



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE QUATRO
ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA.**

CARLA MELIM

Itajaí - 2011

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

CARLA MELIM

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE QUATRO
ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA.

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, da Universidade do Vale do Itajaí, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rivaldo Niero

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Itajaí, dezembro de 2011.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE QUATRO
ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA.
CARLA MELIM**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Tania Mari Belle Bresolin, Doutora
Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas
Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Doutor Rivaldo Niero
Presidente

Doutor Alexandre Bella Cruz (Univali)
Co-orientador

Doutora Ednéia Casagrande Bueno(Univali)
Membro interno

Doutora Jenifer Saffi (UFCSPA)
Membro externo

Itajai (SC), 9, julho de 2010

*Dedico esta dissertação aos
meus amados Pais, Maria
Dolores e Carlos, pelo
incentivo contínuo e
dedicação...*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à DEUS por me abençoar na realização de mais um sonho... sem Ele nada seria possível!

Niero, meu grande orientador, por estar sempre presente, me orientando e agindo acima de tudo como um grande amigo nos momentos de maiores dificuldades;

Alexandre Bella Cruz... pelas intermináveis tardes de orientações e pela amizade;

Ao Professor Dr. Franco Delle Monache do Centro Chimica Recettori, C.N.R., Roma, Itália, pelo auxílio na interpretação dos espectros de RMN;

À Zhelmy pela preparação das amostras, dedicação e prestatividade;

Aos Professores, funcionários e colegas do PMCF pelo conhecimento transmitido e amizade;

À minha Mãe querida Loi por sempre incentivar meus estudos e por ser esta pessoa tão maravilhosa! Não existem palavras para transmitir o quanto a Senhora foi e é importante neste e em todos os momentos da minha vida! Te amo...

Ao meu amado Pai Carlinhos que embora não mais ao meu lado, mas sempre presente no meu coração... Obrigado pelos ensinamentos e por todas as boas e inesquecíveis lembranças... Te amo, saudades!!!!

À minha irmã Carolina que acima de tudo é uma grande amiga e meus tios Norma e José que são meus amores...

Ao meu gerente Valdemar por entender minha ausência e todos os que torceram de alguma forma para concretização deste trabalho;

À todos meus amigos em especial Bibi e Serginho que me deram uma afilhada linda, Maria Luiza... Amo muito vocês!

E por fim ao grande amor da minha vida David... Saiba que você proporciona os melhores momentos da minha vida... Somente com você aprendi o que é amar de verdade!!! Te amo

*“ A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original”*

Albert Einstein

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE QUATRO ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA.

CARLA MELIM

Dezembro 2011

Orientador: Rivaldo Niero, Dr.

Co-orientador: Alexandre Bella Cruz, Dr.

Área de Concentração: Produtos naturais e Substâncias Bioativas

Número de Páginas: 88.

O Brasil detém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial. Esta biodiversidade tem atraído investimentos de grandes grupos de indústrias farmacêuticas com o propósito de obterem novos medicamentos. Destaca-se a necessidade de novos agentes antimicrobianos, visto que cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência bacteriana aos fármacos usados para fins terapêuticos. O presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial antimicrobiano de quatro espécies da flora brasileira (*Garcinia achachairu*, *Microsiphonia velame*, *Pilea microphylla* e *Rubus niveus*), no intuito de direcionar o estudo fitoquímico, através do método de difusão em Ágar. Além disso, foi avaliada a toxicidade através do ensaio com *Artemia salina* e a genotoxicidade através do Teste com *Saccharomyces cerevisiae*, bem como a avaliação de um possível sinergismo. A análise fitoquímica foi realizada através de métodos cromatográficos e espectroscópicos convencionais. As plantas foram coletadas, secas, moídas e maceradas em metanol durante sete dias. Após a eliminação do solvente o extrato foi particionado com solventes de polaridade crescente para a obtenção das respectivas frações semi-purificadas de hexano, clorofórmio e acetato de etila. Todas as espécies apresentaram atividade antimicrobiana com exceção da *Pilea microphylla*. Considerando que *M. velame* apresentou valores de CIM de 125 µg/mL (fração acetato de etila) contra *S. aureus* foi selecionada para um estudo mais detalhado. Da fração acetato de etila foi possível isolar quatro substâncias denominadas de MVAK-[3-6], MVAK-[7-10], MVAK-[15] e MVAK-[19-29]. No ensaio de sinergismo apenas foi observado efeito sinérgico entre o composto MVAK 7-10 e MVAK 19-29 com valor de CIF de 0,75. Em relação à toxicidade, frente *Artemia salina* apenas o extrato de *P. microphylla* (xilopódio) apresentou toxicidade e no ensaio com *Saccharomyces cerevisiae* os mesmos extratos não apresentaram citotoxicidade nem genotoxicidade, mostrando que *V. velame* é uma espécie importante sobre o ponto vista fitofarmacológico.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Atividade Antimicrobiana. Toxicidade.

ANTIMICROBIAL EVALUATION OF THE POTENTIAL OF FOUR MEDICINAL PLANT SPECIES OF THE BRAZILIAN FLORA

CARLA MELIM

December 2011

Supervisor: Rivaldo Niero, Dr.

Co-supervisor: Alexandre Bella Cruz, Dr.

Area of Concentration: Natural Products and Bioactive Substances

Number of pages: 88

Brazil has between 15 and 20% percent of the world's biodiversity. This biodiversity has attracted investments from several major pharmaceutical groups, seeking to obtain new drugs. This study highlights the need for new antimicrobial agents, since increasing bacterial resistance to the drugs used for therapeutic purposes has been observed. This study determines the antimicrobial potential of four species of Brazilian flora (*Garcinia achachairu*, *Microsiphonia velame*, *Pilea microphylla* and *Rubus niveus*), in order to direct phytochemical study, by the agar diffusion method. It also evaluates the toxicity through testing with *Artemia salina* and genotoxicity through testing with *Saccharomyces cerevisiae*, as well as evaluating a possible synergism. Phytochemical analysis was performed by conventional spectroscopic and chromatographic methods. The plants were collected, dried, crushed and macerated in methanol for seven days. After the removal of the solvent, the extract was partitioned with solvents of increasing polarity to obtain the semi-purified fractions of hexane, chloroform and ethyl acetate. All species showed antimicrobial activity with the exception of *Pilea microphylla*. Considering that *M. velame* showed MIC values of 125 mg/mL (ethyl acetate fraction) against *S. aureus*, it was selected for further study. From the ethyl acetate fraction, four substances were isolated: MVAK-[3-6], MVAK-[7-10], MVAK-[15] and MVAK-[19-29]. In the synergism test, a synergistic effect was only observed between the compounds MVAK 7-10 and 19-29 MVAK, with a CIF value of 0.75. In relation to toxicity against *Artemia salina*, only the extract of *P. microphylla* (xylopodium) showed toxicity. In the *Saccharomyces cerevisiae* test, none of the extracts showed cytotoxicity or genotoxicity, showing that *M. velame* is an important phytopharmacological species.

Kew words: Medicinal plants, Antimicrobial activity, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos de <i>Garcinia achachairu</i>	23
Figura 2: Foto de <i>Pilea microphylla</i>	26
Figura 3: Foto de <i>Macrosiphonia velame</i>	28
Figura 4: Foto de <i>Rubus niveus</i>	30
Figura 5: Estrutura de uma bactéria.....	31
Figura 6: Diferença de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa.....	32
Figura 7: Fluxograma do preparo e fracionamento do extrato obtido das partes aéreas de <i>Macrosiphonia velame</i>	46
Figura 8: Representação da metodologia empregada para avaliação do potencial tóxico agudo utilizando <i>Artemia salina</i>	52
Figura 9: Representação esquemática do teste de mutagênese em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> XV 185-14c.	54
Figura 10: Fluxograma das operações realizadas na purificação da fração de acetato de etila.....	58
Figura 11: Espectro de RMN- H^1 (300 MHz; CD_3OD ; TMS) da substância MVAK3-(7-10)	59
Figura 12: Espectro de RMN- C^{13} (75 MHz; CD_3OD ; TMS) da substância MVAK3(7-10)	59

- Figura 13:** Estruturas moleculares das substâncias isoladas da fração de acetato de etila obtida das partes aéreas de *Macrosiphonia velame*..... 61
- Figura 14:** Estrutura molecular sugerida para MVAK 4 [15]..... 62
- Figura 15:** Fluxograma das operações realizadas na purificação da fração clorofórmica de *Macrosiphonia velame*..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos e frações das espécies estudadas.....	56
Tabela 2: Dados de deslocamentos químicos de mvak 3(7-10) em comparação com a literatura*	60
Tabela 03: Concentração Inibitória Mínima de diferentes plantas contra os micro-organismos <i>S.aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> , expressos em µg/mL.....	66
Tabela 04: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de sub-frações de <i>G. achachairu</i> obtidas da cromatografia em coluna das frações de clorofórmio e acetato de etila contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>B. subtilis</i>	69
Tabela 5: Concentração inibitória mínima (µg/ml) de sub-frações obtidas das partes aéreas da fração de acetato de etila de <i>m. velame</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. saprophyticus</i> e <i>E. coli</i>	73
Tabela 6: Concentração Inibitória Fracional (µg/mL) das combinações dos compostos de <i>M. velame</i> contra <i>S. aureus</i>	74
Tabela 7: Valores de CL ₅₀ (µg/mL) obtidos dos extratos metanólicos das espécies estudadas através do método de Probitos, frente ao ensaio de toxicidade com <i>A. salina</i>	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 <u>Objetivo Geral</u>	15
2.2 <u>Objetivos Específicos</u>	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <u>Biodiversidade</u>	16
3.2 <u>Indústria Farmacêutica</u>	17
3.3 <u>Plantas Medicinais</u>	19
3.4 <u>Pesquisa com atividade antimicrobiana</u>	21
3.4.1 <i>Garcinia achachairu</i>	23
3.4.2 <i>Pilea microphylla</i>	25
3.4.3 <i>Macrosiphonia velame</i>	27
3.4.4 <i>Rubus niveus</i>	28
3.5 <u>Micro-organismos</u>	30
3.5.1 Bactérias	31
3.5.1.1 Infecções bacterianas	33
3.5.2 Infecções fúngicas	34
3.5.3 Antimicrobianos	35
3.5.4 Resistência antimicrobiana	36
3.6 <u>Métodos para determinação da atividade antimicrobiana</u>	38
3.7 <u>Ensaio de Sinergismo</u>	40
3.8 <u>Ensaio de toxicidade</u>	41
3.8.1 Ensaio de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i>	42
3.8.2 Genotoxicidade	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 <u>Obtenção do material vegetal</u>	45
4.1.1 Preparação e fracionamento do extrato metanólico	45
4.1.2 Preparação do extrato e obtenção das frações das partes aéreas de	46

<i>Macrosiphonia velame</i>	
4.1.3 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Macrosiphonia velame</i>	46
4.1.4 Identificação dos compostos químicos de <i>Macrosiphonia velame</i>	47
4.2 <u>Material microbiológico</u>	47
4.2.1 Micro-organismos.....	47
4.2.2 Manutenção dos micro-organismos	48
4.2.3 Meios de cultivo	48
4.3 <u>Atividade antimicrobiana</u>	49
4.3.1 Preparo dos inóculos	49
4.3.1.1 Bactérias	49
4.3.1.2 Fungos leveduriformes	49
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	50
4.4 <u>Avaliação da toxicidade</u>	51
4.4.1 Ensaio com <i>Artemia salina</i>	51
4.4.2 Ensaio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
4.5 <u>Ensaio de sinergia</u>	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 <u>Análise fitoquímica</u>	56
5.1.1 Extratos e frações	56
5.1.2 Fração acetato de etila de <i>Macrosiphonia</i> <i>velame</i>	57
5.1.3 Fração clorofórmio.....	63
5.2 <u>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</u>	64
5.3 <u>Ensaio de sinergismo</u>	73
5.4 <u>Toxicidade frente <i>Artemia salina</i></u>	75
5.5 <u>Ensaio de citotoxicidade e mutagenicidade em <i>Saccharomyces</i></u> <u><i>cerevisiae</i></u>	77
6 CONCLUSÕES	78
7 REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento acentuado de infecções, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (CANTON; VIUDES; PEMÁN, 2001). A utilização de substâncias antimicrobianas representa talvez um dos maiores avanços da farmacoterapia. Estas substâncias estão entre os fármacos mais utilizados, tanto em ambulatórios quanto em hospitais, e têm reduzido drasticamente a incidência de muitas doenças infecciosas. Por outro lado, muitas infecções causadas por micro-organismos emergentes ou multirresistentes, principalmente infecções fúngicas, permanecem sem opções terapêuticas efetivas, aliado aos sérios efeitos colaterais produzidos pela farmacoterapia (TAVARES, 2001).

O uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos, assim como a sutileza dos micro-organismos em desenvolver resistência natural e causar doenças oportunistas em pacientes imunodeprimidos, torna necessário a permanente investigação de novos fármacos com potencial antimicrobiano que não sejam tóxicos em doses fisiologicamente aceitas.

O uso de plantas para o tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, com evidências que remetem a aproximadamente 3000 anos a.C. Estas espécies representam muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades. Com isto, o homem adquiriu conhecimentos empíricos sobre plantas medicinais, repassando-os às demais gerações (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O estudo químico de plantas medicinais tem levado à descoberta de compostos bioativos de aplicação no desenvolvimento de novos fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BARREIRO; BOLZANI, 2009). No entanto, somente 1% destas espécies vegetais têm sido estudadas fitoquimicamente (GURIB-FAKIM, 2006). Isto justifica o crescente interesse de profissionais da área no estudo de processos de isolamento e no desenvolvimento de métodos de síntese de tais compostos.

Cerca de 30% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas. Além disso, aproximadamente 50% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, ou

análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN; CARTER, 2005).

Desta forma, no presente trabalho foi realizado a determinação da atividade anti-bacteriana de quatro plantas brasileiras, sendo elas, *Garcinia achachairu*, *Pilea microphylla*, *Macrosiphonia velame* e *Rubus niveus*, frente a uma seleção de microorganismos, na tentativa de selecionar a espécie mais promissora sob o ponto de vista fitoquímico e microbiológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o potencial antimicrobiano de *Garcinia achachairu*, *Pilea microphylla*, *Macrosiphonia velame* e *Rubus niveus* no intuito de direcionar o estudo fitoquímico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil antimicrobiano de extratos e frações obtidos de *Garcinia achachairu*, *Macrosiphonia velame*, *Rubus niveus* e *Pilea microphylla* através do método de difusão em ágar;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações obtidos das diferentes espécies;
- Avaliar o potencial de sinergismo entre os compostos isolados de *M. velame*;
- Analisar fitoquimicamente as frações mais ativas através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Avaliar a toxicidade das espécies através do ensaio com *Artemia salina*;
- Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade das espécies selecionadas através do Teste com *Saccharomyces cerevisiae*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiversidade

O Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies. Dados estatísticos indicam ainda que existem 55 mil espécies de plantas, 517 anfíbios (294 endêmicos), 1622 aves (192 endêmicas), 524 mamíferos (cerca de 130 endêmicos), 468 répteis (172 endêmicos), 3000 espécies de peixes de água doce e cerca de 15 milhões de insetos, muitos completamente desconhecidos. Com toda essa riqueza biológica, o maior produto de exportação comercial do país refere-se a espécies de plantas exóticas, que foram introduzidas como, por exemplo, laranja, soja, cana-de-açúcar e eucalipto (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A Floresta Amazônica é o bioma brasileiro com maior destaque nacional e internacional, devido à diversidade biológica, e principalmente pela grande área territorial e reserva de água doce. O Cerrado e a Mata Atlântica destacam-se também pela biodiversidade, e pelas imensas áreas de matas destruídas pelo avanço da ocupação humana e suas atividades exploratórias (VIEIRA; MARTINS, 2002).

