| 57 | 2798 | Octacosano | | 0,2 | | | |
| 58 | 2901 | Nonacosano | 1,8 | 2,3 | 1,5 | | |
| 59 | 3101 | Untriacontano | 1,7 | 1,3 | | | |

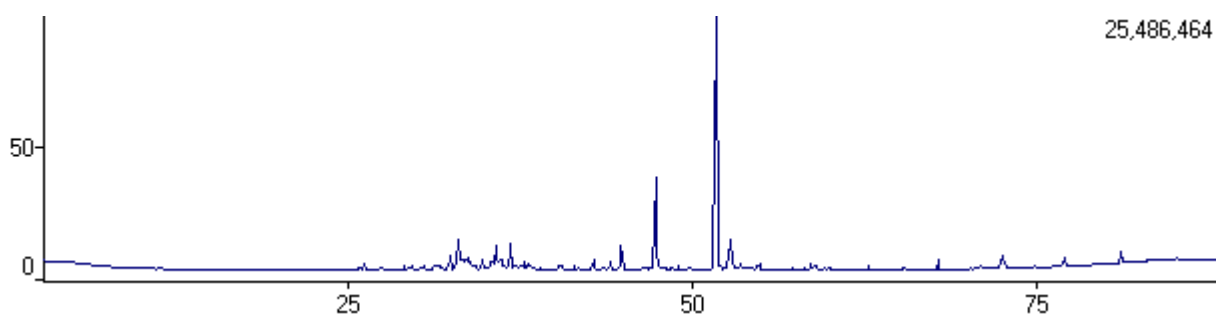
IR* - índice de retenção na coluna DB-5; Tr – traços.

5.3. Rendimento e Composição Química do Óleo Essencial de *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa* (Seção *Uliginosae*)

As espécies *Salvia procurrens* e *S. uliginosa* são duas das três espécies representantes da seção *Uliginosae* no Rio Grande do Sul. Apresentam-se na forma de ervas rasteiras ou subarbustos, suas flores são azuis e nelas existem glândulas de coloração ambar visíveis a olho nu. Amostras dessas espécies foram coletadas nos municípios de Amaral Ferrador, Canoas (BR 116) e Julio de Catilhos, entre os períodos de outubro de 2010 a junho de 2011.

O rendimento dos óleos essenciais, baseado em seu peso fresco (v/p), foi de 0,2% para *Salvia procurrens* e 0,1% para *S. uliginosa*. As duas amostras se apresentaram de coloração laranja-avermelhada. A composição química do óleo extraído dessas espécies, juntamente com seus índices de retenção e porcentagem dos componentes identificados por CG/EM (figura 12) estão sumarizados na tabela 4.

A. *S. procurrens*



B. *S. uliginosa*

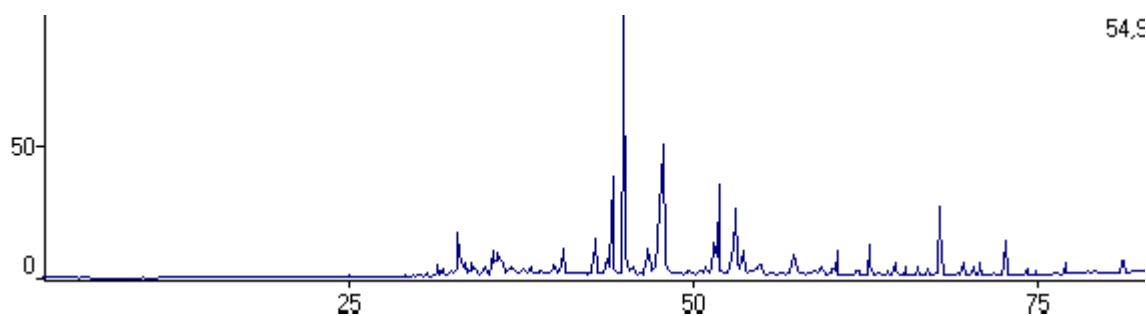


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de **A.** *Salvia procurrens* e **B.** *S. uliginosa*, obtido por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Estas espécies apresentaram sesquiterpenos e ácidos graxos como componentes majoritários. Dentre eles, o ácido hexadecanóico apresentou uma concentração de 22,18% e 30,12% para *S. procurrens* e *S. uliginosa*, respectivamente, sendo este o composto majoritário. Entre os sesquiterpenos, nonadecanal foi o que apresentou maior relevância nas análises para *S. procurrens* (13,18%) e para *S. uliginosa* foi o sesquiterpeno *n*-nonadecano (17,46%).

Tabela 4 – Composição química do óleo essencial de *S. procurrens* e *S. uliginosa*, pertencentes a seção *Uliginosae* Epl.

| Pico | IR* | Componentes | <i>S. procurrens</i> | | <i>S. uliginosa</i> |
|------|------|--|----------------------|-------|---------------------|
| | | | % (1) | % (2) | % |
| 1 | 1370 | α -copaeno | 1,3 | 1,1 | |
| 2 | 1452 | Allo-aromadendreno | 0,2 | | |
| 3 | 1479 | <i>E</i> - β -ionona | 0,8 | 2,5 | |
| 5 | 1515 | <i>Cis</i> -calameneno | 0,6 | | |
| 8 | 1561 | <i>E</i> -nerolidol | TR | | |
| 9 | 1566 | 3 <i>Z</i> -benzoato de hexenila | 0,3 | | |
| 10 | 1572 | Espatuleno | | 1,1 | 1,9 |
| 11 | 1576 | Óxido de cariofileno | 0,8 | | 0,9 |
| 12 | 1578 | Globulol | | | 0,6 |
| 13 | 1579 | Ni | 0,1 | | |
| 14 | 1586 | <i>Epi</i> -globulol | | | 0,9 |
| 15 | 1590 | Gleenol | 3,4 | 3,6 | |
| 16 | 1598 | 5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> -eudesmol | | | 0,3 |
| 17 | 1624 | 1- <i>epi</i> -cubenol | 0,5 | 0,6 | 0,5 |

