

Juliana Bastos Dalmarco

**ESTUDO DAS PROPRIENADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
DE *Rosmarinus officinalis* L.**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química na área de concentração Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dalmarco, Juliana Bastos
Estudo das propriedades químicas e biológicas de
Rosmarinus officinalis L. [tese] / Juliana Bastos
Dalmarco ; orientador, Moacir Geraldo Pizzolatti -
Florianópolis, SC, 2012.
129 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. *Rosmarinus officinalis* L.. 3.
Cromatografia. 4. Terpenos. I. Pizzolatti, Moacir Geraldo
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Química. III. Título.

Juliana Bastos Dalmarco

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE
*Rosmarinus officinalis L.***

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química” com ênfase em Química Orgânica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de Dezembro de 2012.

Prof. Dr. Almir Spinelli

Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti,
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Edésio Luiz Simionatto,
Universida Regional de Blumenau

Prof.^a Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Universidade Federal do Amazonas

Prof.^a Dr.^a Beatriz Garcia Mendes Borba
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Professor Moacir Geraldo Pizzolatti pela orientação, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do laboratório de Química de Produtos Naturais, Heros, Cristian, Henrique, Gustavo, Lizandra, Leandro, Ana Paula, Dalila, Franciane, Aldo, Michele e Beatriz pelo companheirismo. Em especial a minha grande amiga Alessandra, pelo carinho, amizade inigualável e pelo companheirismo admirável.

A Jucélia, Júlia e a professora Dr^a. Tânia Silvia Fröde do laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da UFSC, pela realização dos ensaios farmacológicos de atividade anti-inflamatória.

A Dra. Daniele Guilhermano Machado e a professora Dr^a Analúcia Lúcia Severo Rodrigues do Departamento de Bioquímica da UFSC, pela realização dos ensaios de atividade antidepressiva.

Ao professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela ajuda, ensinamentos e colaboração na realização dos ensaios de atividade antibacteriana.

Aos novos colegas do laboratório LABEC, Maressa, Andrey, Mariana, Jacqueline, Daniel e em especial a minha querida amiga Melina e também ao professor Dr. Gustavo Micke pela ajuda nas análises de Eletroforese e Cromatografia. E também ao INCT, o prof. Dr. Faruk Nome.

Um agradecimento especial também para o Dr. Alberto Wisniewski Jr. (UFES) e o Dr. Edésio Simionatto, da FURB, pelas análises de Cromatografia, amizade e a oportunidade de podermos trabalhar juntos e também aos meus amigos Rafael Gerber e Dilamara Riva.

Aos professores e funcionários da Central de Análises pela elaboração dos espectros.

Ao CNPq e Capes pelo suporte e apoio financeiro.

Aos meus pais e irmão, que sempre acreditaram em mim, e principalmente ao meu grande amor Eduardo, meu porto seguro.

A Deus, que sempre me guiou para que eu seguisse os caminhos certos .

A todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

RESUMO

Introdução: *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) é uma planta medicinal e aromática e está distribuída em diversas regiões do mundo. É apontada por possuir alta capacidade antioxidante, sendo muito utilizada na medicina tradicional e também na alimentação. **Objetivos:** o objetivo deste trabalho foi investigar fitoquimicamente a espécie *R. officinalis* e avaliar os efeitos antibacteriano, anti-inflamatório e antidepressivo. **Metodologia:** partes aéreas da planta foram secas e maceradas em etanol 96% durante dez dias, produzindo o extrato bruto. O extrato bruto foi particionado através de filtração em sílica utilizando solventes de polaridade crescente resultando nas frações hexano, acetato de etila, etanólica e aquosa. As frações hexano e acetato de etila foram submetidas a procedimentos cromatográficos para o isolamento dos compostos. Os compostos foram quantificados no extrato bruto e frações utilizando as técnicas de CLAE-UV e EC. O efeito anti-inflamatório de *R. officinalis* foi analisado no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo. Finalmente, o estudo antidepressivo foi analisado frente aos modelos do nado forçado e da suspensão em cauda. **Resultados:** a análise do óleo essencial apresentou como majoritário o composto 1,8 cineol. Pela análise fitoquímica, foi possível elucidar quatro compostos: três terpenos, ácido betulínico, ácido ursólico, oleanolato metílico e um diterpeno fenólico, o carnosol. Além disso, verificou-se que diferentes solventes interferem na degradação do extrato bruto. Em relação a atividade anti-inflamatória, podemos destacar que em relação a inibição na migração leucocitária, a fração etanólica e o composto isolado ácido ursólico apresentaram melhores resultados, obtendo o mesmo perfil frente a migração de neutrófilos e a exsudação. A inibição da enzima MPO, foi mais evidente quando os animais foram tratados com o extrato bruto e com o terpeno, ácido betulínico. Já a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO_x), a fração mais efetiva foi novamente a fração etanólica, e o composto mais efetivo foi o carnosol. Finalmente, a inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , foi fortemente inibida pelo extrato bruto e pelo terpeno ácido betulínico. No estudo antibacteriano de *R. officinalis*, o composto isolado ácido ursólico exibiu ótima atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus pyogenes* e boa atividade contra *Staphilococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA). Já o ácido

betulínico foi considerado inativo contra as bactérias testadas. O carnosol demonstrou bom efeito antibacteriano contra *Streptococcus faecalis*, *Shigella flexinerii*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA). O estudo antidepressivo do extrato bruto, compostos isolados e óleo essencial da *Rosmarinus officinalis*, demonstrou resultados importantes. Muitos deles comparados aos resultados apresentados pela fluoxetina, com destaque para o extrato bruto, ácido ursólico e óleo essencial, o que sugere a possibilidade de utilização da planta no tratamento da depressão. **Conclusão:** de acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que o alecrim possui importante propriedade anti-inflamatória, antibacteriana e principalmente antidepressiva. Estes efeitos podem ser atribuídos a presença dos compostos isolados como o carnosol e principalmente o ácido ursólico o qual demonstrou os melhores efeitos farmacológicos.

ABSTRACT

Introduction: the *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) is an aromatic and medicinal plant and is distributed in various regions of the world and is identified as having high antioxidant capacity, and is widely used in traditional medicine as well as food. **Objectives:** the objective of this study was investigate the phytochemistry of *R. officinalis* and evaluate possible biological activities of this plant through tests to assess anti-inflammatory, antibacterial and antidepressant activities. **Methodology:** the methodology as follows: the aerial parts of the plant were dried and soaked in 96% ethanol for ten days, yielding the crude extract. The crude extract was partitioned by filtration on silica using increasingly polar solvents resulting in hexane, ethyl acetate, ethanol and aqueous fractions. The fractions hexane and ethyl acetate were subjected to chromatographic procedures for isolation of compounds. The quantification of compounds in the crude extract and fractions were made by HPLC-UV and CE. The anti-inflammatory effect of *R. officinalis* was analyzed in the model of carrageenan-induced pleurisy in mice. The antibacterial effect was assessed using the microdilution method. Finally, the study of the antidepressant effect was assessed by the models of forced swim and tail suspension. **Results:** the essential oil presented as majority compound 1,8 cineol. Through phytochemical analysis, it was possible to elucidate four compounds: three terpenes, betulinic acid, ursolic acid, methyl oleanolato and a diterpene phenol carnosol. Furthermore, it was found that different solvents interfere with the degradation of crude extract fractions. The results of anti-inflammatory activity, we highlight that for inhibition of leukocyte migration, and the ethanol fraction isolated compound ursolic acid showed better results, achieving the same profile front neutrophil migration and exudation. The inhibition of the enzyme MPO was more evident when the animals were treated with the crude extract and the terpene betulinic acid. The production of nitric oxide metabolites (NOx), the most effective fraction was again the ethanol fraction, and the compound most effective was the carnosol. In the study of antibacterial activity of *R. officinalis*, the isolated compound ursolic acid exhibited excellent antibacterial activity against the *Streptococcus pyogenes* and good activity against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Already betulinic acid was found inactive against all bacteria tested. The carnosol demonstrated good antibacterial effect against *Streptococcus faecalis*, *Shigella flexinerii*, *Salmonella typhi* and MRSA. Finally, inhibition of the release of proinflammatory cytokines IL-1 β

and TNF- α , was strongly inhibited by the crude extract and betulinic acid. Finally, the study of antidepressant action of crude extract, isolated compounds and essential oil from *Rosmarinus officinalis*, showed startling results. Many of them, similar to presented by fluoxetine, highlights to crude extract, ursolic acid and essential oil which suggests the possibility of using the plant to treat depression.

Conclusions: according to the results was possible to verify that the *R. officinalis* has an important anti-inflammatory, antibacterial and principally antidepressant properties. These effects may be attributable to isolated compounds such as carnosol and especially to ursolic acid which showed the best pharmacological effects.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Rosmarinus officinallis</i> L. (alecrim)	24
Figura 2	Diterpenos fenólicos de <i>Rosmarinus officinallis</i> L	25
Figura 3	Terpenos isolados de <i>R. officinallis</i> L.	26
Figura 4	Diterpenos e outros compostos isolados de <i>R. officinallis</i> L.	27
Figura 5	Componentes terpênicos encontrados no óleo essencial de <i>Rosmarinus officinallis</i> L	28
Figura 6	Flavonóides isolados de <i>R. officinallis</i> L.	29
Figura 7	Esqueleto básico estrutural de flavonas	29
Figura 8	Fenilpropanóides isolados de <i>R. officinallis</i> L.	31
Figura 9	Procedimento geral de fracionamento do extrato de <i>R. officinallis</i> L	47
Figura 10	Cromatograma de íons totais do óleo essencial de <i>R. officinallis</i> L	57
Figura 11	Esquema geral de fracionamento da espécie <i>R. officinallis</i> L	60
Figura 12	Esquema de fracionamento da fração HEX	61
Figura 13	Espectro de Infravermelho (KBr) do composto 1	62
Figura 14	Ampliação do espectro na região entre 2,7 e 2,85 ppm referente ao H-1 α e simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3	63
Figura 15	Ampliação do espectro na região entre 2,50 e 2,60 ppm referente ao H-1 β e simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3	63
Figura 16	Ampliação do espectro na região entre 1,85 e 2,00 ppm referente ao H-2 α e simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3	64
Figura 17	Ampliação do espectro na região entre 1,55 e 1,65 ppm referente ao H-2 β e simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3	64
Figura 18	Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD/400MHz) do composto 1	65
Figura 19	Estrutura do composto 1	67
Figura 20	Esquema de fracionamento da fração AcOEt de <i>Rosmarinus officinallis</i>	68
Figura 21	Espectro de infravermelho (KBr) do composto 2	69
Figura 22	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz/ Py) do composto 2	70

Figura 23	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz/ Py) do composto 2	70
Figura 24	Estrutura do composto 2, ácido betulínico	73
Figura 25	Espectro de infravermelho do composto 3	73
Figura 26	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, Py) do composto 3	75
Figura 27	Espectro de RMN de ¹³ C (100M Hz, Py) do composto 3	75
Figura 28	Estrutura do composto 3, oleanolato metílico	78
Figura 29	Espectro de infravermelho do composto 4	78
Figura 30	Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, CD ₃ OD), do composto 4	79
Figura 31	Espectro de RMN de ¹³ C (100MHz, CD ₃ OD), composto 4	80
Figura 32	Estrutura do composto 4, ácido ursólico	82
Figura 33	Espectro de UV-visível de mistura de triterpenos	82
Figura 34	Perfil cromatográfico em CLAE-UV (210 nm) das misturas 5 e 6	83
Figura 35	Curva de calibração para o carnosol (A) e ácido rosmarinico (B)	84
Figura 36	Eletoferogramas A- EBSO; B-EB; C-FHEX; D-FACOET1; E-FACOET2; F-FETOH- TBS 20mmol.L ⁻¹ , 50mBar/5s, 25Kv, 10% Metanol	85
Figura 37	Curva de calibração para os padrões A- ácido betulínico; B-ácido oleanólico e C-ácido ursólico por CLAE-UV	88
Figura 38	Cromatogramas dos extratos e frações de <i>R. officinalis</i> por CLAE-UV (200nm)	91
Figura 39	Mecanismo antioxidante proposto a partir do ácido carnósico quinona. *: composto com capacidade antioxidante	94
Figura 40	Perfil cromatográfico por CLAE-UV da degradação do AC. A- etanol; B-hexano; C- etanol + 1% de ácido acético; D- acetona; E- metanol	96
Figura 41	Efeito do tratamento agudo de camundongos com extrato bruto de <i>R. officinalis</i> (1 - 300 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade (teste do nado forçado - (A) e no teste da suspensão da cauda - (B)).	108
Figura 42	Efeito do tratamento repetido (14 dias) de	109

camundongos com extrato bruto de *R. officinalis* (10 - 300 mg/kg, v.o.) e da fluoxetina (10 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda

Figura 43

Efeito do tratamento agudo de camundongos com frações, compostos isolados e óleo essencial da *Rosmarinus officinalis* e da fluoxetina (10 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda

110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Flavonóides descritos para a espécie de <i>R. officinalis</i> L	30
Tabela 2	Atividades farmacológicas para <i>R. officinalis</i> . L	34
Tabela 3	Compostos, fórmula molecular, tempo de retenção e % relativa dos constituintes do óleo essencial	58
Tabela 4	Valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para o composto 1 comparados com a literatura	66
Tabela 5	Valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C para o composto 2 comparados com a literatura	72
Tabela 6	Valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C para o composto 3 comparados com a literatura	77
Tabela 7	Valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C para o composto 4 comparados com a literatura	81
Tabela 8	Quantificação de carnosol e ácido rosmarínico (mg/g de extrato) por Eletroforese Capilar	86
Tabela 9	Quantificação dos triterpenos ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico por CLAE-UV	88
Tabela 10	Atividade anti-inflamatória de <i>R. officinalis</i>	99
Tabela 11	Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto, frações e compostos isolados (em µg/mL).	105

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
AA	Ácido araquidônico
AC	Ácido carnósico
ACOET	Acetato de etila
AO	Ácido oleanólico
AR	Ácido rosmarínico
AU	Ácido ursólico
BHA	Butil- hidróxi-anisol
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butil hidróxi tolueno
CAR	Carnosol
CAT	Catalase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de Ionização em Chama
CG-EM	Cromatografia gasosa com detector de Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Cromatografia Líquida
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBSO	Extrato Bruto sem Óleo Essencial
EC	Eletroforese Capilar
ELISA	Enzimo imuno ensaio
ETOH	Etanol
FACoEt	Fração acetato de etila
FETOH	Fração etanólica
FHEX	Fração hexano
GST	Glutathiona transferase
HETE	Hidroxeicosatetraenóico
HEX	Hexano
HPETE	Ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóico
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de Ultravioleta
IL1- β	Citocina pró-inflamatória
i.o.	Intraorbital

i.p	Intraperitoneal
IRL	Índice de Retenção Linear
IV	Espectrometria de Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases
LT	Leucotrienos
MPO	Mieloperoxidase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NO _x	Óxido nítrico
OE	Óleo essencial
PG's	Prostaglandinas
Py	Piridina
QT	Quimiotipos
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
TBS	Tetraborato de sódio
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxanos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USA	United States of America
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1	Introdução	21
1.1	Importância dos produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos	22
1.2	Considerações sobre a espécie <i>Rosmarinus officinalis</i> L	23
1.2.1	Aspectos botânicos	23
1.2.2	Aspectos químicos	24
1.2.3	Aspectos biológicos e farmacológicos	31
1.2.4	Usos populares de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	34
1.3	Ensaio para a verificação da atividade biológica de produtos naturais	36
1.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória	36
1.3.2	Avaliação da atividade antibacteriana	37
1.3.3	Avaliação da atividade antidepressiva	38
2	Objetivos	41
2.1	Objetivo geral	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	Metodologia	43
3.1	Materiais utilizados e equipamentos	43
3.2	Material vegetal	44
3.3	Preparação do extrato vegetal	44
3.4	Análise do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	44
3.4.1	Extração do óleo essencial	44
3.4.2	Condições de análise do óleo essencial	45
3.4.3	Identificação dos componentes do óleo essencial	45
3.4.4	Quantificação dos componentes do óleo essencial	46
3.5	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto hidroalcoólico	46
3.5.1	Fracionamento da fração HEX	48
3.5.2	Fracionamento da fração AcOEt2	48
3.5.3	Fracionamento da fração EtOH	50
3.6	Quantificação dos compostos no extrato bruto e frações de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. por Eletroforese capilar e CLAE-UV	50
3.6.1	Quantificação do ácido rosmarínico e carnosol por CE-UV	50
3.6.2	Quantificação dos triterpenos por CLAE-UV	51

3.7	Avaliação da degradação do extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. por CLAE-UV	51
3.8	Atividade biológica	51
3.8.1	Atividade anti-inflamatória	51
3.8.2	Atividade antibacteriana	54
3.8.3	Atividade antidepressiva	55
4	Resultados e discussão	57
4.1	Composição do óleo essencial	57
4.2	Fracionamento do extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	59
4.3	Estudo fitoquímico da fração Hexano	61
4.4	Estudo fitoquímico da fração acetato de etila 2	67
5	Quantificação dos compostos no extrato bruto e frações por Eletroforese Capilar (EC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	83
5.1	Preparo da curva analítica e linearidade	84
5.2	Quantificação do carnosol e ácido rosmarínico	84
5.3	Quantificação dos triterpenos por CLAE-UV	87
6	Avaliação da degradação do extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	93
7	Atividade anti-inflamatória	97
8	Atividade antibacteriana	101
8.1	Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto, frações e compostos isolados de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. pela metodologia de microdiluição em caldo	101
9	Atividade antidepressiva	107
10	Conclusões	111
11	Referências	113

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Ao longo do tempo têm sido registrados diferentes tratamentos utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (CALIXTO, 2005; VEIGA-JÚNIOR & MELLO, 2008).

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, como por exemplo, ginkgo, kava pironas, ginseng, erva de São João, etc, são de grande interesse da indústria farmacêutica pelos produtos de origem vegetal. Por volta de 1990, estimou-se que cerca de 80% da população mundial procuravam nas plantas a fonte principal de medicamentos. E está comprovado hoje, que grande parte da população, principalmente aquelas de países em desenvolvimento, usa como medicamentos extratos ou porções oriundas de plantas. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada (MONTANARI, 2001).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte potencial de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica ou como enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO, 2009). Muitos metabólitos secundários de plantas se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, o que comprova que a parceria entre farmacologistas e/ou biólogos e químicos de produtos naturais é uma boa estratégia para a descoberta de fármacos inovadores.

Nas últimas décadas, uma mudança importante no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas

multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a fonte medicinal (MACIEL et al., 2002).

Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese. O interesse na busca por substâncias com atividade biológica visando não somente uma fonte de recurso terapêutico, mas também como futuro medicamento é o objetivo principal do presente trabalho destacando-se a avaliação de potencial efeito anti-inflamatório, antibacteriano e antidepressivo.

1.1 A importância dos produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) 65 a 80% da população mundial, especialmente em países em desenvolvimento, ainda confiam nos produtos à base de plantas medicinais no tratamento de doenças, ou utiliza a medicina tradicional (ou alternativa, não convencional, não ortodoxa ou medicina complementar) na atenção primária à saúde (RAHMAN & SINGHAL, 2002). Esses produtos são utilizados para várias finalidades, sob diversas combinações (com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros) baseados em evidências históricas ou pessoais, onde geralmente não é atribuído nenhum evento adverso (SILVEIRA et al., 2008).

A terapêutica moderna, composta de um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem o suporte dos produtos naturais, especialmente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos. São inúmeros os exemplos de medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sobretudo das plantas. Destacam-se a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisinina, a atropina, a escopolamina, as estatinas, o cromolin, os fármacos usados no tratamento de câncer (vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas), os imunossuppressores, os antibióticos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o Captopril® (VERPOORTE, 1998; BARREIRO, 2002).

Nas últimas décadas, ocorreram fatos importantes que produziram mudanças fundamentais no conceito de medicamentos de origem vegetal. A insatisfação com a eficiência e o custo da medicina

moderna, aliada à admiração pelas coisas “naturais” e “orgânicas”, levou milhões de pessoas em todo o mundo a apreciar melhor o uso dos medicamentos naturais clássicos para o tratamento de muitas doenças. As principais indústrias farmacêuticas reconhecem que certas plantas, que a população sempre utilizou para fins terapêuticos, são provavelmente uma das melhores fontes de protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (ROBBERS, 1997).

Com o surgimento de alguns medicamentos importantes obtidos de fontes naturais, que cientistas e indústrias voltaram a interessar-se pelo ramo. Pode-se, assim, observar que, atualmente, os produtos naturais atualmente são responsáveis, direta ou indiretamente, por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais esta porcentagem é de aproximadamente 70% (CALIXTO, 2001).

1.2 Considerações sobre a espécie *Rosmarinus officinalis* L.

1.2.1 Aspectos botânicos

A planta *Rosmarinus officinalis* L. (Figura 1) pertence a família botânica das Lamiaceae (antiga Labiatae, Adanson - ou Labiadas) que compreende atualmente de 236 a 258 gêneros e de 6970 a 7193 espécies, sendo subdividida em 7 subfamílias. Há cerca de 20 gêneros e 232 espécies nativas do Brasil. São cosmopolitas, porém têm como centros de origem as regiões do mediterrâneo, o Oriente Médio e as montanhas subtropicais (JOLY, 2002). É uma planta medicinal e aromática e vem sendo cultivada por muitos anos. É um arbusto perene, podendo atingir até 2 metros de altura. Apresentam folhas opostas, pequenas, lineares, coriáceas, aromáticas, flores bilabiadas, de cor lilás claro ou branco. No entanto não sobrevive a invernos rigorosos e altos índices de pluviosidade, necessitando de solos bem drenados e sol pleno (LORENZI e MATOS, 2006).



Fonte: <http://www.viagem-do-fazer.com/para/para+que+serve+o+alecrim/> (em 28/10/2012)

Figura 1- *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim)

CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O estudo taxonômico classifica a espécie *Rosmarinus officinalis* L. como segue:

Reino: *Plantae*
Filo: *Magnoliophyta*
Classe: *Magnoliopsida*
Ordem: *Lamiales*
Família: *Lamiaceae*
Gênero: *Rosmarinus*
Espécie: *R. officinalis*

Nomenclatura Binominal: *Rosmarinus officinalis* L. (*Labiatae*)

Sinonímia botânica: *Rosmarinus latifolius* Mill.

Nomes populares: alecrim-de-jardim; alecrim; rosmarino; labinotis; alecrinzeiro; alecrim comum; alecrim-de-cheiro; alecrim-de-horta; erva-coada; flor-do-olimpio; rosa-marinha; rosmarinho (LORENZI e MATOS, 2006).

1.2.2 Aspectos químicos

Dentre as diferentes classes de compostos presentes no extrato de *Rosmarinus*, a classe dos diterpenos fenólicos (Figura 2) é que vem recebendo muita atenção, principalmente o diterpeno carnosol [1], por causa dos seus benefícios medicinais incluindo efeito antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral. Entre os constituintes dos extratos de alecrim, 90% do total da atividade antioxidante derivam do carnosol e ácido carnósico [2]. Munné-Bosch e Alegre (2001) mostraram que o ácido carnósico protege os cloroplastos da oxidação, sequestrando radicais livres, durante situações de estresse da planta, quando submetidas as condições de secas e altas temperaturas. As ervas secas de

alecrim contém aproximadamente 0,2-1% de carnosol e extratos disponíveis comercialmente podem conter até 10,3% de carnosol (LIAN et al., 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram, que o ácido carnósico é o diterpeno fenólico precursor de estruturas γ - e δ -lactona. Na presença de oxigênio, o ácido carnósico é, em alguns dias, degradado em carnosol e rosmanol [3]. Estudos realizados por Luis e colaboradores (1994), sugerem que *in vivo*, o ácido carnósico também pode sofrer conversão enzimática estimulada pelo oxigênio singleto para formar as lactonas (exceto 6) rosmanol [3], isorosmanol [4], 11,12-di-*O*-metilrosmanol [5], 12-*O*-metil-ácido carnósico [6] e o rosmadial [7].

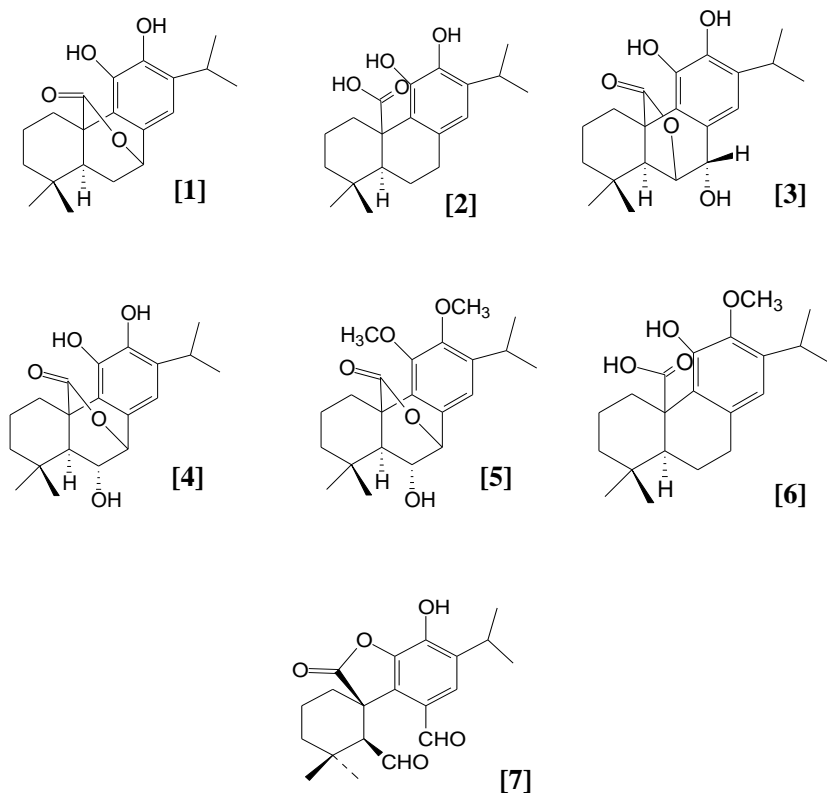


Figura 2. Diterpenos fenólicos de *Rosmarinus officinalis* L.