Considerando a biodiversidade genética do Brasil, as plantas superiores surgem como importante fonte de novos fitoterápicos e fitofármacos. O potencial terapêutico da flora brasileira vem sendo comprovado pelo número de publicações em revistas científicas na área de produtos naturais, atingindo destaque em relação aos países da América Latina (CALIXTO, 2005).

A biodiversidade vegetal do Brasil tem atraído investimentos de grandes grupos de indústrias farmacêuticas com o propósito de obterem novos medicamentos, mas tem sido alvo, também, da biopirataria, especialmente de espécies vegetais da Amazônia. Isto demonstra a necessidade de uma política governamental que incentive os grupos de pesquisa do país, a explorarem de forma sustentável, a biodiversidade vegetal, e criar formas de fiscalizar e punir a degradação da fauna e flora brasileira e o envio de plantas para o exterior (KATO, 2001).

A biopirataria, além do aspecto de contrabando de diversas formas de vida da flora e da fauna, abarca a apropriação e a monopolização de conhecimentos das populações tradicionais no que diz respeito à utilização dos mais diversos recursos naturais existentes em nosso meio ambiente. Dessa forma, referidas comunidades acabam perdendo o domínio sobre os mais diversos recursos essenciais à sua sobrevivência cuja soberania sempre coube ao coletivo (BRUTTI, 2008).

Além do valor intrínseco, a biodiversidade também desempenha papel fundamental na manutenção de processos ecológicos. Além disso, o valor econômico ou utilitário da biodiversidade se apóia na dependência do homem sobre seus recursos, por exemplo, na madeira, fibras, resinas, produtos químicos orgânicos, genes, assim como conhecimento para aplicação em biotecnologia, incluindo medicamentos e subprodutos cosméticos. A biodiversidade compreende também a regulação do clima, habitats alimentares e reprodutivos para a pesca comercial e alguns organismos que contribuem para a fertilidade do solo por meio de ciclos interativos complexos, com a participação de organismos do solo (minhocas, cupins, bactérias, fungos) que atuam na ciclagem de nitrogênio, fósforo e enxofre, tornando-os disponíveis para serem absorvidos pelas plantas. Estes são alguns dos benefícios fornecidos indiretamente da função dos ecossistemas naturais (ALHO, 2008).

3.2 Indústria farmacêutica

A indústria farmacêutica vem ganhando destaque, em termos econômicos, por estar entre uma das mais rentáveis da escala global. Além disso, é uma das mais inovadoras, abrangendo empresas multinacionais que incorporam em seus produtos os maiores avanços das ciências biomédicas, biológicas, químicas entre outras. Mais de 10 mil empresas compõe a indústria farmacêutica mundial, sendo que a maioria está sediada nos Estados Unidos, Suíça, Alemanha, Grã-Bretanha e Suécia (CAPANEMA, 2006). Segundo a *Intercontinental Medical Statistics* (IMS Health), o Mercado farmacêutico mundial de varejo em 2004 movimentou US\$ 550 bilhões, o que demonstra um aumento de 7% em relação ao ano anterior. Já em 2005, houve um aumento de 7% a 8% das movimentações em relação ao ano de

2004, resultando num valor de US\$ 590 bilhões. As expectativas para o final de 2009 foi de um aumento de cerca de 20% resultando em uma movimentação de aproximadamente US\$750 bilhões. Os principais responsáveis por estes dados são, em ordem decrescente, os tratamentos cardiovasculares, tratamentos dos sistemas nervoso central, alimentar/metabólico, respiratório, anti-infecciosos, músculo-esqueléticos, genitourinário, citostáticos e dermatológicos. Embora o câmbio seja desfavorável para a exportação aos fabricantes de produtos farmacêuticos no Brasil, em 2006 houve uma movimentação neste âmbito de cerca de US\$ 622,12 milhões, o que significa um aumento de aproximadamente 31% em relação ao ano anterior. Já em 2007, a movimentação da indústria brasileira de medicamentos foi de R\$ 23 bilhões. Acredita-se que em 2008 este valor atingiu cerca de R\$ 30 bilhões, o que indica um aumento de cerca de 30% em relação ao ano de 2007. Estes valores justificam a extensão para o Brasil de alguns dos maiores grupos farmacêuticos do mundo, como a Pfizer, Sanofi-Aventis, Roche, Merck, Squibb, Schering-Plough entre outras (FEBRAFARMA, 2009).

Em 2003 o mercado farmacêutico brasileiro apresentou cerca de 1,4 bilhões de unidades vendidas (caixas) - o que corresponde a R\$ 16,9 bilhões - ocupando, segundo a Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica (FEBRAFARMA), a 11ª posição no *ranking* do mercado farmacêutico mundial. Em 2004 o Brasil apresentou um faturamento de cerca de R\$ 19,9 bilhões, o que correspondeu à venda de 1,65 bilhões de unidades, passando a ocupar a 8ª posição no *ranking* do mercado farmacêutico mundial. Já em 2005, o Brasil passou a ocupar a 10ª posição, com queda nas vendas para 1,61 bilhões de unidades, equivalendo a um faturamento de R\$ 22,2 bilhões (CAPANEMA, 2006).

Na visão da indústria farmacêutica, a descoberta de novos agentes antimicrobianos não é vantajoso financeiramente, uma vez que o investimento para o desenvolvimento de um novo antimicrobiano é muito alto. Além disso, a venda deste possível medicamento poderia ser afetada pelo rápido desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos (BUTLER, 2005).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma imensa variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência da bactéria a essas drogas usadas para fins terapêuticos (COUTINHO et al.,2004).

3.3 Plantas Medicinais

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para síntese e descoberta de novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Muitos metabólitos secundários ou especiais se notabilizam como matérias primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Com isto, torna-se extremamente importante a colaboração entre grupos multidisciplinares, os quais destacam-se a fitoquímica, farmacologia, microbiologia, toxicologia, farmacotécnica e outras áreas afins (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Já Fitoterápico, segundo a RDC 48 (2004) envolve todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (NIERO, 2010). E por fim, têm-se a definição de fitofármaco que é "a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal" (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Com o passar dos anos o uso de plantas medicinais no tratamento de diversas patologias tem aumentado. Isto deve-se ao fato das plantas apresentarem um menor custo de tratamento, da população optar por terapias não clássicas e também pelo aumento da divulgação de trabalhos científicos demonstrando a sua eficácia. Na década de 1990, cerca de 65% à 80% da população em países

desenvolvidos já utilizavam plantas medicinais como única alternativa de cuidados básicos de saúde. Atualmente, sabe-se que maioria dos medicamentos antitumorais e anti-infecciosos são obtidos de origem natural (BUTLER, 2008).

Por meio do Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006, o governo federal aprovou, a Política Federal de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, composta por políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. As ações estão contidas no PNPMF- Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e são imprescindíveis para a melhoria de acesso da população aos medicamentos, à inclusão social e regional, ao desenvolvimento social e tecnológico, à promoção da segurança alimentar e nutricional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização, valorização e preservação do conhecimento tradicional associado das comunidades tradicionais e indígenas (PROGRAMA, 2007). Sendo assim, o objetivo da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é “garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (COUTO; VITORINO; SILVA, 2010).

Os produtos naturais causam intenso fascínio à ciência, especialmente por suas atividades medicinais, as quais vêm recebendo especial atenção de inúmeros pesquisadores. Muitos dos compostos naturais sejam de origem vegetal ou animal tem apresentado atividade biológica relevante, possibilitando que estes se tornem potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos medicamentos (RASKIN et al., 2002; NIERO et al., 2010).

Cerca de 50% dos medicamentos empregados mundialmente na clínica são obtidos de produtos naturais e seus derivados. Isto demonstra a importância e o grande potencial químico das plantas medicinais. Porém, das milhares de espécies de plantas do mundo, somente 15% foram estudadas fitoquimicamente e 6% biologicamente (GURIB-FAKIM, 2006).

A descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos a partir da pesquisa com plantas medicinais têm apresentado grande sucesso. Além disso, esta descoberta acarretou um aumento no faturamento das indústrias farmacêuticas. Dados demonstram que um em cada dez mil medicamentos chega ao mercado a um custo médio de US\$897,5 milhões e sete entre dez não cobrem os custos desse tipo de pesquisa (NIERO, 2010).

Com o passar dos anos também tem sido observado um aumento na utilização de terapias alternativas ou complementares por parte da população. Isto é devido principalmente ao baixo poder aquisitivo da maioria da população que procura uma medicina alternativa a menores custos, preocupações ecológicas e a confirmação da eficácia das mesmas, comprovadas em estudos experimentais, clínicos e pré-clínicos (BURTLER, 2008).

Apesar de plantas medicinais serem utilizadas extensivamente, somente por meio de um estudo químico e de um estudo detalhado de suas propriedades biológicas, é possível a confirmação de sua eficácia, qualidade e segurança na terapêutica. No entanto o uso indiscriminado pode promover efeitos adversos relacionados à presença de algumas substâncias nocivas, ou até mesmo a possibilidade de ocorrer algumas interações medicamentosas entre planta e fármaco comercial (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos de otimização e padronização de preparações vegetais, na tentativa de obter um material apropriado para o consumo, buscando investigar a qualidade, segurança, eficácia, sua pureza, identidade e estabilidade (CRAGG; NEWMAN, 2007).

3.4 Atividade antimicrobiana

Pesquisas com plantas têm comprovado seu potencial antimicrobiano no tratamento de várias doenças infecciosas. Isto faz com que sejam recuperadas as pesquisas sobre a atividade antimicrobiana, mecanismo de ação e potenciais de usos destas espécies (LIMA et al., 2006). Os antimicrobianos obtidos de plantas medicinais têm sido uma ótima escolha no tratamento de doenças infecciosas devido ao seu alto potencial terapêutico e a ótima alternativa para países em desenvolvimento, uma vez que estes apresentam uma vasta biodiversidade a ser explorada, como é o caso do Brasil (CALIXTO, 2005). Além disso, o tratamento de doenças infecciosas com plantas medicinais, também apresentam uma diminuição de efeitos colaterais quando comparados com antimicrobianos sintéticos (BELLA CRUZ et al., 2010). Como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana de plantas medicinais têm-se os flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas e terpenos (SOUZA et al., 2007).

Poucas indústrias farmacêuticas estão empenhadas na descoberta de novos agentes antimicrobianos. Desde o ano de 1968, foram lançadas no mercado apenas duas novas classes de antimicrobianos (uma em 2000 e outra em 2003) que são a oxazolidinona e o lipopeptídeo. Isto acarreta uma necessidade urgente de se descobrir novos agentes antimicrobianos, uma vez que os micro-organismos apresentam-se cada vez mais multirresistentes. Atualmente ainda não existe nenhum composto obtido de planta com atividade antimicrobiana usado na clínica, embora haja uma grande quantidade de pesquisas nesta área (BELLA CRUZ et al., 2010).

Em geral micro-organismos têm habilidade genética de adquirir e transmitir resistência aos fármacos utilizadas como agentes terapêuticos. O problema destes micro-organismos resistentes esta crescendo e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais como terapêuticos e principalmente com atividade antibiótica devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas ou adaptar as já existentes para que voltem a ter atividade (COUTINHO et al.,2004).

Para que o tratamento de uma doença infecciosa seja bem sucedido, deve-se primeiramente escolher o antimicrobiano adequado para o micro-organismo causador da patologia. O uso inadequado ou abusivo de agentes antimicrobianos é o principal causador de micro-organismos resistentes (POWERS, 2004).

O primeiro caso de resistência antimicrobiana aconteceu em 1940 com o uso das penicilinas. A resistência antimicrobiana tem causado vários problemas terapêuticos, visto que algumas bactérias apresentam resistência intrínseca à vários antimicrobianos e também sofrem mutações genéticas causando problemas ainda mais graves de resistências (BUSH, 2004).

Para o combate das infecções, especialmente frente aos micro-organismos resistentes, deve-se fazer o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de novos antimicrobianos mais eficazes que possibilitem a prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo ao invés de inviabilizá-lo geneticamente, inibindo assim o desenvolvimento de resistência (GIBBONS, 2005).

Devido ao elevado numero de casos de doenças infecciosas, a grande quantidade de efeitos colaterais dos antimicrobianos disponíveis na clínica e a

resistência antimicrobiana, torna-se extremamente importante a busca por novos agentes antimicrobianos (BELLA CRUZ et al., 2010).

3.4.1 *Garcinia achachairu*

O achachairu (*Garcinia sp*) (Figura 1), pertencente a família Clusiaceae, é uma fruta bastante apreciada e nativa da Bolívia, onde há projetos de desenvolvimento da cadeia produtiva para o atendimento de produtores do município de Ayacucho, Santa Cruz. Os frutos têm massa de aproximadamente 30 gramas e são globoso-oblongos, semelhantes à nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Externamente, os frutos são amarelo-alaranjados, com casca grossa, lisa, firme e resistente. A polpa, não aderente a casca, é branca, suculenta e de textura mucilaginosa, representando 1/3 da massa média do fruto. O sabor, que lembra um pouco o do araçá, é bem agradável e doce-acidulado equilibrado, com pH 4,1 (BARBOSA et al., 2008).

Figura 1: Frutos de *Garcinia achachairu* (BARBOSA et al., 2008).



O achachairu é pouco conhecido no Brasil, sendo muitas vezes confundido erroneamente com outras espécies como bacupari, bacuripari e bacurizinho. No nordeste do país, o amadurecimento dos frutos do achachairú ocorre entre os meses de fevereiro à abril. O fruto apresenta-se bastante resistente ao transporte e conserva-se bem em geladeira (BARBOSA; ARTIOLI, 2010).