Tabela 4 – Composição química do óleo essencial de *S. procurrens* e *S. uliginosa*, pertencentes a seção *Uliginosae* Epl.

| Pico | IR* | Componentes | <i>S. procurrens</i> | | <i>S. uliginosa</i> |
|------|------|----------------------|----------------------|-------|---------------------|
| | | | % (1) | % (2) | % |
| 18 | 1637 | iso-espatulenol | 0,7 | | |
| 19 | 1640 | T-cadinol | 0,3 | 1,0 | |
| 20 | 1643 | T-muurolol | 0,9 | | 0,4 |
| 21 | 1646 | α -muurolol | | | 1,1 |
| 22 | 1652 | α -cadinol | 0,5 | 0,8 | |
| 23 | 1670 | Cadaleno | 0,2 | | |
| 24 | 1707 | Pentadecanal | | | 0,2 |
| 25 | 1778 | Ácido pentadecanóico | 4,1 | | |
| 26 | 1833 | Tridecanediol | 0,2 | | |
| 27 | 1839 | Heptadecanona | 1,3 | | |
| 28 | 1861 | Ftalato | 0,5 | | 0,7 |
| 29 | 1895 | 2-heptadecanona | 2,3 | 3,1 | |
| 30 | 1896 | <i>n</i> -nonadecano | | | 17,5 |
| 31 | 1982 | Ácido hexadecanóico | 22,2 | 18,7 | 30,1 |
| 32 | 2112 | Nonadecanal | 13,2 | 0,2 | 4,5 |
| 33 | 2172 | Ácido octadecanóico | 1,1 | | 1,1 |
| 34 | 2303 | Tricosano | 0,7 | | 0,8 |
| 35 | 2500 | Pentacosano | 0,7 | | 1,3 |
| 36 | 2598 | Hexacosano | | 0,3 | 0,3 |
| 37 | 2704 | Heptacosano | 1,2 | | 2,9 |
| 38 | 2802 | Octacosano | 0,3 | 0,4 | 0,3 |
| 39 | 2906 | Nonacosano | 2,6 | 0,4 | 1,5 |
| 40 | 3001 | Triacotano | 0,6 | 0,6 | |
| 41 | 3099 | Untriacontano | | | 0,5 |
| 42 | 3106 | Hentriacontano | 1,8 | | |
| 43 | 3201 | Dotriacontano | 0,4 | | |
| 44 | 3225 | Tritriacontano | 2,1 | | |

IR* - índice de retenção na coluna DB-5, Ni - não identificado.

Devido às diferentes combinações de umidade, relevo, clima, vegetação, temperatura e solos do Rio Grande do Sul, o teor e a composição química dos óleos essenciais podem variar. Estudos recentes com uma espécie de *Eupatorium* (Asteraceae) demonstraram que existe correlação positiva entre a proporção de macronutrientes no solo e o teor do óleo essencial das partes aéreas dessa planta

(Gudaityté e Venskutonis, 2007). Outro fator muito importante para estas diferenças é o clima. Na maior parte do Estado ocorre clima subtropical úmido sem estiagem, exceto nos locais com altitude próximas ou superiores a 600 m onde ocorre clima mais temperado úmido sem estiagem. Os diferentes locais de coleta de *S. procurrens*, em altitudes de cerca de 150 m (Amaral ferrador) e 500 m (Julio de Castilhos), poderiam justificar as diferenças qualitativas e quantitativas encontradas.

A sazonalidade também tem influência sobre a produção de óleo essencial em muitas espécies. Muitos autores demonstraram que o rendimento de óleo é maior nos meses mais quentes para *Salvia officinalis*, *Eucalyptus citriodora* e *Artemisia dracuncululus* (Sangwan *et al.*, 2001). Esses fatores podem ter influenciado no teor e na composição química dos óleos essenciais dessas espécies.

Como já citado anteriormente, muitos são os estudos que relatam a composição química de diferentes espécies de *Salvia*. Cabe ressaltar que, na maioria deles, a presença de compostos monoterpênicos é bastante relevante. Ozkan *et al.* (2010) estudaram a composição química do óleo essencial de *S. pisidica* e suas possíveis atividades biológicas. Esta espécie é uma das 86 espécies nativas do Turquia. A análise química da composição mostrou que 90% dos compostos são monoterpênicos, entre eles o linalol, verbenol, limoneno, canfeno, α -pineno e *p*-cimeno estavam presentes no óleo.

Outro estudo realizado por Kotan *et al.* (2008) mostrou que o óleo de *S. hydrangea*, espécie encontrada na Turquia, foi caracterizado por uma quantidade relativamente elevada de monoterpênicos oxigenados (69,6%) e sesquiterpenos (23,4%). Resultados semelhantes ocorreram com essa mesma espécie coletada no Irã (Rustaiyan *et al.*, 1997; Barazandeh, 2004).

Delamare *et al.* (2007) identificaram os compostos presentes em duas espécies de *Salvia*: *S. officinalis* e *S. triloba*, ambas espécies exóticas cultivadas no Rio grande do Sul. Para estas duas espécies foram encontrados 31 componentes no óleo essencial, dentre eles 27 eram monoterpênicos.

Pitarokili *et al.* (2006) estudaram a composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Salvia* nativas da Grécia. Para *S. verticillata*, *S. verbenaca* e *S. candidissima*, os principais compostos presentes em seus óleos foram monoterpenos. *S. verticillata* apresentou 28 compostos no total do óleo, dentre eles 64,5% eram monoterpenos. *S. verbenaca* apresentou 19 compostos sendo 56,4% monoterpenos e em *S. candidissima* 36 componentes foram identificados, sendo 70,9% deles monoterpenos.

Ainda que, de um modo geral, os componentes de óleos essenciais de *Salvia* sejam do grupo dos monoterpenos, relatos de espécies ricas em sesquiterpenos também são encontrados. São exemplos óleos essenciais de *S. glutinosa* e *S. hypoleuca* apresentando 32,2% e 44,9% de sesquiterpenos, respectivamente (Gülacti (Gülacti *et al.*, 1996; Nickavar *et al.*, 2005).