Outros terpenos também já foram descritos para a espécie como os triterpenos ácidos ursólico [8], oleanólico [9], micromérico [10] e betulínico [11] (ALTINIER et al., 2007).

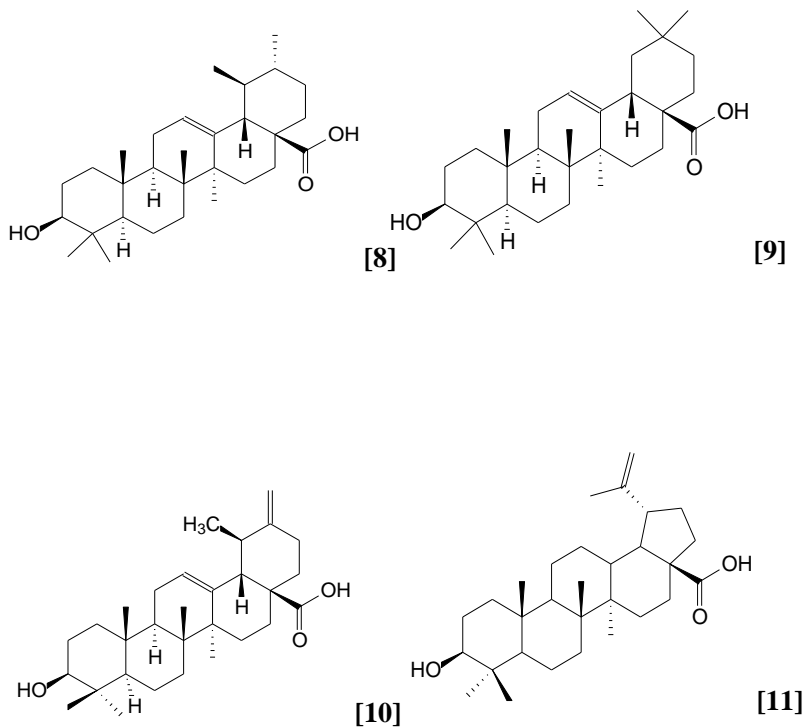
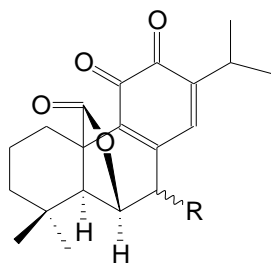


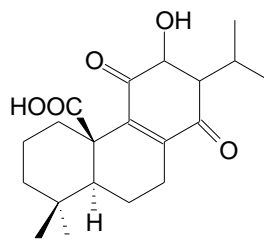
Figura 3. Terpenos isolados de *R. officinalis L.*

Também foram encontrados os diterpenos quinona rosmaquinona A [12], rosmaquinona B [13] além dos compostos p -quinona ácido roileanonico [14], betulina [15], ácido 23-hidroxibetulínico [16] e roficerona [17] (MAHMOUD et al., 2005).

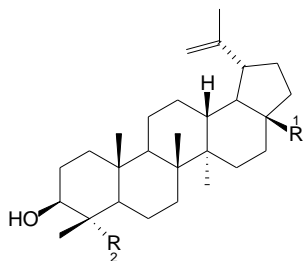


[12]: $R = \beta\text{-OCH}_3$

[13]: $R = \alpha\text{-OCH}_3$

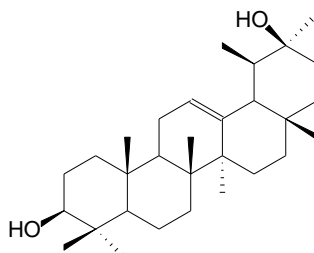


[14]



[15]: $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$; $R_2 = \text{H}$

[16]: $R_1 = \text{COOH}$; $R_2 = \text{OH}$



[17]

Figura 4. Diterpenos e outros compostos isolados de *R. officinalis*

Os terpenos $\text{C}_{10}\text{-C}_{15}$ que fazem parte da composição dos óleos essenciais, igualmente chamados de óleos voláteis, correspondem à fração oleosa responsável pelo aroma dos vegetais (flores, folhas, sementes, frutas, raízes, etc.). Embora possam ter um componente majoritário, os óleos essenciais são normalmente constituídos por uma mistura de compostos apolares de baixo peso molecular, onde

encontramos a predominância de terpenos e fenilpropanóides (BURT, 2004), podendo, não raro, estarem presentes alcanos, alcenos, alcoóis, aldeídos e ésteres.

A composição do óleo volátil de alecrim é de 95 a 98% de monoterpenos e derivados e 2 a 5% de sesquiterpenos. Os principais compostos voláteis no alecrim são: cânfora [18] e 1,8-cineol [19], seguido de borneol [20], verbenona [21], α -pineno [22] e canfeno [23] (Figura 5) (SZUMNY et al., 2010).

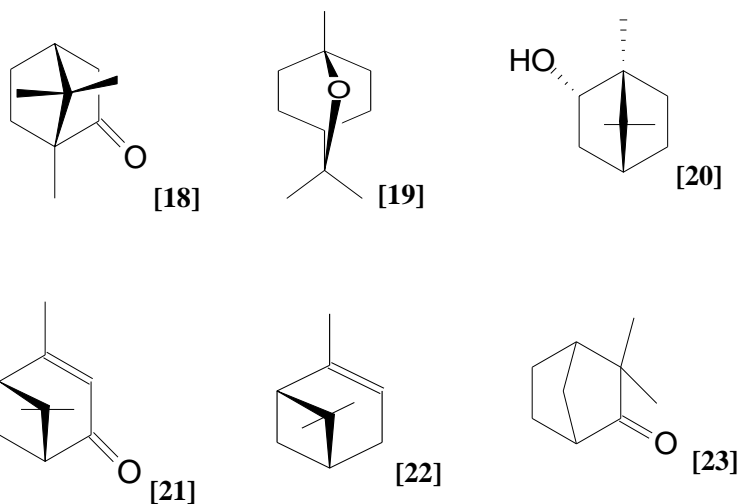


Figura 5. Componentes terpênicos encontrados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Embora a grande atenção dada para os princípios ativos de *R. officinalis* seja para a classe dos diterpenos, a presença de flavonóides na espécie também é constatada. Del Bano e colaboradores (2004) isolaram e identificaram 7 flavonóides, sendo eles: eriocitrina [24], hesperidina [26] (flavononas); luteolina 3'-O- β -D-glucuronideo [25], diosmina [27], isoscutelareína 7-O-glicosídeo [28], hispidulina 7-O-glicosídeo [29] e gencuanina [30] (flavonas). Outras flavonas também foram isoladas, incluindo a diosmetina [31], luteolina [32] e apigenina

[33] (SILVA et al., 2008); 6-hidróxi-luteolina-7-glicosídeo [34], escutelareína [35], cirsimaritina [36], 4-metoxitectorisina [37] (Tabela 1) identificados no extrato por CLAE-UV (ALMELA et al., 2006).

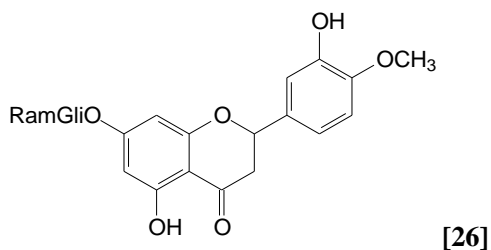
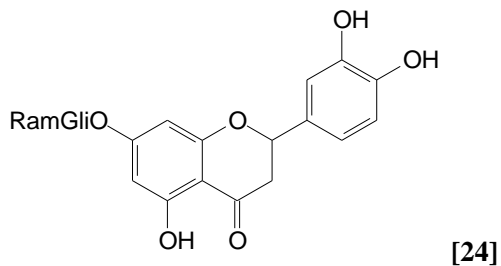


Figura 6. Flavonoides isolados de *R. officinalis* L.

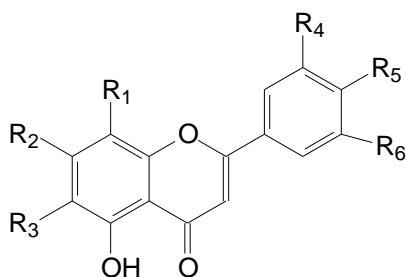


Figura 7. Esqueleto básico estrutural de flavonas

Tabela 1. Flavonóides descritos para a espécie de *R. officinalis L.*

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
[25]	H	OH	H	<i>O</i> - Glicuronídeo	OH	H
[27]	H	<i>O</i> -Glucose- Ramnose	H	OH	OCH ₃	H
[28]	OH	<i>O</i> -Glucose	H	H	OH	H
[29]	H	<i>O</i> -Glucose	OCH ₃	H	OH	H
[30]	H	OCH ₃	H	H	OH	H
[31]	H	OH	H	OH	OCH ₃	H
[32]	H	OH	H	H	OH	OH
[33]	H	OH	H	H	OH	H
[34]	H	<i>O</i> -Glucose	OH	H	OH	OH
[35]	H	OH	OH	H	OH	H
[36]	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
[37]	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H

Segundo a família Lamiaceae mostra ser uma fonte rica de espécie que contêm grandes quantidades de ácidos fenólicos, especialmente em formas de depsídeos, como por exemplo, o ácido rosmarínico [38] (ZGORKA e GLWNIK, 2001), caféico [39], clorogênico [40] e neoclorogênico [41] (SILVA et al., 2008).

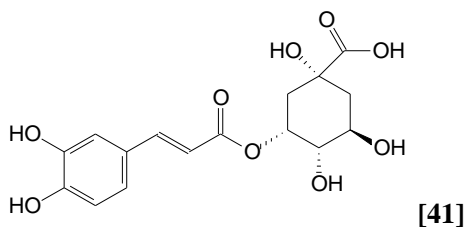
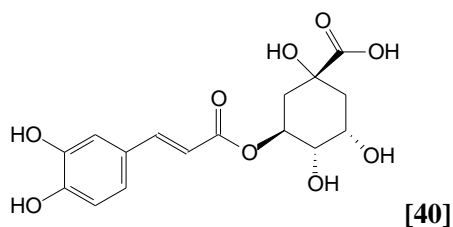
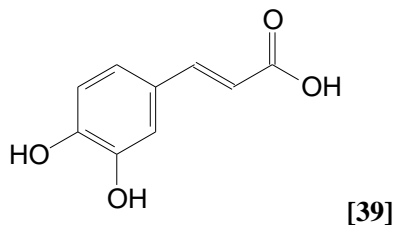
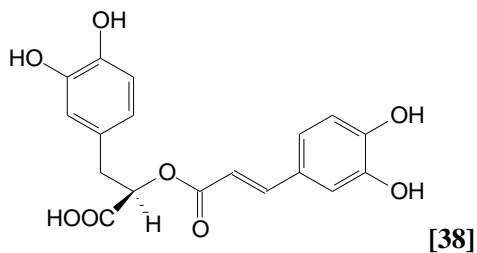


Figura 8. Fenilpropanóides isolados de *R. officinalis* L.

1.2.3 Aspectos Biológicos e Farmacológicos

A indústria alimentícia está cada vez mais interessada em plantas aromáticas, principalmente as que pertencem à família Lamiaceae, devido à crescente demanda de consumidores por alimentos

saudáveis e de origem natural. Estes produtos são utilizados, não somente como aromatizantes e/ou conservantes, mas também com outros propósitos terapêuticos como anti-inflamatórias ou também como antioxidantes. Além da indústria alimentícia, as plantas da família Lamiaceae são também utilizadas na tinturaria, fragrâncias, cosméticos, bebidas e indústrias de tabaco. A família de plantas Lamiaceae é muito rica em compostos antioxidantes que podem ser usados na conservação de alimentos contra processos oxidativos, como por exemplo, o alecrim, orégano, manjeriço, sálvia e tomilho, que são plantas aromáticas populares que crescem em muitas regiões do mundo (HOSSAIN et al., 2010).

O alecrim é a única especiaria disponível comercialmente para uso como antioxidante na Europa e Estados Unidos, comercializadas sob forma de um óleo solúvel, pó seco e também dispersáveis em água (BOZIN et al., 2007).

As propriedades antioxidantes dos extratos de alecrim vêm recebendo considerável atenção nos últimos anos. Na indústria de alimentos, seu efeito antioxidante é considerado superior aos do antioxidante sintético butil- hidróxi-anisol (BHA) e semelhante ao do butil-hidróxi-tolueno (BHT). Comercialmente, usa-se em combinação com tocoferóis, onde se observa sinergia entre o alecrim e o α -tocoferol. O alecrim também mostra efeito sinérgico com o ácido cítrico e com o antioxidante BHA (JUSTO et al., 2008). Este apresenta importante ação antioxidante e reduz a peroxidação lipídica, além de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, reduzindo a inflamação. O ácido carnósico e seus derivados possuem características estruturais únicas contendo um grupo catecol e duas regiões hidrofóbicas constituídas pelo grupo isopropil e pelo anel “A” com o grupo dimetil. O grupo catecol é reconhecido a unidade estrutural responsável pela captura de radicais livres de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, o anel “A” e o grupo isopropil conferem a estas moléculas a capacidade de fazer interações hidrofóbicas com as membranas e outros alvos biológicos, permitindo uma maior biodisponibilidade de seu potencial antioxidante.

Muitas atividades biológicas reportadas para os compostos e extratos de alecrim estão provavelmente relacionadas com a habilidade de reduzir dano oxidativo causado por radicais livres sobre os elementos celulares como DNA, proteínas e membranas fosfolipídicas. Supõe-se que estas moléculas antioxidantes podem agir como sequestradores de radicais livres, mas adicionalmente podem desempenhar um papel na regulação da atividade e/ou expressão de certos sistemas enzimáticos

implicados em processos fisiológicos relevantes como apoptose, destruição de células tumorais, transdução do sinal intracelular ou na regulação também das enzimas que metabolizam xenobióticos no fígado (superóxido dismutase, catalase e glutathione transferase). A natureza lipofílica dos derivados diterpênicos de alecrim levam a pensar que as membranas biológicas podem ser um dos principais alvos para a sua atividade, visto que, de fato, o ácido carnósico e seus derivados foram encontrados associados a membranas de cloroplastos, provavelmente desempenhando um papel antioxidante de proteção (PÉREZ-FONS et al., 2006).

A Tabela 2 mostra outras atividades farmacológicas descritas para o extrato, frações, compostos e óleo essencial de *R. officinalis*.

Tabela 2. Atividades farmacológicas para *R. officinalis L.*

EXTRATO/ COMPOSTO	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
Extrato etanólico	Hipoglicemiante Antiespasmódica Anticâncer	BAKIREL et al., 2008 VENTURA- MARTINEZ et al., 2011 TAI et al., 2012
Ácido rosmarínico, extrato metanólico e óleo essencial-QT- cineol	Inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase	ORHAN et al., 2008
Óleo essencial QT-cânfora	Repelente de mosquito	GILLIJ et al., 2008
Carnosol e ácido carnósico	Inibição da 5- lipoxigenase e supressão da resposta pró-inflamatória	POECKEL et al., 2008
Ácido carnósico	Efeito neuroprotetor	SATOH et al., 2008
Carnosol	Inibição da ativação de NF-kappa B	LIAN et al., 2010
Ácido micromérico, ursólico e oleanólico	Ação anti- inflamatória tópica	ALTINIER et al., 2007
Óleo essencial	Ação hipoglicemiante	AL-HADER et al., 1994
12-metóxi-trans- ácido carnósico, ácido carnósico e carnosol	Atividade antimicrobiana	OLUWATUYI et al., 2004
Extrato metanólico, ácido carnósico, sesamol, carnosol e ácido rosmarínico	Atividade antioxidante	ERKAN et al., 2008

1.2.4 Usos populares de *Rosmarinus officinalis* L.

Os antropólogos e arqueólogos encontraram evidências que as ervas de alecrim eram usadas com virtudes medicinais, culinárias e cosméticas no Egito antigo, Mesopotâmia, China e Índia (STEFANOVITS-BÁNYAI et al., 2003).

No México e Guatemala, o alecrim é utilizado principalmente como um remédio “*postpartum*”, e também para tratar doenças respiratórias e contra infecções de pele. Segundo a etnofarmacologia nesses países, o *Rosmarinus* é também utilizado para combater distúrbios: da musculatura esquelética, gastrointestinais, de pele, respiratórios, circulatórios, do sistema nervoso central e ginecológico (HEINRICH et al., 2006).

Além disso, o alecrim é popularmente utilizado como estimulante do SNC, no combate a azia, gastrite, contra a tosse, previne formação de gases intestinais, anti-hipertensivo, estimula a liberação da bilis da vesícula para o duodeno, favorecendo a digestão de gorduras, como estimulante do fluxo menstrual, antireumático e diurético (CARVALHO e ALMANÇA, 2003), e também no tratamento de doenças respiratórias de caráter inflamatório, como a asma brônquica (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Os óleos essenciais são amplamente utilizados na indústria cosmética, mais especialmente na produção de águas de colônia, loções de banho, loções de cabelo, xampus, e ainda como constituintes de desinfetantes e inseticidas. Os compostos fenólicos, presentes nos óleos essenciais, são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana e por serem seguros, portanto, são utilizados para prevenir o crescimento de bactérias contaminantes em plantas colocadas em estoque pós-colheita. Os óleos essenciais obtidos de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), sálvia (*Salvia officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cravo (*Syzygium aromaticum*), coentro (*Coriandrum sativum*), alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*), comprovadamente demonstraram atividade antimicrobiana, sendo amplamente utilizados com este fim (OKOH et al., 2010).

Já, na aromaterapia, o alecrim é comumente usado para estimular a mente e a memória. Angioni e colaboradores (2004) comprovaram a eficácia do óleo essencial de alecrim, em aumentar o desempenho cognitivo de seres humanos saudáveis submetidos a uma bateria de testes cognitivos computadorizados, demonstrando que o impacto olfatório causado por esse óleo essencial realça significativamente a

qualidade total da memória e dos fatores secundários da memória (ANGIONI et al., 2004).

1.3 Ensaios para a verificação da atividade biológica de produtos naturais

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais neste final de século tem promovido interesse pelo conhecimento das características dos fármacos delas originados, incluindo sua morfologia, composição química e propriedades farmacológicas, especialmente quando se trata de plantas brasileiras (SIMÕES et al., 2003). Hoje, com a disponibilização de ensaios biológicos específicos, eficientes e rápidos, os ensaios para *screening* biológico vêm sendo utilizados dia a dia nas pesquisas em busca de novas substâncias. Os bioensaios guiados por semelhanças estruturais e/ou interação com receptores constituem uma verdadeira revolução na busca de princípios bioativos. Os estudos do metabolismo de fármacos e as observações clínicas também são ferramentas poderosas na descoberta de novas substâncias promissoras.

1.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A inflamação é um fenômeno complexo de alterações que ocorre nos tecidos em resposta a um estímulo lesivo, como por exemplo: a radiação ultravioleta, estímulos químicos, as infecções e o choque mecânico. Todas as etapas da reação inflamatória são orquestradas por interações complexas entre as células e o que chamamos de mediadores do processo inflamatório. Atualmente, são conhecidos inúmeros mediadores, dentre eles podemos destacar: aminas vasoativas (histamina e serotonina), sistema complemento como, por exemplo: C3a, C5a-C5b-C9, componentes da coagulação e de fibrinólise (fibrino-peptídeos, produtos da degradação da fibrina, entre outros), metabólitos do ácido araquidônico (AA) como os produtos da via da ciclooxigenase (COX), incluindo as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX) e da lipooxigenase (leucotrienos (LT), ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóico (HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (HETE), espécies reativas derivados do oxigênio e do nitrogênio, óxido nítrico (NO), citocinas, entre outros (ROCCA e FITZGERALD, 2002; CHAKRABORTI, 2003).

Didaticamente podemos dividir a inflamação em três fases distintas: a fase inicial, onde existe o reconhecimento do estímulo lesivo; a fase de amplificação, onde diversos mediadores inflamatórios

são liberados com objetivo de destruir o estímulo lesivo, e finalmente a fase de término do processo, onde mediadores inibitórios são liberados com a função de finalizar o processo inflamatório. Em alguns casos, o estímulo inflamatório pode não ser “vencido” pelo organismo, se estabelecendo então a inflamação crônica, a qual pode levar a perda funcional do órgão afetado. Uma das condições mais importantes associada a este tipo de evolução é a artrite reumatóide, em que a inflamação crônica resulta em dor e destruição do osso e da cartilagem (SILVA et al, 2002).

A inflamação aguda é caracterizada por uma resposta inicial à lesão tecidual e é mediada pela liberação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos, e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. Essas substâncias, em especial, a histamina, aumentam o fluxo sanguíneo local e também a permeabilidade dos capilares venosos, o que permite que grandes quantidades de líquido e de proteína sejam transportadas da circulação para os tecidos, resultando em edema localizado. A resposta imune aparece, quando as células imunologicamente competentes (linfócitos) são ativadas em resposta a organismos estranhos ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; HOFSETH, 2008).

Neste trabalho, avaliamos a atividade anti-inflamatória da espécie *Rosmarinus officinalis L.* no modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina em camundongos, que é um modelo de fácil execução, e que permite a quantificação das células envolvidas e dos mediadores inflamatórios, sem que se tenha que utilizar procedimentos complexos de extração (SALEH et al., 1996).

1.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionaram o tratamento médico causando uma diminuição bastante significativa na mortalidade causada por doenças microbianas, mas durante as últimas décadas, novas doenças infecciosas surgiram e algumas infecções têm reemergido. Este episódio, juntamente com a disseminação do uso indiscriminado de antibióticos, lamentavelmente, fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento da resistência bacteriana (SILVEIRA et al., 2006). Em adição a estes problemas, os antibióticos são algumas vezes associados a efeitos diversos que incluem hipersensibilidade, redução da

flora intestinal e das mucosas, imunossupressão e reações alérgicas. Portanto, existe uma grande necessidade em desenvolver fármacos antimicrobianos alternativos para o tratamento de doenças infecciosas (AHMAD, 1998).

Diante deste cenário alarmante, percebe-se que o problema da resistência bacteriana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antibacterianas, incerta. Por esta razão, é que existe uma demanda crescente por novas substâncias capazes de inibir processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos resistentes e que tem provocado uma verdadeira corrida em busca de agentes antibacterianos de origem natural, semi-sintéticos ou sintéticos cada vez mais eficientes. Para isso, torna-se então imperativo adotar medidas para enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de antibióticos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sejam elas sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

1.3.3 Avaliação da atividade antidepressiva

De acordo com a OMS, a depressão unipolar foi projetada para 2020 como a segunda doença mais proeminente da população mundial. A doença é caracterizada pela diminuição do humor, perda do interesse geral, incapacidade de concentração, distúrbios do sono e do apetite, baixa energia, culpabilidade, além de ideação de suicídio. A doença é preocupante, pois afeta principalmente indivíduos em pleno auge da capacidade produtiva. Com relação a medicamentos com ação antidepressiva de origem natural, há uma lacuna. Com exceção dos estudos relacionados ao *Hipericum perforatum* e a confirmação dos efeitos da hipericina, o qual é indicado para casos de depressão leve, nenhuma outra planta ou um fitoconstituente foi estudado a ponto de se tornar um medicamento para o tratamento da depressão unipolar ou depressão maior (BRESOLIN e CECHINEL FILHO, 2010).

A depressão é uma síndrome crônica comum, e muitas vezes refratária ao tratamento com medicamentos, e que acabam por afetar a qualidade de vida e a produtividade destes pacientes. A depressão é comumente aceita por ser um distúrbio devido a perturbações em função dos neurotransmissores, principalmente a serotonina, noradrenalina e dopamina. A redução de serotonina no cérebro foi relatada por ser um dos fatores etiológicos mais importantes para a gênese da depressão, e por isso, um dos antidepressivos mais utilizados são os inibidores de

recaptação da serotonina que acabam por aumentar a disponibilidade de serotonina extracelular (SCHREIBER et al., 1995). Além disso, os sistemas noradrenérgico (noradrenalina) e dopaminérgico (dopamina) são relatados por também estarem envolvidos, agindo em conjunto ao sistema serotoninérgico (serotonina) (BILICI et al., 2001).