A família Clusiaceae têm apresentado mais de 100 substâncias isoladas de cerca de 20 espécies diferentes, com diferentes atividades biológicas, especialmente atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antidepressiva (FRUTUOSO et al., 2007). O gênero *Rheedia* ou *Garcinia* apresenta várias substâncias com propriedades farmacológicas. Estudos prévios demonstraram a presença de flavonóides, xantonas e benzofenonas poliisopreniladas. Um destes componentes, as benzofenonas poliisopreniladas, em especial a 2,4,6-triidroxi-benzofenonas, apresentaram uma boa atividade antibacteriana contra importantes patógenos (ALMEIDA et al., 2008). Estas substâncias também apresentam atividade sobre o sistema imunológico, são antioxidantes e anticancerígenos (BARBOSA; ARTIOLI, 2010). Existe um grande número de benzofenonas poliisopreniladas que estão divididas em dois grupos: as de estruturas mais simples do tipo I e as de estruturas mais complexas possuindo o anel biciclo[3.3.1]nonano do tipo II (DAL MOLIN, 2009).

O achachairú é de grande importância para a indústria farmacêutica uma vez que, de seus frutos e folhas, são extraídas substâncias como as benzofenonas e os biflavonóides (BARBOSA; ARTIOLI, 2010).

Com a recente mudança do gênero *Rheedia* para *Garcinia*, estabeleceu-se certa confusão na nomenclatura das dezenas de espécies conhecidas. Isso porque, muitos autores ainda usam o termo *Rheedia* para algumas frutíferas nativas e exóticas, existentes em várias regiões tropicais mundiais. A fruta mais famosa desse gênero, talvez, seja o mangostão (*G. mangostana* L.), originada no trópico asiático. Outras espécies de *Garcinia*, além de sua importância, também fazem parte da alimentação da população da região Amazônica, onde os frutos são bastante abundantes (BARBOSA et al., 2008).

A *Rheedia* ou *Garcinia*, um dos gêneros da família Clusiaceae, é comumente usada na medicina popular para inúmeras desordens incluindo constipação, reumatismo, inflamação e dores (FRUTUOSO et al., 2007). Os frutos e folhas

também são utilizados como cicatrizantes, digestivos e no tratamento de úlcera gástrica (BARBOSA; ARTIOLI, 2010).

Na busca bibliográfica por artigos científicos publicados sobre algumas espécies de *Rheedia* verificou-se que há menos de 30 artigos brasileiros envolvendo as espécies, *R. acuminata*, *G. multiflora*, *G. mangostana*, *R. gardneriana*, *G. macrophylla*, *G. gardneriana*, *G. cochinchinensis* e *G. cambogia* (BARBOSA; ARTIOLI, 2010).

Dentre os estudos realizados a respeito de espécies de *Garcinia*, destaca-se um estudo fitoquímico com extrato metanólico de *G. xantochymus*, onde foram extraídas duas novas benzofenonas conhecidas como guittiferona H e gambogenona. Estas apresentaram atividade antioxidante e antitumoral. Já da *G. subellíptica* foram isoladas a garcinialiptona FA e garcinialiptona FB que também apresentam atividade antitumoral (DAL MOLIN, 2009).

3.4.2 *Pilea microphylla*

A família *Urticaceae* compreende somente representantes herbáceos, sendo raros os arbustivos e arbóreos, com folhas inteiras, de disposição alterna (às vezes oposta), com estípulas. Cistólitos presentes na epiderme, bem como pêlos urticantes em certos gêneros (*Urtica*, *Urera*). Flores muito pequenas, de sexo separado, muitas vezes reunidas em densas inflorescências axilares com ou sem perianto. Este, quando existe, é formado por 4 ou 5 tépalas dispostas em 2 séries. Flores masculinas com em geral 4 estames e um rudimento de ovário no centro (pistilódio). Os estames apresentam-se com os filetes curvados no botão. Este abre-se explosivamente e o movimento lança o pólen no ar como uma poeira. Tal deiscência explosiva se faz pela manhã quando a planta recebe os primeiros raios de sol. Flor feminina com um único ovário que é unicarpelar e unilocular com um só óvulo. Às vezes ocorrem estaminódios. O fruto é um pequeno aquênio ou drupa (JOLY, 2002).

A família compreende cerca de 42 gêneros distribuídos nos trópicos e subtropicais de todo o mundo. O maior gênero da família é o *Pilea*; a popular brilhantina (*Pilea microphylla*) (Figura 2). Trata-se de uma planta perene, herbácea, prostrada, muito ramificada, com 10 a 20 cm de comprimento e que se propaga por

sementes. Conhecida popularmente como brilhantina trata-se de uma planta daninha (FREITAS et al., 2007).

Em estudo realizado sobre uso popular de plantas no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia, foi relatado o uso de *Pilea microphylla* (Figura 2) para casos de dores abdominais (RODRIGUES; GUEDES, 2006). Além disso, também é utilizada popularmente na inflamação do ovário (SANTANA et al., 2008), auxílio no parto e infertilidade (LANS, 2010) e tem uso místico (banho de descarga em criança - partes aéreas) (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006). Porém, apesar dos dados referentes ao uso popular descritos acima, esta planta apresenta pouquíssimos dados na literatura devido a falta de estudos sobre a mesma (RODRIGUES; GUEDES, 2006). Sendo assim, têm-se a necessidade de que evidenciem e comprovem suas possíveis atividades biológicas.

Figura 2: Foto de *Pilea microphylla* (LORENZI; SANTOS, 1999)



3.4.3 *Macrosiphonia velame* (Velame-branco)

A família *Apocynaceae* compreende aproximadamente 200 gêneros com mais de 2.000 espécies de distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, na maioria latescentes, vivem tanto nos campos como nas matas (JOLY, 2002).

A família *Apocynaceae* é uma das maiores e mais representativas famílias de Angiospermas, contendo em seus limites atuais cerca de 335 gêneros e 3.700 espécies, incluindo espécies de diversos hábitos, como árvores, arbustos, lianas e poucas ervas (AGUIAR, CARMELO-GUERREIRO, KINOSHITA; 2009).

O velame-branco (Figura 3) também conhecido como babado, barbasco, flor-de-babeiro, jalapa-branca ou velame. É uma erva hermafrodita, perene, de até 80 cm, alvo-lanosa salvo a face interior do perianto, androceu, gineceu e sementes glabras; caule único ou pouco ramificado, semiprostrado ou ereto; látex branco. Suas folhas são opostas, simples pecioladas; limbo com 2,5 a 6,5 x 1 a 3 cm, oval a elíptico, cartáceo; ápice agudo a acuminado; base subcordada, rotunda ou truncada; nervação elevada na face dorsal e imperceptível na ventral devido à densa pilosidade; nervuras secundárias ascendentes, alternas; pecíolo com cerca de 1 a 5 mm de comprimento. Inflorescência corimbo terminal ou lateral, bracteado, com 1 a 5 flores. As flores medem de 10 a 12 cm, actinomorfas; cálice com 5 sépalas livres, linear-lanceoladas; corola alva-amarelada, hipocrateriforme, com 5 lobos arredondados, imbricados, de aproximadamente $\frac{1}{4}$ do comprimento do tubo; estames 5, inclusos; filetes curtos; anteras rimosas; introrsas; oblongo-cônicas; ovário súpero, com 2 carpelos livres, elípticos, trígonos, com muitos óvulos; estiletos 2, filiformes, unidos no ápice em estigma único, umbraculiforme. Fruto folículos gêmeos com até 25 cm, lineares, torulosos; sementes com cerca de 1 cm castanho-escuras, elíptico-fusiformes, coroadas por denso tufo de finos pelos avermelhados (ALMEIDA et al., 1998).

Em estudo realizado com extrato hidroetanólico do xilopódio de *M. velame*, houve a comprovação de que a espécie apresenta atividade antiinflamatória, antinociceptivo e antipirético. Além disso, este também apresentou baixa toxicidade aguda oral. A análise fitoquímica do extrato revelou de presença de flavonóides, triterpenóides pentacíclicos, saponinas, cumarinas, catequinas, taninos catéquicos e alcalóides (RIBEIRO et al., 2010).

A *Macrosiphonia velame* é popularmente utilizada como depurativa do sangue (raizada ou chá) (TRESVENZOL et al., 2006; RIBEIRO et al., 2010), emenagoga (úlceras e gastrite), contra doenças venéreas (infusão, folha, raiz e látex) (VILA VERDE; PAULA; CARNEIRO, 2003). É uma erva essencialmente medicinal também utilizada como anti-sifilíticos e em veterinária, contra as feridas pútridas de equinos e muares (ALMEIDA et al., 1998; RIBEIRO et al., 2010).

Figura 3: Foto de *Macrosiphonia velame* (ALMEIDA et al., 1998)



3.4.4 *Rubus niveus*

Rubus niveus (Figura 4) pertence à família *Rosacea*, gênero *Rubus*, sendo uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro. Sua origem não é muito definida (Europa, América do Norte e América do Sul), possuindo características de adaptação climáticas muito variadas. O fruto verdadeiro da amoreira é denominado mini drupa ou drupete. Cada mini drupa possui uma pequena semente e a junção dos frutos verdadeiros forma o fruto agregado. Cada fruto agregado possui cerca de

4 a 7 g, apresentando coloração negra e sabor ácido a doce-ácido (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009).

O gênero *Rubus* em especial, tem se destacado pelos usos populares, muitas das espécies são conhecidas pelos frutos saborosos que produzem, e suas folhas são usadas em infusos com propósito terapêutico. As espécies têm sido alvas de vários estudos científicos visando o isolamento de novas moléculas e avaliação do potencial farmacológico e biológico de extratos e compostos isolados (PATEL et al., 2004).

A espécie possui grande potencial antioxidante, anticancerígeno e antiinflamatório, sendo capaz de exercer efeitos protetores para o cérebro, retardando o envelhecimento e a ocorrência de doenças relacionadas. Adicionalmente, o ácido elágico encontrado nestes frutos apresenta ação antimutagênica, além de ser um potente inibidor da indução química do câncer (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009).

Estudos realizados com outras espécies pertencentes ao gênero *Rubus* revelou ação contra diabetes (JOUAD et al., 2002), anticonvulsivante e relaxante muscular em camundongos (NOGUEIRA et al., 2000), ação na diminuição dos níveis de DNA HVB viral da hepatite B possuindo assim uma atividade anti-HVB (KIM et al., 2001) e ação antimicrobiana (RICHARDS et al. 1994).

A *R. idaeus* é uma das espécies de *Rubus* mais estudadas. Esta é caracterizada pela presença de diversos flavonóides e outros compostos fenólicos, onde os principais são as formas glicosídicas como quercetina, quercetina 3-O- β -D-glucosídeo, kampeferol 3-O- β -L-arabinosídeo (8), e metil galato (NIERO; CECHINEL- FILHO, 2008).

Ainda em relação a atividade antimicrobiana, em estudo realizado por Panizzi et al., foram relatados a presença de três Rubantronas A, B e C, onde a Rubantrona A apresentou atividade contra *S. aureus*. Outra espécie que também apresentou atividade antimicrobiana foi a *R. pinfaensis*, onde os estudos fitoquímicos revelaram a presença de sete terpenóides incluindo ursólico, euscáfico, 28-glicosil tormentico e 19 α -hidroxiasiatico ácidos. Além destas, a *R. chamaemorus* também apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *C. albicans* (NIERO; CECHINEL- FILHO, 2008).

Figura 4: Foto de *Rubus niveus* (Fundação Charles Darwin, 2006)



3.5 Micro-organismos

As doenças infecciosas tem sido uma das principais causas de mortalidade no mundo. Em alguns países elas representam metade dos casos de óbitos. Este quadro é mais comum entre os países em desenvolvimento, embora também tem-se observado um aumento no número de óbitos por infecções em países desenvolvidos (BELLA CRUZ et al., 2010).

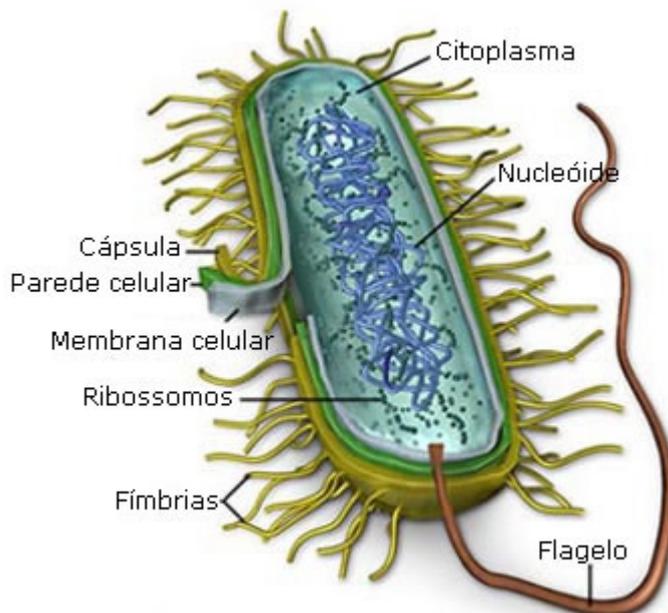
O Brasil é o país que mais apresenta mortes por sepse grave, ocupando o 1º lugar no *ranking* mundial. Na maioria destes casos as infecções são adquiridas dentro do próprio ambiente hospitalar (BELLA CRUZ et al., 2010).

As doenças imunossupressoras podem estar associadas ao aumento de infecções que geralmente são desencadeadas por micro-organismos oportunistas causadores de micoses humanas, pelo aumento de micro-organismos emergentes, por micro-organismos ainda não identificados e, principalmente pelo surgimento de micro-organismos resistentes a agentes antimicrobianos. Isto acarreta uma maior preocupação dos setores de saúde pública (CUNHA, 2006).

3.5.1 Bactérias

As bactérias são células que apresentam tamanhos variados, de 0,2 a 500 micrômetros, podendo ser esféricas ou em forma de bastões (Figura 5). Trata-se de um dos organismos mais simples do ambiente natural (SCHAECHTER et al., 2002). A reprodução é rápida, por divisão simples (fissão binária) e, dependendo da bactéria, pode acontecer a cada 20 minutos (FIOCRUZ, 2010). São seres procariontes, unicelulares e sustentam uma única forma. A célula bacteriana apresenta várias estruturas que desempenham funções essenciais para o micro-organismo (TRABULSI et al., 2005). As principais funções da membrana bacteriana são biossíntese de componentes, transporte de solutos, duplicação do DNA, produção de energia por transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e secreção de enzimas (SCHAECHTER et al., 2002).