Com base nesses estudos pode-se concluir que na maioria das espécies de *Salvia* o maior grupo de compostos presentes nos óleos essenciais é constituído por monoterpenos. A variação de compostos verificadas nesse trabalho pode ser atribuída à diferença de região geográfica, altitude, clima e hora da coleta. Porém, é necessário levar em consideração que as plantas nativas pertencem a outros táxons, ainda não investigados do ponto de vista químico. Assim, a ausência de monoterpenos e presença de compostos como ácido hexadecanóico, por exemplo, pode ser uma característica taxonômica. A fim de confirmar essa hipótese, análise de outros vegetais pertencentes a essas seções são necessárias.

5.4 Extração via solvente e Análise preliminar dos extratos

As partes aéreas das espécies *S. procurrentis* e *S. uliginosa*, ambas da seção *Uliginosae*, apresentam glândulas de coloração âmbar, visíveis a olho nu. Essas estruturas coloridas foram observadas somente nessas duas espécies.

Usualmente os constituintes encontrados em glândulas secretoras são óleos essenciais. Entretanto, diterpenos também podem ser encontrados nessas estruturas vegetais (Siebert, 2004). Considerando o baixíssimo rendimento em óleos essenciais das espécies de *Salvia* estudadas, decidiu-se obter extratos diclorometano das duas espécies portadoras de glândulas coloridas, objetivando verificar a presença de diterpenos nestas plantas.

As partes aéreas das duas espécies foram submetidas à extração com diclorometano. No momento do contato do solvente com o material vegetal, desenvolveu-se uma intensa coloração laranja. Com o passar do tempo, o extrato tornou-se esverdeado devido à concomitante extração de clorofilas.

O gênero *Salvia*, conforme citado anteriormente, é uma rica fonte de diterpenos. Grande parte dos diterpenos é incolor devido à ausência de insaturações na molécula. No entanto, os diterpenos de núcleo abietano apresentam estrutura saturada, podendo se apresentar fortemente coloridos devido à presença de grupamento quinona. Esses abietano-quinonas, diterpenos encontrados em espécies desse gênero, podem apresentar uma, duas ou até três carbonilas na molécula (Kabouche e Kabouche, 2008).

As análises cromatográficas foram realizadas em gel de sílica utilizando diferentes proporções de diclorometano: hexano, conforme indicado na literatura para diterpenos. Após o desenvolvimento do cromatograma, verificou-se em ambas as plantas a presença de diversas bandas fortemente coloridas no visível, não havendo necessidade de agentes cromogênicos.

Assim, é possível sugerir que os componentes presentes nas glândulas dessas espécies sejam diterpenos de núcleo abietano-quinona.

5.5. Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Extratos Diclorometano de *S. procurrens* e *S. uliginosa*

Muitos são os estudos que relatam o potencial biológico de óleos essenciais. Entre as atividades mais estudadas está a antibacteriana, que vem ganhando destaque em muitas pesquisas nas últimas décadas (Magiatis *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1999; Bailac *et al.*, 2000).

Produtos isolados de óleos essenciais foram avaliados devido a esta atividade e muitos compostos mostraram ação antibacteriana, destacando-se: tujona, 1,8 cineol e cânfora (Sivropoulou *et al.*, 1997; Delamare *et al.*, 2007), cariofileno e óxido de cariofileno (Azaz *et al.*, 2002), carvacrol, γ -terpineno e *p*-cimeno (Baydar *et al.*, 2004), limoneno, linalol, nerol, geraniol, verbenona, α -pineno, octanal, ácido octanóico (Inouye *et al.*, 2001).

Muitas técnicas diferentes são utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana de óleos e extratos, sendo uma delas a cromatografia em camada delgada (CCD) com detecção por bioautografia. Esta consiste numa modificação na técnica de difusão em ágar, utilizada para detectar compostos com atividade antibacteriana em misturas. Basicamente esta técnica consiste no acoplamento de uma placa de CCD em uma placa de Petri com o microrganismo já inoculado. Esta placa, contendo o inóculo é incubada a 37 °C durante 24 horas. Esta técnica permite a detecção de compostos microbiologicamente ativos em amostras de óleos essenciais e extratos.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos diclorometano de *S. uliginosa* e *S. procurrens* foi testada através do método de bioautografia. Para tanto, a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi inoculada em 100 mL de meio de cultura Muller-Hinton. Para o ensaio, todas as amostras (aproximadamente 0,05 mL de óleo e 50 mg de extrato) foram ressuspensas em 1 mL de diclorometano.

As amostras foram aplicadas sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm) as quais foram submetidas ao sistema eluente hexano: acetato de etila (97:3), para os óleos essenciais e hexano: diclorometano (1:1) para o extrato diclorometano. Após secagem, as placas cromatografadas foram colocadas em uma placa de Petri e sobre

elas verteu-se 20 mL do meio de cultura Muller-Hinton contendo a suspensão bacteriana. Em seguida as mesmas foram incubadas à 37 °C. Após nítido crescimento dos microrganismos (24 h), a ocorrência ou não, de halos de inibição foi observada. Os testes foram realizados em triplicata.

O ensaio de atividade antibacteriana permitiu evidenciar que alguns dos componentes dos óleos essenciais de *S. procurrans* e *S. uliginosa*, da Seção Uliginosae, foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, conforme pode ser verificado nas figuras 13 e 14.

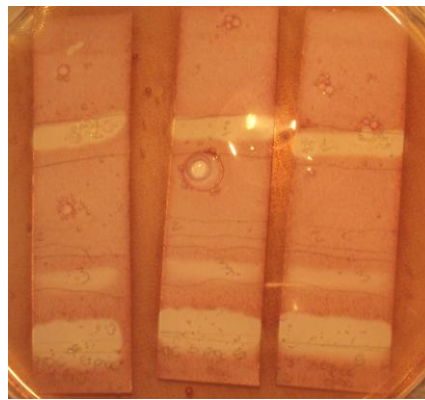


Figura 13. Bioautografia do óleo essencial de *S. procurrans* demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano.