O estresse oxidativo tem sido relatado por ser de fundamental importância na gênese da depressão. Estudos clínicos mostram que pacientes com maior depressão, apresentaram elevada atividade de enzimas antioxidantes e aumento da peroxidação lipídica. A superóxido dismutase (SOD), uma enzima antioxidante, causa uma dismutação no radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é gerado no processo de desaminação mitocondrial das catecolaminas pela enzima MAO (monoaminoxidase). O tratamento com medicamentos antidepressivos diminui significativamente os níveis de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica em pacientes (SINGH et al, 2009).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Realizar o isolamento e caracterização dos constituintes químicos de *Rosmarinus officinalis* L., assim como utilizar técnicas analíticas para a quantificação dos compostos bioativos, além de avaliar as atividades biológicas do extrato, frações, compostos isolados e óleo essencial.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação do quimiotipo de *R.officinalis* pela caracterização de seu óleo essencial usando CG-DIC , CG-EM e índices de retenção;
- Caracterização estrutural dos princípios ativos isolados utilizando métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear, infravermelho, e técnicas analíticas de CLAE-UV e EC;
- Utilização de EC e CLAE-UV como ferramenta para a obtenção do perfil micromolecular e quantificação dos constituintes presentes nos extratos e frações;
- Avaliação da degradação do extrato de alecrim por CLAE-UV;
- Estudo da potencial atividade biológica do extrato bruto, frações, compostos obtidos e óleo essencial de *R. officinalis*:
 - Avaliação atividade antibacteriana utilizando o método de Concentração Inibitória Mínima, contra bactérias gram positivas, gram negativas e bactérias multiresistentes;
 - Avaliação da atividade no sistema nervoso central dando ênfase a ação antidepressiva utilizando camundongos frente aos modelos de nado forçado e teste de suspensão da cauda;
 - Avaliação da atividade anti-inflamatória utilizando camundongos no modelo de pleurisia induzido pela carragenina.

3 Metodologia

3.1 Materiais utilizados e equipamentos

Os solventes utilizados na filtração em sílica, cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa (CG) foram de grau analítico PA. Para as análises de cromatografia líquida (CL) os reagentes utilizados foram de grau analítico CLAE/UV.

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por CC, foi utilizado como fase estacionária sílica gel 60 - 200 *mesh* para CC normal e 230 - 400 *mesh* para CC flash.

As frações e compostos obtidos foram analisados através de CCD, utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários métodos: revelação em câmara de iodo, revelação com reagente cloreto férrico e revelação com reagente anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento a 110 °C. Este reagente foi preparado do seguinte modo: A 9 mL de etanol foram adicionados sequencialmente, com agitação e banho de gelo, 0,5 mL de ácido sulfúrico (conc.), 0,1 mL de ácido acético glacial e 0,5 mL de anisaldeído. O reagente foi estocado sob refrigeração.

Para medir o ponto de fusão dos compostos isolados, foi utilizado um aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Este equipamento é provido de lupa para a visualização da fusão da amostra e uma chapa aquecida, sobre a qual é colocada a amostra entre a lâmina e lamínula.

Para a obtenção dos espectros dos compostos isolados na região do infravermelho (IV), utilizou-se o espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC, com as amostras preparadas em pastilhas comprimidas de KBr, sendo os valores registrados em centímetros⁻¹ (cm^{-1}).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Varian AS-400, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em metanol, clorofórmio e/ou piridina deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em valores adimensionais, a constante de acoplamento J em Hz, a multiplicidade dos sinais foi indicada como s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, ddd= duplo duplo duplete, t = tripleto e m = multiplete.

O cromatograma do óleo essencial foi obtido utilizando-se um Cromatógrafo Gasoso com Detector de Ionização de Chama – CG-DIC,

modelo SHIMADZU 14 B. O espectro de massa foi obtido utilizando-se um Espectrômetro de Massas (CG-EM), modelo VARIAN CP 3800, com ionização por elétrons de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 170°C.

O equipamento de eletroforese capilar utilizado para as análises foi da marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), modelo HP3DCE, equipado com um detector de arranjo de diodos. A aquisição e tratamento dos dados foi feito com o software HP Chemstation™. As medidas foram efetuadas a uma temperatura de 25 °C, em capilares de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (32 cm x 50 µm D.I. x 375 µm D.E.) procedentes da empresa Polymicro (Phoenix, AZ, USA).

Para a análise da degradação do extrato bruto, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo VARIAN PROSTAR 230/310, detector de UV ($\lambda = 210\text{nm}$), coluna C18 fase reversa (250 x 4,6mm)

3.2 Material vegetal

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. foi coletada na cidade de Santo Amaro da Imperatriz, Santa Catarina, identificada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg e depositada no herbário FLOR, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina tendo como número de exsicata 34.918.

3.3 Preparação do extrato bruto

Partes aéreas (folhas e galhos) de *Rosmarinus officinalis* L., foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C, triturada em moinho de facas e submetida ao procedimento de maceração em etanol hidratado 96 % durante dez dias. O extrato obtido foi evaporado em rota-evaporador (60 °C) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até seu volume ser reduzido. Este mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes resultando no final das extrações 61 g de extrato bruto seco, correspondendo a 10,16 % da planta seca.

3.4 Análise do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

3.4.1 Extração do óleo essencial

Parte das folhas frescas (200g) de *R. officinalis* foram submetidas ao processo de extração do óleo essencial, sendo este obtido pela técnica extração por arraste de vapor, em aparelho de Clevenger, como descrito por HOUGHTON e RAMAN (1998). Em um balão de fundo redondo, o material fresco a ser extraído foi adicionado de água, e destilado durante 4 horas. O vapor, contendo o óleo, depois de condensado, foi recolhido em reservatório graduado onde a fase oleosa foi separada. Adicionalmente, a fase aquosa restante foi extraída com éter etílico e seco com sulfato de sódio anidro. O material obtido foi armazenado sob refrigeração, para posterior análise em CG-DIC e CG-EM. Após esta etapa, obteve-se 1,5 mL de óleo essencial, com rendimento de 0,75% em relação a massa fresca.

3.4.1.1 Obtenção do Extrato Bruto sem Óleo Essencial

Após a obtenção do óleo essencial e retirada do hidrolato, o material foi submetido a maceração em etanol durante 5 dias em etanol 96% para a obtenção do Extrato Bruto sem Óleo Essencial (EBSO), gerando 10,43g deste extrato, com rendimento de 5,11% em relação a massa fresca.

3.4.2 Condições de análise do óleo essencial

A análise por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM) foi realizada no laboratório de cromatografia do IPTB – FURB, em Blumenau, sob a supervisão do Prof. Dr. Edésio L. Simionatto. Neste protocolo, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Varian® CP 3800, acoplado ao espectrômetro de massas Saturn® 2000 e equipado com uma coluna CP Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm, filme de 0,25 µm). Como gás de arraste foi usado Hélio, com fluxo constante de 1 mL/minuto. Programação da temperatura do forno: isoterma inicial de 50° C por 1 min, seguida de uma taxa de aquecimento de 3° C/ min até a temperatura final de 240° C; temperatura do injetor: 250° C.

3.4.3 Identificação dos componentes do óleo essencial

A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada na biblioteca NIST® 98 e no cálculo dos índices de retenção linear (IA) para cada substância, juntamente com a análise e comparação dos seus espectros de massa com a literatura (ADAMS, 1995). Os índices de

retenção foram obtidos pela co-injeção com uma série de hidrocarbonetos lineares (C₁₀ – C₃₀) e calculados para cada composto a partir da equação 1, a seguir:

$$IA = 100.P_z + 100 [(RT(x) - RT(P_z)) / (RT(P_{z+1}) - RT(P_z))]$$

Onde:

P_z = número de átomos de carbonos do hidrocarboneto com tempo de retenção inferior ao do composto alvo

RT(x) = tempo de retenção do composto alvo

RT(P_z) = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente inferior ao tempo de retenção do composto alvo

RT(P_{z + 1}) = tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente superior ao tempo de retenção do composto alvo

3.4.4 Quantificação dos componentes do óleo essencial

A quantificação dos componentes do óleo essencial foi realizada através das áreas relativas dos picos do cromatograma obtido em um Cromatógrafo a Gás com detector de Ionização em Chama (CG-DIC), modelo SHIMADZU 14 B, coluna OV-5 (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm de espessura de filme). Neste procedimento, utilizou-se N₂ como gás de arraste, com pressão constante de 80 kPa. A razão de split foi de 1/150 e injetou-se 0,3 μL do óleo puro. A temperatura do detector foi de 300 °C e do injetor de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C (3 min), com taxa de aquecimento de 5 °C/min até 270 °C de temperatura final com isoterma de 8 min.

3.5 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto hidroalcoólico

O extrato bruto foi fracionado previamente por filtração em coluna de sílica gel utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo estes o hexano, acetato de etila, etanol e água, conforme o esquema apresentado na figura 9. Este procedimento resultou nas frações Hexano (FHEx), Acetato de etila (FACoEt 1 e 2), Etanólica (FETOH) e Aquosa (FAq), após completa remoção dos solventes por rota-evaporador. A FACoEt foi separada em 2 frações, sendo que a FACoEt 1 foi separada da 2 por apresentar-se sob uma forma mais escura e resinosa. As

frações FHEX, FACcOEt2 e FETOH obtidas, foram cromatografadas em coluna de sílica gel e a separação monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Nestes procedimentos obtiveram-se compostos isolados em quantidade suficiente para submissão aos ensaios de atividade biológica.

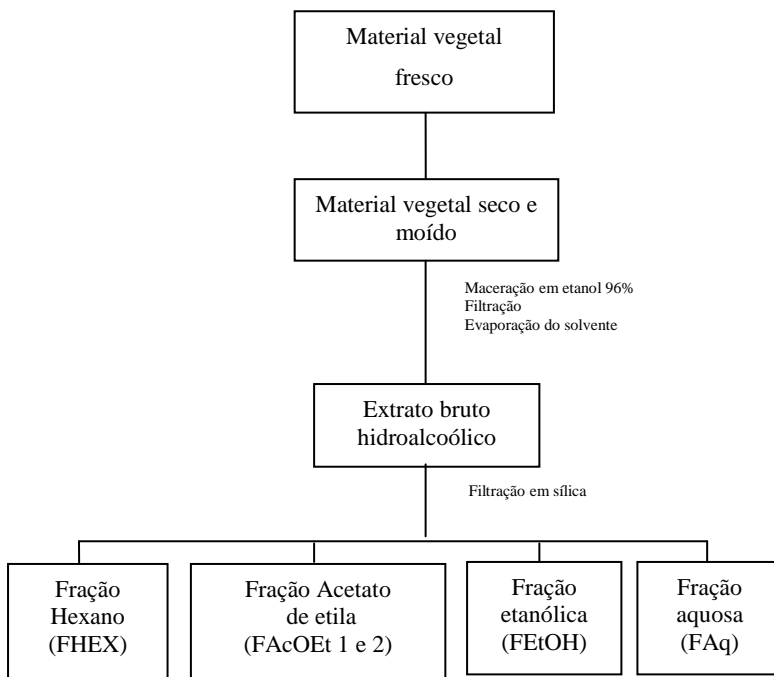


Figura 9: Procedimento geral de fracionamento do extrato de *R. officinalis*

L.

3.5.1 Fracionamento da fração Hexano

Parte da fração hexânica (9,37g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com misturas de hexano (HEX) e acetato de etila (ACOET) para obter um gradiente crescente de polaridade. Nesta etapa, foram coletadas 13 sub-frações, as quais foram reunidas conforme similaridade por cromatografia em camada delgada. As sub-frações 8 e 9, eluídas com HEX:ACOEt (75:25 v/v) foram reunidas e purificadas resultando no isolamento do diterpeno carnosol (**1**).

Composto (1): purificado por recristalização em acetona obtendo-se cristais incoloros. P.f.: 215°C-219°C; P.f. literatura: 211 °C

IV (KBr) cm^{-1} : 3493, 3290, 2966, 2939, 2871, 1714 (γ -lactona), 1586, 1453, 1322, 1199, 1032, 918, 771.

RMN de H^1 (CD_3OD , ppm): δ H-19 (s, 0,87), H-18 (s, 0,87), H-17 (d, 1,19, $J = 6,83$ Hz), H-16 (d, 1,20, $J = 6,84$ Hz), H-3 β (ddd, 1,33, $J = 3,51, 13,47, 13,67$ Hz), H-3 α (d, 1,51, $J = 13,08$ Hz), H-2 β (dt, 1,60, $J = 3,2, 3,2, 3,7, 4,5, 15,1$ Hz), H-5 (dd, 1,69, $J = 5,47, 10,55$ Hz), H-2 α (dt, 1,91, $J = 13,78, 3,2, 3,2, 0,8, 0,8$), H-6 α (m, 1,85), H-6 β (dt, 1,92, $J = 3,32, 1,66$ Hz), H-1 β (ddd, 2,57, $J = 15,12, 14,06, 4,49$ Hz), H-1 α (dddd, 2,80, $J = 1,97, 3,33, 3,8, 15,12$), H-15 (m, 3,24), H-7 α (d, 5,42, $J = 2,54$ Hz), H-14 (s, 6,69).

3.5.2 Fracionamento da fração Acetato de etila2

Parte da fração AcOEt 2 (8.83 g) também foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com misturas de HEX e AcOEt para obter um gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 33 sub-frações, as quais foram reunidas conforme similaridade por cromatografia em camada delgada. As sub-frações 7 a 9 eluídas com HEX:AcOEt (75:25, v/v), foram reunidas e purificadas resultando no isolamento do triterpeno ácido betulínico **2** (43 mg), ácido betulínico (AB). As sub-frações 20–33 (coluna A) foram reunidas e purificadas por cromatografia flash e eluída no modo isocrático com HEX:Acetona (80:20 v/v), obtendo-se 52 sub-frações. Este procedimento permitiu o isolamento de três terpenóides: o éster metílico do ácido oleanólico (**3**) (5mg), o ácido ursólico(**4**) (87 mg), e também o diterpeno carnosol **1** (52mg). Neste experimento, ainda foi identificado também, a presença de duas misturas dos triterpenos ácido ursólico, oleanólico e betulínico.

Composto 2: purificado em etanol obtendo-se um precipitado branco.

P.f: 296°-298°C. P.f. Literatura: 296,5°C

IV (KBr) cm^{-1} : 3450, 2943, 2869, 1687, 1641, 1452, 1236, 882.

RMN de H^1 (piridina-D5, ppm): δ H-3 (dd, 3,53, J=11,71, 4,49 Hz), H-13 (ddd, 2,74), H-18 (m, 1,85), H-19 (m, 3,45), H-23 (s, 1,22), H-24 (s, 1,00), H-25 (s,0,81), H-26 (s, 1,05), H-27 (s, 1,06), H α -29 (s, 4,94), H β -29 (s,4,76), H-30 (s, 1,78).

RMN de ^{13}C (piridina-D5, ppm): δ C-28(178,91), C-20 (151,36), C-29 (110,01), C-3 (78,15), C-17 (56,67),C-5 (55,94), C-9 (50,98), C-19 (49,78), C-18 (48,59), C-14 (47,82),C-8 (41,14), C-4 (39,57), C-1 (39,31), C-13 (38,64), C-10 (37,63),C-22 (37,55), C-16 (34,85), C-15 (32,91), C-21 (31,24), C-23, (30,32), C-2 (28,71), C-12 (28,34), C-11 (26,14), C-30 (21,24), C-26 (19,51), C-6 (18,82), C-24 (16,45), C-25 (14,95), C-27 (14,93).

Composto 3: purificado em metanol obtendo-se um precipitado branco.

Literatura: 300°C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3439, 2947, 2864, 1725, 1635, 1464, 1162.

RMN de H^1 (piridina-D5, ppm): δ H-3 (m, 3,44), H-12 (t, 5,4), H-18 (dd, 3,09), H-23 (s, 1,25), H-24 (s, 1,04), H-25 (s, 0,86), H-26 (s, 0,92), H-27 (s, 1,21), H- Me éster C-30 (s, 3,71), H-29 (s, 0,92), H-30 (s, 0,91).

RMN de ^{13}C (piridina-D5, ppm): δ C-28 (178,01), C-13 (144,12), C-12 (122,47), C-3 (78,04), C-5 (55,7), MeOOC-28 (51,59), C-9 (47,9), C-17 (46,9), C-19 (46,04), C-14 (41,9),C-18 (41,7), C-8 (39,6), C-4 (39,3), C-1 (38,8), C-10 (37,3), C-21 (33,9), C-29 (33,06), C-7 (32,75), C-22 (30,7), C-20 (30,7), C-23 (28,75), C-15 (28,04), C-2 (28,04), C-27 (26,08), C-30 (23,7), C-16 (23,6), C-11 (23,37), C-6 (18,74), C-26 (17,14), C-24 (16,5), C-25 (15,5).

Composto 4: purificado em metanol obtendo-se um precipitado branco.

P.f: 286-287,5°C. Literatura: 283-285°C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3443, 2939, 2872, 1694, 1457, 1387.

RMN de H^1 (CD_3OD): δ H-3 (m, 3,14), H-5 (d, 0,88), H-12 (s, 5,22), H-18 (d, 2,18);

RMN de ^{13}C (CD_3OD , ppm): δ C-28 (181,63), C-13 (139,62), C-12 (126,90), C-3 (79,69), C-5 (56,74), C-18 (54,35), C-9 e C-17 (43,24), C-14 (40,78), C-8 (40,42), C-4 (39,99), C-19 (39,89), C-1 (38,10), C-22 (34,33), C-7 (31,77), C-21 (29,21), C-10 (28,78), C- 15 e C-23 (27,89), C-2 (25,32), C-16 (24,37), C-11 (24,10), C-30 (21,58), C-6 (19,48), C-26 (17,80), C-29 (17,66), C-24 (16,39), C-25 (16,03).

3.5.3 Fracionamento da fração etanólica

Parte da fração etanólica (1,47g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com misturas de HEX e ACOET para obter um gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 10 sub-frações, as quais foram reunidas conforme similaridade por cromatografia em camada delgada. As frações 1 a 4, eluídas com HEX:ACOEt (60:40 v/v) promoveram reação positiva com o reagente anisaldeído-sulfúrico, foram reunidas e purificadas resultando no isolamento em 22mg de ácido ursólico (4).

As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas pelas análises dos respectivos espectros de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . A confirmação das estruturas veio da comparação dos dados espectroscópicos com aqueles da literatura e por co-eluição em CCD com padrões.

3.6 Quantificação dos compostos no extrato bruto e frações de *Rosmarinus officinalis* L. por Eletroforese capilar e CLAE-UV

3.6.1 Quantificação do ácido rosmarínico e carnosol por EC-UV

As análises por Eletroforese Capilar foram realizadas no Labec-Departamento de Química da UFSC. Primeiramente o capilar (50 μm x 32cm) foi condicionado a 25 °C da seguinte forma: 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹, 30 minutos com água deionizada e 10 minutos com o eletrólito de corrida a ser utilizado na análise. O condicionamento entre as corridas foi de 1 minuto com o eletrólito de corrida. As soluções padrão e as amostras foram introduzidas na extremidade do capilar mais próxima do detector, *outlet*, sob injeção hidrodinâmica, com uma pressão de 50 mbar/8s. A separação dos analitos foi efetuada aplicando-se a voltagem de 25 kV, com polaridade positiva no lado da injeção. A detecção foi realizada espectrofotometricamente com monitoramento no comprimento de onda de máxima absorção 200nm. Todos os reagentes usados nos experimentos foram de grau analítico. Tetraborato de sódio (TBS) foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e metanol (MeOH) foi adquirido da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). O padrão de ácido rosmarínico foi obtido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) e o padrão de carnosol foi obtido conforme procedimento conforme 3.5.1. Uma solução estoque de TBS na concentração de 100 mmol L⁻¹ foi utilizada para a preparação do eletrólito de corrida. Água deionizada (Milli-Q

deionizer, Millipore, Bedford, MA, USA) foi utilizada no preparo das soluções. Soluções estoque dos padrões (100 ppm) foram preparados em água desionizada para o ácido rosmarínico e 1000 ppm em metanol para o carnosol, para a construção da curva analítica. O composto fenólico 4-nitrofenol na concentração de 20 ppm foi utilizado com padrão interno. A porcentagem de MeOH utilizada foi de 10% e o eletrólito de corrida considerado satisfatório para a separação dos analitos foi constituído por 20 mmol L⁻¹ TBS. A fim de minimizar o tempo de análise, optou-se pela injeção hidrodinâmica, injeção pelo “outlet”. A injeção realizada desse modo permitiu detectar o ácido rosmarínico e o carnosol em menos de 3 minutos nas amostras que o continham.

3.6.2 Quantificação dos triterpenos por CLAE-UV

Para auxiliar na identificação e quantificação dos compostos, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido com detector de Ultravioleta (Shimadzu LC10-AVP). A análise foi realizada no comprimento de onda a 210 nm, utilizando uma coluna C18 fase reversa Phenomenex Gemini-NX (250 x 4,6 mm x 5 µm), com fluxo de 1,0 ml/min. Os padrões ácido ursólico, oleanólico e betulínico utilizados foram da marca Sigma-Aldrich. O sistema de solvente utilizado foi o mesmo proposto por LIANG e colaboradores (2009), sendo no modo isocrático de eluição durante 15 minutos e a mistura composta de acetonitrila:metanol:H₂O:acetato de amônio (70:10:20:0,2).

3.7 Avaliação da degradação do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. por CLAE-UV

Para realizar a avaliação da degradação do extrato de alecrim, o mesmo foi diluído em diferentes solventes (10mg/mL), sendo etanol, etanol + 1% de ácido acético, hexano, acetona e metanol. Nesta etapa, foram realizadas 4 leituras nos tempos 0, 10, 24 e 36h. O sistema de solvente utilizado foi: (A) metanol, (B) acetonitrila e (C) água. Programação: 0-7,5 min, 60%A:40%C (isocrático); 7,5-20 min., gradiente linear até 60%B; 20-30min, 100% B (isocrático).

3.8 Atividade biológica

3.8.1 Atividade anti-inflamatória

3.8.1.1 Animais

Camundongos suíços, pensando entre 18-25g foram alojados em condições padronizadas à temperatura ambiente constante (22 ± 2 ° C), com a alternância de períodos de 12 h de luz e escuridão, umidade 50-60%. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (Licença N ° - PP00197), e os experimentos foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Estes experimentos foram desenvolvidos no laboratório de pesquisa em Imunologia pela mestre em Farmácia Jucélia Benincá, sob orientação da prof. Dra Tânia Silvia Frode do Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

3.8.1.2 Pleurisia induzida por carragenina em camundongos

A pleurisia, em camundongos foi induzida segundo metodologia descrita por SALEH et al., 1996; DALMARCO et al., 2002, 2004. De acordo com o protocolo experimental, para o estudo da curva dose resposta, diferentes grupos de animais receberam tratamento prévio (0,5 h) com diferentes doses de extrato bruto, frações e compostos, administrado por via intraperitoneal (i.p.). A análise da resposta inflamatória foi realizada 4 h após a administração da carragenina (1%). Os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital (80 mg/Kg, i. p.).

3.8.1.3 Determinação do Grau de exsudação

Para a avaliação indireta da exsudação, os animais foram tratados com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/Kg, 0,2 mL/animal) administrado por via intraorbital (i.o.) 10 min antes da indução da pleurisia. Após respeitado o período de pleurisia (4 hs), os animais foram sacrificados e os lavados pleurais obtidos foram lidos em leitor de ELISA a 620 nm (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) para a determinação das concentrações de azul de Evans.

3.8.1.4 Determinação dos níveis de Leucócitos Totais e Neutrófilos

A contagem dos leucócitos totais no lavado pleural foi realizada com o auxílio de um hematocitômetro (Câmara de Neubauer). Os resultados foram expressos em número total de leucócitos $\times 10^6$. Para a contagem diferencial dos leucócitos, os lavados pleurais foram

centrifugados em citocentrífuga (Citospin®, Fanem, modelo: 248, São Paulo, Brasil) e corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (Neutrófilos) foi realizada em microscópio óptico comum. Os resultados foram expressos em número total de células $\times 10^6$ (SALEH et al., 1996, 1999; DALMARCO et al., 2002, 2004).

3.8.1.5 Determinação da atividade da Mieloperoxidase

As amostras dos lavados das cavidades pleural foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase de acordo com a metodologia descrita por Rao et al., 1993. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7 – 140 U/L) e suas densidades óticas (450 nm) também foram determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em U/L, com o auxílio da equação da reta. A leitura foi realizada em Espectrofotômetro (Quick-Lab, Drake Eletrônica e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) (FRÖDE e MEDEIROS, 2001). Esta dosagem tem a finalidade principal verificar se o tratamento dos animais propiciou uma redução na ativação dos neutrófilos.

3.8.1.6 Análise quantitativa dos níveis de Nitrito/Nitrato

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram quantificados pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras dos lavados das cavidades pleurais foram coletadas para a determinação das concentrações de nitrato/nitrito (Di ROSA et al., 1996). A reação foi quantificada através da medida das densidades óticas em Espectrofotômetro (Quick-Lab, Drake Eletrônica e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) em 543 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- ou NO_3^- (0-150 μM) e suas densidades óticas também foram determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no exsudato em μM , com auxílio da equação da reta (SALEH et al., 1999).

3.8.1.7 Quantificação dos níveis das interleucinas IL-1 β e TNF- α

Para a análise das citocinas, o lavado pleural foi coletado e imediatamente preparado para a quantificação dos níveis de citocina. Neste protocolo, foram utilizados kits de ELISA comerciais seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de citocinas mostrados foram estimados por médias de leituras colorimétricas em 450 nm em um leitor de ELISA por extrapolação da curva padrão previamente realizada. A dosagem das citocinas teve como objetivo verificar se os produtos naturais seriam capazes de reduzir a ativação e a perpetuação das células gerenciadoras do processo inflamatório, os mononucleares, já que estas citocinas são produzidas principalmente por este tipo celular.