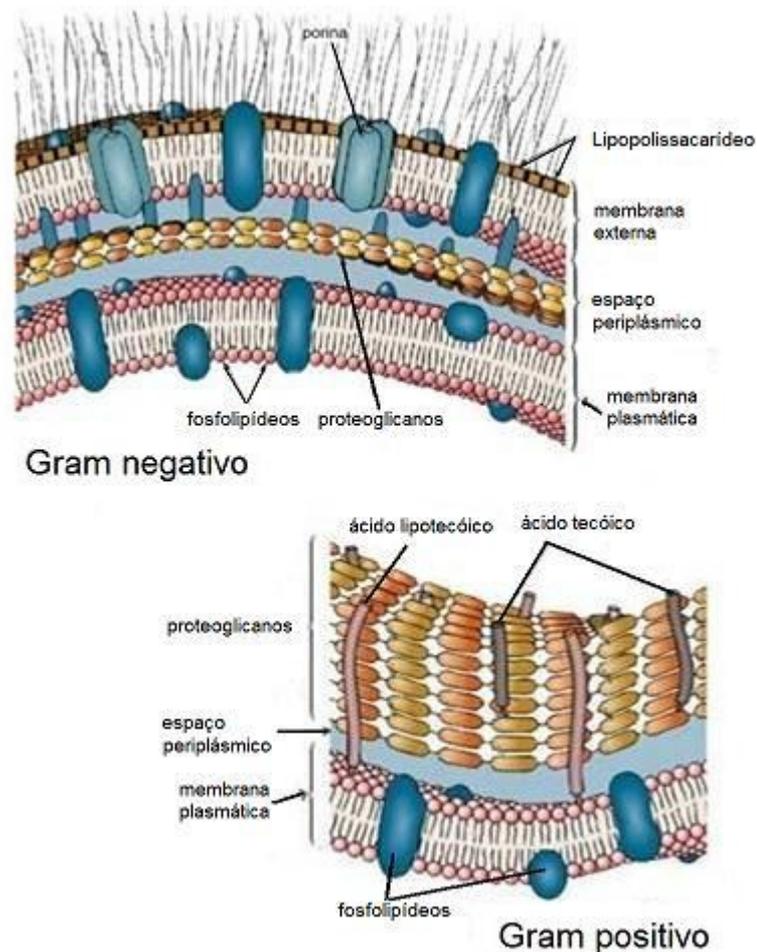
Figura 5: Estrutura de uma bactéria



As bactérias estão divididas em dois grupos: Gram-negativas e Gram-positivas (Figura 6). O critério para esta classificação é a constituição da parede celular principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície (SCHAECHTER et al., 2002). A parede celular das bactérias Gram-

positivas é rígida, isto deve-se a presença de uma camada espessa de peptidoglicano. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas são mais frágeis e assim mais susceptíveis a permeabilidade devido a fina camada de peptidoglicano (ROSA, 2008). Também pode-se ressaltar que as bactérias Gram-negativas não possuem o ácido teicóico (RANG et al., 2003).

Figura 6: Diferença de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa



Além das diferenças citadas acima, as bactérias Gram-negativas diferem também das Gram-positivas pela presença de outros três componentes que são a lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo (LPS). A lipoproteína tem como função estabilizar a membrana externa e ancorá-la a camada de peptidoglicano. A membrana externa possui uma dupla camada de lipídios, com moléculas de

proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano na face interna da membrana. Em sua membrana externa encontra-se o LPS, este é capaz de conferir propriedade patogênica as bactérias. O LPS é conhecido também como endotoxina, pois é tóxico, sendo considerado um ativador nas reações inflamatórias de fase aguda (TRABULSI et al., 2005).

3.5.1.1 Infecções bacterianas

As bactérias encontram no corpo humano uma coleção de nichos ambientais que fornecem calor, umidade e alimento essenciais para se desenvolverem. Devido a grande capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, as bactérias podem facilmente penetrar no ambiente, ter acesso aos alimentos e ter a capacidade de evadir-se do processo de eliminação pela resposta imunológica do hospedeiro. Todas estas habilidades de adaptar-se tornam as bactérias um sério problema à saúde do hospedeiro (FOXMAN, 2007).

O gênero *Staphylococcus* compreende cerca de 42 espécies e está associado a uma ampla variedade de doenças, sendo que aproximadamente 20 delas são responsáveis por causar infecções oportunistas. As principais espécies causadoras de doenças são *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (TRABULSI et al., 2005).

S. aureus é uma bactéria de grande importância na clínica, visto que esta apresenta grande potencial em desenvolver resistência bacteriana e é responsável por diversas patologias, que vão desde infecções cutâneas e intoxicação alimentar até infecções sistêmicas fatais (XAVIER et al., 2007).

Dentre as infecções causadas pelo *S. aureus* têm-se a osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, artrite bacteriana e meningite. Estas infecções geralmente ocorrem em pacientes que sofreram algum tipo de trauma físico, queimadura ou ainda que estão com baixa imunidade (SILVA et al., 2007).

O *S. saprophyticus* é um micro-organismos causador de infecções urinárias que acometem principalmente mulheres. Este pode causar desde cistite até uma pielonefrite aguda, e sua patogenicidade esta relacionada com a capacidade de aderir as células epiteliais do trato urinário (SCHAECHTER et al., 2002).

A *Escherichia coli* faz parte das bactérias gram-negativas. Ela é responsável por causar infecções no trato urinário e bacteremia em pacientes hospitalizados (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009).

3.5.2 Infecções fúngicas

O reino fungi, compreende cerca de 50.000 espécies de fungos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000). São seres eucarióticos que apresentam núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear; uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular; mitocôndrias; aparelho de Golgi; ribossomas ligados ao retículo endoplasmático; e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Devido as suas características existe a dificuldade de se elaborar novas estratégias terapêuticas específicas contra o micro-organismo e inerte para o hospedeiro, visto que as células fúngicas apresentam grande semelhança as células do hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

A grande maioria dos fungos são benéficos aos seres humanos, sendo responsáveis pela produção de alimentos e bebidas alcoólicas, além de apresentar características essenciais para o incremento da medicina, como o desenvolvimento de fármacos, agentes imunossupressores e metabólitos bioativos úteis. No entanto, também existem os fungos patogênicos, que causam as infecções fúngicas, conhecidas também como micose (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

As micoses superficiais e cutâneas são infecções fúngicas mais comuns e acometem principalmente pele, cabelos e unhas. As micoses superficiais acometem as camadas superiores queratinosas da pele e cabelos e são infecções assintomáticas. Os principais causadores destas infecções superficiais são *Malassezia furfur* e *Piedraia hortae*. Já as micoses cutâneas são causadas principalmente pela *Candida* sp e são sintomáticas afetando, e muitas vezes destruindo, as camadas epidérmicas (FISCHER; COOK, 2001).

A *C. albicans* é um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003). Embora o gênero *Candida* esteja na cavidade bucal estabelecendo um estado de equilíbrio ecológico na microbiota, modificações desse equilíbrio favorecem o

desenvolvimento de condições patológicas, denominadas candidíase, que se manifestam desde quadros clínicos benignos, como infecções de pele e mucosas, a quadros graves e fatais como as infecções invasivas e disseminadas (ATAIDES et al., 2010).

3.5.3 Antimicrobianos

Antibióticos são substâncias químicas produzidas a partir de metabolismos secundários de micro-organismos (principalmente micro-organismos como os actinomicetos ou fungos). Este termo significa “contra a vida”. Já os quimioterápicos são substâncias obtidas somente por síntese orgânica, não sendo encontrado na natureza. Tanto os antibióticos como os quimioterápicos podem atuar nos micro-organismos causando sua morte ou impedindo o crescimento destes (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Os antibacterianos podem atuar de diversas formas, dentre elas pode-se citar (SOUZA et al., 2003):

- Inibidores da respiração e/ou fosforilação oxidativa: As substâncias deste grupo não podem ser usadas na terapêutica, pois atuam em processos comuns a todas as células, são igualmente tóxicos para a bactéria e hospedeiro;
- Inibidores da síntese da parede celular: Por atuarem em estruturas não existentes nas células humanas, os agentes antimicrobianos com este local de ação são bastante seguros e amplamente utilizados. Estes atuam no processo de replicação celular, produzindo parede com “defeitos” estruturais;
- Inibidores das funções da membrana celular: Neste tipo enquadram-se dois tipos de ação. Os agentes hidrofóbicos, que agem produzindo desorganização da estrutura da membrana, e os, ionóforos, que produzem alterações na permeabilidade da membrana, por modificações na distribuição de íons ou nos sistemas ativos de permeação por atuarem em estruturas comuns a todas as células, porém todos estes agentes são igualmente tóxicos para a bactéria e hospedeiro, sendo empregados clinicamente em escala limitada;
- Inibidores da síntese de ácidos nucléicos: A maioria destes agentes interage com o DNA, tendo pouca toxicidade seletiva e são geralmente empregados como agentes

antitumorais, entretanto alguns podem ser usados por via sistêmica como antimicrobianos.

- Inibidores da síntese de proteínas: Os agentes com este local de ação podem atuar sobre a subunidade ribossômica maior ou menor, tanto em células procarióticas (subunidade 30S e 50S) quanto eucarióticas (subunidade 40S e 50S). Se eles se limitam a atuar em qualquer subunidade das células bacterianas, tem menor probabilidade de provocar efeitos tóxicos nos hospedeiros do que aqueles que atuam tanto em células procarióticas como eucarióticas.

As células fúngicas são muito semelhantes às células humanas. E por este motivo os antifúngicos apresentam toxicidade também sobre às células do hospedeiro. Sendo assim, a seleção do antifúngico é uma etapa muito importante e deve levar em consideração o tipo de micose, o agente etiológico e o estado de saúde geral do paciente. Em relação à terapia farmacológica, deve-se observar o mecanismo de ação e o espectro do fármaco escolhido, além do conhecimento da via de administração e os possíveis efeitos colaterais (TRABULSI et al., 2005).

Os fármacos antifúngicos são classificados em três categorias distintas. Os derivados poliênicos (anfotericina B e nistatina) e derivados imidazólicos (cetoconazol) que atuam afetando a membrana celular; Griosefulvina, que atua intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como síntese de RNA, DNA ou proteínas e equinocandinas (Caspofungina, Micafungina e a Anidulafungina) que atuam interferindo na síntese da parede celular (TRABULSI et al., 2005).

3.5.4 Resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana tem sido motivo de preocupação em todo o mundo, principalmente no ambiente hospitalar. Dados publicados em estudos realizados nos Estados Unidos, Europa e América Latina mostram um número crescente de resistência bacteriana nos hospitais (ALVAREZ et al, 2006).

A luta dos seres humanos contra os micro-organismos patogênicos existe durante toda a história da humanidade. Como exemplos têm-se a peste bubônica, tuberculose, malária e mais recentemente, a síndrome de imunodeficiência adquirida. Ambas já causaram um grande número de mortes em todo o mundo. Um avanço no desenvolvimento de agentes antimicrobianos ocorreu no século XX,

porém este sucesso no tratamento de infecções durou pouco tempo, uma vez que as bactérias logo desenvolveram mecanismos de resistência. Sendo assim, a resistência bacteriana torna-se um fator importante e preocupante à sociedade, visto que os mecanismos de resistências desenvolvidos pelos patógenos estão cada vez mais complexos (TENOVER, 2006).

Os avanços relacionados aos procedimentos clínicos e o aparecimento de micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos usados rotineiramente na prática médica tornaram as infecções hospitalares um grave problema de saúde pública. Estudos realizados nos Estados Unidos pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) mostraram que as infecções hospitalares aumentam consideravelmente as taxas de morbi-mortalidade e prolongam a permanência de um paciente no hospital (SILVA et al., 2007).

A resistência antimicrobiana pode ocorrer através de três categorias diferentes: resistência primária, seletiva e adquirida. A resistência primária, ou também conhecida como intrínseca ou inata, ocorre quando o paciente é colonizado por um micro-organismo, que não seja coberto pelo espectro do antimicrobiano administrado. Já a resistência seletiva ocorre quando o paciente apresenta uma infecção causada por vários micro-organismos e com o tratamento os patógenos mais sensíveis são eliminados, fazendo com que se tenha um favorecimento da seleção e do crescimento dos mais resistentes. Por fim, a resistência adquirida, que também é conhecida como resistência secundária, ocorre quando os micro-organismos infectantes, que primeiramente eram sensíveis, sofrem mutações tornando-se resistentes (ROGERS, 2006).

A inativação enzimática, efluxo ativo de antibióticos, alteração da permeabilidade da membrana, e alteração do sítio de ligação do antibiótico são os principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias (AL-HARONI, 2008).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos está diretamente associada ao uso extensivo e inapropriado de fármacos antimicrobianos e conduz ao rápido desenvolvimento de resistência específica ao fármaco por micro-organismos causadores de doenças. A descoberta e o uso clínico de vários antimicrobianos conhecidos é concomitante ao surgimento de bactérias que resistem à sua ação (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Assim, o uso racional é imprescindível para a saúde pública, pois toda essa situação representa um constante desafio

terapêutico, no qual faz-se necessário uma conscientização de todos os profissionais da saúde o quão é importante o uso racional e responsável dos antimicrobianos, pois o sucesso do tratamento só poderá ser alcançado através de uma prescrição individualizada, baseada numa conduta terapêutica ética e responsável (ALANIS, 2005).

3.6 Métodos para determinação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para a determinação da atividade antimicrobiana de um composto geralmente são realizados através de métodos *in vitro*. Os micro-organismos testados são cepas padrões ou isolados de materiais biológicos (RIOS; RECIO, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva, desde 1977, a busca por novos produtos de origem natural com atividade antimicrobiana, principalmente contra micro-organismos resistentes aos fármacos utilizados na clínica (BELLA CRUZ et al., 2010).

Atualmente existem diversas técnicas de triagem para definir se o extrato de uma determinada planta ou substância possui atividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas, que muitas vezes se tornam indisponíveis em alguns laboratórios (ALVES et al., 2008). Os mais difundidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

Os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (MURRAY, 1999).

As CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar a performance de todos os outros métodos de susceptibilidade. Nos laboratórios de diagnóstico, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (MURRAY, 1999).

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realizar o teste preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação durante 24 horas, a 35 °C, examinam-se os testes e determina-se a CIM (Concentração Inibitória Mínima). A CIM pode ser detectada pela inspeção visual ou através de aparelhos baseados em leitura óptica (ALVES et al., 2008). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003).

Vários fatores podem interferir nos resultados da determinação da CIM para determinado antimicrobiano. Como exemplos pode-se citar o tipo de meio de cultura utilizado, a forma de diluição do fármaco, a padronização do inóculo bacteriano e a temperatura de incubação (ALDERMAN; SMITH, 2001). A temperatura pode estar alterando a estabilidade dos agentes antimicrobianos, a fisiologia e metabolismo bacteriano e as bases genéticas de regulação e expressão gênica (MICHEL; BLANC, 2001). Adicionalmente, isolados de uma mesma espécie bacteriana, adaptados diferencialmente a climas tropicais ou temperados podem apresentar características distintas de crescimento *in vitro* (ALDERMAN; SMITH, 2001).