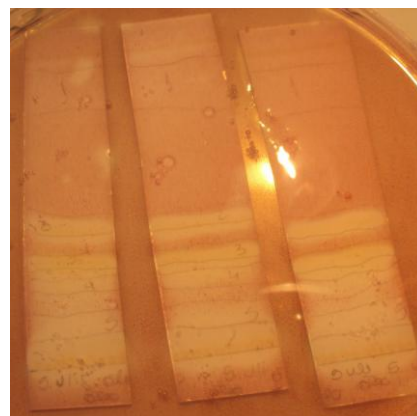


Figura 14. Bioautografia do óleo essencial de *S. uliginosa* demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano.

Os ensaios de bioautografia foram também aplicados aos extratos diclorometano dessas duas espécies. Os resultados podem ser verificados nas figuras 15 e 16.

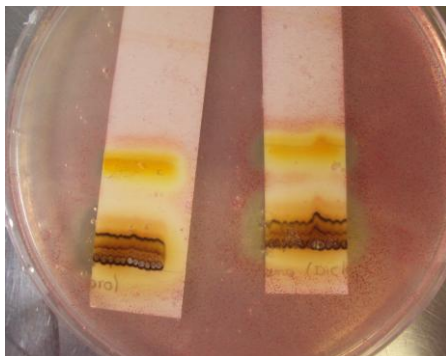


Figura 15. Bioautografia do extrato diclorometano de *S. procurrens* mostrando halos de crescimento bacteriano.

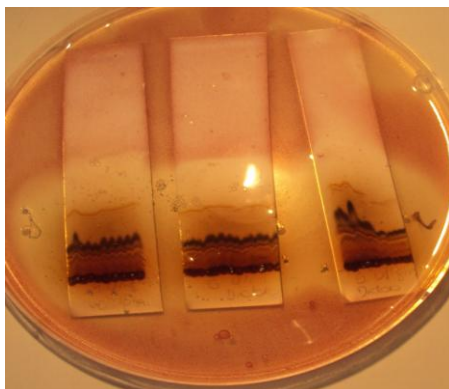


Figura 16. Bioautografia do extrato diclorometano de *S. uliginosa* demonstrando halos de inibição de crescimento bacteriano

Verificou-se que nos extratos diclorometano das duas espécies há presença de compostos com evidente atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Pela polaridade dos compostos evidenciados nos cromatogramas e pelas colorações apresentadas, pode-se inferir que, ao menos em parte, os compostos responsáveis pela atividade sejam da classe dos diterpenóides e alguns, possivelmente, do tipo abietano-quinona.

Por apresentar limitações para substâncias com baixa difusibilidade no meio de cultura, esse método de ensaio para atividade antibacteriana foi utilizado somente

como teste preliminar qualitativo. Emprega-se esse método para detecção de atividade antibacteriana, pois é um método simples, rápido e confiável para testar os efeitos antimicrobianos de extratos de plantas e de substâncias puras, podendo assim direcionar o isolamento dos compostos bioativos, tendo sido empregados com extratos de diversas plantas medicinais (Hostettmann, 1998; Ulubelen *et al.*, 2000).

Assim, os resultados obtidos nesse estudo são preliminares e para determinação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais e dos extratos diclorometano das espécies de *Salvia* em estudo, novos experimentos são necessários, utilizando outras técnicas e outros microrganismos. Da mesma forma, fracionamento das amostras deverá ser realizado visando determinar os componentes responsáveis pela atividade. Entretanto, essa etapa deverá ser realizada apenas com os extratos diclorometano uma vez que o baixíssimo rendimento de óleos essenciais não permite o fracionamento dos mesmos.

5.6. Atividade Amebicida do Extrato Diclorometano de *Salvia procurrens* e *Salvia uliginosa*

A atividade amebicida dos extratos diclorometano de *S. procurrens* e *S. uliginosa* foi testada contra trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*. Os experimentos foram acompanhados por meio de microscópio óptico invertido durante todo o período dos testes para verificação da viabilidade celular dos trofozoítos. Para verificação da viabilidade dos trofozoítos, foi utilizado o corante azul de Tripan, que tem a propriedade de corar células inviáveis. Os testes foram realizados em placas de cultura de células e as contagens foram realizadas em câmara de Fuchs-Rosenthal.

As concentrações finais testadas (7,5, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL) foram definidas com base em trabalhos prévios realizados pelo grupo de pesquisa (Ródio *et al.*, 2008; Sauter *et al.*, 2011).

Os experimentos realizados com a cepa de *A. polyphaga* de procedência clínica (ATCC 30461) mostraram que após 24 horas o extrato diclorometano de *S. procurrens* não apresentou atividade, enquanto que o extrato de *S. uliginosa* mostrou atividade de 100% nas concentrações de 7,5 e 5 mg/mL, 70% nas concentrações 2,5 mg/mL e cerca de 60% em 1,25 mg/mL. Contudo, na concentração de 0,625 mg/mL o extrato não apresentou atividade (figura 17). O grupo controle recebeu apenas água com 1% do agente tensoativo (Tween 20).