3.8.2 Atividade antibacteriana

Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As amostras do extrato bruto, frações e compostos isolados foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), com objetivo de se produzir soluções-mãe contendo 100 mg/mL e para os compostos isolados soluções-mãe na concentração de 2mg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas destas soluções em caldo Brain Heart Infusion (BHI), produzindo concentrações variando de 50 mg/mL a 1,5 µg/mL, distribuídas em volumes de 100 µL em cada orifício teste da placa de microdiluição estéril de 96 poços. Em cada orifício teste foi adicionado 5 µL do inóculo bacteriano contendo 5×10^5 UFC/mL de cada microorganismo testado. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em aerobiose a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esta incubação inicial, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol, a cada microcavidade da placa utilizada no experimento (CLSI, 2005). Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micropoços onde há presença de bactérias viáveis, ou seja, onde os extratos, frações e compostos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. O teste do tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases presentes nos processos respiratórios dos tecidos. Durante a respiração celular, ocorre a liberação de íons hidrogênio, com os quais o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio reage formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada de formazam (JOHNSON et al., 1985; RAHMAN et al., 2004). Para a

classificação da atividade antibacteriana de extratos e frações, foi utilizado o critério proposto por Machado e colaboradores (2005). Os extratos e as frações que apresentaram valores de CIM menores que 10 µg/mL foram considerados excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL bons; valores entre 100 e 500 µg/mL atividade moderada; valores entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade e para valores de CIM acima de 1000 µg/mL, inativos. Já para a classificação da atividade antibacteriana dos compostos isolados, foi utilizado o critério proposto por Ríos e Recio (2005), o qual classifica como moderada atividade compostos com valores entre 10 a 100 µg/mL; e como excelente atividade antibacteriana compostos com CIM abaixo de 10 µg/mL e inativos atividade superior a 100 µg/mL. Como controle de inibição bacteriana foi utilizado o antibiótico de referência gentamicina, um antibiótico que apresenta boa atividade contra todas as cepas testadas. Estes ensaios foram realizados pelo Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco na Universidade Regional de Blumenau.

3.8.3 Atividade antidepressiva

O extrato bruto, frações, compostos isolados e óleo essencial foram avaliados frente aos ensaios de atividade antidepressiva nos modelos do nado forçado (NF) e suspensão da cauda (SC).

3.8.3.1 Teste do nado forçado (NF)

O teste do nado forçado é utilizado como um modelo preditivo do efeito antidepressivo (CRYAN et al., 2002). O procedimento foi realizado de acordo com modelos animais padronizados e validados no laboratório de Neurobiologia da Depressão do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina pela aluna Daniele Guilhermano sob orientação da professora Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues (BROCARDI et al., 2008; ECKELI et al., 2000; KASTER et al., 2005; ZOMKOWSKI et al., 2004). Os camudongos são colocados individualmente em uma cuba cilíndrica aberta (diâmetro 10 cm, altura 25 cm), contendo 19 cm de água a 25 ± 1 °C. A hipótese é que os animais nadam vigorosamente pelo instinto de sobrevivência. No entanto logo ficam deprimidos (2-3 min.) e desistem de lutar pela vida ficando apenas flutuando e tentando manter as narinas acima da superfície da água. O efeito antidepressivo se manifesta no retardamento do período de imobilidade e do tempo de imobilidade.

3.8.3.2 Teste de suspensão da cauda (SC)

A duração total da imobilidade induzida por suspensão pela cauda foi medido de acordo com o método descrito por Steru et al., 1985. Resumidamente, os camundongos tanto acústica quanto visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva colocados a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. O tempo de imobilidade foi cronometrado pelo observador durante um período de 6 min (CUNHA et al, 2008; MACHADO et al, 2007; RODRIGUES et al, 2002).

3.8.3.3 Análise estatística

- Ensaio anti-inflamatório: a comparação entre os parâmetros inflamatórios dos controles inflamados e os tratados com os produtos naturais, foi realizada através do teste *t* de Student (Não paramétrico). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos entre cada um dos grupos em comparação ao controle inflamado.

- Ensaio antidepressivo: as comparações entre os grupos experimentais e de controle foram realizadas por curvas dose-resposta ou ANOVA de dois fatores, seguido por teste de Tukey quando necessário. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 Resultados e discussão

4.1 Composição do óleo essencial

O cromatograma da figura 10 mostra o perfil cromatográfico do óleo essencial (OE) de *R. officinalis* representando 86,97% do óleo. A análise quantitativa da proporção relativa dos constituintes do OE foi calculada pelas áreas dos respectivos picos cromatográficos. A identificação dos constituintes foi realizada pela interpretação dos espectros de massas obtidos da análise por CG-EM e por comparação com os IRL (índices de retenção linear) (Tabela 3).

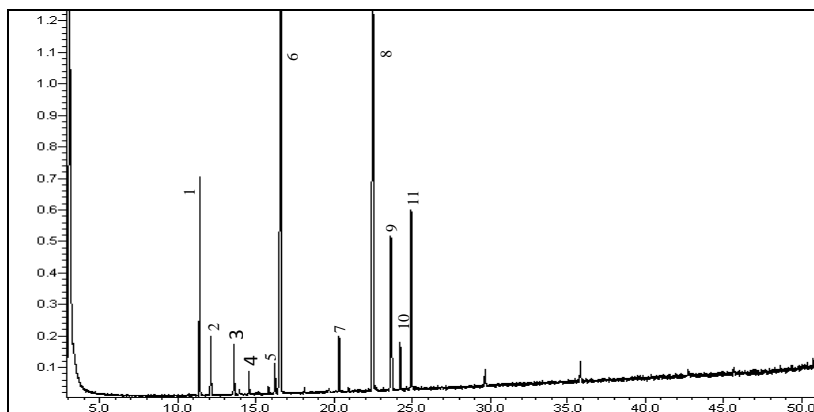


Figura 10. Cromatograma de íons totais do óleo essencial de *R. officinalis*

L.

O cromatograma da figura 10 mostra que o composto majoritário do óleo essencial é o monoterpeneo 1,8 cineol, representando 45,1 % do óleo total, seguido de cânfora com 21,8 %. Resultados semelhantes também foram encontrados por Hussain e colaboradores (2010), os quais encontraram também como componente majoritário o 1,8 cineol representando 38,5 % do óleo. Em relação ao grupo químico dos constituintes, verifica-se que a maior parte são monoterpeneos do tipo oxigenados, representando 78,6% do total do óleo.

Tabela 3. Compostos, fórmula molecular, tempo de retenção e % relativa dos constituintes do óleo essencial.

	Compostos	TR	FM	%REL	IRLt	IRLc
1	α -pineno	11.42	C ₁₀ H ₁₆	4,62	932	931
2	Canfeno	12.13	C ₁₀ H ₁₆	1,37	946	948
3	β -pineno	13.61	C ₁₀ H ₁₆	1,07	974	972
4	β -mirceno	14.57	C ₁₀ H ₁₆	0,54	988	986
5	p-cimeno	16.23	C ₁₀ H ₁₄	0,76	1020	1018
6	1,8 cineol	16.61	C ₁₀ H ₁₈ O	45,14	1026	1024
7	Linalol	20.34	C ₁₀ H ₁₈ O	1,26	1095	1093
8	Cânfora	22.49	C ₁₀ H ₁₆ O	21,75	1141	1139
9	Borneol	23.65	C ₁₀ H ₁₈ O	4,77	1165	1164
10	4-terpineol	24.25	C ₁₀ H ₁₈ O	1,12	1174	1171
11	α -terpineol	24.95	C ₁₀ H ₁₈ O	4,57	1186	1185

TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular; %REL: porcentagem relativa; IRLt: índice retenção linear teórico (literatura); IRLc; índice retenção linear calculado

De acordo com Guillén e colaboradores (1996), existem 3 quimiotipos (QTs) principais em *Rosmarinus officinalis* L., classificados de acordo com o composto majoritário encontrado no óleo essencial. O QT1 refere-se a plantas originárias da Espanha e que possui alto teor em cânfora, o QT2 originário da França, Inglaterra e Índia de maior teor em cineol (eucaliptol) e o QT3 encontrado somente na França e que possui predominância da cetona verbenona. O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, não possuindo teores apreciáveis de cânfora, cineol ou

verbenona na sua composição química, altera totalmente seu uso. Por exemplo, o óleo de alecrim é indicado para problemas hepáticos e da vesícula, mas o detalhe é que tais indicações são restritas somente ao QT3 verbenona, pois esta cetona é seu maior princípio ativo neste quimiotipo.

A espécie em estudo aproxima-se do quimiotipo QT2, considerando seu alto teor de cineol. Isto lhe confere propriedades farmacológicas peculiares, pois o cineol apresenta efeito anestésico, antisséptico, bactericida, expectorante e, também, atividades herbicida e inseticida sendo, em função disso, muito utilizado na indústria farmacêutica (ARAÚJO et al., 2010). O uso deste óleo em fitoterapia também está relacionado principalmente as atividades como antimicrobiana, espasmolítica, carminativa, hepatoprotetora, antiviral, anticarcinogênica, entre outros (BOZIN et al., 2007).

Um detalhe importante que também foi observado, é que embora o óleo de alecrim possua a verbenona como sendo um dos compostos majoritários presentes no óleo, a presença deste não foi encontrado. De acordo com o seu índice de retenção linear, 961, este apareceria no tempo de retenção entre os compostos 2 e 3. Como podemos observar no cromatograma da figura 10, não existe nenhum pico entre estes compostos, confirmando assim a sua ausência neste óleo.

4.2 Fracionamento do extrato de *Rosmarinus officinalis* L.

A partir de 600g de material vegetal seco, o extrato bruto hidroalcoólico obtido teve um rendimento 10,16%. O fracionamento do extrato bruto por filtração em sílica gel rendeu 21,93% da fração hexano, 45,75% da fração acetato de etila 1 e 2, 21,68% da fração etanol e 10% da aquosa. As frações obtidas (exceto a aquosa) foram submetidas à avaliação de suas possíveis atividades biológicas, e as frações que apresentaram resultados promissores, foram submetidas a fracionamentos cromatográficos para o isolamento dos constituintes micromoleculares e determinação das estruturas (ensaios biomonitorados) (Figura 11).

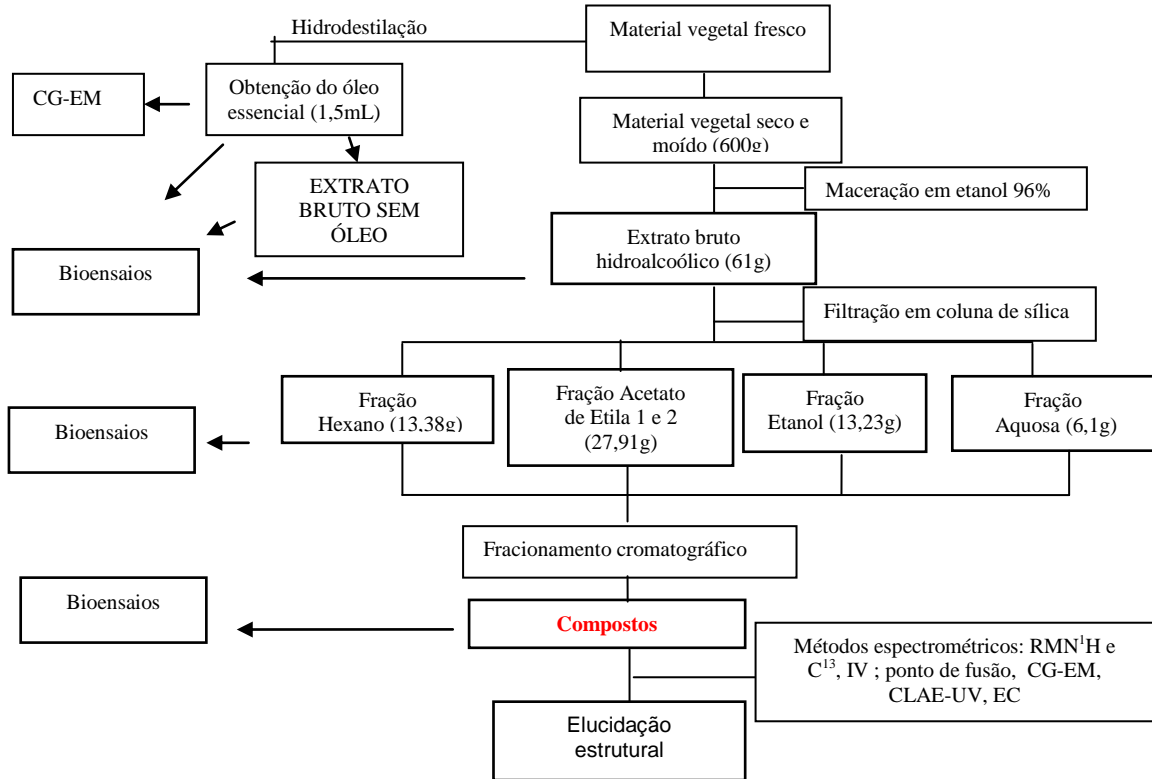


Figura 11. Esquema de fracionamento da espécie *R. officinalis* L.

4.3 Estudo fitoquímico da fração Hexano - FHEX

O sistema de fracionamento cromatográfico (Figura 12) da FHEX em coluna de sílica gel foi eluído com HEX/ACOET no modo gradiente de polaridade, gerando 13 sub-frações conforme mostra a figura abaixo:

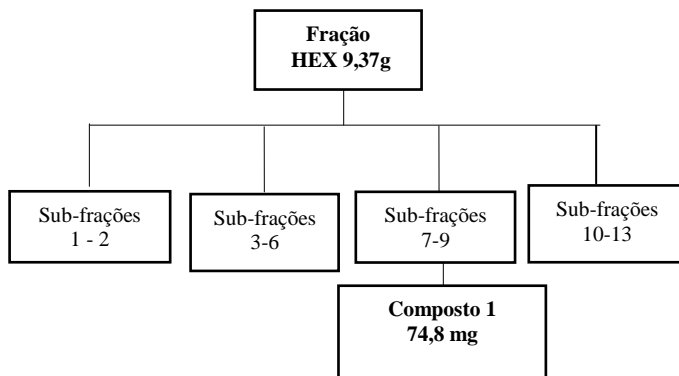


Figura 12. Esquema de fracionamento da fração HEX.

As sub-frações 7-9 foram reunidas e purificadas por recristalização em acetona fornecendo 74,8 mg do composto 1, sob forma de um cristal incolor. O espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 13) apresentou um perfil de absorção típico de estruturas diterpênicas. Neste espectro, foram observadas duas bandas, uma intensa e fina absorção em 3493 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O-H livre e outra em 3290 cm^{-1} sugerindo a presença de OH com algum tipo de interação do tipo ligação de H; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de $2980\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$, cuja a intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada. Além disso, observou-se uma banda fina e intensa em 1714 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação (C=O), que pela frequência de absorção sugere ser ser uma carbonila de γ -lactonas (Figura 13).

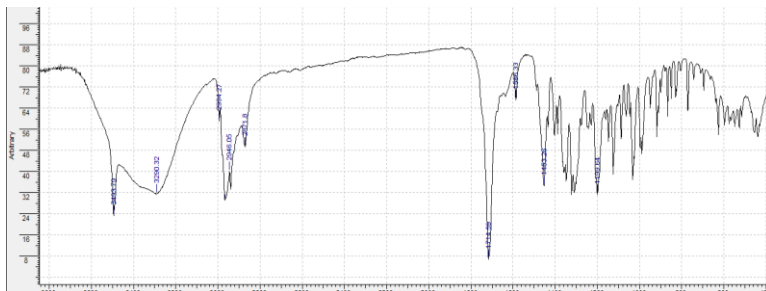


Figura 13. Espectro de Infravermelho (KBr) do composto 1.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 14) confirma o perfil de uma estrutura terpênica. No espectro de RMN de ^1H , são observadas entre outros sinais, dois simples em 0,87 ppm referentes aos hidrogênios ligados ao C-18 e C-19 das duas metilas geminais em C-4; duas metilas dupletos em 1,19 e 1,20 ppm ($J=6,84$ Hz) conectadas ao septeto centrado em 3,24 ppm identifica um fragmento isopropil, que pela desproteção anisotrópica do CH, está ligado a um anel aromático. O grupo de absorções na região de 1,25 e 3,4 são típicos de estruturas terpênicas. Para melhor visualização dos sinais dos hidrogênios 1α (figura 15), 1β (figura 16), 2α (figura 17) e 2β (figura 18), foi utilizado a ferramenta de simulação de acoplamentos FOMSC3. A presença do duplo duplo duplo (ddd) centrado em 2,57 ppm ($J= 15,12, 14,06, 4,49\text{Hz}$) e um quadruplo duplo (dddd) em 2,80 ppm ($J= 15,12; 3,8, 3,3, 1,9\text{Hz}$) são referentes aos sinais de H- 1β (figura 15) e H- 1α (figura 14) respectivamente. A multiplicidade do hidrogênio dddd engloba um acoplamento a longa distância com o hidrogênio 5. O sinal centrado em 1,60 ppm é referente ao H- 2β , com acoplamentos ($J=15,1, 4,5, 3,7, 3,2, 3,2$ Hz) (Figura 17). Já o sinal centrado em 1,90 ppm, é referente ao H- 2α com acoplamentos ($J=13,8, 3,2, 3,2, 0,8, 0,8$ Hz) (figura 16). Podemos destacar ainda o duplo duplo em 5,42 ppm ($J=1,46\text{Hz}; 3,33\text{Hz}$) referente ao H- 7α e o simpleto em 6,69 ppm referente ao H-14 ligado a carbono sp^2 do anel aromático. Os dados de RMN ^1H do composto 1 comparados com a literatura estão listados na tabela 3.

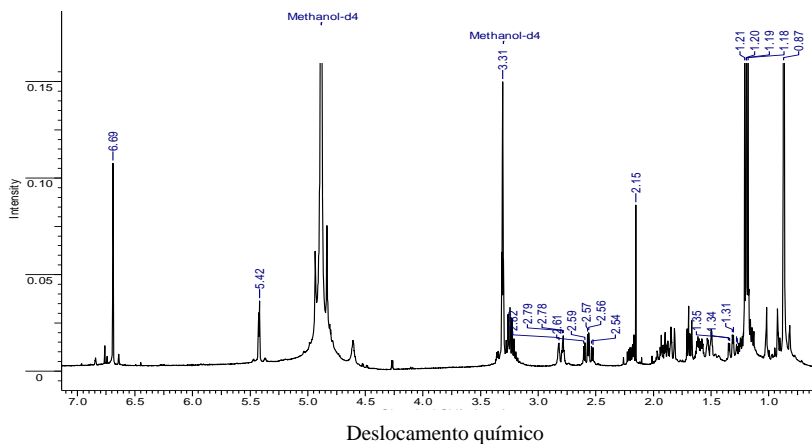


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/400\text{MHz}$) do composto 1.

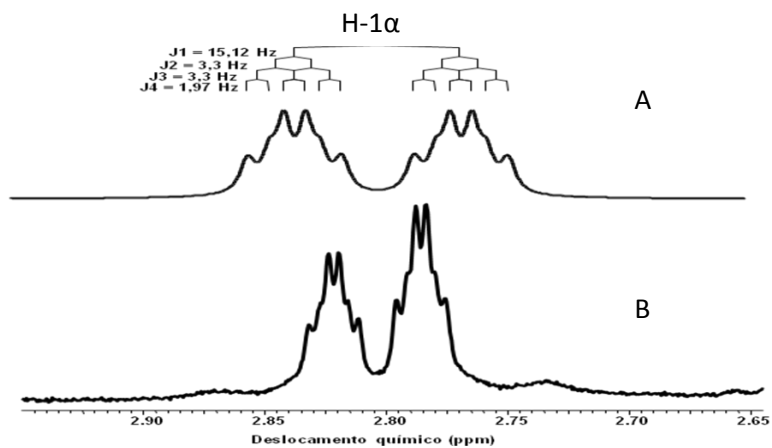


Figura 15. A- simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3; B- Ampliação do espectro na região entre 2,7 e 2,85 ppm referente ao H-1 α .

H-1 β

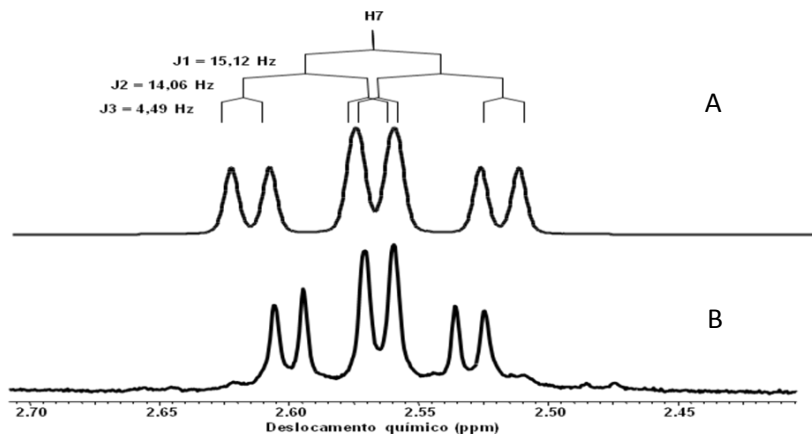


Figura 16. A- simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3; B - Ampliação do espectro na região entre 2,50 e 2,65 ppm referente ao H-1 β .

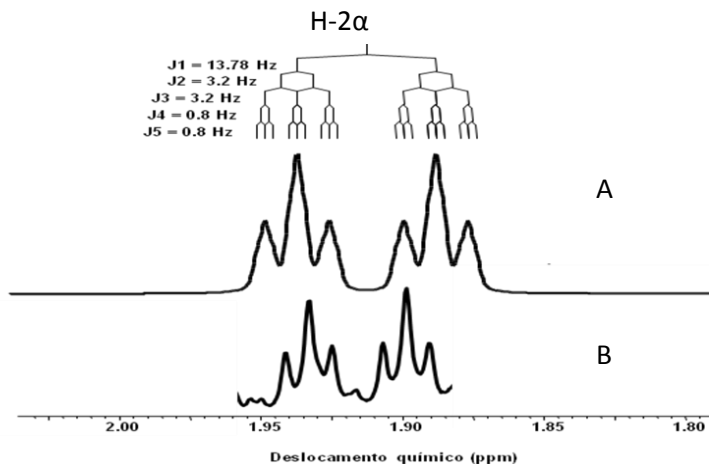


Figura 17. A- simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3; B - Ampliação do espectro na região entre 1,85 e 2,00 ppm referente ao H-2 α .

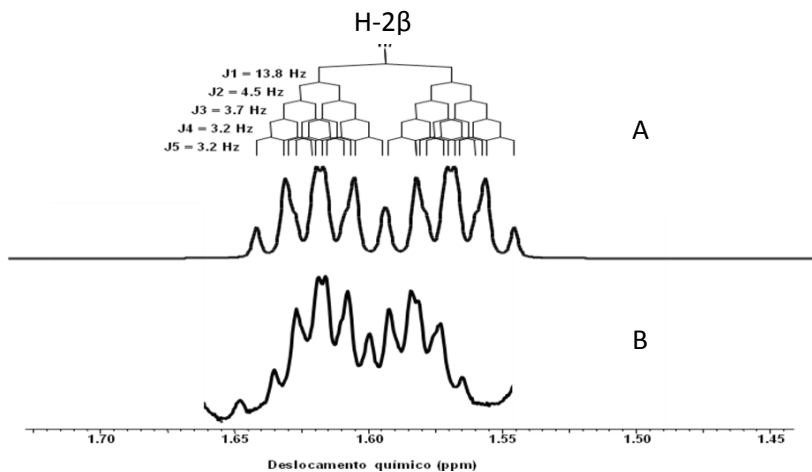


Figura 18. A- simulação dos acoplamentos com a ferramenta FOMSC3; B - Ampliação do espectro na região entre 1,55 e 1,65 ppm referente ao H-2 β

Após a análise dos espectros de IV e RMN de ^1H , comparação com dados de literatura (Tabela 4) e também com a ajuda da ferramenta FOMSC3, foi possível concluir que o composto 1, trata-se do diterpeno fenólico carnosol (Figura 19).

Tabela 4. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H para o composto 1 comparados com a literatura (PUKALSKAS et al., 2005).

H	δ deslocamento químico (ppm)	
	Composto 1	δ_{H} literatura MeOD, 400MHz
1 α	2,80 ddd ($J=15,1, 3,8, 3,3, 1,9$ Hz)	2,80 d ($J=14,3$)
1 β	2,57 ddd ($J=15,1, 14,1, 4,5$ Hz)	2,57 ddd ($J=4,4, 14,1$)
2 α	1,90 dt ($13,8, 3,2, 3,2, 0,8, 0,8$)	1,89 m
2 β	1,60 dt ($J=13,8, 4,5, 3,7, 3,2, 3,2$ Hz)	1,62 dt ($J=13,7, 4,9$)
3 α	1,51 d ($J=13,1$)	1,51 d ($J=13,1$)
3 β	1,33 ddd ($J=13,7, 13,5, 3,5$ Hz)	1,32 ddd ($J=13,5, 13,3, 3,1$)
5	1,69 dd ($J=10,5, 5,5$ Hz)	1,69 dd ($J=10,6, 5,7$)
6 α	1,85 m	1,84 m
6 β	1,92 dt ($J=13,6, 3,3$ Hz)	2,20 m
7 α	5,42 dd ($J=1,4, 3,3$ Hz)	5,43 d ($J=2,8$)
7 β	-	-
14	6,69 s	6,69 s
15	3,24 m	3,25 m
16	1,20 d ($J=6.8$ Hz)	1,20 d ($J=6,7$)
17	1,19 d ($J=6.8$ Hz)	1,19 d ($J=6,6$)
18	0,87 s	0,87 s
19	0,87 s	0,87 s
20	-	-

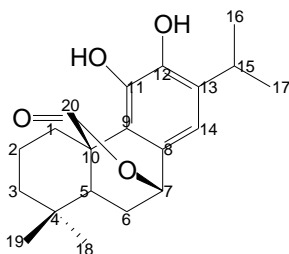


Figura 19. Estrutura do composto 1, carnosol.