Para que um novo composto seja aceito no tratamento de patologias, os órgãos regulamentadores exigem que este, seja tão eficiente quanto os que já estão disponíveis na clínica. Com isto, torna-se importante critérios de classificação da atividade antimicrobiana destes novos compostos testados (BELLA CRUZ et al., 2010).

Para a classificação da atividade antimicrobiana, de extratos e/ou seus produtos de fracionamento podem ser empregados os seguintes critérios: para concentração inibitória mínima (CIM) entre 10 e 100 µg/mL, é considerado como boa; entre 100 e 500 µg/mL como atividade moderada; entre 500 e 1000 µg/mL como fraca atividade; e quando a concentração for maior que 1000 µg/mL esses produtos podem ser considerados como inativos (MACHADO et al., 2005). Embora ainda seja um critério discutível, ele se baseia no fato de que a grande maioria dos antimicrobianos de uso clínico disponível apresenta atividade contra microrganismos

sensíveis em concentração de até 10µg/mL (RIOS; RECIO, 2005), bem como também leva-se em consideração que os extratos e frações de produtos naturais geralmente possui composição complexa, e muitas vezes os compostos ativos estão presentes em quantidades muito pequenas (BELLA CRUZ et al., 2010).

A forma de como a preparação do extrato, fracionamento ou composto é obtido podem influenciar nos testes de atividade antimicrobiana. Isto se deve ao fato de que dependendo do tipo de solvente empregado para a obtenção dos extratos, bem como os procedimentos de extração e fracionamento utilizados, é possível se alcançar melhores índices de extração dos princípios ativos ou o contrário. Conseqüentemente isto interfere nos resultados da avaliação da atividade (COS et al., 2006).

É importante lembrar que para os testes de atividade antimicrobiana os extratos, frações e compostos devem estar totalmente isentos de solventes utilizados durante sua obtenção, bem como também devem ser mantidos protegidos da luz, umidade e temperatura excessiva antes do teste (BELLA CRUZ et al., 2010).

Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, há assim, a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste. Os aspectos importantes a serem considerados são: meios de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo, condições de incubação, soluções diluentes, entre outras (ALDERMAN; SMITH, 2001).

3.7 Ensaio de Sinergismo

Sinergismo é um tipo de resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais antimicrobianos, cuja resultante é maior do que simples soma dos efeitos isolados. O sinergismo pode ocorrer com medicamentos que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que reagem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). Das associações sinérgicas podem surgir efeitos terapêuticos ou tóxicos. Estes últimos são frequentes nas combinações de medicamentos com toxicidade nos mesmos órgãos, por exemplo, aminoglicosídeo

e vancomicina (nefrotoxicidade) ou corticosteróides e antiinflamatórios não esteroidais (ulceração gástrica) (SECOLI, 2001).

As plantas apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários que, quando isolados e testados separadamente podem apresentar uma redução da sua atividade. Isto deve-se ao fato de que a maioria destes compostos/substâncias atuam de forma concomitante através de um efeito sinérgico.

Em duas revistas especializadas em agentes antimicrobianos (*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* e *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*) encontram-se respectivamente 1230 e 1677 artigos sobre sinergismo desde o ano de 1975 (BIAVATTI, 2010). Existem vários artigos publicados sobre sinergismo e atividade antimicrobiana de extratos de plantas e seus componentes, como por exemplo, pode-se citar um estudo realizado com o Orégano (*Origanum vulgare*) e Amoras (*Vaccinium macrocarpon*), onde juntos apresentaram efeito antimicrobiano potencializado contra *Vibrio parahaemolyticus* e *Helicobacter pylori* (KAMATOU et al., 2006). Também existem estudos na literatura a respeito do efeito sinérgico entre extratos com potencial antioxidante juntamente com antibióticos, onde há um aumento na eficácia clínica destes antibióticos por parte dos extratos (OKUSA et al., 2007).

3.8 Ensaios de toxicidade

Segundo a OMS a maior parte da população de países em desenvolvimento depende exclusivamente de plantas medicinais para o tratamento de suas enfermidades. Isto se deve ao fato de que esses países apresentam um alto índice de pobreza e conseqüentemente de falta de acesso à medicina tradicional. Contudo, embora exista uma vasta biodiversidade mundial, apenas de 15% a 17% desta foi estudada cientificamente em relação à qualidade, segurança e eficácia (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

O estudo da toxicidade de substâncias bioativas, sejam eles provenientes de plantas ou sintéticos, deve ser viável, de fácil execução e que forneça um resultado rápido, têm sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química, farmacologia ou microbiologia. Animais, cultura celular, avaliação de sistemas bioquímicos podem

ser realizados, mas apresentam custo elevado para uma triagem. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração, os laboratórios não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes (CAVALCANTE et al., 2000). Estes são realizados através de biomarcadores que são sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

3.8.1 Ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina*

O ensaio de letalidade com microcrustáceo *Artemia salina*, desenvolvido para verificar compostos bioativos em amostras vegetais, também é utilizado para a pesquisa de toxicidade de produtos naturais (RUIZ et al., 2005; NUNES et al., 2008). Adicionalmente, alguns trabalhos mostram uma boa correlação entre o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e a citotoxicidade em linhagens de células humanas para esses produtos (NUNES et al., 2008).

Visto que os compostos bioativos isolados de produtos naturais geralmente são tóxicos em alta dose, tem-se a necessidade de um monitoramento que seja realizado de forma rápida e objetiva durante o fracionamento dos extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *A. salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (SIQUEIRA; BOMM; PEREIRA, 1998; LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

As principais vantagens apresentadas pelo teste com larvas de *A. salina* são de baixo custo, fácil acesso a compra dos ovos do microcrustáceo no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco. Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90 (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, medida pela toxicidade frente *A. salina*, pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de

produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas. Neste contexto, a utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas vem crescendo consideravelmente nos laboratórios de pesquisa em nível mundial como método alternativo para o uso de animais de laboratório. *A. salina* Leach é um microcrustáceo amplamente conhecido como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza a CL₅₀ (Concentração Letal Média) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (NUNES et al., 2008).

O ensaio com *A. salina* também tem sido utilizado para realizar triagem de toxinas fúngicas, detectar toxicidade preliminar de algas marinhas, para testes de toxicidade em materiais dentários e avaliar efeitos de exposição a metais pesados e pesticidas. Carballo et al. (2002) compararam extratos de produtos marinhos com o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e quanto à citotoxicidade em 2 linhagens de células humanas. Os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido para extratos de plantas, sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

3.8.2 Genotoxicidade

As ações mutagênicas causadas às células podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Estes agentes podem causar processos cancerosos e até mesmo morte celular, visto que afetam os processos vitais das células como duplicação e transcrição gênica, além de ocasionar alterações cromossômicas. Sendo assim, estas substâncias que causam lesões no material genético das células são chamadas de genotóxicas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Análises de genotoxicidade são executadas em bioindicadores de toxicidade, ou de efeitos adversos, que podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais incluem-se nesta (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006).

Um dos micro-organismos mais utilizados para avaliar a mutagenicidade e/ou genotoxicidade é o *S. cerevisiae*. Esta é uma levedura anaeróbia facultativa

(MOURA, 2006), eucarioto com grande semelhança às células de mamíferos no que diz respeito às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, o que os torna importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA; FERREIRA, 2001; MOURA, 2006).

Mutações reversas são os testes mais utilizados para análise de mutagenicidade e estão baseados na restauração ou compensação de um defeito gênico. A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um codon que determina um aminoácido para um codon de terminação da síntese protéica). Para que seja identificada a mutação reversa é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um *background* de crescimento (GASPARRI, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

As partes aéreas e os xilopódios de *M. velame* foram coletados no município de Cuiabá pela equipe do Prof. Domingos Tabajara de Oliveira Martins da Universidade Federal do Mato Grosso e identificadas pela professora Prof^a Dr^a Miramy Macedo Curadora do Herbário Central da UFMT. Uma exsicata foi depositada no Herbário central da UFMT sob o número 32.834.

Os galhos de *G. achachairu* foram coletados no município de Camboriú e identificados pelo professor Dr. Oscar B. Iza da UNIVALI. Uma exsicata foi registrada e depositada no herbário Barbosa Rodrigues de Itajaí – SC, sob o número HBR 52637.

As partes aéreas de *R. niveus* e *P. microphylla* foram coletados no município de Itajaí e identificadas pelo professor Dr. Oscar B. Iza da UNIVALI. Uma exsicata foi registrada e depositada no herbário Barbosa Rodrigues de Itajaí – SC, sob o número VCfilho 52 e 53, respectivamente.

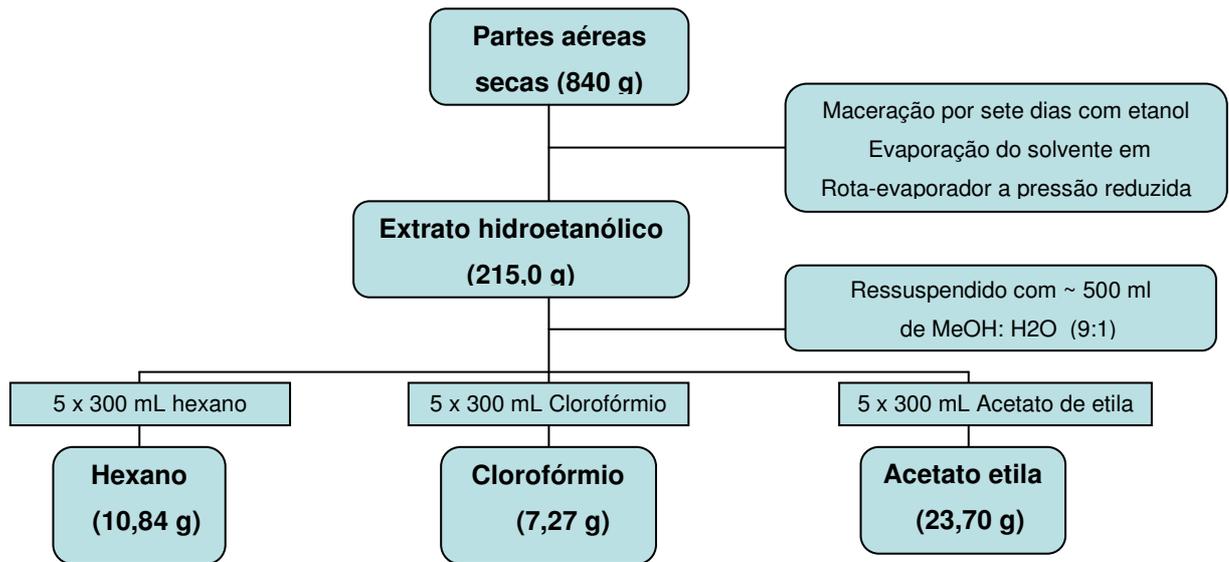
4.1.1 Preparação e fracionamento do extrato metanólico

Todos os extratos e frações foram obtidos pelos alunos do Curso de Farmácia (Suellen Silva e Karoliny Guimarães) e do Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas (Marlova Manhabosco Dal Molin e Zhelmy Del Rocio Martin Quintal) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) orientados pelo Professor Doutor Rivaldo Niero. Os extratos foram preparados através da maceração utilizando o metanol como solvente extrator durante sete dias a temperatura ambiente. Posteriormente, os solventes foram evaporados a pressão reduzida em evaporador rotatório a 50 °C e acondicionados em dessecador sob sílica ativada até peso constante. Cada extrato metanólico foi ressuspendido numa solução metanol: água 9:1 e particionado utilizando-se solventes de polaridade crescente como hexano, clorofórmio e acetato de etila, rendendo as respectivas frações semipurificadas.

4.1.2 Preparação do extrato e obtenção das frações das partes aéreas das espécies estudadas

O material moído e seco (840 g) foi submetido à maceração com etanol/água 70% (1:5) durante sete dias. Após a evaporação do solvente à pressão reduzida em rota-evaporador o extrato hidroetanólico obtido (215,0 g) foi ressuscitado com aproximadamente 500 mL de metanol e água na proporção de 9:1. Este extrato foi particionado com diferentes solventes de polaridade crescente hexano, clorofórmio e acetato de etila, para a obtenção das respectivas frações semipurificadas. Um fluxograma das operações realizadas encontra-se na Figura 8.

Figura 7: Fluxograma do preparo e fracionamento do extrato obtido das partes aéreas de *M. velame*.



4.1.3 Isolamento dos constituintes químicos de *M. velame*

No processo de purificação foram utilizadas cromatografias de coluna aberta (CC) de diferentes dimensões, dependendo do tipo e da quantidade de material a ser purificado. Para o monitoramento das subfrações foi utilizado à cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 adquiridas da Merck® e eluentes em diferentes proporções conforme pré-selecionados pela melhor resolução

cromatográfica. Nas CCDs, as substâncias foram reveladas por vaporização com solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento durante 5 minutos à 110° C para as classes dos terpenóides e esteróides. As substâncias de características fenólicas foram vaporizadas com solução de FeCl₃ 1% e secas a temperatura ambiente. Além disso, as placas também foram visualizadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 250 e 366 nm como método físico de identificação (UGAZ, 1988; HOSTETTMANN, 1997; MALTESE, 2009).

4.1.4 Identificação dos compostos químicos de *M. velame*

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 foram obtidos a 300 e a 75 MHz num equipamento BRUCKER AC 300 disponível na Central analítica da Univali. Os deslocamentos químicos foram medidos em ppm, utilizando TMS como padrão interno de referência (DELLE MONACHE, 2001; VERPOORTE, 2008).

4.2 Material microbiológico

4.2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados como cepas padrões para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana foram:

- Bactérias Gram-positivas:

Bacillus subtilis (ATCC 14579)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)

Staphylococcus saprophyticus (ATCC 35552)

- Bactéria Gram-negativa:

Escherichia coli (ATCC 11775)

- Fungos leveduriformes:

Candida albicans (ATCC 10231)

Saccharomyces cerevisiae

As cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativa e fungos leveduriformes foram fornecidos pela "Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello", Campinas, São Paulo.

4.2.2 Manutenção dos micro-organismos

As bactérias foram mantidas em ágar Nutriente e conservadas sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI. Estas foram repicadas em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis.

Os fungos leveduriformes foram mantidos em ágar Sabouraud dextrosado e armazenadas sob refrigeração 4 °C.

4.2.3 Meios de cultivo

Os meios de cultivo que foram utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana e toxicidade foram:

- Ágar Mueller-Hinton (Merck)
- Ágar Nutriente (Merck)
- Ágar Sabouraud dextrosado (Difco)
- Ágar –ágar 1,5% (Merck)
- Agar Completo [glicose 2% (Nuclear), extrato de levedura 1% (Criteriom), peptona 0,5% (Merck), agar-agar 1,5% (Merck)]
- Caldo Completo [glicose 2% (Nuclear), extrato de levedura 1% (Criteriom), peptona 0,5% (Merck)]
- Extrato de levedura 1% (Criteriom)
- Protease peptona 0,5% (Merck)
- Sacarose 4% (Nuclear)

4.3 Atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras a foram realizadas por diluição em ágar.

4.3.1 Preparo dos inóculos

4.3.1.1 Bactérias

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas as bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* e a Gram-negativa *Escherichia coli*.