Os resultados foram baseados em comparação com o grupo controle, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

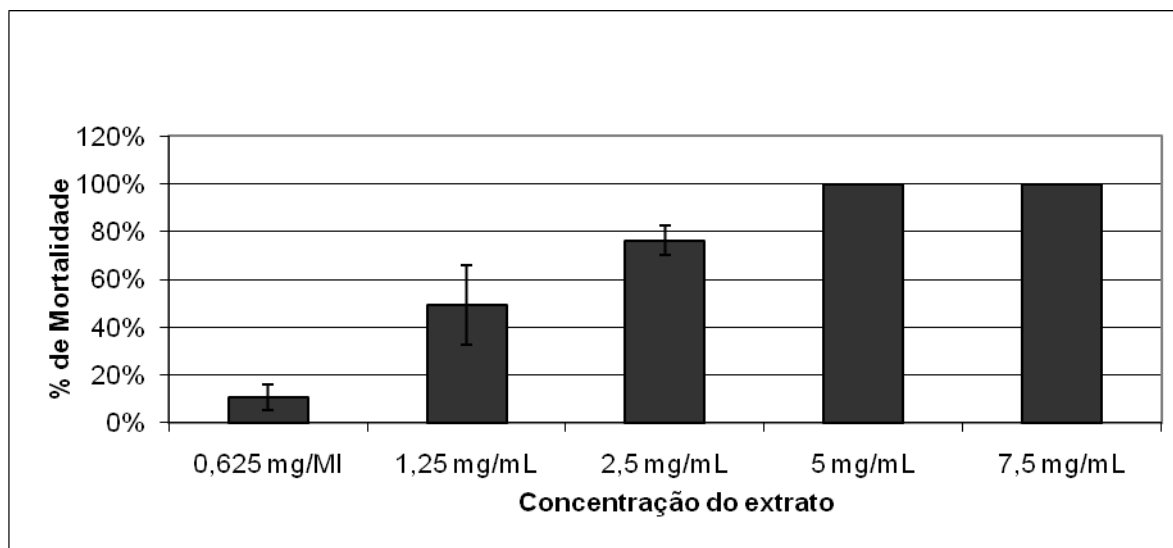


Figura 17. Atividade amebicida do extrato de *Salvia uliginosa* frente a *A. polyphaga* (AP2 - ATCC 30461). As colunas representam as médias da atividade de cada concentração de extrato testada, em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle)

A atividade amebicida verificada neste trabalho poderia ser atribuída aos diterpenos, prováveis componentes do extrato diclorometano de *S. uliginosa*. A atividade de diterpenos frente a vários protozoários vem sendo relatada na literatura. São exemplos os diterpenos de *Azorella yareta* (Apiaceae) com atividade anti-*Trichomonas vaginalis* (Loyola *et al.*, 2001); abietano-quinonas de *Perovskia abrotanoides* (Lamiaceae) com atividade leishmanicida e antiplasmodica (Sairafianpour *et al.*, 2001).

Especificamente para o gênero *Salvia*, também são encontrados alguns relatos de atividade antiprotozoária: Kabouche e Kabouche (2008) isolaram diterpenóides do tipo abietano de espécies de *Salvia* os quais apresentaram atividade antiparasitária; Tan *et al.* (2002) isolaram dois novos diterpenos do extrato acetônico de *Salvia cilicica* e estes diterpenos apresentaram atividade antiparasitária frente a duas espécies de *Leishmania* (*L. donovani* e *L. major*). Extratos de algumas espécies de *Salvia* encontradas no sul da África apresentaram atividade antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* e os autores acreditam que essa atividade seja causada por diterpenos presentes na sua composição (Kamatou *et al.*, 2008).

Apesar de os extratos das duas espécies de *Salvia* da seção *Uliginosae* apresentarem compostos com comportamento cromatográfico de diterpenos do tipo abietano-quinona, apenas o extrato de *S. uliginosa* mostrou-se ativo. Para identificar os componentes ativos presentes no extrato é necessário proceder ao isolamento dos mesmos.

Um fato que merece ser ressaltado é que durante o tratamento com o extrato diclorometano não se verificou encistamento das amebas. Conforme citado anteriormente, o agente terapêutico ideal para o tratamento de infecções por *Acanthamoeba* necessita ser amebicida, não permitindo o encistamento dos protozoários.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho referentes às espécies de *Salvia* permitem as seguintes conclusões:

- O rendimento dos óleos essenciais extraídos foi de 0,05% para *S. guaranitica*, 0,02% para *S. ovalifolia*, *S. borjensis* e *S. cordata*, 0,1% para *S. uliginosa* e 0,2% para *S. procurrens*;
- O óleo essencial de *S. guaranitica* (seção *Coerulea*) é caracterizado pela presença exclusiva de sesquiterpenos, sendo β -cariofileno (18,9%) seu componente majoritário;
- Na composição dos óleos de *S. cordata*, *S. ovalifolia* e *S. borjensis*, todas pertencentes à seção *Rudes*, verificou-se a presença de sesquiterpenos e alguns ácidos graxos de cadeia longa. *Salvia cordata* teve como composto majoritário *epiglobulol* (32,3%); para *S. ovalifolia* nonadecanal foi o majoritário nas duas amostras (14,0% e 56,7%) e para *S. borjensis* o composto majoritário foi *espatulenol* (18,7% e 38,1%), nas duas amostras analisadas;
- Os constituintes desses óleos essenciais de *Salvia uliginosa* e *S. procurrens*, ambas pertencentes à seção *Uliginosae*, também foram sesquiterpenos e alguns ácidos graxos. Para as duas espécies o composto majoritário foi ácido hexadecanóico, 22,2% e 30,1%, para *S. procurrens* e *S. uliginosa* respectivamente;
- As glândulas de coloração âmbar presentes em *S. procurrens* e *S. uliginosa* (seção *Uliginosae*) possivelmente apresentam na sua composição diterpenos de núcleo abietano-quinona;
- Os óleos essenciais e os extratos diclorometano de *S. procurrens* e *S. uliginosa*, mostraram atividade frente à *Staphylococcus aureus* pelo método de bioautografia;
- O extrato diclorometano de *S. uliginosa* apresentou atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*. Esse extrato foi mais ativo nas concentrações de 5 e 7,5

mg/mL, inviabilizando 100% dos trofozoítos. Nas concentrações mais baixas, de 2,5 e 1,25 mg/mL o extrato inviabilizou cerca de 70% e 60% e na concentração de 0,625 mg/mL não verificou-se atividade;

Os óleos essenciais e extratos diclorometano obtidos das espécies *S. procurrens* e *S. uliginosa* apresentaram resultados promissores nos experimentos realizados *in vitro*. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para identificar os compostos presentes nestas amostras.