4.4 Estudo fitoquímico da fração acetato de etila 2 – FAcOEt2

O fracionamento cromatográfico (Figura 20) da FAcOEt2-8,83g, em coluna de sílica gel eluída com HEX/ACOET no modo gradiente de polaridade, resultou em 33 sub-frações das quais foram isolados os compostos **2**, **3**, **4** e o carnosol novamente, além de outras duas frações cujas análises por CLAE-UV revelaram se tratar de uma mistura de triterpenos. A análise por CCD das 33 sub-frações reveladas com anisaldeído, indicou a presença de estruturas terpenoídicas nas sub-frações 1-12 e 20-33.

As sub-frações de 1 a 12 foram reunidas e purificadas em etanol, resultando em um sólido branco amorfo com ponto de fusão 296°C-298°C. O espectro de IV em pastilha de KBr (figura 21) também apresentou um perfil de absorção típico de estruturas terpênicas. Duas bandas, uma intensa e larga com máximo de absorção em 3450 cm^{-1} característica do estiramento de hidroxila; um grupo de bandas de absorção para estiramentos C-H na região de 2943-2868 cm^{-1} , cuja intensidade indica a presença de uma grande cadeia hidrocarbonada não linear. Além disso, observou-se uma banda fina e intensa em 1687 cm^{-1} , correspondente a absorção de estiramento de ligação (C=O). Nos ácidos carboxílicos, onde o grupo -COOH está rodeado de grupos volumosos, estes se encontram na forma de monômeros e absorvem em 1678-1690 cm^{-1} . Se o ácido se encontra na forma de dímero a absorção localiza-se em 1742 a 1745 cm^{-1} (Figura 21) (CÎNTĂ PÎNZARU et al., 2002).

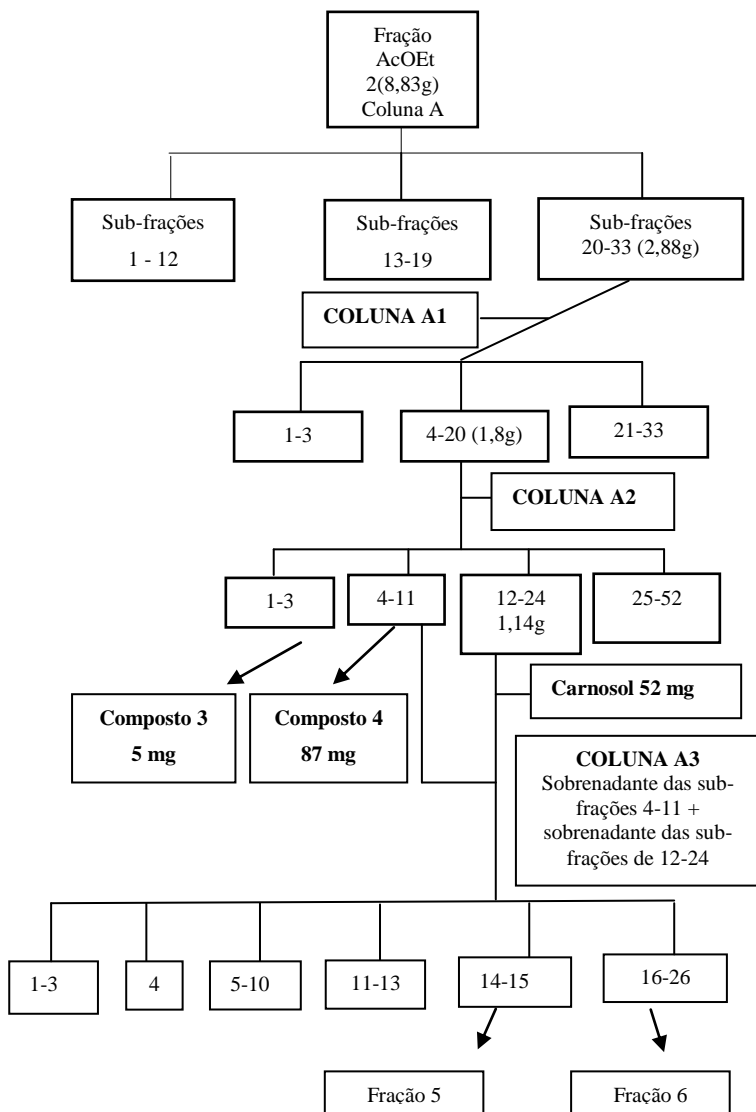


Figura 20. Esquema de fracionamento da fração AcOEt de *Rosmarinus officinalis* L.

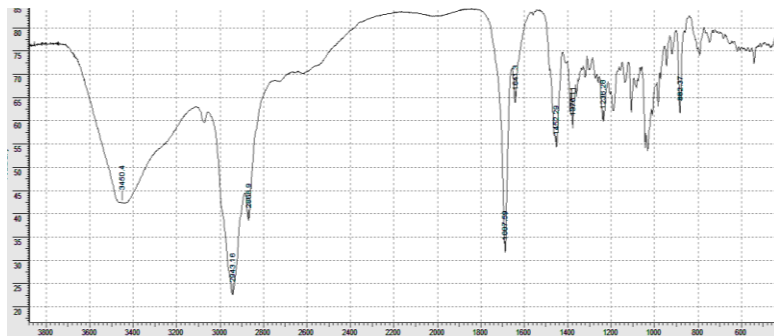


Figura 21. Espectro de IV (KBr) do composto 2.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 22) e ^{13}C (Figura 23) do composto 2 confirmam o perfil de uma estrutura triterpênica. O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais para 6 grupos metila em δH (3H, s): 0,81 (H-25); 1,00 (H-24); 1,05 (H-26); 1,06 (H-27); 1,22 (H-23); 1,78 (H-30). Os sinais em 4,94 (1H, s, H-29 α) e 4,76 (1H, s, H-29 β) típico de um grupo metileno sp^2 ($=\text{CH}_2$) que juntamente com a metila alílica em 1,78 ppm sugere a presença de um fragmento isopropenil. O grupo de absorções na região de 0,7-2,8 são típicos de estruturas terpenoídicas com destaque ao duplo tripleto (dt) centrado em 2,61 ppm ($J=13,1, 3,7$ Hz) para o hidrogênio ligado ao C-13 e um duplo duplo duplete (ddd) centrado em 2,74 ppm ($J=11,5, 8,60, 2,7$ Hz) referente aos hidrogênios de C-21. A presença do duplo duplete em 3,53 ppm ($J=11,7, 4,5$ Hz) é indicativo de H-3 carbinólico típico da C-3 hidroxilação comum nos terpenos. Os valores das constantes de acoplamento entre o H3 e o metileno vicinal sugerem a β -hidroxilação. O multiplete centrado em 3,45 ppm é atribuído ao hidrogênio metínico em C-19, cuja desproteção se deve ao efeito anisotrópico da cadeia lateral isopropenil.

O espectro de RMN de ^{13}C de 2 (Figura 23) mostrou sinais para 30 carbonos, característicos de triterpenos. Além disso, a presença dos carbonos sp^2 em (δ 110,01) e (δ 151,36), um oximetínico (δ 78,15) e também um carbono carbonílico (δ 178,91), permitiram sugerir a estrutura do triterpeno ácido de esqueleto lupano.

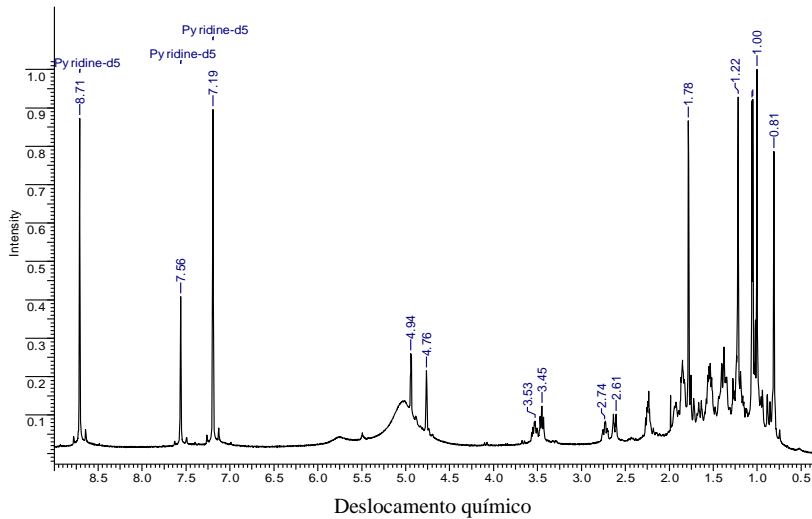


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz/ Pi) do composto 2.

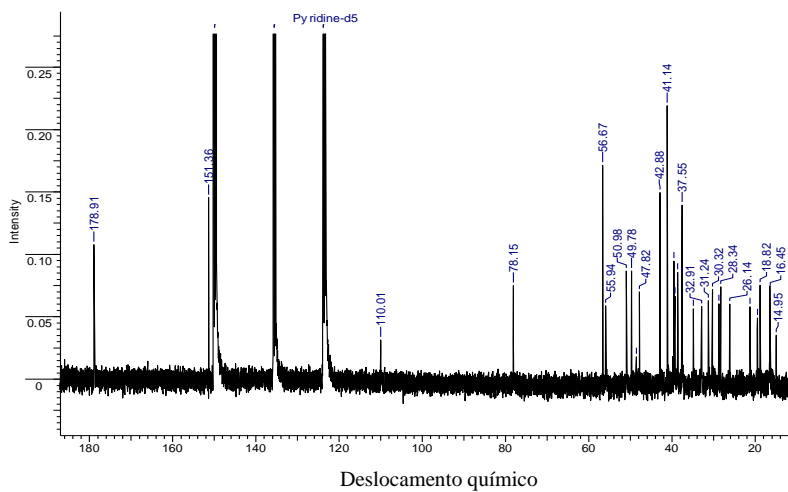


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz/ Pi) do composto 2.

A comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (LEAL et al., 2010) (Tabela 5) permitiu a identificação do composto 2 como sendo o ácido betulínico (Figura 24) .

Tabela 5. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para o composto 2 comparados com a literatura (LEAL et al., 2010).

C	δ deslocamento químico (ppm)	
	Composto 2	δ_{C} literatura MeOD, 500MHz
1	35,5	39,5
2	28,3	28,3
3	78,1	78,1
4	39,3	39,3
5	55,9	55,9
6	18,8	18,8
7	34,8	34,8
8	41,4	41,1
9	50,9	50,9
10	37,5	37,5
11	21,2	21,2
12	26,1	26,1
13	38,6	38,6
14	42,8	42,8
15	30,3	30,3
16	32,9	32,8
17	56,6	56,6
18	49,7	49,7
19	47,8	47,8
20	151,3	151,3
21	31,2	31,2
22	37,6	37,6
23	28,7	28,7
24	16,4	16,4
25	16,4	16,4
26	16,3	16,3
27	14,9	14,9
28	178,9	178,9
29	110,0	109,9
30	19,5	19,5

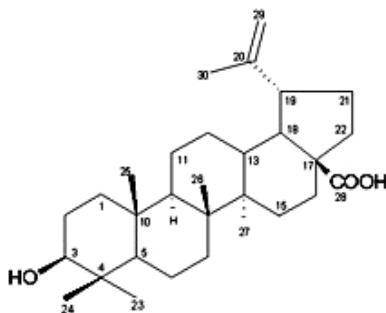


Figura 24. Estrutura do composto 2, ácido betulínico.

As sub-frações 20-33 recromatografadas em coluna de sílica gel, resultaram no isolamento de um sólido branco com ponto de fusão 196,5-198,8°C, o composto **3**. O espectro de IV (Figura 25) em pastilha de KBr também apresentou um perfil de absorção típico de estruturas terpênicas. Uma banda larga em 3439 cm^{-1} típico de estiramento de hidroxila; um grupo de bandas entre 2940 e 2860 cm^{-1} referente a estiramentos de ligação C-H. Além disso, pode-se observar uma banda bem definida em 1725 cm^{-1} , característica de estiramento C=O de ésteres e também uma banda pequena e fraca em 1635 cm^{-1} , o que indica estiramento de C-C de dupla ligação.

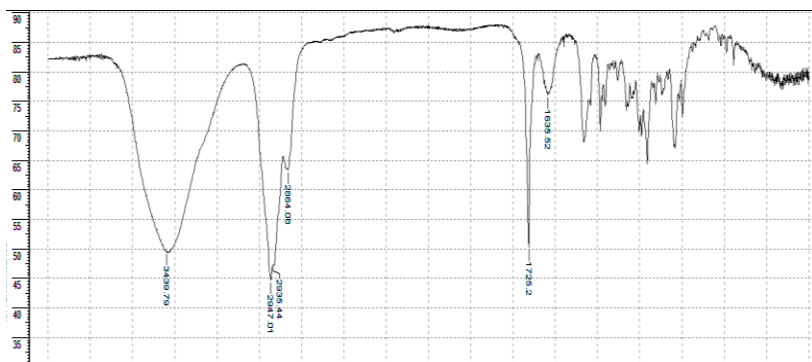


Figura 25. Espectro de infravermelho (KBr) do composto 3.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 26) e de ^{13}C (Figura 27) do composto **3** confirmam novamente uma estrutura triterpênica. O espectro de RMN de ^1H mostra um grupo de sinais entre 0,75 e 2,45 ppm típicos de estruturas terpenóidicas. Além disso, pode-se observar um duplo duplete em 3,11 ppm ($J=14,1, 3,7$ Hz), indicando H ligado a carbono sp^3 alílico referente ao H-18, que também está sob a desproteção da carbonila em C-28. O duplo duplete em 3,45 ppm, com constantes de acoplamento iguais a 5,47 e 10,94 Hz, indicam a presença de hidroxilação 3- β . Ocorre também um simpleto em 3,71 ppm referente a hidrogênio metoxílico e um tripleto em 5,4 ppm indicativo de hidrogênio ligado a carbono sp^2 de uma ligação dupla endocíclica trissubstituída.

Através do espectro de RMN de ^{13}C , foi possível observar 31 sinais, indicando ser um derivado triterpeno. Além disso, a presença de dois carbonos sp^2 C-12 e C-13 (δ 122,47 e 144,12 respectivamente) que juntamente com o deslocamento de C-20 em 30,7 ppm e também um oximetínico em (δ 78,04), permitiram sugerir que a substância trata-se de um triterpeno de esqueleto oleanano. A presença de carbono carbonílico em 178,01 ppm confirmou ser carbonila de éster, pois se fosse carbonila de ácido, este sinal estaria mais deslocado, aproximando-se de 180 ppm. Outro sinal importante para ajudar na caracterização encontra-se em 51,59 ppm, o que é confirmado pela presença de um carbono ligado a oxigênio exocíclico.

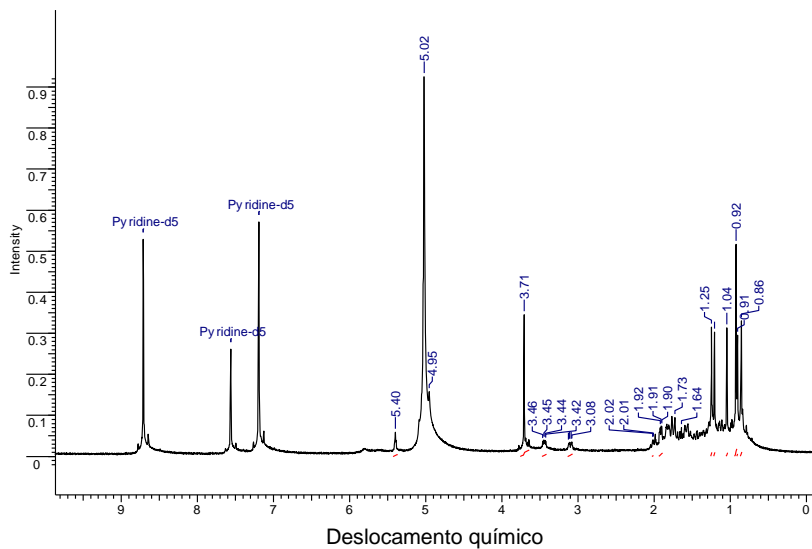


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Pi) do composto 3.

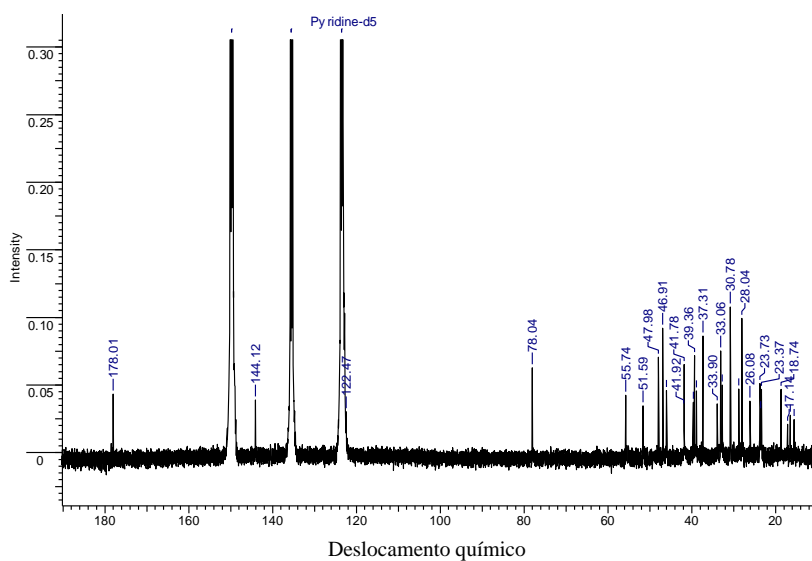


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C (100M Hz, Pi) do composto 3.

A comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura (FLORES et al., 2005) (Tabela 6) permitiu concluir que o composto **3** trata-se do éster metílico do ácido oleanólico (Figura 28).

Tabela 6. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para o composto 3 comparados com a literatura (FLORES et al., 2005).

C	δ deslocamento químico (ppm)		
	Composto 3	δ_{C} literatura CDCl_3 , 100MHz	ACD-LABS
1	38,8	38,4	38,7
2	28,04	27,1	27,4
3	78,04	78,9	78,7
4	39,3	38,7	38,8
5	55,7	55,1	55,5
6	18,7	18,3	18,5
7	32,7	32,6	32,5
8	39,6	39,2	39,5
9	47,9	47,6	48,1
10	37,3	36,9	37,2
11	23,3	23,0	23,3
12	122,4	122,3	122,6
13	144,1	143,7	143,9
14	41,9	41,6	41,8
15	28,04	27,6	27,9
16	23,6	23,3	23,5
17	46,9	46,7	46,6
18	41,7	41,2	41,6
19	46,0	45,8	46,0
20	30,7	30,6	30,6
21	33,9	33,8	34,0
22	32,7	32,3	32,5
23	28,7	28,0	28,2
24	16,5	15,5	15,7
25	15,5	15,3	15,3
26	17,1	16,8	16,9
27	26,0	25,9	25,9
28	178,0	178,3	177,9
29	33,0	33,1	33,1
30	23,7	23,6	23,6
Me-COO-C28	51,5	51,5	51,2

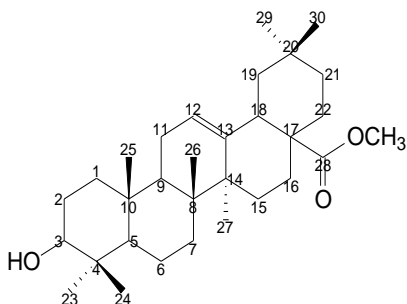


Figura 28. Estrutura do composto 3, oleanolato metílico.

As sub-frações de 4 a 11 da coluna A2, foram reunidas e purificadas por precipitação em metanol, obtendo-se um sólido branco amorfo, o composto 4. O espectro de infravermelho em pastilha de KBr (Figura 29) também apresentou um perfil característico de estruturas terpênicas. Uma banda larga em 3443 cm^{-1} o que corresponde a estiramentos de hidroxila. Um grupo de bandas entre 2870 e 2940 cm^{-1} referentes a estiramentos de ligação C-H. Além disso, observamos uma banda em 1694 cm^{-1} típica de estiramento de ligação C-O de carbonilas de ácido.

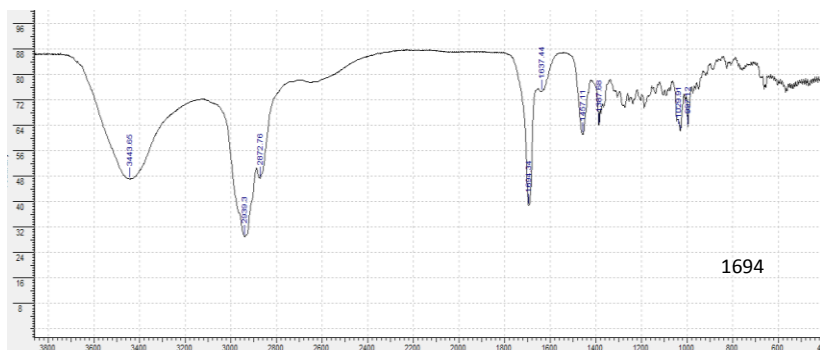


Figura 29. Espectro de infravermelho (KBr) do composto 4.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 30) e de ^{13}C (Figura 31) do composto 4 são também característicos de uma estrutura triterpênica. O espectro de RMN de ^1H apresenta o grupo de sinais entre 0,5 e 2,5 ppm caracterizando a estrutura hidrocarbonada de triterpenos com destaque para cinco metilas simples em 0,77 (s, H-25), 0,88 (d, H-30, $J=6,25$ Hz), 0,84 (s, H-24 e 26), 0,96 (d, H-29, $J=6,05$ Hz) e 1,11 (s, H-23 e 27) ppm e duas metilas dupletos 0,96 (d, H-29, $J=6,05$ Hz). Este dados juntamente com o duplo duplo presente em 2,18 ppm com constante de acoplamento $J=12,3$ Hz, corresponde ao H-18, sugere a estrutura do esqueleto ursano. Um duplo duplo em 3,14 ppm característico de hidrogênio carbinólico em C-3, com constantes de acoplamento J_{ae} e J_{aa} ($J=4,3$ e $10,7$ Hz), indicando a orientação β -hidroxilação e um triplo em 5,22 ppm relativo a hidrogênio ligado a carbono sp^2 de dupla ligação endocíclica trissubstituída (H-12).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C permitiu verificar a presença de 30 sinais, confirmando ser uma estrutura triterpênica. Neste contexto, foi observado a presença de dois sinais para carbonos sp^2 em 139,6 e 126,9 ppm correspondentes aos carbonos da ligação dupla endocíclica 12-13, a presença do sinal de carbonila de ácido em 181,6 ppm e também do sinal de carbono carbinólico em 79,6 ppm.

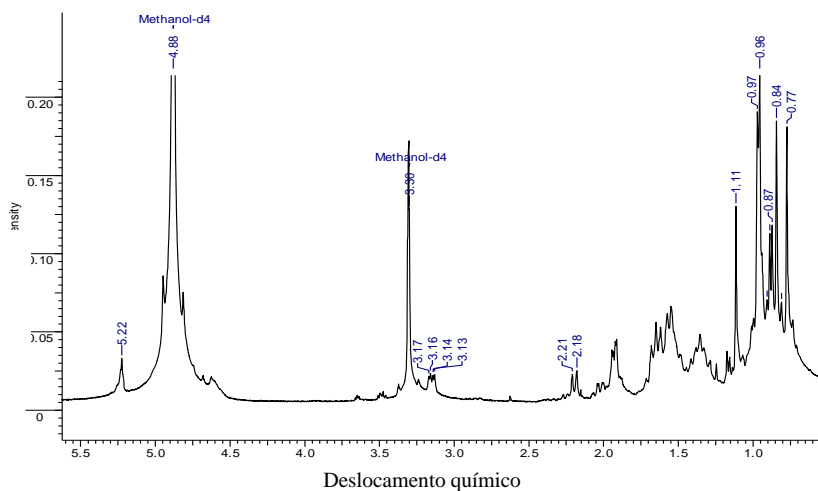


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CD_3OD), do composto 4.

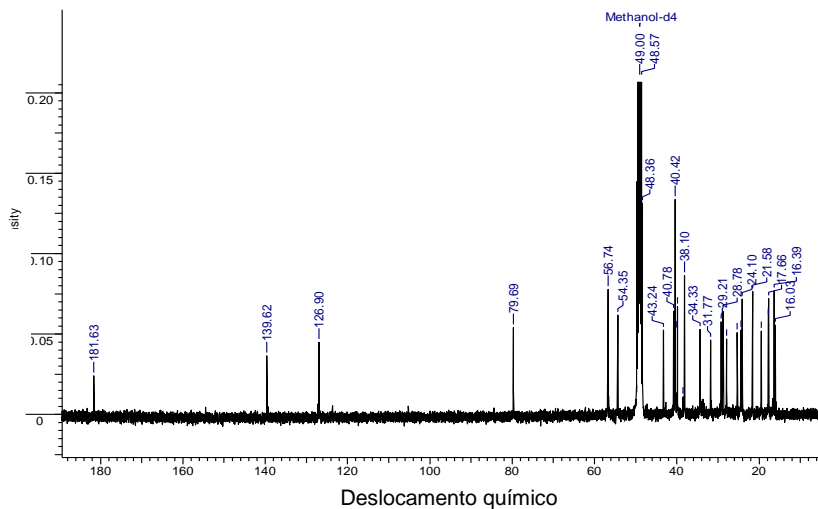


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD), composto 4.

A comparação com os dados obtidos experimentalmente com os dados da literatura (SEEBACHER, 2003) (Tabela 7), foi possível identificar o composto 4 como sendo o ácido ursólico (Figura 32).