Cada bactéria foi transferida do meio de manutenção para o meio ágar Mueller-Hinton (MERCK) e incubada a 37 °C por 18-24 horas, para a ativação da respectiva cultura.

Após ativação, foram selecionadas de 4 a 5 colônias da bactéria e estas foram transferidas para tubo de ensaio com 5 mL de solução NaCl 0,86 % estéril, seguidas de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm. A solução salina estéril foi empregada como branco. Quando necessário, se fez a diluição para alcançar a concentração desejada de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL, compatível com a escala 0,5 de MacFarland. Foi inoculado em cada frasco contendo meio de cultivo e amostra, uma alçada calibrada de 1 µL resultando em concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células.

4.3.1.2 Fungos leveduriformes

Para o preparo dos inóculos de fungos leveduriformes foi utilizado a levedura *Candida albicans*. Esta foi cultivada em ágar Sabouraud dextrosado, pelo menos duas vezes, para assegurar viabilidade das culturas jovens de 24 e 48 horas a 37°C. Posteriormente foram selecionadas de 4 a 5 colônias de leveduras, com

aproximadamente 1 mm de diâmetro, as quais foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85% estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada, por espectrofotometria a 520 nm para a obtenção de transmitância equivalente a 95% e como branco, foi utilizado água destilada estéril ajustando-se a transmitância para 100%. Em cada frasco contendo meio de cultivo e amostra, foi inoculado uma alçada calibrada de 1 µL resultando em concentração final entre $1-5 \times 10^6$ células/mL, como descrito por Espinel-Ingroff e Pfaller (1995).

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método consistiu em se preparar diluições da amostra vegetal a ser testada, em meios de cultivo sólido ou líquido, semear a bactéria ou fungo em estudo, e após incubação, verificar a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do micro-organismo utilizado no ensaio.

Os valores da CIM foram determinados através da diluição das amostras vegetais em ágar. A amostra foi dissolvida em solução de dimetilsufóxido (DMSO) 40%. Foi realizado a diluição seriada em séries de 5 frascos com capacidade para 5 mL em diferentes concentrações (1000 µg/mL a 62,25 µg/mL). Em seguida foi adicionado em cada frasco 1 mL de meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para as leveduras, seguido de imediata homogeneização da mistura. Após a solidificação foram inoculados os microrganismos previamente ativados e incubados a 35 °C por 18 a 24 horas para as bactérias, 35 °C por 24 e a 48 horas para os fungos leveduriformes.

Após o período de incubação, foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados foi considerado CIM a diluição que apresentar inibição total do crescimento microbiano.

Durante os testes foram utilizados controles, com os meios de cultivo e solvente utilizado na solubilização das substâncias, a fim de verificar seu efeito sobre os micro-organismos. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos controles.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 Avaliação da toxicidade

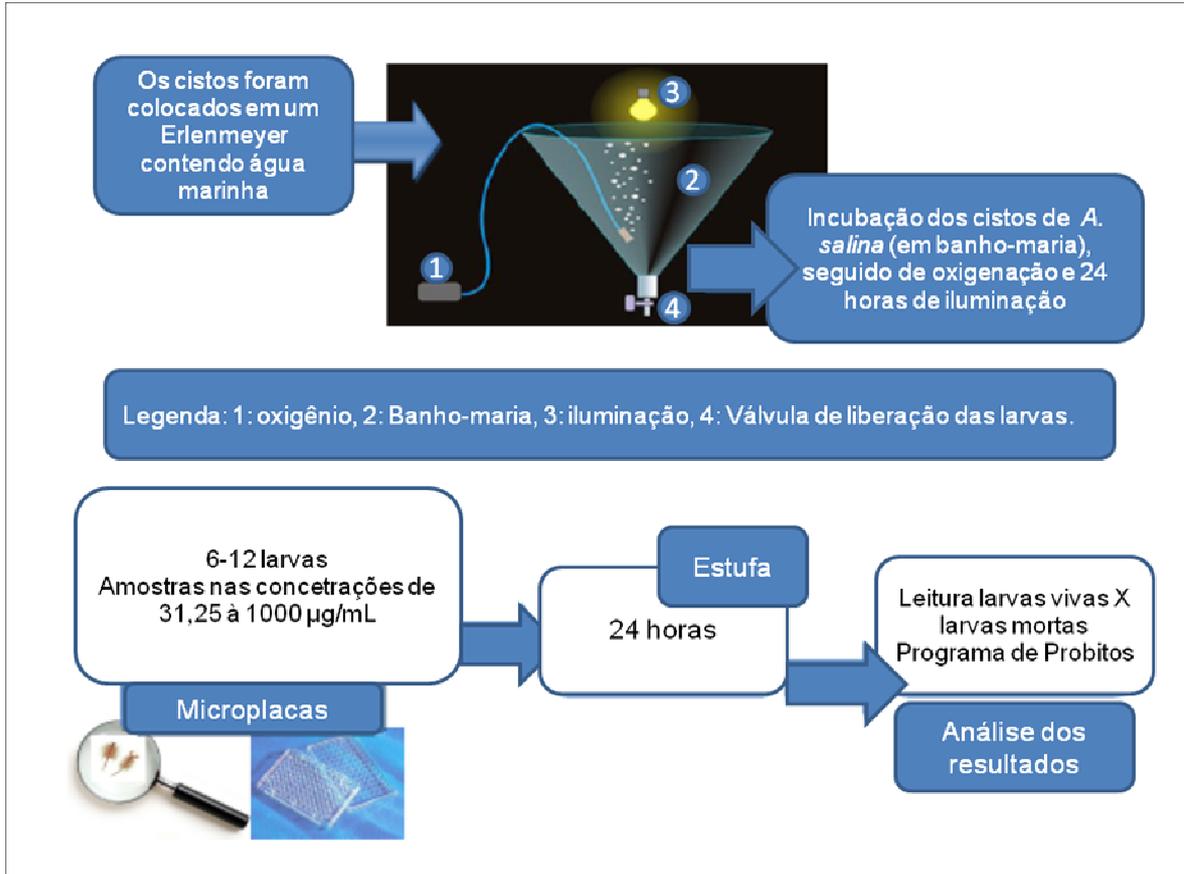
4.4.1 Ensaio com *Artemia salina*

Para realização do ensaio de toxicidade dos extratos obtidos de *G. achachairu*, *M. velame*, *P. microphylla* e *R. niveus*, foi utilizado o microcrustáceo *Artemia salina*, obtido em comércio local. O teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meyer et al. (1982) (Figura 8). As amostras foram preparadas com 1% de DMSO para facilitar a dissolução destas, e água marinha sintética (38 g/mL). Para o preparo da água marinha foi dissolvido o sal apropriado em água destilada. Em um frasco Beaker com água marinha sintética foram adicionados os ovos de *Artemia salina* que foram incubados em banho-maria à temperatura de 20-25 °C durante 48 horas a fim de favorecer a eclosão dos ovos. Em microplacas (200 µL) foi preparado diferentes concentrações das amostras a serem testadas, que variam de 31,25 µg/mL a 1000 µg/mL e a cada uma delas foram adicionados de 6 a 12 larvas do microcrustáceo, incubando-as novamente em banho-maria (20 °C a 25 °C) por 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio nas concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL e como controle negativo 200 µL de água marinha.

Os resultados somente foram validados com a morte de todas as larvas de *Artemia salina* no controle positivo e sobrevivência de todas no controle negativo.

Para o cálculo final da concentração letal de 50% (CL₅₀) e seu respectivo intervalo de segurança foi utilizado o método de Próbitos de análise. As substâncias foram consideradas tóxicas quando o ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* foi menor que 250 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982; PARRA *et al.*, 2001).

Figura 8: Representação da metodologia empregada para avaliação do potencial tóxico agudo utilizando *Artemia salina*.



4.4.2 Ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*

Para este ensaio utilizou-se a linhagem haploide *S. cerevisiae* (XV- 185-14c), como descrito em Medina et al. (2008), com algumas modificações (Figura 9). O crescimento das células foi realizado em meio líquido completo (YEL) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose (Difco, Oxoid ou Vetec). Para determinação do número de células viáveis, ou seja, unidades formadoras de colônias, foram semeados em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-agar, marca Vetec (AUSUBEL et al., 1989).

Para todos os tratamentos, as células foram ressuspensas e diluídas em PBS (tampão salina fosfato- Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, KCl 2,7 mM, e NaCl 137 mM; pH 7,4) sendo que o PBS também foi usado como controle negativo. Neste teste foi empregado o Meio Sintético (SC) suplementado (SC-histidina, SC-lisina e SC-homoserina), nos quais os aminoácidos foram omitidos, conforme descrito por

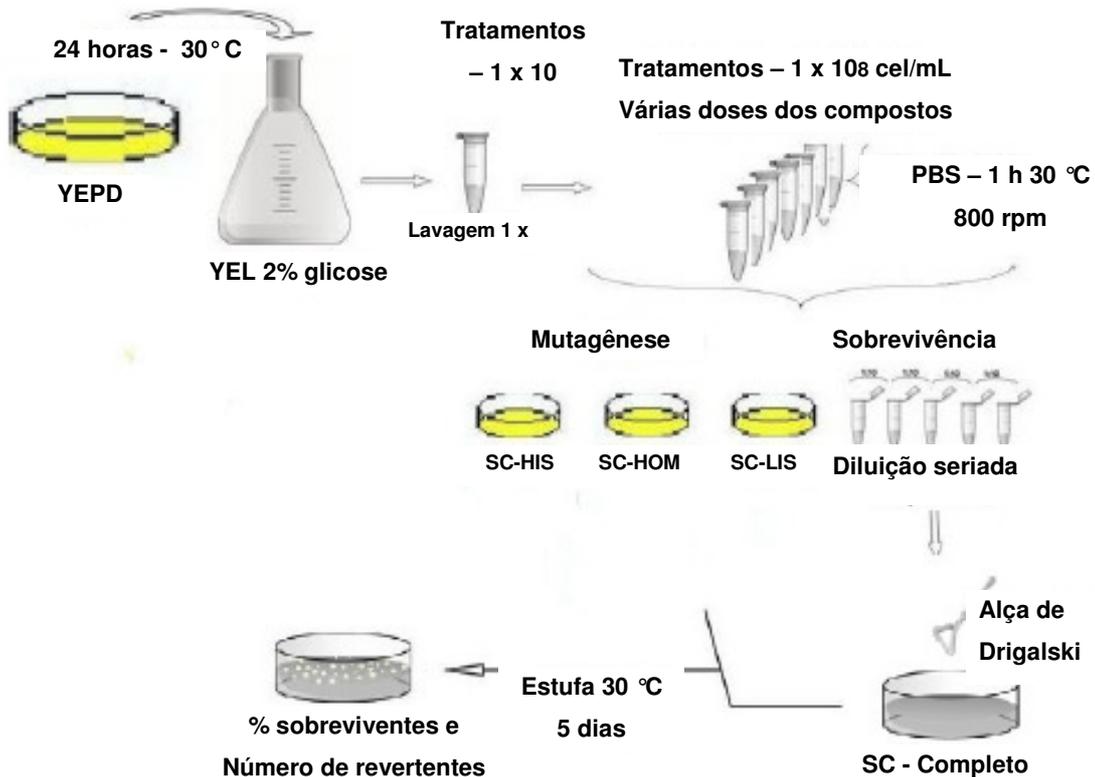
Ausubel e colaboradores (1989). Em frasco de Erlenmeyer contendo 20 mL de YEL foi inoculada uma colônia isolada dessa linhagem e colocada para crescer em *shaker* (incubadora com agitação orbital – LABLINE), a 180 rpm e 30°C, durante 24 horas, para atingir a fase estacionária. As culturas assim mantidas atingiam uma concentração de 1 a 2 x10⁸ células/mL. Duas diluições foram preparadas e as células foram então contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico. Posteriormente, 5 mL desta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 10 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Após esta centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se uma quantidade de PBS calculada para atingir a concentração de 1x 10⁹ células/mL. Dessa suspensão final, utilizou-se 100 µL para cada tratamento (25; 62,25; 125; 250 e 500 µg/mL) dos extratos. As células foram tratadas por 1 hora a 30°C, sob agitação a 800 rpm. Determinou-se a sobrevivência através de semeadura em meio mínimo completo (SC). Para cada tubo de tratamento foram feitas cinco diluições, a concentração do tubo de onde foram retirados os volumes para a semeadura equivalente a 1 x 10³ células/mL, as placas foram colocadas em estufa na ausência de luz a 30°C por 5 dias. Para detecção de mutação induzida (revertentes das marcas auxotróficas *his1-7 lis1-1 hom3-10*) as células foram semeadas em meio mínimo seletivo na concentração de 1 x 10⁸ células/mL nas mesmas condições de incubação. Como controle positivo foi utilizado o composto nitroquinoleína-1-óxido (4-NQO 5 µM) (Sigma). O teste foi feito em triplicata.

A mutação *his1-7* e um alelo com mutação de sentido incorreto do tipo não supressivo, e portanto as reversões são a consequência de mutações no próprio locus. Entretanto, o alelo *lis1-1* corresponde a uma mutação do tipo ocre sem sentido, a qual pode ser revertida de forma locus-específica ou através de mutação para frente (*forward mutation*) em um gene supressor. A diferença entre as reverções verdadeiras e mutações supressoras no locus *lis1-1* foi bem descrita por Schuller e Von Borstel (1974), em que o conteúdo de adenina reduzido no meio SC-*lis* mostra reversão no locus quando as colônias são vermelhas e mutações supressoras quando as colônias ficam brancas. Acredita-se que *hom3-10* contenha mutação *frameshift*, devido a sua resposta a uma série de agentes sabidamente mutagênicos.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Teste ANOVA Dunnett, comparando-se os tratamentos das amostras com o controle negativo

(dose zero de amostra). Foi considerado estatisticamente significativo $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Figura 9: Representação esquemática do teste de mutagênese em *Saccharomyces cerevisiae* XV 185-14c.



4.5 Ensaio de sinergia

O teste de sinergismo foi realizado apenas para as subfrações de *M. velame*, visto que esta espécie foi a que apresentou melhores resultados de CIM. Além disso, as subfrações desta espécie foram as mais purificadas, propiciando assim a realização do ensaio. As combinações realizadas foram com 2 subfrações devido a pequena quantidade de amostra disponível. Com isto, já é possível avaliar possível sinergismo. As subfrações testadas foram MVAK 3-6, MVAK 7-10, MVAK 15 e MVAK 19-29. As combinações realizadas foram MVAK 3-6 + MVAK 7-10; MVAK 3-6

+ MVAK 15; MVAK 3-6 + MVAK 19-29; MVAK 7-10 + MVAK 15; MVAK 7-10 + MVAK 19-29 e MVAK 15 + MVAK 19-29.