A diferença na composição química verificada nos óleos essenciais das espécies nativas, em relação às diversas espécies citadas na literatura, merece investigação. É possível que a ausência de monoterpenos e presença de compostos como ácido hexadecanóico seja característica de significância taxonômica para as seções a que pertencem as espécies analisadas nesse trabalho.

7. Referências

Adam, K.; Zapp, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, v. 48, p. 953-959, 1998.

Alvarenga, L.S.; Freitas, D.; Hofling-Lima, A.L. Ceratite por *Acanthamoeba*, **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, p. 155-159, 2000.

Alziar, G. Catalogue synonymique des *Salvia* L. du monde (Lamiaceae). I–VI. **Biocosme Mesoge**, v. 10, p. 3-4, 1993.

Amabeoku, G.J.; Eagles, P.; Scott, G.; Mayeng, I.; Spring, E. Analgesic and antipyretic effects of *Dodonaea angustifolia* and *Salvia africana-lutea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 117–124, 2001.

Ambrósio, S.R.; Aracawa, N.S.; Esperandim, V.R.; Albuquerque, S.; Da Costa, F.B. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1413-1415, 2008.

Anthony, J.P.; Fyfe, L.; Smith, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitology**, v. 21, p. 462-468, 2004.

Araújo, M.E.M. Química dos produtos naturais. DBQ 2010-11 (www.dbq.fc.ul.pt)

Aximoff, I.A. Longevidade floral e sucesso reprodutivo de uma espécie ornitófila de *Salvia* (Lamiaceae). 2008. A968I. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2008.

Azaz, D.; Demirci, F.; Satil, F.; Kurkçuoğlu, M.; Baser, K.H.C. Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 817–821, 2002.

Barazandeh, M.M. Volatile constituents of the oil of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. from Iran, **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 20-21, 2004.

Bailac, P.N.; Dellacasa, A.D.; Bernasconi, H.O.; Firpo N.H.; Ponzi, M.I. Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*, **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, v. 45, p. 207-211, 2000.

Baricevic, D.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 125-132, 2001.

Bisio, A.; Tommasi, N.D.; Romussi, G. Diterpenoids from *Salvia wagneriana*, **Planta Medica**, v. 70, p. 452–457, 2004.

Baydar, H.; Sagdiç, O.; Ozkan, G.; Karadogan, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169-172, 2004.

Bouaziz, M.; Yangui, T.; Sayadi, S.; Dhouib, A.D. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2755-2760, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 104 de 26 de abril de 1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 14 de maio, 1999.

Brenna, E.; Claudio, F. Serra, s. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: Asymmetry pergamon**, v. 14, p. 1-42, 2003.

Bretmaier, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner, p. 227, 1999.

Càrdenas, J.; Rodriguez-Hahnt, L. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia candicans*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 199-204, 1994.

Cardile, V.; Russob, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Senatore, F.; Arnold, N.A.; Piozzi, F. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 265-272, 2009.

Castro, H.G.; Ferreira, F.A.; da Silva, D.J.H.; Mosquim, P.R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2. Ed.. Viçosa: UFV, 113 p., 2004.

Claben-Bockhoff, R.; Wester, S.; Tweraser, P. The staminal lever mechanism in *Salvia* - a review. **Plant Biology**, v. 5, p. 33-41, 2003.

Claben-Bockhoff, R.; Speck, T.; Tweraser, P.; Wester, S.; Thimm, R.; Reith, M. The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? **Organisms Diversity and Evolution**, v. 4, p. 189-205, 2004.

Cordell, G.A.; Colvard, M.D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 5-14, 2005.

Costa, E.V.; Pinheiro, M.L.B.; Silva, J.R.A.; Maia, B.H.L.N.S.; Duarte, M.C.T.; Amaral, A.C. F.; Machado, G.M.C.; Leon, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae) **Química Nova**, v. 32, p. 78, 2009.

Darias, V.; Bravo, L.; Rabanal, R.; Sanchez-Mateo, C. C.; Martin Herrera, D. A. Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several Lamiaceae species from the Canary Islands, **Planta Medica**, v. 56, p. 70-72, 1990.

Da Costa, F.B.; Albuquerque, S., Vichnewski, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity. **Panta Medica**, v. 62, p. 557-559, 1996.

Delamare, A.P.L.; Ivete, T.; Moschen-Pistorello, L. A.; Atti-Serafini, I.; Echeverrigaray, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

Deprê, K.P.; Brocksom, T.J. A formação do esqueleto carbônico de diterpenos tricíclicos pela reação de Diels Alder multicomponente. **Anais de Eventos da UFSCar**, v. 6, p. 2010, 2010.

Dobrynin, V.N.; Kolosov, M.N.; Chernov, B.K.; Derbentseva, N.A. Antimicrobial substances of *Salvia officinalis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 5, p. 686-687, 1976.

Dubey, S.V.; Bhalla, R.; Luthra, R. An overview of the non-mevalonate pathway of terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, p. 637-646, 2003.

Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatile, **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

Eidi, A.; Eidi, M. Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 3, p. 40-44, 2009.

El-Lakany, A.M.; Abdel-Kader, M.S.; Sabri, N.N.; Stermitz, F.R. Lanigerol: a new antimicrobial icetexane diterpene from *Salvia lanigera*, **Planta Medica**, v. 61, p. 559-560, 1995.

Felicetti, B.; Cane, D.E. Aristolochene Synthase. Mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 7212-7221, 2004.

Fennel, C.W.; Lindsey, K.L.; Mc Gaw, L.J.; Sparg, S.G.; Stafford, G.I.; Elgorashi, E.E.; Grace, O.M.; Van Staden, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205-217, 2004.

Filho, C.R.M.S.; Souza, A.G.; Conceição, M.M.; Silva, T.G.; Silva, T.M.S.; Ribeiro, A.P.L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 919-923, 2009.