Tabela 7. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para o composto 4 comparados com a literatura (SEEBACHER, 2003).

C	δ deslocamento químico (ppm)	
	Composto 4	δ_{C} literatura Pi, 600MHz
1	39,8	39,2
2	27,8	28,2
3	79,6	78,2
4	40,7	39,6
5	56,7	55,9
6	19,4	18,8
7	34,3	33,7
8	43,2	40,1
9	48,5	48,1
10	38,5	37,5
11	24,1	23,7
12	126,9	125,7
13	139,6	139,3
14	48,2	42,6
15	28,7	28,8
16	24,3	25,0
17	48,3	48,1
18	54,3	53,6
19	40,4	39,5
20	39,9	39,4
21	31,7	31,1
22	38,1	37,4
23	29,2	28,8
24	16,3	16,5
25	16,0	15,7
26	17,6	17,5
27	25,3	24,0
28	181,6	179,7
29	17,8	17,5
30	21,5	21,4

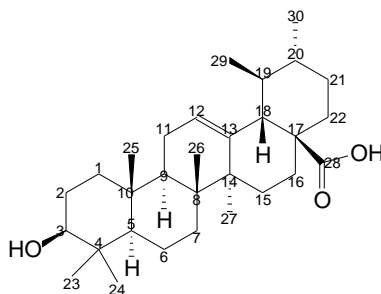


Figura 32. Estrutura do composto 4, ácido ursólico.

As frações chamadas de **5** e **6** foram separadas de uma mistura dos sobrenadantes das sub-frações 4-24 da coluna A2 (Figura 20) e eluídos com HEX/ACOEt em ordem crescente de polaridade. Os dois compostos foram purificados por precipitação com metanol apresentando-se sob forma de um pó branco, porém, a placa de CCD revelada com anisaldeído mostrou a presença de duas manchas típicas de terpenos. Para a identificação destes compostos, foi realizada uma análise em CLAE-UV (Figura 34) conforme metodologia descrita no item 3.7. Portanto, primeiramente foi realizada uma varredura destes compostos de 200 a 500 nm em Espectrômetro UV/VIS (Figura 33) para determinar o melhor comprimento de onda para a análise da mistura. Após a varredura, foi possível verificar, que o melhor comprimento de onda foi o de 210nm. Para comparação, foram utilizados os padrões de ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico.

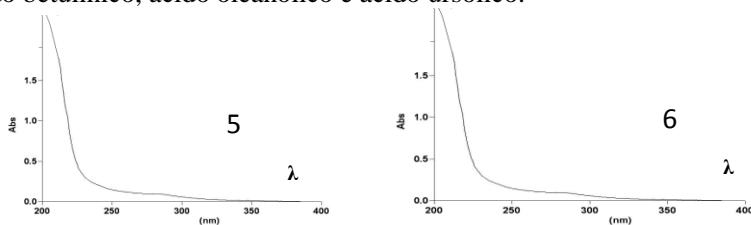


Figura 33. Espectro de UV-visível de mistura de triterpenos.

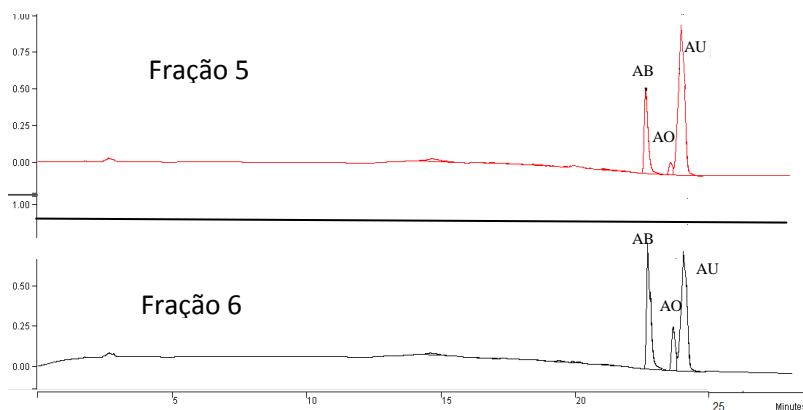


Figura 34. Perfil cromatográfico em CLAE-UV (210 nm) das frações 5 e 6.

Após a análise em CLAE das frações 5 e 6, comparadas com os padrões de triterpenos, foi possível identificar que 5 e 6 são misturas dos triterpenos ácidos betulínico, oleanólico e ursólico. A diferença está somente na proporção dos componentes das misturas. Em 5, a proporção relativa é: 24,3% de ácido betulínico (AB), 3,3% de ácido oleanólico (AO) e 72,3% ácido ursólico (AU) e em 6 a proporção relativa é 40,1% de AB, 11,3% de AO e 48,6% de AU.

5 Quantificação dos compostos no extrato bruto e frações por Eletroforese Capilar (EC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A eletroforese capilar também é uma técnica muito utilizada para a análise de compostos fenólicos em plantas, principalmente porque permite a injeção direta de extratos sem necessidade de purificação dos princípios ativos, utilização de volumes reduzidos de amostras, baixo consumo de reagentes e automação das análises. Os métodos desenvolvidos neste protocolo foram propostos com base nas estruturas, nos valores de pK_a , no comprimento de onda máximo de absorção e em curvas de mobilidade versus pH dos compostos em estudo.

Na EC, a separação ocorre devido à migração diferencial de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, a qual é função da razão entre carga e tamanho do íon e da presença do fluxo eletrosmótico (resultado da carga das paredes internas do capilar após aplicação do campo elétrico) para um dado pH (SUNTORNUSUK, 2002;

ISSAQ, 2000). Como os compostos fenólicos são ácidos fracos, os experimentos são conduzidos com soluções tampão de pH próximo a 10, para a melhor separação dos componentes. A técnica de eletroforese foi utilizada para a quantificação do ácido rosmarínico e carnosol.

5.1 Preparo da curva analítica e linearidade

Após determinar as condições eletroforéticas ideais para a análise de ácido rosmarínico (AR) e carnosol (CAR) construiu-se uma curva de calibração interna. A curva para o ácido rosmarínico foi realizada na concentração de 10 a 90 mg/L e o padrão interno (4-nitrofenol) em uma concentração fixa de 20 ppm; a curva para o carnosol na concentração de 11,4 a 114,0 mg/L com padrão interno também com uma concentração fixa de 20 ppm. Para a construção da curva de calibração, foi utilizada a média das razões da área do padrão do composto dividida pela área do padrão interno x concentração do padrão (Figura 35). As curvas foram realizadas com 5 pontos duplicados, sendo que todos os pontos da curva foram preparados dissolvendo-se em água Milli Q. Os eletroferogramas (Figura 36) foram todos obtidos a 200nm.

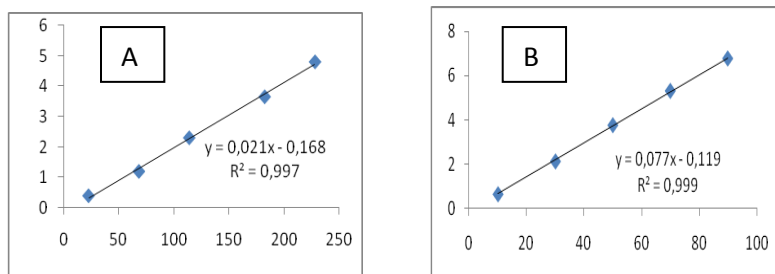


Figura 35. Curva de calibração para o carnosol (A) e ácido rosmarínico (B). TBS 20 mmol.L⁻¹, 50 mBar/5s, 25Kv, 10% metanol.

5.2 Quantificação do carnosol e ácido rosmarínico

Para a realização da quantificação (Tabela 8), o extrato bruto e frações também foram dissolvidos em água Milli Q em concentrações que variaram de 150 a 280 ppm. As amostras também foram injetadas em duplicata. Os eletroferogramas obtidos nas análises estão demonstrados na figura 36.

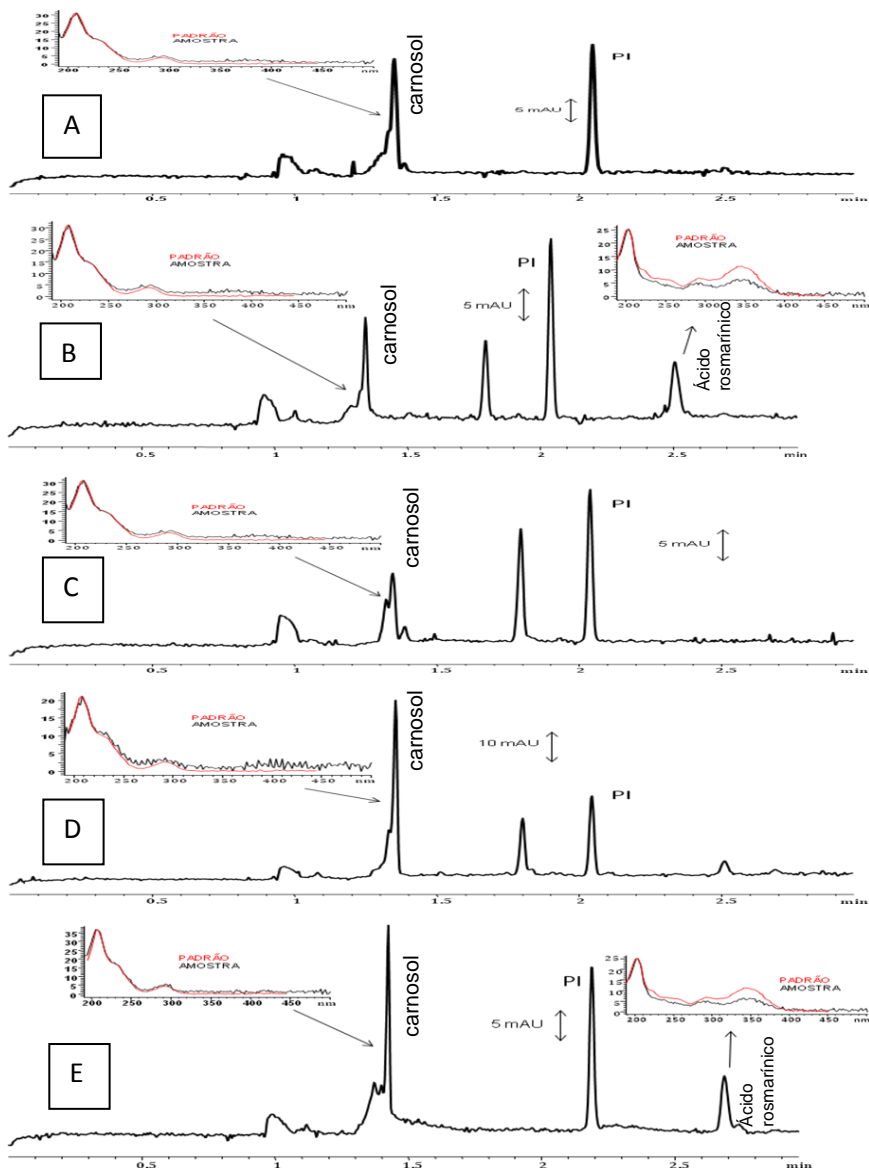


Figura 36. Eletroferogramas A- EBSO; B-EB; C-FHEx; D-FACoEt 1; E- FACoEt 2; TBS 20 mmol.L⁻¹, 50 mBar/5s, 25Kv, 10% metanol.

Tabela 8. Quantificação de carnosol (CAR) e ácido rosmarínico (AR) (mg/g) por Eletroforese Capilar.

AMOSTRAS	[CAR]	*CV,%	[AR]	*CV,%
EBSO	451,43 ± 1,49	2,02	n.d.	n.d.
EB	157,14 ± 2,58	7,21	34,88 ± 0,06	0,85
FHEX	215,61 ± 1,44	3,42	n.d.	n.d.
FACoEt 1	501,90 ± 0,18	0,14	n.d.	n.d.
FACoEt 2	201,31 ± 0,2	0,37	28,76 ± 0,02	0,34
FETOH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*CV- Coeficiente de variação; EBSO-Extrato Bruto sem óleo essencial; EB-extrato bruto; FHEX-fração hexano; FACoEt 1- fração acetato 1; FACoEt 2-fração acetato 2; FETOH-fração etanólica; n.d. – não detectado.

Uma das técnicas mais utilizadas para a separação e quantificação de compostos fenólicos e diterpenóides em extratos de plantas, é a técnica de CLAE-UV. No entanto, na grande maioria destes relatos cita ser necessário longos tempos de corrida, durante os quais, os compostos fenólicos inerentemente instáveis podem se degradar, ou ainda, necessitam de uma boa separação de linha da base em relação a estes compostos, o que compromete e dificulta a quantificação dos mesmos (ZHANG et al, 2012). Como opção, a técnica analítica de eletroforese capilar (EC), que foi desenvolvida no início dos anos 80, tem atraído cada vez mais pesquisadores como alternativa a técnica de CLAE-UV para otimizar as análises fitoquímicas. Em comparação a técnica de CLAE, a EC apresenta muitas vantagens incluindo separação de alta eficiência, tempos de análises bastante reduzidos, e o uso reduzido de solventes, tornando assim esta técnica com um grande número de adeptos a sua utilização na química de produtos naturais (CHEUNG e ZHANG, 2008).

A utilização deste protocolo mostrou-se bastante satisfatório, uma vez que foi possível separar e identificar os dois compostos sem a utilização de tratamentos prévios, além de reduzido tempo de análise total. As concentrações dos compostos variaram de 157,14 a 501,90 mg/g de extrato ou fração para o carnosol e 28,76 a 34,88 mg/g de extrato ou fração de ácido rosmarínico. A FACoEt1 apresentou a maior concentração de carnosol, representando 50,19% do total da fração,

seguido do EBSO representando 45,14% do total do extrato. Já para o AR, a identificação dele só foi possível no EB e FAcOEt₂.

A composição e concentração de compostos bioativos em plantas podem apresentar grandes diferenças, sendo que estas dependem de muitos fatores, como por exemplo, sua origem, a espécie, a variedade, o controle genético, fase vegetal, fatores externos como clima, solo, temperatura, exposição a microorganismos, entre outros (LAMIEN-MEDA et al, 2010). E estes são alguns dos fatores que acabam dificultando muitas vezes a comparação entre os resultados encontrados com outros obtidos para espécie em estudo.

Estas diferenças podem ser observadas no estudo apresentado por Bauer e colaboradores 2012, que em uma comparação entre diversas coletas de uma planta da mesma família do alecrim (Lamiaceae), a espécie de *Salvia officinalis* apresentou concentrações de carnosol variado entre 8 a 25 % nos extratos. Por outro lado, diferentes extratos de alecrim apresentaram concentrações de carnosol que variaram de 3 a 13% e de ácido rosmarínico de 0,3 a 0,6% no extrato seco conforme observado por Del Bano e colaboradores, 2004.

O extrato que estudamos no presente trabalho possui altos teores de carnosol, tornando-se portanto, uma fonte rica deste diterpeno.

5.3 Quantificação dos triterpenos por CLAE-UV

Para a quantificação dos triterpenos (Tabela 9) foram realizadas curvas de calibração externa com 5 pontos duplicados para cada padrão de ácido betulínico, ácido oleanólico e ursólico (figura 37) nas concentrações que variaram de 100 a 900 ppm. Os padrões foram diluídos em metanol grau CLAE. As amostras foram injetadas em duplicata.

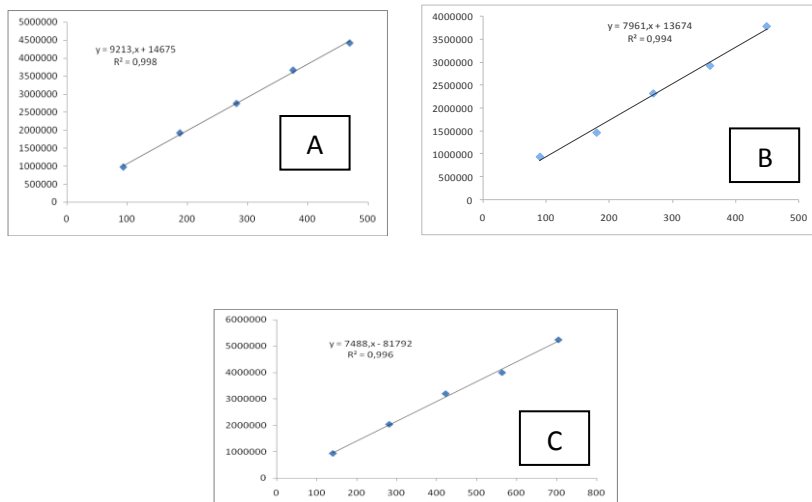


Figura 37. Curva de calibração para os padrões A- ácido betulínico; B- ácido oleanólico e C-ácido ursólico por CLAE-UV.

Tabela 9. Quantificação dos triterpenos (mg/g) de ácido betulínico (AB), ácido oleanólico (AO) e ácido ursólico (AU) por CLAE-UV

AMOSTRAS	[AB]	*CV,%	[AO]	*CV,%	[AU]	*CV, %
EBSO	45,0±3,63	9,71	53,12±0,82	1,86	69,3±2,55	4,43
EB	26,9±1,83	5,25	59,9±2,54	3,26	134,4±1,45	0,83
FHEX	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FAcOEt 1	53,0±3,16	4,59	81,0±7,90	7,51	53,3±3,92	5,66
FAcOEt 2	10,3±0,09	0,88	123,1±1,57	1,24	375,5±11,8	3,05
FETOH	n.d.	-	33,6±1,10	3,90	109,6±0,05	0,05

*CV- Coeficiente de variação; EBSO-Extrato Bruto sem óleo essencial; EB- extrato bruto; FHEX-fração hexano; FAcOEt 1- fração acetato 1; FAcOEt 2- fração acetato 2; FETOH-fração etanólica; n.d. – não detectado

Os triterpenos pentacíclicos são estruturas bastante comuns de serem isoladas em plantas, principalmente em plantas da família Lamiaceae. Estes triterpenos, nas últimas décadas, vem ganhando grande relevância em relação aos seus efeitos farmacológicos, devido as suas propriedades anti-inflamatória, anti-tumoral, hepatoprotetora e ainda associado a baixa toxicidade (CHATURVEDI et al., 2008). Além disso, esses triterpenos, são geralmente encontrados em diversas plantas em concentrações acima de 3% em relação ao extrato seco.

Considerando a diversidade de técnicas analíticas disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta é uma das técnicas que tem dominado a separação e determinação de triterpenóides pentacíclicos (LIANG et al., 2009). No entanto, ela é um pouco limitada em relação a separação de isômeros de posição, o qual possuem estruturas muito semelhantes e também por serem estruturas não cromóforas (RAZBORSEK et al., 2008). Entretanto, através da técnica de CLAE-UV foi possível identificar e quantificar os compostos nas respectivas frações e extratos de *R. officinalis* (Figura 38).

Podemos verificar que a FAcOEt2 possui a maior quantidade de AO e AU com 123,1 e 375,53 mg/g de fração respectivamente. Já a maior presença de AB foi verificada na FAcOEt1 com 53 mg/g de fração. Embora os triterpenos acima analisados possuam hidrofobicidade para serem solubilizados em hexano, não foi possível verificar a presença dos mesmos na fração hexânica.

Segundo Jäger e colaboradores 2009, em um estudo realizado com diferentes plantas e diferente tratamento para obtenção de uma fração rica em triterpenos, o qual utiliza n-heptano e aquecimento, nossos resultados podem ser comparados com diversas plantas e frutas, incluindo o extrato de folhas de *R. officinalis*, o qual também obtiveram concentrações de aproximadamente 50% do somatório dos triterpenos AB, AO e AU.

Esses resultados mostram que o alecrim além de apresentar uma grande quantidade de carnosol, a planta mostrou ser também uma fonte rica em triterpenos ácidos principalmente o ácido ursólico. Embora o ácido ursólico seja um triterpeno bastante comum de metabólito secundário encontrado em plantas, ele tem grande importância principalmente em atividades como a hepatoproteção, inibição de peroxidação lipídica, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-depressiva entre outros (LIU, 1995). Além disso, estudos recentes com o ácido ursólico mostram que este triterpeno é capaz de produzir aumento de músculo e diminuição de gordura em camundongos (KUNKEL et al.,

2011) e também sugerem a eficácia na redução de mudanças mediadas pelo estresse oxidativo no fígado de ratos.

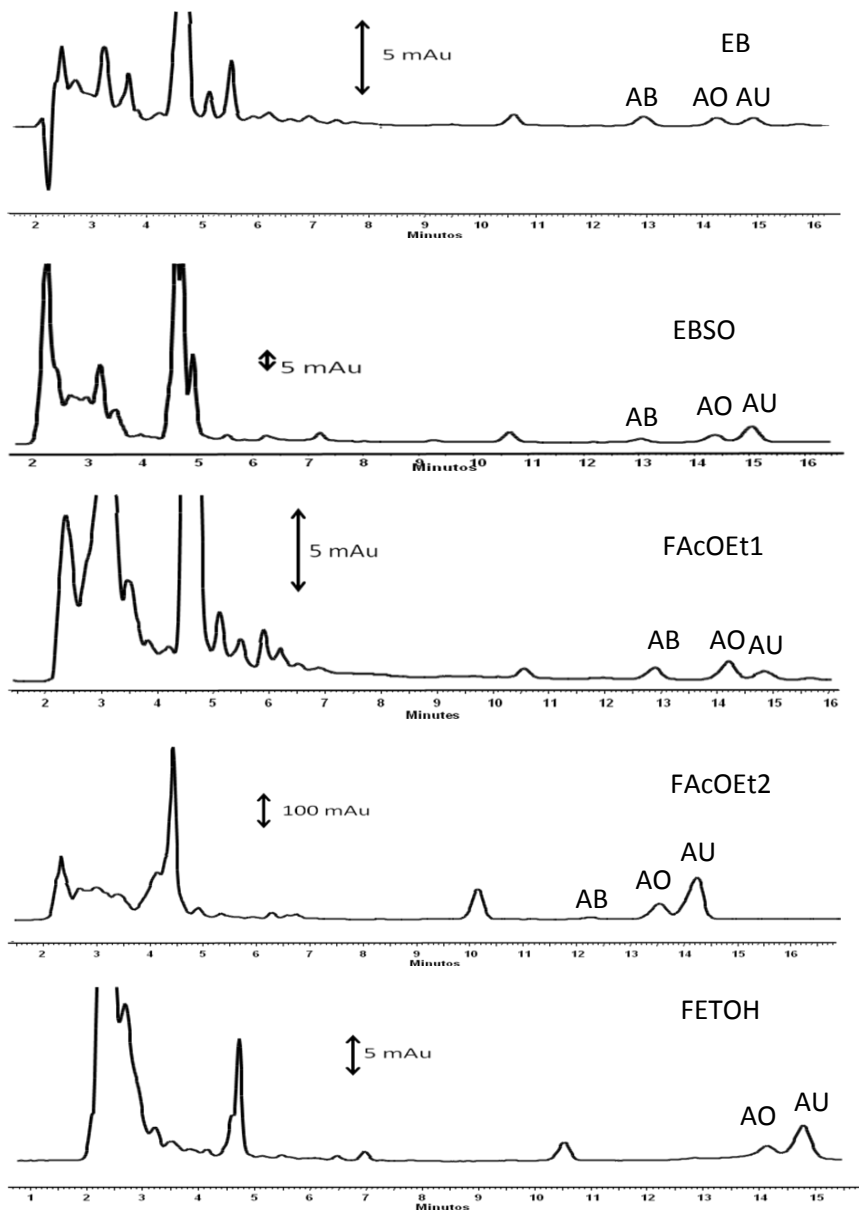


Figura 38. Cromatogramas dos extratos e frações de *R. officinalis* por CLAE-UV (200nm).

6 Avaliação da degradação do extrato de *Rosmarinus officinalis L.*

Nos últimos anos, os compostos naturais, tais como os ácidos fenólicos, diterpenos e triterpenos fenólicos, presentes em várias plantas, têm sido objeto de investigação intensa devido à seus potenciais benefícios para a saúde humana. Tem sido demonstrado que a atividade antioxidante de captação de radicais são as principais propriedades destes compostos. Portanto, eles podem contribuir para a prevenção cardiovascular ou doenças inflamatórias e câncer, que são causados, entre outros fatores, pelos efeitos nocivos dos radicais livres. Além da sua atividade antioxidante, os compostos também exibem uma variedade de funções biológicas tais como antibacteriano, citotóxicos, atividades antivirais e fungistática (RAZBORSEK et al., 2007).

O ácido carnósico (AC) tem sido relatado como o principal responsável pela atividade antioxidante do alecrim, seguido por carnosol, ácido rosmarínico, rosmanol e rosmadial, sendo o principal composto encontrado nas folhas de alecrim. O ácido carnósico é um antioxidante lipofílico capaz de neutralizar oxigênio, radicais hidroxila e peroxil e assim, inibir a peroxidação lipídica e diminuindo os danos da membrana celular. Assim, os extratos de alecrim

têm um grande interesse como fonte de compostos ativos para a indústria de alimentos (RODRÍGUEZ-MEIZOSO et al., 2007).