Inicialmente foi realizado o preparo das soluções a serem testadas. Para o teste foi empregado uma diluição a partir de uma concentração acima da CIM para cada componente testado, exceto para a subfração MVAK 15, pois a quantidade de amostra foi insuficiente. A concentração desta foi igual a CIM da mesma. As soluções de cada componente descritos abaixo foram dissolvidas em 160 μL de DMSO e completados volume para 1 mL de água estéril.

MVAK 3-6: 20 mg/mL (CIM: 250 $\mu\text{g/mL}$)

MVAK 7-10: 40 mg/mL (CIM: 500 $\mu\text{g/mL}$)

MVAK 15: 5 mg/mL (CIM: 125 $\mu\text{g/mL}$)

MVAK 19-29 : 20 mg/mL (CIM: 250 $\mu\text{g/mL}$)

Após o preparo das soluções estas foram adicionados em placas de microtitulação de acordo com as combinações. O volume adicionado de cada amostra foi de 50 μL totalizando 100 μL totais (50 μL amostra A + 50 μL amostra B), completando com mais 100 μL de meio de cultivo Muller Hinton quem continha o micro-organismo *S. aureus* já previamente ativado na concentração de 10^4 células/200 μL . Após o procedimento as placas foram encubadas por 24 horas e a leitura foi realizada utilizando o corante de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

O ensaio foi realizado testando-se apenas o micro-organismo *S. aureus*. Este foi escolhido devido ao fato de que as amostras apresentaram previamente atividade inibitória contra micro-organismos Gram-positivos, sendo *S. aureus* o representante do grupo.

Para avaliar se houve ou não sinergismo se verificou o Índice de Concentração Inibitória Fracional (CIF) que é determinado através da seguinte equação (STAPLETON, 2006):

$\Sigma\text{CIF} = \text{CIF}_1 + \text{CIF}_2$, onde CIF= (menor concentração do composto obtida na junção dos dois compostos) / (CIM do composto isolado).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica

5.1.1 Extratos e frações

Após a maceração das partes aéreas de cada espécie com etanol por 7 dias, as soluções extrativas foram concentradas em rota-evaporador a pressão reduzida e posteriormente mantidas em dessecador sob sílica ativada. A utilização de metanol como líquido extrator teve como objetivo um maior poder de extração das substâncias presentes no material vegetal tendo em vista um possível isolamento e determinação estrutural (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1997). Posteriormente, cada extrato passou por um processo de particionamento com solventes de polaridade crescente rendendo as respectivas frações semi-purificadas. Os rendimentos de cada extrato e frações podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos e frações das espécies estudadas

Espécie/parte s estudadas	Planta seca (g)	EM(g)/ RMVS (%)	FH (g)/ RMVS (%)	FC (g)/ RMVS (%)	FAE (g)/ RMVS (%)
<i>P. m</i> (<i>P. aéreas</i>)	60,0	1,84/3,07	0,15/ 0,25	0,25/ 0,42	0,01/ 0,017
<i>G. a</i> (<i>Galhos</i>)	1630	123,0/ 7,55	---	37,40/ 2,29	28,30/ 1,74
<i>R. n</i> (<i>P. aéreas</i>)	1300	99,01/ 7,62	17,76/ 1,37	7,10/ 0,55	5,89/ 0,45
<i>M. v</i> (<i>P. aéreas</i>)	840,0	83,28/ 9,91	10,80/ 1,29	7,27/ 0,86	23,70/ 2,82

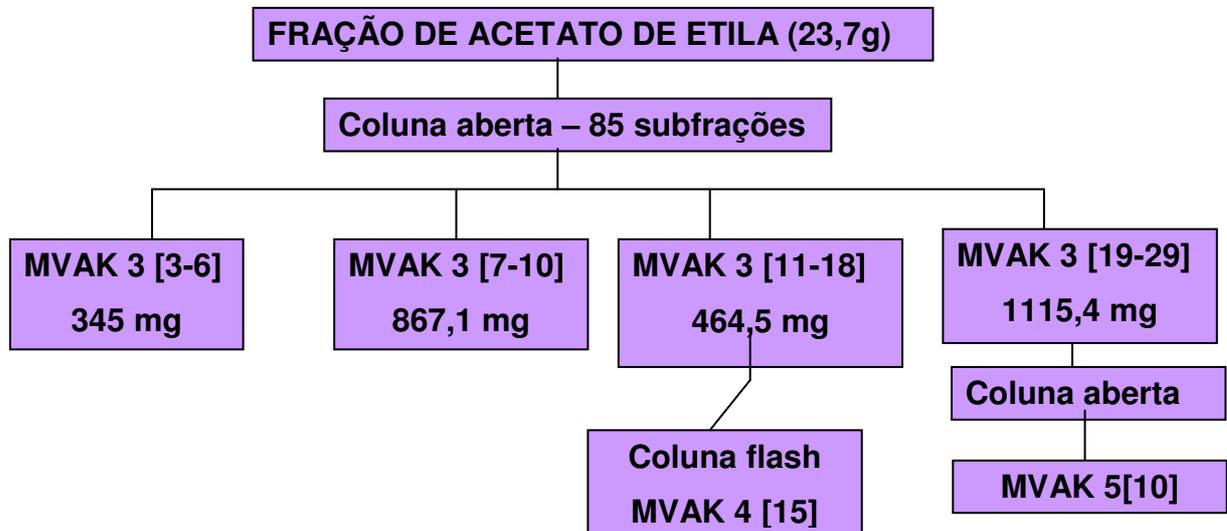
--- Não realizado; EM = Extrato metanólico; FH= Fração hexânica; FC = Fração clorofórmica; FAE= Fração acetato de etila; *P.m.* = *Pilea microphylla*; *R.n.* =*Rubus niveus*; *G.a.*= *Garcinia achachairu*; *M.v.*= *Microsiphonia velame*; RMVS (%): Rendimento (%)/material vegetal seco.

Já se sabe que fatores sazonais são bem conhecidos por afetarem a composição química em espécies vegetais. Como exemplos pode-se citar regiões, épocas e climas de colheita diferentes, idade e desenvolvimento das plantas, variações circadianas, disponibilidade hídrica, temperatura, radiação ultra-violeta, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e fatores mecânicos como ataque de patógenos (GOBBO-NETO et al., 2007).

5.1.2 Fração acetato de etila de *M. velame*

Considerando que a fração de acetato de etila de *M. velame* foi a que apresentou perfil microbiológico mais relevante, 23,7g de fração foram impregnados em sílica na forma de pastilha. Como fase móvel, foi empregada uma mistura de hexano:acetato de etila:metanol na proporção de 3:6:1 até a fração 10, aumentando a polaridade com acetato de etila e de metanol, até 100% metanol. As frações semelhantes foram reunidas em quatro subfrações através do perfil cromatográfico por CCD e denominadas de MVAK-3 (3-6; 345 mg), MVAK-3 (7-10; 867,1mg), MVAK-3 (11-18; 464,5 mg) e MVAK 3 (19-29; 1115,4 mg). Um fluxograma das operações realizadas pode ser observado na figura 10. As subfrações MVAK-3 (3-6) e MVAK-3 (7-10) por apresentarem bom grau de pureza, foram submetidas às análises de RMN- H^1 e C^{13} em metanol (Figuras 11 e 12).

Figura 10: Fluxograma das operações realizadas na purificação da fração de acetato de etila de *M. velame*.



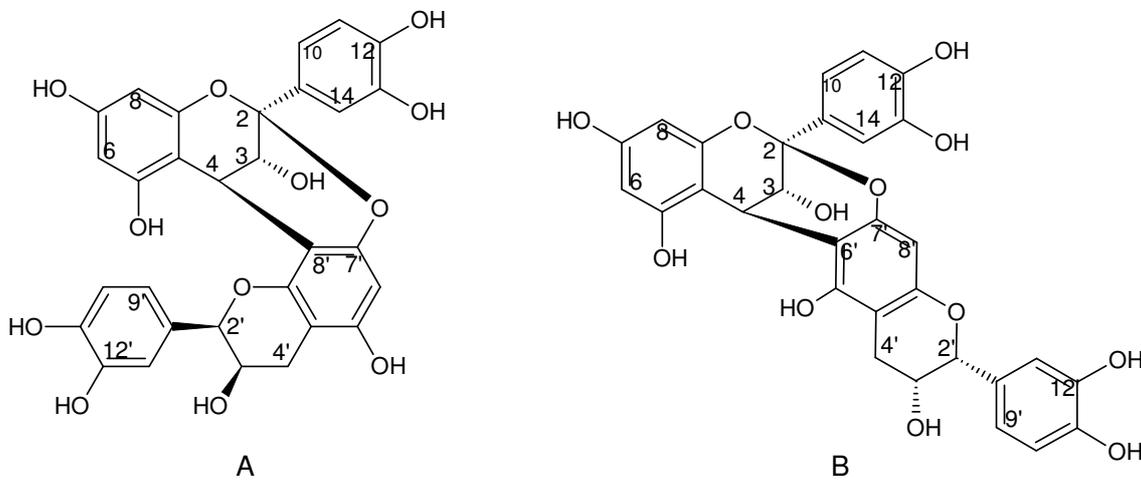
Todas as subfrações apresentam-se na forma de um sólido amorfo os quais deram coloração marrom quando submetidas à reação com anisaldeído sulfúrico como revelador, coloração sugestiva de proantocianidinas (LOU et al., 1999). Em relação a subfração MVAK-3 (7-10; 867,1mg), os espectros de ^1H -RMN mostram sinais característicos de flavonas diméricas baseados nos dois dupletos na região de 4,04 e 4,40 ppm e atribuídos aos H3 e H4 da unidade superior, bem como o multipletto e dois dupletos nas regiões de 4,24, 2,72 e 4,95 ppm atribuídos aos H3', 4' α e 4' β , respectivamente. Outros sinais evidentes são os dupletos observados em 6,0 e 6,08 ppm característicos de acoplamento orto e atribuídos aos H6 e H8 do anel aromático da unidade superior (Figura 11). Outros sinais que merecem destaque são o simpleto em 6,10 ppm bem como os multipletos em 4,64 e 4,24 ppm e atribuídos aos hidrogênios H6' H2' e H3', da unidade inferior, respectivamente. Em relação ao espectro de RMN $-\text{C}^{13}$ (Figura 12), é possível observar um sinal característico de carbono cetálico em 100,32 ppm e atribuído ao C2 e sugerindo a união da subunidade inferior (LIU et al., 2007; LOU et al., 1999). Os sinais em 29,4 e 30,05 ppm foram atribuídos ao carbonos C4 e C4' de ambas as unidades. Os sinais mais desblindados entre 145,3 e 158,2 ppm são característicos de carbonos fenólicos e atribuídos aos carbonos C5, C5', C7, C7' C11, C11', C12, C12' além dos C8a e C8a'. Para efeito de comparação, os demais sinais encontram-se da tabela 2. Baseados

Tabela 2: Dados de deslocamentos químicos de MVAK 3 (7-10) em comparação com a literatura*

Carbono	RMN- ¹ H MVAK8 (ppm)	RMN- ¹ H Literatura* δ (ppm)	RMN- ¹³ C MVAK8 δ (ppm)	RMN- ¹³ C Literatura* δ (ppm)
2	-----	-----	100,32	100,21
3	4,04 d(3,6)	4,05 d(3,4)	68,23	68,12
4	4,40 d(3,4)	4,39 d(3,4)	29,40	29,31
4 ^a	-----	-----	104,40	104,29
5	-----	-----	157,15	157,05
6	6,00 d(3,6)	6,00 d(2,3)	98,44	98,34
7	-----	-----	158,27	158,16
8	6,08 d(3,6)	6,07 d(2,3)	96,77	96,67
8 ^a	-----	-----	154,39	154,31
9	-----	-----	132,60	132,50
10	7,5 d(3,0)	7,14 d(2,4)	115,77	115,66
11	-----	-----	146,44	146,34
12	-----	-----	145,80	145,69
13	6,79 d(12,0)	6,82 d(8,2)	116,18	116,08
14	7,07 dd (9,6; 3,0)	7,07 dd (8,2; 2,4)	120,51	120,41
2'	4,64 br s	4,91 br s	81,90	81,81
3'	4,24 m	4,23 m	67,13	67,02
4'α	2,72 dd (17,2; 3,4)	2,74 dd (17,3; 3,2)	30,05	29,93
4'β	4,95 dd (17,4; 4,8)	4,95 dd (17,3; 4,6)	-----	-----
4a'	-----	-----	102,57	102,46
5'	-----	-----	156,75	156,65
6'	6,10s	6,09s	96,63	96,53
7'	-----	-----	152,29	152,34
8'	-----	-----	107,36	107,25
8 ^a '	-----	-----	152,45	152,18
9'	-----	-----	131,35	131,24
10'	7,13 d (3,0)	7,13 d (2,2)	115,77	115,70
11'	-----	-----	146,91	146,80
12'	-----	-----	146,14	146,03
13'	6,83 dd (12,0)	6,81 dd (8,2)	116,07	115,97
14'	7,03 dd (9,6; 3,0)	6,99 dd (8,2; 2,2)	119,92	119,81

*LIU et al., **Food Chem.** 105, 1446-1451, 2007

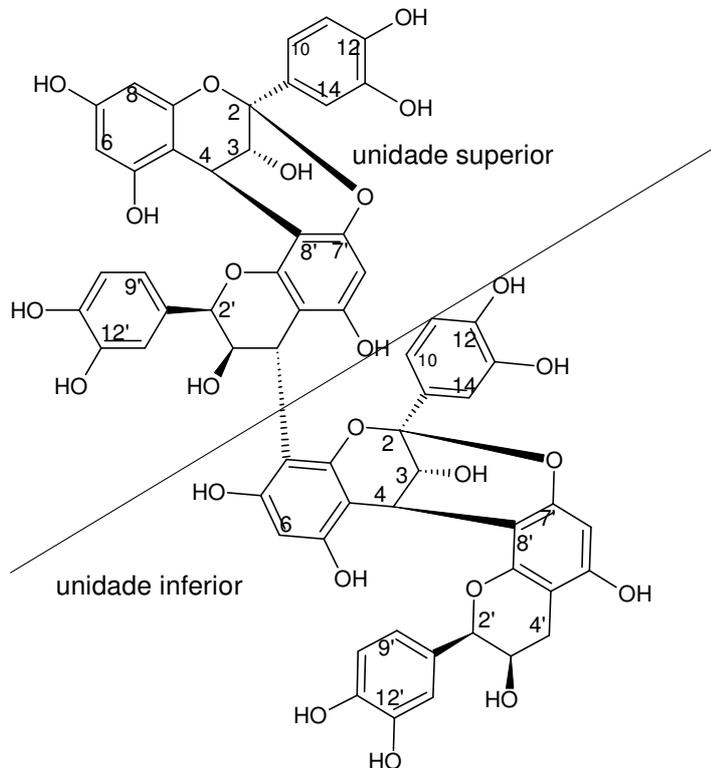
Figura 13: Estruturas moleculares das substâncias isoladas da fração de acetato de etila obtida das partes aéreas de *M. velame*



Em relação MVAK-3 (3-6), todos os dados espectroscópicos (dados não demonstrados) são idênticos ao MVAK 3 (7-10) diferenciando apenas pelo simpleto em 6,20 ppm e a atribuído ao H8' e o sinal na região de 96 ppm no espectro de carbono treze, levando a sugerir que se trata de outra proantocianidina A2 com interligações dos monômeros do tipo 2β-O-7' →4β-6' (Figura 13B). A maior parte dos dados estão de acordo com a literatura (LIU et al., 2007; VIVAS, GLORIES, 1996).