Fraga, B.M. Sesquiterpenoids. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 7, p. 145-185, 1991.

Gali-Muhtasib, H.; Hilan, C.; Khater, C. Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 513-520, 2000.

Gökdil, G.; Gülacti, T.; Sönmez, U.; Ulebelen, A. Terpenoids and flavonoids from *Salvia cyanescens*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 799-800, 1997.

González, A.G.; Luis, J.G.; Ravelo, A.G.; Plantas Iberoamericanas. Fuentes de moléculas bioactivas, **Aaieti**. Tenerife, Bogotá, v. 2, p. 27-28, 1990.

Gudaityté, O.; Venskutonis, P.R. Chemotypes of *Achillea millefolium* transferred from 14 different locations in Lithuania to the controlled environment, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 582-592, 2007.

Gülacti, T.; Tan, N.; Kökdil, G.; Ulbelen, A. Terpenoids from *Salvia glutinosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1293-1294, 1996.

Guignard, J.L.; Cosson, L.; Henry, M. **Abrégé de Phytochimie**. Paris: Masson, 1985.

Guignard, J.L. **Biochimie végétale**. Paris: Masson, 1996.

Haznedaroglu, M.Z.; Karabay, N.U.; Zeybek, U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. **Fitoterapia**, v. 72, p. 829-831, 2001.

Hitokato, H.; Morozumi, S.; Wauke, T.; Saiki, S.; Kurata, H. Inhibitory effects of species on growth and toxin production of toxigenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 818, 1980.

Hostettman, K. Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 23-27, 1998.

Hussein, A.I.; Anwar, F.; Nigam, P.S.; Sarker, S.D.; Moore, J.E.; Mazundar, A. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.

Inouye, S.; Takisawa, T.; Yamaguchi, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 565-573, 2001.

Jefferies, P.R.; Payne, R.; Branco A.H. A química da *Dodonaea* spp. VIII. Isolamento e estrutura cristalina de um diterpeno ácido de *Dodonaea petiolares*. **Jornal Brasileiro de Química**, v. 34, p. 1001-1007, 1981.

Kabouche, A.; Kabouche, Z.; Öztürk, M.; Kolak, U.; Topcu, G. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1281-1287, 2007.

Kabouche, A.; Kabouche, Z. Bioactive diterpenoids of *Salvia* species. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 753-832, 2008.

Kamatou, G.P.P.; Viljoen, A.M.; Van Zyl, R.L.; Davids, H.; Van Heerden, F.R.; Lourens, A.C.U. The antimalarial and cytotoxic effects of solvent extracts of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 238-243, 2008.

Kamatou, G.P.P.; Viljoen, A.M.; Steenkamp, P. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 684-688, 2010.

Kerrola, K.; Galambosi, B.; Kallio, H. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 776-781, 1994.

Khan, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Review**, v. 30, p. 564-595, 2006.

Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; Kesdek, M.; Kaya, Y.; Kilic, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. Ex. Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 360-368, 2008.

Koehn, F.E.; Carter, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p. 206-220, 2005.

Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; Kesdek, M.; Kaya, Y.; Kilic, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 360-368, 2008.

Krammer, G.; Winterhalter, P.; Schwab, M.; Scheirer, P. Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca* L.), peach (*P. persica* L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *syriaca*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 778-781, 1991.

Li, M.; Zhang, J.S.; Ye, Y.M.; Fang, J.N. Constituents of the roots of *Salvia prionitis*, **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 139-141, 2000.

Lin, L.Z.; Wang, X.M.; Huang, Y.; Cordell, G.A. Antibacterial, antituberculous and antiphlogistic activities. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3542-3543, 1989.

Loyola, L.A.; Bórquez, J.; Morales, G.; Araya, J.; González, J.; Neira, I.; Sagua, H.; San-Martín, A. Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. **Phytochemistry**, v.56, p.177-180, 2001.

Machado, M.; Santoro, G.; Sousa, M.C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes, **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 156, 2010.

Magiatis, P.; Melliou, E.; Skaltsounis, A.L.; Chinou, I.B.; Mitaku, S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. **Planta Medica**, v. 65, p. 749-752, 1999.

Marciano-Cabral, F.; Cabral, G.; *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology**. v. 16, p. 273-307, 2003.

Matos, F.J. Sistemas de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas com unidades, **Farmácias Vivas**, 2. ed. Fortaleza: EUFC, p. 180, 1994.

Merfort, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpenes lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115-130, 2002.

Min-hui, L.; Jian-min, C.; Yong, P.; Pei-gen, X. Distribution of phenolic acids in Chinese salvia plants. **World Science and Technology**, v. 10, p. 46-52, 2008.

Nagegowda, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation, **FEBS Letters**, v. 584, p. 2965–2973, 2010.

Nascimento, E.M.; Furlong, J.; Pimenta, D.S.; Prata, M.C.A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 817-824, 2009.

Nickavar, B.; Mojaba, F.; Asgarpanah, J. Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca* Benth. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 51-53, 2005.

Ondarza, R.N.; Iturbe, A.; Hernández, E. In vitro antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. **Archives of Medical Research**, v.37, p. 723-729, 2006

Ozcan, G.; Sagdic, O.; Gokturk, R.S.; Unal, O.; Albayrak, S. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pispidica*. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 186-190, 2010.

Paton, A. *Salvia lanceolata*, Labiateae: In the Kew Magazine Incorporating Curtis's Botanical Magazine. **The Royal Botanic Gardens, Kew**. 1991.

Peñuelas, J.; Llusià, J. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v. 155, p. 227, 2002.

Peñuelas, J.; Munné-Bosch, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends Plant Sciences**, v. 10, p. 166-169, 2005.

Pereda-Miranda, R.; Hernandez, L.; Lopez, R. A novel antimicrobial abietane-type diterpene from *Salvia albocaerulea*. **Planta Medica**, v. 58, p. 223-224, 1992.

Pérez, C.; Agnese, A.M.; Cabrera, J.L. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 91-96, 1999.

Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Ohara, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 325, 2003.