Estudos de degradação realizados por Munné-Bosch e colaboradores (2000) e Masuda e colaboradores (2002) mostraram que, o ácido carnósico é instável em solução, principalmente em solventes polares e sua degradação pode ser induzida pelo oxigênio do ar, formando outros derivados como o carnosol e o rosmanol. O carnosol e outros diterpenos são formados a partir de uma cascata de oxidação do ácido carnósico conforme a Figura 39. Esta cascata de oxidação é muito interessante do ponto de vista da atividade antioxidante das plantas, porque os novos fenóis antioxidantes formados, tais como carnosol e rosmanol, possuem forte ação antioxidante também. Este é um fenômeno importante que mostra a razão pela qual extratos de sálvia e alecrim são potentes antioxidantes. A atividade antioxidante, especialmente do tipo que quebra a cadeia, é uma atividade típica baseada em uma reação química em que o antioxidante é sacrificialmente oxidado para evitar a oxidação da substância biológica. Geralmente, um antioxidante perde a sua atividade, após esta reação.

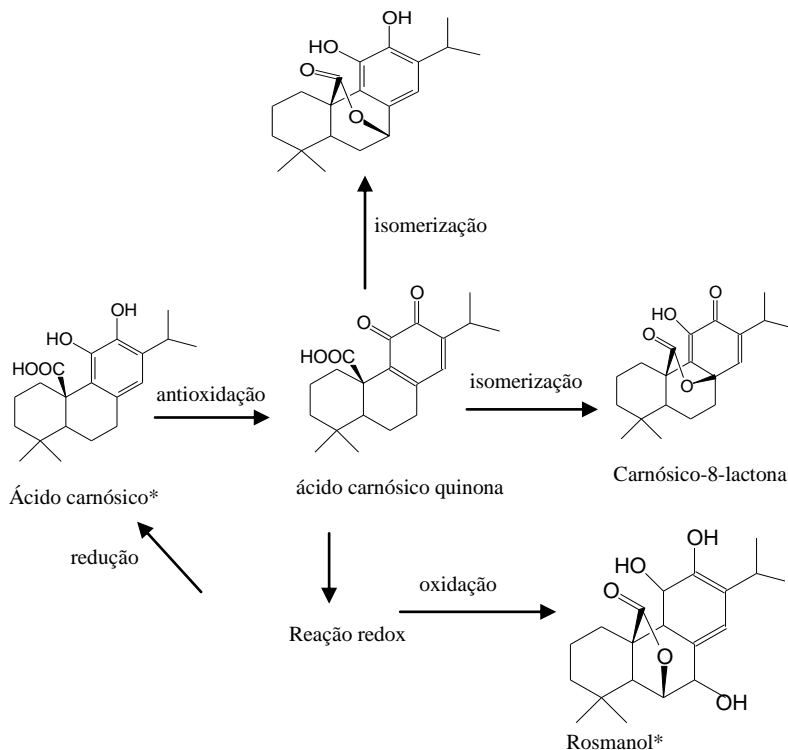


Figura 39. Mecanismo antioxidante proposto a partir do ácido carnósico quinona. *: composto com capacidade antioxidante.

Devido ao ácido carnósico ser um composto instável e de difícil isolamento por técnicas cromatográficas comuns, é que foi realizado um estudo da verificação de sua degradação no extrato em diferentes solventes utilizando a técnica de CLAE-UV.

A grande dificuldade de se isolar o ácido carnósico no presente trabalho, pode ser explicada pela alta instabilidade deste metabólito como descrito acima, colocando-se a hipótese de diferentes solventes interferirem nos procedimentos de isolamento deste ácido. De acordo com os resultados obtidos (Figura 40), pode-se perceber com clareza que conforme o tempo que o extrato fica em contato com o solvente, o

ácido se degrada, formando carnosol e outros derivados. Isso ocorre principalmente no extrato diluído em solventes mais polares. Já em meio acidificado, a área do AC manteve-se constante durante todo o período e com hexano, a área do ácido foi maior durante as primeiras 24hs. Quando o extrato foi diluído em metanol, após 10 horas de contato com o solvente, o ácido carnósico já está totalmente degradado. Com isso, pode-se concluir que os solventes interferem com grande significância na degradação do ácido carnósico, principalmente os mais polares, produzindo como maior metabólito o carnosol.

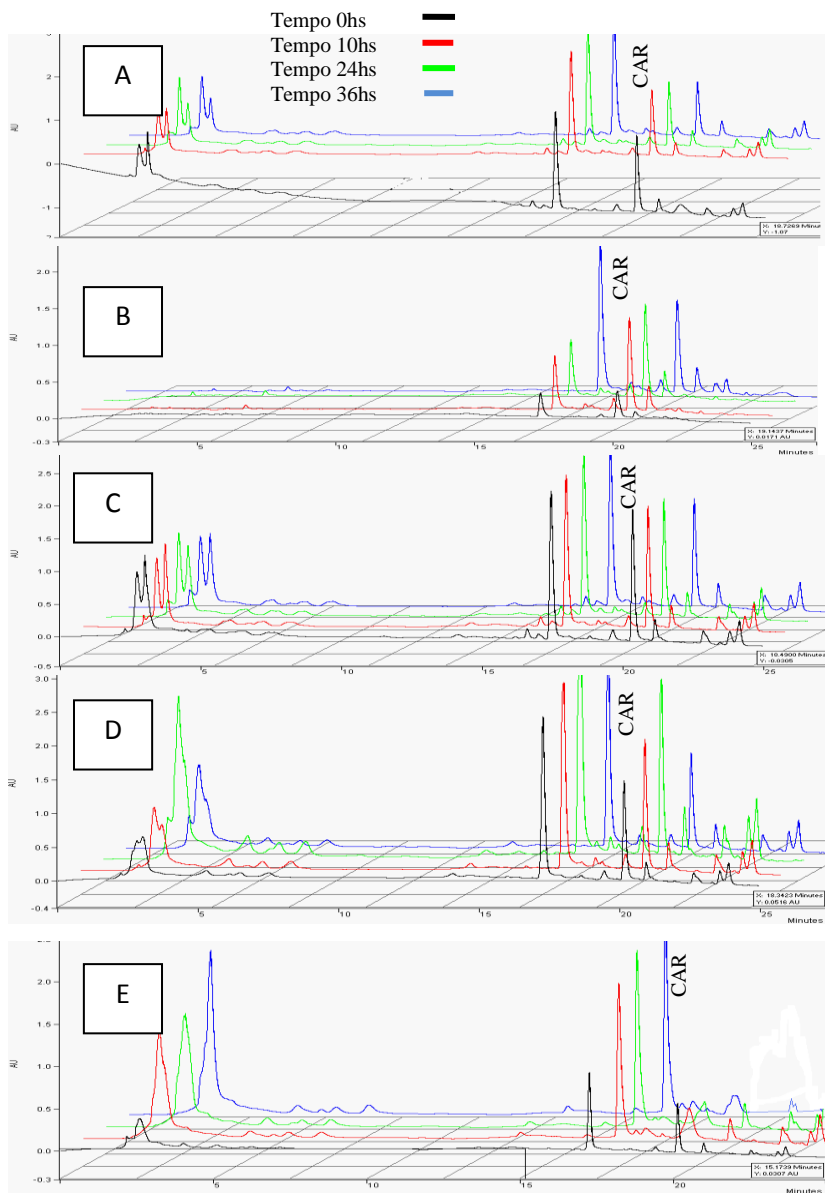


Figura 40. Perfil cromatográfico por CLAE-UV da degradação do AC (ácido carnósico). A- etanol; B-hexano; C- etanol + 1% de ácido acético; D- acetona; E- metanol; CAR-carnosol

7 Atividade anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória de *Rosmarinus officinalis* L., foi realizada, utilizando-se o modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina em camundongos, que é um modelo de fácil execução e que permite a quantificação das células e mediadores inflamatórios envolvidos na inflamação, sem que se tenha que utilizar procedimentos complexos de extração (SALEH et al., 1996).

Os resultados obtidos neste estudo (Tabela 10) apresentam evidências diretas de que o extrato bruto de *R. officinalis* L., suas frações, bem como os compostos isolados, possuem efeito anti-inflamatório notável no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, inibindo a liberação de importantes mediadores pró-inflamatórios, incluindo óxido nítrico (NOx), a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além de reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural (Tabela 10). Estes resultados enfatizam e corroboram com o uso desta planta na medicina tradicional/popular, para o tratamento de doenças inflamatórias (ALBUQUERQUE et al, 2007).

O estudo também revelou que a planta além de inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, também reduziu a ativação destas células. Afirmação esta, feita devido à significativa redução na atividade da enzima mieloperoxidase, enzima presente em grandes quantidades dentro dos leucócitos do tipo neutrófilos (Tabela 10).

Dentre os principais constituintes, presentes na *Rosmarinus officinalis*, destacaram-se o carnosol e os triterpenos ácidos betulínico e ursólico, que de maneira significativa demonstraram potente ação anti-inflamatória (Tabela 10), resultados corroborados por diversos autores que anteriormente também demonstraram efeitos anti-inflamatório destes compostos em outros modelos (ALTINIER et al., 2007; FU et al., 2005; LEE et al., 2008; LO et al., 2002; PAUR, AUSTENAA, & BLOMHOFF, 2008; POECKEL et al., 2008; TAKADA & AGGARWAL, 2003; YOON et al., 2010). Embora, não podemos excluir a possibilidade da presença de outros compostos minoritários estarem também contribuindo para este efeito. A exemplo disto, diversos outros compostos como o ácido rosmarínico, rosmanol, ácido micromérico que já foram isolados desta planta por outros autores demonstram também importante propriedade anti-inflamatória pela diminuição de edema, estresse oxidativo, inibição da atividade da COX-2 e redução na síntese de leucotrienos, em outros modelos inflamatórios

(ALTINIER et al., 2007; ALMELA et al., 2006; LAI et al., 2009; POECKEL et al., 2008; SCHECKEL et al., 2008).

Comparando-se os resultados de atividade anti-inflamatória do extrato bruto hidroalcolico, frações e compostos isolados, podemos destacar que em relação a inibição na migração leucocitária, a fração etanólica e o composto isolado ácido ursólico apresentaram melhores resultados. Este mesmo perfil foi mantido quando avaliamos a ação dos produtos naturais frente a migração de neutrófilos (tipo de leucócito predominante na pleurisia induzida pela carragenina) e a exsudação (edema) (Tabela 10).

A inibição da enzima mieloperoxidase foi mais evidente quando os animais foram tratados com o extrato bruto e o terpeno ácido betulínico (Tabela 10). Já a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO_x), a fração mais efetiva foi novamente a fração etanólica, e o composto mais efetivo foi o carnosol (Tabela 10). Finalmente, a inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 beta e TNF-alfa, foram fortemente inibidas pelo extrato bruto e pelo terpeno ácido betulínico (Tabela 10). Este é mais um resultado que reforça a ação dos compostos inibindo a atividade dos leucócitos, já que estas citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas e liberadas por este tipo celular (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

Os resultados apresentados acima, confirmam as propriedades anti-inflamatórias do *Rosmarinus officinalis*, e ainda suportam a hipótese que esta atividade é atribuída, pelo menos em parte, à presença de carnosol, e dos ácidos betulínico e ursólico no extrato. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de outros compostos também participarem desta ação, mesmo que se apresentem em pequenas quantidades que não nos permitiram o isolamento, identificação e disponibilidade para o teste biológico. Além disso, nossos resultados reforçam e confirmam dados populares quanto ao uso do alecrim como planta com atividade anti-inflamatória (HEINRICH et al., 2006).

Tabela 10. Atividade anti-inflamatória de *R. officinalis*.

Grupo/dose (mg/kg)	Leucócitos	Neutrófilos	Exsudação	MPO	NOx	IL-1 β	TNF- α
S ^a	0.94 \pm 0.11	0.16 \pm 0.03	1.95 \pm 0.12	60.0 \pm 9.62	1.71 \pm 0.79	70.7 \pm 9.39	45.3 \pm 4.79
C^a	4.80 \pm 0.17	4.06 \pm 0.15	11.6 \pm 0.53	408 \pm 51.0	14.9 \pm 1.15	1156 \pm 119	2945 \pm 379
EB ^b (50)	3.06 \pm 0.26**	2.44 \pm 0.30**	9.86 \pm 0.56*	196 \pm 51.0*	6.87 \pm 1.10**	466 \pm 57.7**	577 \pm 62.9**
FHEX ^b (25)	2.82 \pm 0.40**	2.37 \pm 0.31**	9.31 \pm 0.84*	260 \pm 22.3*	10.4 \pm 1.61*	619 \pm 85.4*	812 \pm 111**
FACOEt2 ^b (10)	3.11 \pm 0.24**	2.42 \pm 0.18**	8.17 \pm 1.04**	250 \pm 33.9*	6.28 \pm 0.92**	565 \pm 67.9**	800 \pm 88.2**
FETOH ^b (50)	1.87 \pm 0.26**	1.46 \pm 0.21**	7.56 \pm 0.43**	287 \pm 39.4*	4.88 \pm 0.68**	733 \pm 64.8*	1858 \pm 218*
AB ^b (2.5)	3.91 \pm 0.33*	3.42 \pm 0.27*	6.51 \pm 0.35**	202 \pm 16.0**	10.5 \pm 1.28*	487 \pm 86.6**	670 \pm 47.2**
CAR ^b (2.5)	3.86 \pm 0.17**	3.46 \pm 0.16*	8.29 \pm 0.44**	229 \pm 49.6*	7.96 \pm 0.86**	707 \pm 57.7*	953 \pm 210**
AU ^b (25)	1.31 \pm 0.12**	0.88 \pm 0.08**	5.77 \pm 0.49**	196 \pm 23.7**	10.3 \pm 0.96*	626 \pm 57.7*	1032 \pm 24.2**
Indo ^b (5)	2.26 \pm 0.32**	1.78 \pm 0.25**	7.93 \pm 0.56**	120 \pm 13.7**	7.40 \pm 0.90**	764 \pm 72.2*	1553 \pm 140*
Dexa ^b (0.5)	1.75 \pm 0.29**	1.33 \pm 0.21**	6.51 \pm 0.49**	136 \pm 5.65**	5.80 \pm 1.20**	516 \pm 33.4**	1376 \pm 270*

a = administrado via intrapleural; b= administrado via intraperitoneal; S= grupo controle negativo (salina); C= controle positivo inflamado (carragenina); Dexa = grupo controle tratado com o anti-inflamatório dexametasona; Indo = grupo controle tratado com o anti-inflamatório indometacina; EB = extrato bruto; FHEX = fração hexano; FACOEt2 = fração acetato de etila 2; AB = Ácido betulínico; CAR = carnosol; AU = ácido ursólico. * = P < 0.05; ** = P < 0.01. Os resultados apresentados nesta tabela, já foram publicados em Benincá et al., 2010.

8 Atividade antibacteriana

8.1 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto, frações e compostos isolados de *Rosmarinus officinalis* L. pela metodologia de microdiluição em caldo

As doenças infecciosas são causadas por bactérias, vírus, parasitas e fungos, e isto é devido a uma complexa interação entre o hospedeiro, patógeno e o ambiente. A descoberta dos antibióticos a partir da década de 1920, tinha diminuído drasticamente as infecções que até então assolavam a humanidade, mas o seu uso indiscriminado com o passar dos anos, acabou levando ao desenvolvimento de patógenos multirresistentes (SILVEIRA et al, 2006).

Os produtos naturais, principalmente os isolados e/ou derivados de fungos e bactérias sempre foram a principal fonte para o desenvolvimento de novos antibacterianos. Enquanto 25 a 50% de produtos farmacêuticos correntes são derivados de plantas, nenhum são utilizados como agentes antimicrobianos. Embora os curandeiros tradicionais tenham utilizado plantas para prevenir ou curar doenças infecciosas, a medicina ocidental vem tentando seguir estes passos. As plantas particularmente são ricas em uma ampla variedade de metabolitos secundários, tais como os taninos, terpenóides, alcalóides e flavonóides, que têm se demonstrado por experimentos realizados *in vivo* e em *in vitro*, como possuidores de importante atividade antimicrobiana (RIOS e RECIO, 2005; ARIF et al, 2009).

A busca por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas, parece apenas estar começando. Um rápido olhar para a natureza nos tem evidenciado facilmente que de alguma forma as plantas tem sobrevivido ao contato diário e intenso com microorganismos que se encontram a nível ambiental, sem que isso tenha gerado algum tipo de extinção vegetal. Por este motivo, tem se acreditado que as pesquisas na busca pelas substâncias responsáveis por esta "defesa" vegetal contra os microorganismos ambientais, nos leve em pouco tempo a uma nova era no desenvolvimento de fármacos com atividade antimicrobiana, a era dos antimicrobianos derivados de plantas (HEMAISWARY et al, 2008).

A determinação da atividade antimicrobiana, *in vitro*, de *Rosmarinus officinalis* contra microorganismos bacterianos, foi realizada através da metodologia da concentração inibitória mínima (CIM). Observando os resultados demonstrados na tabela 11, pode-se verificar que o extrato bruto (EB) da *Rosmarinus officinalis* apresentou atividade que variou de 500 a 15 µg/mL, mostrando ser mais ativo

contra a bactéria gram positiva *Streptococcus pyogenes* (15 µg/mL), e que segundo os critérios de de avaliação citados por Machado e colaboradores (2005), pode ser classificada como boa atividade. A diferença nos resultados da atividade antibacteriana, dentre as diferentes bactérias testadas, pode ser atribuída a grande diversidade de compostos químicos presentes no extrato e também pela proporção relativa dos constituintes individuais, além das diferenças entre as bactérias testadas. No caso do EB, o diterpeno carnosol (15,71%) e o triterpeno ácido ursólico (13,44%) são os compostos majoritários presentes neste extrato, e devido a isso acreditamos que sejam os principais compostos que contribuíram para tal efeito (HORIUCHI et al, 2007; HORIUCHI, 2007).

Levando-se em conta a classificação da atividade proposta por Machado e colaboradores (2005), verificamos que a fração HEX demonstrou boa atividade contra a bactéria gram positiva *Streptococcus pyogenes* com CIM de 30 µg/mL (Tabela 11), sendo que esta fração apresenta uma maior concentração de carnosol representando 21,56% desta fração. A FETOH apresentou atividade considerada moderada frente a todas as bactérias testadas. Já a FAcOEt₂, apresentou boa atividade contra as bactérias gram positivas *Streptococcus pyogenes* (CIM = 17 µg/mL) e também contra a cepa multi-resistente de *Staphylococcus aureus*, o MRSA (*Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina*) (CIM = 33 µg/mL). Em relação à constituição da fração, podemos verificar que a mesma foi a que apresentou a maior concentração do triterpeno ácido ursólico (37,55%), além de carnosol (20,13%).

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos compostos isolados da espécie *Rosmarinus officinalis*, foi utilizado a proposta de classificação adotada por Rios e Recio, (2005). O composto isolado ácido ursólico, apresentou de uma maneira geral atividade moderada, exceto para a bactéria *Streptococcus pyogenes* o qual apresentou atividade considerada excelente, com um CIM de 8,5 µg/mL (Tabela 11). Outros resultados também significativos foram encontrados contra as cepas gram positivas *Enterococcus faecalis* (CIM = 15 µg/mL) e também contra o MRSA (CIM = 15 µg/mL). Este resultado poderia explicar, pelo menos em partes, a atividade antibacteriana verificada na fração AcOEt e também no extrato bruto, já que ambas possuem grande concentração de tais compostos.

Com resultados apresentados pelo EB, FHEX, FAcOEt₂ e ETOH podemos sugerir que seus efeitos antibacterianos devem-se principalmente a presença dos triterpenos, já que quando testados

isoladamente apresentaram o mesmo perfil de atividade. Por este motivo, acreditamos que a ruptura da membrana celular bacteriana é o mecanismo de ação principal pelo qual o EB e as frações isoladas de *Rosmarinus officinalis* destroem as bactérias gram-positivas (COWAN, 1999).

Embora o mecanismo de ação de terpenos ainda não seja totalmente compreendido, especula-se que há um envolvimento da ruptura de membrana pelos compostos lipofílicos, o qual permite romper os lípidos da membrana celular bacteriana e mitocôndrias, perturbando as estruturas e tornando-os mais permeáveis. Esta ruptura pode ser entendida pela diminuição da fluidez da membrana bacteriana ao incorporar o ácido oleanólico, ursólico ou betulínico. Por exemplo, nas membranas biológicas dos animais, elas possuem diferentes concentrações de colesterol, cuja principal função é controlar o grau de fluidez das membranas. Estruturas que necessitam de membranas mais rígidas incorporam uma maior quantidade de colesterol. O provável aumento da rigidez da membrana celular bacteriana devido a incorporação do triterpeno é possível que leve a uma diminuição em sua mobilidade, podendo assim, ocasionar sua ruptura (COWAN, 1999).

O outro triterpeno isolado, o composto ácido betulínico, apresentou atividade fraca contra todas as cepas testadas. Já o carnosol, apresentou boa atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias, mostrando ser bastante ativo contra *Enterococcus faecalis* (CIM = 18 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM = 18 µg/mL) e também para a multi-resistente MRSA (CIM = 18 µg/mL). Resultado semelhante também foi encontrado por Oluwatuyi e colaboradores (2004), os quais encontraram uma atividade antibacteriana com um CIM de 16 µg/mL contra MRSA. Embora o carnosol seja um terpenóide, o mesmo é considerado um composto fenólico devido a presença de 2 hidroxilas em orto formando um grupamento catecol. Segundo Cowan (1999), os catecóis mostraram ser tóxicos aos microorganismos. O número de hidroxilas nos grupos fenólicos está diretamente relacionado com a toxicidade frente aos microorganismos, o que evidencia que o aumento da hidroxilação resulta em um aumento da toxicidade. Em adição, alguns autores também descobriram que quanto mais oxidado o fenol, maior atividade antibacteriana ele terá.

O achado mais relevante que podemos destacar em nossos experimentos, foi a atividade moderada do ácido ursólico e também do carnosol, frente ao *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), que é uma bactéria diretamente envolvida em casos de infecção hospitalar que acabam muitas vezes a levar o paciente a óbito

por falta de antimicrobianos eficazes no arsenal terapêutico atual (ALVAREZ et al, 2010).

Tabela 11. Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto, frações e compostos isolados (em µg/mL).

	EB	FHEX	FETOH	FAcOEt		AU	AB	CAR	GE
				1	2				
Bactérias Gram-Positivas									
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	62	125	625	37	67	60	250	37	0,37
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	250	500	625	62	125	15	125	18	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	250	125	625	62	125	60	250	37	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	125	125	625	62	125	60	250	18	0,75
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC	15	30	312	17	17	8,5	125	37	0,37
Bactérias Gram-Negativas									
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	125	125	156	125	250	62	62	37	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	500	500	625	250	500	125	250	150	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 31488	250	250	312	125	250	62	125	75	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	250	250	312	125	500	125	250	150	1,5
<i>Salmonella typhi</i> ATCC	250	250	312	125	250	125	125	18	1,8
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12022	125	250	312	125	250	125	125	18	1,5
Multiresistentes									
MRSA*	125	125	625	25	33	15	250	18	> 40,0
KPC**	500	250	625	125	500	125	250	75	> 20,0

EBSO= Extrato Bruto sem óleo essencial; EB = Extrato bruto hidroalcoólico; FHEX = fração hexano; FAcOEt1= fração acetate de etil1; FAcOEt2= fração acetato de etila 2; FETOH = fração etanólica; AU = Ácido ursólico; AB = Ácido betulínico e CAR = Carnosol; GE = Gentamicina; *Meticilina resistente *Staphylococcus aureus*; ***Klebsiella pneumoniae* produtor de carbapenemases; ATCC – American type collection culture.

9 Atividade antidepressiva

A depressão é o transtorno mental humano mais prevalente sendo que é reconhecida por ser sintomaticamente, psicologicamente e biologicamente heterogênea. Esta desordem é caracterizada pela apatia, perda de energia, retardo do pensamento e da atividade normal como um todo, bem como profundos sentimentos de desespero e ideação suicida. Apesar da disponibilidade de medicamentos antidepressivos, como os antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos reversíveis da monoamina-oxidase A (MAO-A), inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRIs) e inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (SNRIs), a depressão continua a ser um grande problema médico, principalmente pelo motivo que a maioria destes medicamentos demoram algumas semanas para começarem a exercer seus efeitos (THASE e HOWLAND, 1995; YU et al.; 2002). Além disso, existe um número considerável de efeitos colaterais, sendo os mais comuns, como: alteração do sono e apetite, alterações gastrintestinais (diarréia ou obstipação intestinal), retenção urinária, alergias de pele, sudorese, diminuição da libido ou retardo da ejaculação, aumento ou diminuição de peso, náusea, tontura e tremores.

A neurociência básica oferece a possibilidade de melhorar a nossa compreensão da fisiopatologia da doença, permitindo se identificar novos mecanismos envolvidos, que por sua vez, podem ser alvo de mais farmacoterapias eficazes além de possibilitarem a triagem de substâncias de origem natural ou sintética. Esta consideração implica na busca de novos agentes antidepressivos que possuam um rápido início de ação, com menos efeitos colaterais e uma margem de segurança maior, sendo as plantas reconhecidamente uma fonte de medicina complementar e uma alternativa para o manejo de transtornos do humor (SANTOSH et al., 2011).

Neste trabalho foi avaliado o efeito antidepressivo do extrato bruto (teste do nado forçado e no teste da suspensão da cauda), frações, compostos isolados e óleo essencial da *Rosmarinus officinalis* (no modelo da suspensão em cauda). Os modelos aqui utilizados são modelos comportamentais preditivos do efeito antidepressivo e que são sensíveis aos antidepressivos de diferentes classes farmacológicas, inclusive extratos e compostos isolados de plantas (MACHADO et al., 2009).

Como citado anteriormente, o efeito do extrato bruto de *Rosmarinus officinalis* foi investigado em dois modelos comportamentais: o teste do nado forçado e o de suspensão da cauda em

camundongos. O extrato bruto hidroalcoólico produziu um significativo efeito antidepressivo, uma vez que o tratamento agudo dos camundongos com o extrato por via oral, reduziu significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (na dose de 100 mg/kg) e da suspensão em cauda (nas doses de 10 e 100 mg/kg), quando comparado com o grupo controle sem alterações (Figura 41).

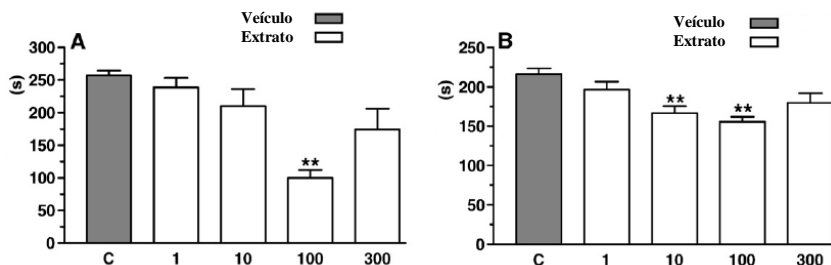


Figura 41. Efeito do tratamento agudo de camundongos com extrato bruto de *R. officinalis* (1 - 300 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade (teste do nado forçado - (A) e no teste da suspensão da cauda - (B)). Cada coluna representa a média \pm erro padrão. N = 6-10 animais. ** P < 0.01, comparado com o grupo tratado com o veículo (controle).

Em seguida, verificamos que o extrato manteve seu efeito, mesmo quando os animais foram tratados de forma crônica (14 dias consecutivos), que caracterizou efeito mesmo em logos tratamentos. Um dos principais problemas dos antidepressivos convencionais, já que os mesmos perdem seus efeitos ao longo do tratamento. Neste experimento, a repetição da administração do extrato durante 14 dias por via oral, continuou a produzir um significativo efeito antidepressivo no teste de suspensão em cauda (nas doses de 100 e 300 mg/kg) (Figura 42).

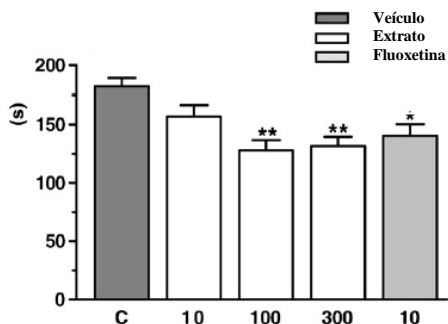


Figura 42. Efeito do tratamento repetido (14 dias) de camundongos com extrato bruto de *R. officinalis* (10 - 300 mg/kg, v.o.) e da fluoxetina (10 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda. Cada coluna representa a média \pm erro padrão. N = 6-10 animais. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$, comparado com o grupo tratado com o veículo (controle).

Quando avaliamos o efeito das frações de *R. officinalis* no teste antidepressivo da suspensão em cauda, verificamos que todas as frações testadas, bem como os compostos isolados (carnosol e ácido betulínico) foram capazes de reduzir de maneira significativa ($P < 0.05$) o tempo de imobilidade quando comparados com o grupo controle tratados apenas com o veículo de diluição dos produtos naturais e de maneira semelhante ao resultado apresentado com o antidepressivo fluoxetina ($P > 0.05$) (Figura 43).

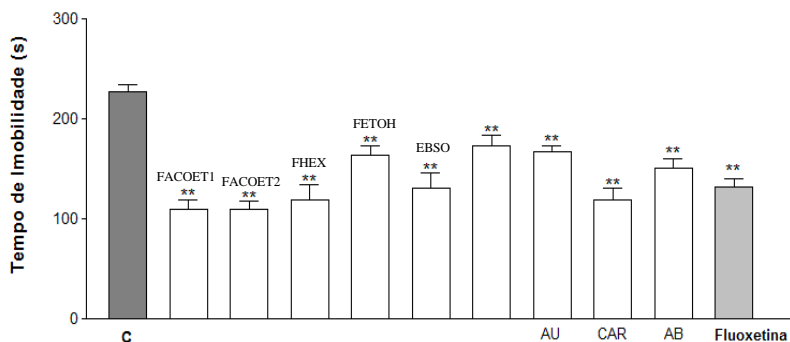


Figura 43 - Efeito do tratamento agudo de camundongos com frações, compostos isolados e óleo essencial da *Rosmarinus officinalis* e da fluoxetina (10 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda. FACOEt 1= fração acetato de etila 1 (1 mg/kg, v.o.); FACOEt 2 = fração acetato de etila 2 (1 mg/kg, v.o.); FHEX = fração hexano (1 mg/kg, v.o.); FETOH= fração etanólica (0,1mg/kg, v.o.); EBSO= exatros bruto sem óleo essencial (100 mg/kg, v.o.); Óleo essencial (10mg/kg) AU = ácido ursólico (0,1 mg/kg, v.o.); CAR = carnosol (0,1 mg/kg, v.o.); AB = ácido betulínico (10 mg/kg, v.o.). Cada coluna representa a média \pm erro padrão. N = 6-10 animais. ** P < 0.01, diferença significativa comparado com o grupo tratado com o veículo (controle).

10 Conclusões

- Em relação ao estudo fitoquímico:

Foi possível isolar e identificar 4 compostos distribuídos nas frações hexano e acetato de etila 2, sendo que o carnosol foi isolado da fração hexano e acetato de etila 2 e os triterpenos ácido betulínico, oleanolato metílico e ácido ursólico foram isolados da fração acetato de etila 2;

O óleo essencial de *R. officinalis* foi identificado como sendo do quimiotipo cineol;

O carnosol e o ácido rosmarínico foram encontrados em maior quantidade nas frações FACOET1 e no extrato bruto; e os triterpenos ácidos AB na fração FACOET1, AO na fração FACOET2 e o AU na FACOET2;

- Em relação ao estudo anti-inflamatório:

Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação da atividade anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis*, confirmam as propriedades anti-inflamatórias da planta, e ainda suportam a hipótese que esta atividade é atribuída, pelo menos em parte, à presença de carnosol, e dos ácidos betulínico e ursólico no extrato. Embora, não podemos descartar a possibilidade de outros compostos também participarem desta ação, mesmo os que se apresentam em pequenas quantidades que não nos permitiram o isolamento, identificação e disponibilidade para o teste biológico.

Além disso, nossos resultados reforçam e confirmam dados populares quanto ao uso do alecrim como planta utilizada no tratamento de doenças inflamatórias.

- Em relação ao estudo antibacteriano:

O estudo antibacteriano de *Rosmarinus officinalis*, demonstrou boa atividade antibacteriana, com destaque para o ácido ursólico e para o carnosol. Inclusive demonstrando boa atividade frente a bactérias resistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) que é um microorganismo hospitalar, o qual não existe tratamento antimicrobiano disponível.

Já o ácido betulínico foi considerado inativo contra as bactérias testadas.

- Em relação ao estudo antidepressivo:

O estudo antidepressivo do extrato bruto, frações, compostos isolados e óleo essencial da *Rosmarinus officinalis*, demonstraram resultados bastante significativos nos modelos do nado forçado e da suspensão da cauda. Muitos deles comparados aos resultados apresentados pela fluoxetina, com destaque para o extrato bruto, ácido ursólico e óleo essencial, o que sugere a possibilidade de utilização da planta no tratamento da depressão.

11 Referências

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, p. 114-140, 2007.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. **Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties.** Journal of Ethnopharmacology, v. 62, p. 183-193, 1998.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; et al. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach.** Journal of Ethnopharmacology, v. 114, p. 325–354, 2007.

ALCANTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; SILVA, J. R. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae).** Acta Amazonica, v. 40, p. 567-572, 2010.

AL-HADER, A. A.; HASAN, Z. A.; AQEL, M. B. **Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*.** Journal of Ethnopharmacology, v. 43, p. 217-221, 1994.

ALMELA, L.; SANCHEZ-MUNOZ, B.; FERNANDÉZ-LOPEZ, J. A.; ROCA, M. J.; RABE, V. **Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material.** Journal of Chromatography A, v. 1120, p. 221-229, 2006.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; **Characterization of topical**

anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 1718-1723, 2007.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. **Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA) na América Latina.** Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 14, p. 107-118, 2010.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. **Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, p. 3530-3535, 2004.

ARAÚJO, F. O. L.; RIETZLER, A. C.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; CARAZZA, F.; VIERA FILHO, S. A. **Constituintes químicos e efeito ecotoxicológico do óleo volátil de folhas de *Eucalyptus urograndis* (Mirtaceae).** Química Nova, v. 33, p. 1510-1513, 2010.

ARIF, T.; MANDALA, T.K.; KUMARA, N.; BHOSALEA, J.D.; HOLEA, A.; SHARMAC, G.L.; PADHIB, M.M.; LAVEKAR, G. S.; DABURA, R. ***In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb.** Journal of Ethnopharmacology, v. 123, p. 177-180, 2009.

BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELE, U. O.; GUNE, S.; YARDIBI, H. ***In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits.** Journal of Ethnopharmacology, v. 116, p. 64-73, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from medicinal plants.** Life Sciences, v. 78, p. 431 – 441, 2005.

BARREIRO, E. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** Química Nova, v. 32, p. 679-688, 2009.

BAUER, J.; KUEHNL, S.; ROLLINGER, J. M.; SCHERER, OL.; NORTHOFF, H.; STUPPNER, H.; WERZ, O.; KOEBERLE, A. **Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 syntase-1.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 342, p. 169-176, 2012.

BENINCÁ, J. P.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRODE, T. S. **Analysis of anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice.** Food Chemistry, v. 124, p. 468-475, 2010.

BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R.E. **Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence?.** Journal of Neuroendocrinology, v.13, p.1009-1023, 2001.

BONOLI, M.; PELILLO, M.; LERCKER, G. **Fast separation and determination of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid in different Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts by Capillary zone Electrophoresis with ultra violet diode array detection.** Chromatographia, v. 57, p. 505-512, 2003.

BOZIN, I.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. **Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 7879-7885, 2007.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos- Uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Santos, 2010.

BROCARD, P.S.; BUDNI, J.; KASTER, M.P.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A. L. S. **Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems.** *Neuropharmacology*, v. 54, p.464–473, 2008.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223– 253, 2004.

CALIXTO, J.B. **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p.131-134, 2005.

CARVALHO, J. C. T.; ALMANÇA, C. C. J. **Formulário de prescrição terapêutica.** São Paulo: Editora Atheneu, p. 49 – 65, 2003.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, p.241-246, 2005.

CHAKRABORTI, S. **Phospholipase A2 isoforms: a perspective.** *Cellular Signalling.*, v. 15, n.7, p. 637-665, 2003.

CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. **Lupeol: connotations for chemoprevention.** *Cancer Letters*, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHEUNG, H.; ZHANG, Q. **Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers.** *Journal of Chromatography A*, v. 1213, p. 231-238, 2008.

CÎNTĂ PÎNZARU, S.; LEOPOLD, N.; KIEFER, W. **Vibrational spectroscopy of betulinic acid HIV inhibitor and of its birch bark natural source**. *Talanta*, v.57, p.625- 631, 2002.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. **Anti-infective of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”**. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. **Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs**. *Trends in Pharmacological Science*, v. 23, p. 238-245, 2002.

CUNHA, M.P.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; CAPRA, J.C.; Rodrigues ALS. **Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test**. *Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry*, v. 32, p.1913–1920, 2008.

DA SILVA E. N J., CAVALCANTI B. C., GUIMARÃES T. T., PINTO M. D. C., CABRAL I. O., PESSOA C., COSTA L. V., DE MORAES M. O., DE ANDRADE C. K., DOS SANTOS M. R., DE SIMONE C. A., GOULART M. O., PINTO A. V. **Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p.399-410, 2010.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy**. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy**. *Transplant Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.

DEL BANO, M. J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; MARÍN, M. P.; DEL RÍO, J. A.; ORTUÑO, A.; IBARRA, I. **Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*, postulation of biosynthetic pathway.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n. 16, p. 4987-4992, 2004.

ECKELI, A. L.; DACH, F.; RODRIGUES, A. L. S. **Acute treatment with GMP produce antidepressantlike effects in mice.** NeuroReport, v.11, p. 1839–1843, 2000.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E.i. **Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.** Food Chemistry, v. 110, p. 76-82, 2008.

FALCAO, H. S.; LIMA, I. O.; DANTAS, H. F.; DINIZ, F. M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. **Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, p. 381-391, 2005.

FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M.C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S.O. **Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar.** Planta Daninha, v. 23, p.611-619, 2005.

FLORES, Y.; DÍAZ, C.; GARAY, F.; COLQUE, O.; STERNER, O.; ALMANZA, G. R. **Oleanane-type triterpenes and derivatives from seed coat of bolivian *Chenopodium quinoa* genotype “SALAR”.** Revista Boliviana de Química, v. 22, p. 71-77, 2005.

FU, L.; ZHANG, S.; LI, N.; WANG, J.; ZHAO, M.; SAKAI, J.; et al. **Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity**

of the isolated compounds. Journal of Natural Products, Cincinnati, v.68, p.198–206, 2005.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.627-641, 2008.

GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S.M. **Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents.** Journal of Ethnopharmacology, v. 110, n. 2, p. 200-234, 2007.

GAYATHRI, R.; PRIYA, D. K. D.; GUNASSEKARAN, G. R.; SAKTHISEKARAN, D. **Ursolic Acid Attenuates Oxidative Stress-mediated Hepatocellular Carcinoma Induction by Diethylnitrosamine in Male Wistar Rats.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 10, 2009.

GILLIJ, Y.G.; GLEISE, R. M.; ZYGADLO, J. A. **Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina.** Bioresource Technology, v. 99, p. 2507-2515, 2008.

GUILLÉN, M. D.; CABO, N.; BURILLO, J. **Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest.** Journal of Science and Food and Agriculture, v. 70, p. 359-363, 1996.

HEINRICH, M.; KUFER, J.; LEONTI, M.; PARDO-DE-SANTAYANA, M. **Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences.** Journal of Ethnopharmacology, v. 107, p. 157-160, 2006.

HOFSETH, L.J. **Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer.** *Cancer Letters*, v. 268, n.1, p. 10-30, 2008.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. **Potential of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 287—290, 2007.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. **Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE).** *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 1147—1149, 2007.

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. **Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs.** *Food Chemistry*, v. 123, p. 85-91, 2010.

HOSSEINZADEH, H.; NOURBAKHSH, M. **Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice.** *Phytoterapy Research*, v. 17, p. 938-941, 2003.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts.** London: Chapman & Hall, 1998.

<http://www.viagem-do-fazer.com/para/para+que+serve+o+alecrim/>
Acesso em: 28/10/2012)

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. ***Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

JAGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. **Pentacyclic triterpene distribution in various plants-Rich sources for a new group of multi-potent plant extract.** *Molecules*, v. 14, p. 2016-2031, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal.** 13ª edição, São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JOHNSON, T.L.; FORBES, B.A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K.D. **Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; VIEIRA e ROSA, P. T. **Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico.** *Química Nova*, v. 31, p. 1699-1705, 2008.

KASTER, M. P.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. **Involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test.** *Brain Research Bulletin*, v. 67, p. 53-61, 2005.

KUNKEL, S.; SUNEJA, M.; EBERT, S. M.; BONGERS, K. S.; FOS, D. F.; MALMBERG, S. E.; ALIPOUR, F.; SHIELDS, R. K.; ADAMS, C. M. **mRNA Expression Signatures of Human Skeletal Muscle Atrophy Identify a Natural Compound that Increases Muscle Mass.** *Cell Metabolism*, v. 13, p. 627-639, 2011.

LAI, C. S.; LEE, J. H.; HO, C. T.; LIU, C. B.; WANG, J. M.; WANG, Y. J.; et al. **Rosmanol potently inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through downregulating MAPK, NF-KB, STAT3 and C/EBP signaling pathways.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, 10990-10998, 2009.

LAMIEN-MEDA, A.; NELL, M.; LOHWASSER, U.; BORNER, A.; FRANZ, C.; NOVAK, J. **Investigation of Antioxidant and Rosmarinic Acid Variation in the Sage Collection of the Genebank in Gatersleben.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, p. 3813-3818, 2010.

LEAL, I. C. R.; Ramos; SANTOS, K. R. N.; JÚNIOR, I. I.; ANTUNES, O. A. C.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L.; KUSTER, R. M. **Ceanothane and Lupane Type Triterpenes from *Zizyphus joazeiro*—An Anti-Staphylococcal Evaluation.** Planta Medica, v. 76, p. 47-52, 2010.

LEE, C. H.; WU, S. L.; CHEN, J. C.; LI, C. C.; LO, H. Y.; CHENG, W. Y.; et al. **Eriobotrya japonica leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme production via the nuclear factor- κ B signaling pathway in lung epithelial cells.** The American Journal of Chinese Medicine, v. 36, p. 1185–1198, 2008.

LIAN, K.; CHUANG, J.; HSIEH, C.; WUNG, B.; HUANG, G.; JIAN, T.; SUN, Y. **Dual mechanisms of NF- κ B inhibition in carnosol-treated endothelial cells.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 245, p. 21-35, 2010.

LIANG, Z.; JIANG, Z.; FONG, D. W.; ZHAO, Z. **Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Oldenlandia diffusa* and its substitute using High Performance Liquid Chromatography.** Journal of Food and Drug Analysis, v. 17, p. 69-77, 2009.

LO, A.H.; LIANG, Y. C.; LIN-SHIAU, S.Y.; HO, C.T.; & LIN, J.K. **Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages.** Carcinogenesis, v. 23, p. 983–991, 2002.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Francisco José de Abreu Matos, Primeira Edição, Instituto Plantarum, Nova Odessa, p. 512, 2006.

LUIS, J. G.; QUINONES, W.; GRILLO, T. A.; KISHI, M. P. **Diterpenes from the aerial part of *Salvia columbarie***. *Phytochemistry*, v.35, p. 1373–1374, 1994.

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. **Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora***. *Pharmaceutical Biology*, v.43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR. V. F. **Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies**. *Química Nova*, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAHMOUD, A. A.; AL-SHIHRY, S. S.; SON, B. W. **Diterpenoid quinones from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)**. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1685–1690, 2005.

MANN, J.J.; MALON, E.K.M.; DIEHL, D.J.; PEREL, J.; COOPRE, T.B.; MINTUN, M.A. **Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients**. *American Journal of Psychiatry*, v.153, p.174-181, 1996.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. *Química Nova*, v. 24, p. 105-111, 2001.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L.; SCHWARZ, K. **Plant material from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is of commercial interest**

for its essential oil content and its antioxidant compounds. European Food and Research Technology, v. 210, p.263–267, 2000.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. **Treatment of mood disorders.** Nature Neuroscience, v.5, p.1068-1070, 2002.

NEMEROFF, C.B.; VALE, W.W. **The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery.** Journal of Clinical Psychiatry, v.7, p.5-13, 2005.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONEM, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. **Neurobiology of depression.** Neuron, v.34, p.13-25, 2002.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. **Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hidrodistillation and solvent free microwave extraction methods.** Food Chemistry, 2010, v. 120, p. 308-312.

OKUSA, P. N.; PENGE, O.; DEVLEESCHOUWER, M.; DUEZ, P. **Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae).** Journal of Ethnopharmacology, 2007, v. 112, p. 476-481.

OLUWATUY, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. **Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*.** Phytochemistry, v. 65, p. 3249-3254, 2004.

ORHAN, I.; ASLAN, S.; KARTAL, M.; SENER, B.; CAN BASER, K. H. **Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes.** Food Chemistry, v. 108, p. 663-668, 2008.

PAUR, I.; AUSTENAA, L. M.; & BLOMHOFF, R. **Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p.1288–1297, 2008.

PEREIRA, P.; TYSCA, D.; OLIVEIRA, P.; BRUM, L. F. S.; PICADA, J. N.; ARDENGHI, P. **Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid**. Pharmacological Research, v. 52, p. 199-203, 2005.

PÉREZ-FONS, L.; ARANDA, F. J.; GUILLÉN, J.; VILLALAIN, J.; MICOL, V. **Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 453, p. 224–236, 2006.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HÖRING, C.; STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. **Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes**. Biochemical Pharmacology, v. 76, p. 91-97, 2008.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. **Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants**. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie, v. 229, 327–336, 1977.

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.R.; DETTLING, A.C.; WESTON, A.; RUSSIG, H.; FERGER, B.; FELDON, J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: **Potential animal models in depression research**. Neuroscience Biobehavior Review., v.29, p.649-674, 2005.

PUKALSKAS, A.; VAN BEEK, T. A.; WAARD, P. **Development of a triple**

hyphenated CLAE-radical scavenging detection- DAD – SPE- NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, p. 81-88, 2005.

RAHMAN, S.Z.; SINGHAL, K.C. **Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them.** *Uppsalla Reports 17*, January Supplement, 2002.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. **Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

RAZBORSEK, M. I.; VONCINA, D. B.; DOLECEK, V.; VONCINA, E. **Determination of Major Phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry.** *Acta Chemical Slovenica*, v. 54, p. 60-67, 2007.

RIOS, J. L.; RECIO, M.C. **Medicinal plants and antimicrobial activity.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G.A. **Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response.** *International Immunology Pharmacology*, v.2, p. 603-630, 2002.

RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; ROMÁN, R. S.; IBAÑES, E.; ELVIRA, C. **A systematic study on the interactions between carnosic acid and ethylpyrrolidine methacrylate–methyl methacrylate copolymer in supercritical media.** *The Journal of Supercritical fluids*, v. 41, p. 452-460, 2007.

ROMANO, C S.; ABADI, K.; REPETTO, V.; VOJNOV, A. A.; MORENO, S. **Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives.** Food Chemistry, v. 115, p. 456–461, 2009.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. **Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy.** British Journal of Pharmacology, v. 118, n.3, p. 811-819, 1996.

SANTOSH, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, S.; MANGALA, L. **Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foedita* leaves in mice.** International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 3, p. 112-115, 2011.

SATOH, T.; IZUMI, M.; INUKAI, Y.; TSUTSUMI, Y.; NAKAYAMA, N.; KOSAKA, K.; SHIMOJO, Y.; KITAJIMA, C.; ITOH, K.; YOKOI, T.; SHIRASAWA, T. **Carnosic acid protects neuronal HT22 Cells through activation of the antioxidant-responsive element in free carboxylic acid- and catechol hydroxyl moieties-dependent manners.** Neuroscience Letters, v. 434, p. 260-265, 2008.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. **Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives.** Magnetic Resonance in Chemistry, v. 41, p. 636-638, 2003.

SCHECKEL, K. A.; DEGNER, S. C.; & ROMAGNOLO, D. F. **Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines.** The Journal of Nutrition and Disease, v. 138, p. 2098–2105, 2008.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. **Analysis of Inflammation.** Annual Review of Biomedical Engineering, California, v. 8, p. 93-151, 2006.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAJEM, T. J.; LEÃO, M. A. **Efeito dos flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico.** Medicina, v. 35, p. 127-133, 2002.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. **Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p. 236-240, 2008.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p. 618-626, 2008.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENCEZI, H. **Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana.** Química Nova, v. 29, n.4, 2006.

SINGH, G. K.; GARABADU, D.; MURUGARANDAM, A. V.; JOSHI, V. K.; KRISHNAMURTHY, S. **Antidepressant activity of *Asparagus racemosus* in rodent models.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 91, p. 283-290, 2009.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. **Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.** Nature reviews-Immunology, v. 10, p. 427-439, 2010.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELE, M. M. F.; FILHO, J. M.; VIANA G. S. B. **Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n .4, 2008.

STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; TULOK, M. H.; HEGEDUS, A.; RENNER, C, VARGA, S. I. **Antioxidant effect of various Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones.** Acta Biologica Szegediensis, v. 47, p.111-113, 2003.

STERU,L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. **The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.** Psychopharmacology v, 85, p.367–370, 1985.

SZUMNY, A.; FIGIEL, A.; GUTIÉRREZ-ORTÍZ, A.; CARBONELL-BARRACHINA, A. **Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method.** Journal of Food Engineering, v. 97, p. 253–260, 2010.

TAI, J.; CHEUNG, S.; WU, M.; HASMAN, D. **Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*.** Phytomedicine, v. 19, p. 436-443, 2012.

TAKADA, Y.; & AGGARWAL, B. B. **Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: Abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9.** The Journal of Immunology, v. 171, p.3278–3286, 2003.

THASE, M. E.; HOWLAND, R. H. **Biological processes in depression: na update and integration.** In: Beckham EE, Leber WR, editors. Handbook of Depression, 2nd ed., New York, Guilford, 1995; 213–279.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants: Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, p. 47-69, 1991.

VEIGA-JUNIOR, V.F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 308-313, 2008.

VENTURA-MARTINEZ, R.; RIVERNO-OSORNO, O.; GOMÉZ, C.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E. **Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum**. Journal of Ethnopharmacology, v. 137, p. 1528-1532, 2011.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, v. 29, p. 326-337, 2006.

WONG, M.; LICINIO, J. **Research and treatment approaches to depression**. Nature Reviews Neuroscience, v.2, p.343-351, 2001.

YOON, J. J.; LEE, Y. J.; KIM, J. S.; KANG, D. G.; & LEE, H. S. **Protective role of betulinic acid on TNF- α -induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 391, p. 96–101, 2010.

YU, Z.F.; KONG, L.D.; CHEN, Y. **Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice**. Ethnopharmacology, v. 83, p.161, 2002.

ZGORKA, G.; GLOWNIAK, K. **Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 26, p. 79–87, 2001.

ZHANG, Y.; SMUTS, J. P.; DODBIBA, E.; RANGARAJAN, R.; LANG, J. C.; ARMSTRONG, D. W. **Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using CLAE.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, p. 9305-9314.

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ROSA, A.O.; LIN, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L. S. **Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test.** Brain Research, v.1023, 253–263, 2004.