Ródio, C.; Vianna, D.R.; Kowalski, K.P.; Panatieri, L.F.; von Poser, G.; Rott, M.B. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae)

against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, v.104, p. 191–194, 2008.

Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cardenas, J.; Ramamoorthy, T.P. The distribution of diterpenoids in *Salvia*. In: Harley RM, Reynolds T (eds). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 335–345, 1992.

Rustaiyan, A.; Masoudi, S.; Jassbi, A.R. Essential oil of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 599-600, 1997.

Sairafianpour, M.; Christensen, J.; Staerk, D.; Budnik, B.A.; Kharazmi, A.; Bagherzadeh, K.; Jaroszewski, J.W. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.1398-1403, 2001.

Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shabih, F.; Sangwan, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

Santos-Gomes, P.C.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Fernandes-Ferreira, M. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinales* L.). **Plant Science**, v. 162, p. 981-987, 2002.

Saravanan, C.; Cao, Z.; Kumar, J.; Qiu, J.; Plaunt, A. G.; Newburg, D. S.; Panjwai, N.; Milk components inhibit *Acanthamoeba*-Induced cytopathic effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, p.1010 –1015, 2008.

Sauter, I.P.; dos Santos, J.C.; Apel, M.A.; Cibulski, S.P.; Roehe, P.M.; von Poser, G.L.; Rott, M.B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. *Parasitol Research*, 109:575-580, 2011.

Savelev, S.V.; Okello, E.J.; Perry, E.K. Butyryl- and Acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 315-324, 2004.

Siebert, D.J. Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. **Annals of Botany**, v. 93, p. 763-771, 2004.

Siqueira, C.A.T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C.L.; Moreno, P.R.H.; Reimão, J.Q.; Tempone, A.G.; Fischer, D. C. H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 33-40, 2011.

Siqui, A.C.; Sampaio, A.L.F.; Sousa, M.C.; Henriques, M.G.M.O.; Ramos, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

Silva, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

Silva, A.F.; Barbosa, L.C.A.; Silva, E.A.M.; Casali, V.W.D.; Nascimento, E.A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1-7, 2003.

Sivropoulou, A.; Nikolaou, C.; Papanikolaou, E.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3197-3201, 1997.

Sukh Dev. Terpenoids. In: J.W. Rowe. **Natural Products of Woody Plants**. Berlin: Springer-verlag, p. 697-807, 1989.

Steinegger, E.; Hänsel, R. **Pharmakognosie**. 5.ed. Berlin: Springer, 1992.

Tan, N.; Kaloga, M.; Radtke, O. A.; Kiderlen, A.; Oksiiz, F.S.; Ulubelen, A.; Kolodziej, H.; Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. **Phytochemistry**, v. 61, p. 881-884, 2002.

Tellez, M.R.; Canel, C.; Rimando, A.M.; Duke, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1035-1040, 1999.

Topcu, G.; Tan, N.; Ulubelen, A.; Sun, D.; Watson, W.H. Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 501-504, 1995.

Topcu, G.; Tan, N.; Gökdil, G.; Ulebelen, A. Terpenoids from *Salvia glutinosa*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1293-1294, 1997.

Ulubelen, A.; Topcu, G.; Tan, N. Studies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3637, 1992.

Ulubelen, A.; Sönmez, U.; Topcu, G. Diterpenoids from the roots of *Salvia sclarea*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1297-1299, 1996.

Ulubelen, A.; Topcu, G.; Bozok-Johansson, C. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1275-1280, 1997.

Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Kolak, U.; Tan, N.; Bozak-Johansson, C.; Çelik, C.; Kohlbau, H.J.; Voelter, W. Diterpenoids from the roots of *Salvia bracteata*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1455-1459, 1999.

Ulubelen, A.; Oeksuez, S.; Topcu, G.; Goeren, A.C.; Voelter, W. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaen*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 549-551, 2000.

Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Topcu, G.; Gören, A.C.; Bozok-Johansson, C.; Celik, C.; Kökdil, G.; Voelter, W. A new antibacterial diterpene from the roots of *Salvia caespitosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, p. 307-314, 2001.

Verlag, S. Terpene Biosynthesis. **Biosynthesis of Natural Products**, v. 209, 2000.

Wagner, H. **Pharmazeutische Biologie 2, Drogen und ihre Inhaltsstoffe**. 5.ed. New York: G. Fischer, 1993. 522 p.

Yesilyurt, V.; Halfon, B.; Öztürk, M.; Topcu, G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. **Food Chemistry**, v. 108, p. 31-39, 2008.

Yunes, R.A.; Calixto, J.B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Ed. Argos. 2001. 523 p.

Anexos



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | |
|---|--|
| Número: 29915-1 | Data da Emissão: 16/08/2011 16:02 |
| Dados do titular | |
| Nome: Paula Santos Pinto | CPF: 008.015.530-83 |
| Título do Projeto: Terpenóides em espécies do gênero Salvia (Lamiaceae) | |
| Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL | CNPJ: 92.969.856/0001-98 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|------------------------|------------------|---------------|
| 1 | Projeto de mestrado | 08/2011 | 03/2012 |

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |
| 7 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|------------------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------|---------------|
| 1 | Sergio Augusto de Loreto Bordignon | Coletor e identificador das espécies | 283.209.130-04 | 3012456434 sjs-RS | Brasileira |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-----------------------|----|--------------------------------------|------------|
| 1 | CAMBARA DO SUL | RS | Canyons Itaimbezinho e Fortaleza | Fora de UC |
| 2 | SAO JOSE DOS AUSENTES | RS | Serra da Rocinha | Fora de UC |
| 3 | TORRES | RS | Morro Azul | Fora de UC |
| 4 | MORRINHOS DO SUL | RS | campo | Fora de UC |
| 5 | CAMBARA DO SUL | RS | PARQUE NACIONAL DE APARADOS DA SERRA | UC Federal |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|--|-----------|
| 1 | Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico | Lamiaceae |

Material e métodos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 35972768



Página 1/3