Dando continuidade ao isolamento, a subfração MVAK 3 [11-18], por apresentar significativo grau de impureza, foi submetida a um processo de purificação utilizando-se um sistema de coluna flash. Neste aspecto, 464,5 mg foram impregnados em sílica na forma de uma pastilha e eluída num sistema eluente composto de diclorometano:acetona:metanol na proporção de 6:3:1 com aumento gradativo de polaridade até 100% metanol. Foram obtidas oito subfrações reunidas de acordo com a similaridade através de CCD. Considerando que a subfração MVAK 4(15) foi a que apresentou maior grau de pureza, foi então submetida à análise de RMN- ^1H e ^{13}C , utilizando metanol como solvente. Embora as análises estejam em andamento, os dados preliminares (espectros não demonstrados) sugerem ser uma proantocianidina tetramérica conforme demonstrada na figura 14.

Figura 14: Estrutura molecular sugerida para MVAK 4 [15]



Da mesma forma, a subfração MVAK 3 (19-29), foi submetida a um sistema de coluna aberta. Neste sentido, uma massa de 1115,4 mg foi eluída num sistema de eluente composto por diclorometano:acetona:metanol na proporção de 6:3:1 de forma isocrática. Deste procedimento, foram obtidas 11 subfrações as quais foram reunidas de acordo com a semelhança por CCD. A subfração MVAK 5 (20) que apresentou maior grau de pureza foi submetida à análise de RMN- ^1H e ^{13}C em metanol. No entanto, estas análises estão em andamento, o que não permite ter uma sugestão estrutural até o momento.

As proantocianidinas correspondem atualmente à designação que até alguns anos era dada aos taninos condensados. O papel destes compostos, nos vegetais tem sido destacado, não só devido ao seu importante papel na enologia, como também dos seus potenciais benefícios para a saúde humana. Desta forma, estes compostos assumem um importante papel ao nível das características gustativas principalmente nos vinhos, assim como na cor e sabor destes devido à sua associação com as antocianinas (DIXON; XIE; SHARMA, 2005). Por outro lado, reagem com as proteínas da saliva, e, portanto são responsáveis pela adstringência evidenciada. Em termos da estrutura química, estas moléculas cujas unidades

fundamentais são estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos com uma estrutura em forma de C₆-C₃-C₆. Em meio ácido e a quente, as proantocianidinas sofrem hidrólise e libertam antocianidinas (BEECHER, 2004).

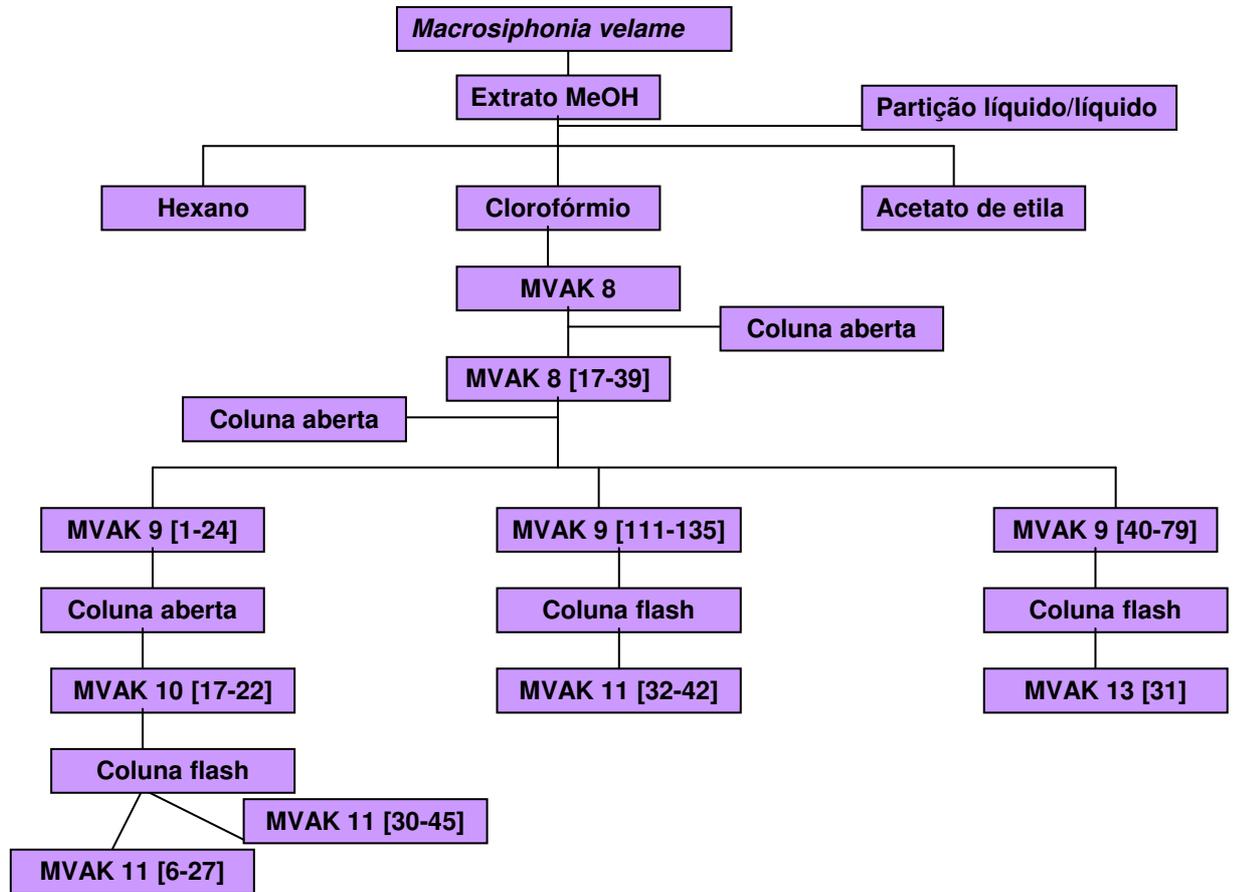
Estudo realizado com a espécie *Ixora coccinea* demonstrou que foram isoladas das folhas da espécie diversas proantocianidinas. Dentre elas destacam-se a ixoratanina A-2 e cinantanina B-1 que apresentaram atividade antioxidante. Além destas, todas as proantocianidinas isoladas da espécie foram ativas contra *B. subtilis*, porém destaca-se a epicatequina e quercetina-3- α -L-raminopiranosideo que além de inibir crescimento de *B. subtilis* foram ativas também contra *E. coli* (IDOWU et al., 2010).

As proantocianidinas também apresentam efeito cardioprotetor e anti-tumoral, analgésica, espasmolítica e anti-inflamatória, além de apresentarem ação antibacteriana em infecções urinárias causadas principalmente por *E. coli* (DIXON; XIE; SHARMA, 2005).

5.1.3 Fração clorofórmio

Embora a fração de clorofórmio não tenha revelado importante efeito antimicrobiano, foi processada na tentativa de isolar alguma substância de importância fitoquímica. Neste aspecto, 5,0 foram impregnados em sílica gel na forma de pastilha e processadas utilizando um sistema de coluna aberta. Como fase móvel foi utilizado um sistema eluente composto de clorofórmio:metanol na proporção de 98:2 com aumento de polaridade até 100% metanol rendendo 39 subfrações. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança através de CCD. Posteriormente, dependendo da subfração, foi submetida a procedimento similar de cromatografia aberta ou sistema flash conforme observado na figura 5. Como resultado. Foi possível isolar quatro substâncias, as quais foram previamente denominadas de MVAK 11 [5-27], MVAK 11 [30-45], MVAK 9 [32-42] e MVAK 13 [31]. Estas substâncias foram submetidas às análises espectroscópicas e neste momento encontra-se em fase de identificação. Um fluxograma das operações realizadas na purificação pode ser observado na figura 15.

Figura 15: Fluxograma das operações realizadas na purificação da fração clorofórmica de *M. velame*.



5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Devido ao surgimento de vários micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, principalmente as associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes, faz-se necessária a busca, através de pesquisas, de novos agentes antimicrobianos (PENNA et al., 2001). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Deve ser ressaltado também que a utilização de estudos de triagem contribuem para a descoberta de atividade farmacológica de novos agentes, o que se torna importante, principalmente no Brasil, devido a grande biodiversidade do país (LEITÃO et al., 2006).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é determinada através da determinação da menor quantidade da amostra necessária para inibir o crescimento do micro-organismo; esse valor é conhecido como CIM. Alguns aspectos devem ser levados em consideração para determinar a CIM de extratos vegetais como, por exemplo, os aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (OSTROSKY et al., 2008).

Diversos fatores interferem na determinação da CIM de extratos de plantas, dentre eles podemos citar a cepa do micro-organismo utilizado no teste, a técnica aplicada, à origem da planta, modo de preparo dos extratos se os mesmos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas, a época da coleta e a quantidade de extrato testada. Sendo assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

Inicialmente foi realizada uma triagem com extratos metanólicos e as frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol obtidas de *G. achachairu* (partes aéreas), *P. microphylla* (partes aéreas), *M. velame* (partes aéreas e xilopódio) e *R. niveus* (partes aéreas). Estas foram testadas contra micro-organismos representantes das bactérias Gram-positivas (*S. aureus*), Gram-negativos (*E. coli*) e um fungo leveduriforme (*C. albicans*) (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de diferentes plantas contra os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, expressos em µg/mL.

Espécies	Frações	<i>S. aur</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. alb</i>
<i>G. achachairu</i> (Partes aéreas)	MeOH	>1000	>1000	>1000
	Hex	>1000	>1000	>1000
	Clo	1000	>1000	>1000
	AE	>1000	>1000	>1000
	But	>1000	>1000	>1000
<i>P. microphylla</i> (Partes aéreas)	MeOH	>1000	>1000	>1000
	Hex	>1000	>1000	>1000
	Clo	>1000	>1000	>1000
<i>M. velame</i> (Xilopódio)	Met	>1000	>1000	>1000
	AE	>1000	>1000	>1000
<i>M. velame</i> (Partes aéreas)	MeOH	500	>1000	>1000
	Hex	>1000	>1000	>1000
	Clo	1000	>1000	>1000
	AE	125	>1000	>1000
<i>R. niveus</i> (Partes aéreas)	MeOH	250	>1000	>1000
	Hex	>1000	>1000	>1000
	Clo	>1000	>1000	>1000
	AE	500	>1000	>1000

AE (Acetato de etila), But (Butanol), Clo (Clorofórmio), Hex (Hexano), MeOH (metanol); *C. alb* (*Candida albicans*), *E. coli* (*Escherichia coli*), *S. aur* (*Staphylococcus aureus*).

Como pode ser observado, em relação ao micro-organismo Gram-negativo *E. coli* e a levedura *C. albicans* nenhum dos extratos apresentaram atividade antimicrobiana até a concentração máxima testada. A ausência de atividade antimicrobiana dos compostos frente aos micro-organismos Gram-negativos pode ser explicada devido a sua morfologia, uma vez que estas apresentam uma membrana externa, que consiste numa dupla camada de lipídios, contendo moléculas de proteínas e lipoproteínas ligadas ao peptidoglicano. Além disso, agregado à membrana externa, há o espaço periplasmático, composto por enzimas responsáveis pela inativação de algumas substâncias com ação antibacteriana. Assim, todas essas características adjuntas, explicam o porquê muitos agentes antimicrobianos têm dificuldade em penetrar nessa membrana (TRABULSI et al., 2005).

Porém, com relação à bactéria representante dos Gram-positivos *S. aureus*, pode ser observada atividade antimicrobiana significativa que foi de moderadamente ativo à fraco. A fração de clorofórmio de *G. achachairu* (partes aéreas) apresentou CIM de 1000 µg/mL. Já em relação a *M. velame* (partes aéreas) apenas a fração hexano não apresentou atividade antimicrobiana. O extrato metanólico e as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram, respectivamente, CIM para *S. aureus* de 500, 1000 e 125 µg/mL. *R. niveus* não mostrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* nas frações de hexano e clorofórmio, enquanto que o extrato metanólico e as frações de acetato de etila apresentaram CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente.

Solventes apolares como éter, hexano e clorofórmio são responsáveis pela extração de grupos esteróides, cumarínico, terpenos, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides. Estes provavelmente são os grupos extraídos da *G. achachairu* visto que, em estudos realizados por Almeida et al. (2008) com o gênero *Garcinia* foi verificado a presença de flavonóides, xantonas e benzofenonas. Já o diclorometano e acetato de etila extrai compostos mais polares fenólicos como os flavonóides, cumarinas, cromenos, benzofuranos, xantonas, quinonas e taninos que são os prováveis grupos encontrados na extração de *M. velame* (CARVALHO et al., 2001).

Segundo Holets et al. (2002), valores de CIM menores que 100 µg/mL são considerados como boa atividade antimicrobiana, de 100 – 500 µg/mL moderadamente ativos, de 500 – 1000 µg/mL pouco ativos e maior de 1000 µg/mL são vistos como substâncias inativas. De acordo com a tabela 3, os resultados

obtidos podem ser classificados como moderadamente ativos, visto que a fração de *M. velame* apresentou CIM de 125 µg/mL. Como pode ser observado, este resultado está quase dentro da faixa de boa atividade que é menor que 100 µg/mL. Com isto, existe a grande probabilidade de novos fármacos antimicrobianos a partir desta planta.

Bactérias Gram-positivas são responsáveis por grande parte das doenças infecciosas e a resistência aos antibióticos deste grupo vem crescendo de maneira significativa. A resistência bacteriana é uma preocupação crescente a nível mundial. Em particular, todos os importantes patógenos Gram-positivos são resistentes a múltiplos agentes (COLEMAN, 2004).

S. aureus é um organismo versátil, com várias características virulentas e diversos mecanismos de resistência. Também é causa significativa de uma vasta gama de doenças infecciosas em seres humanos. Embora tradicionalmente confinadas principalmente ao ambiente hospitalar, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), está rapidamente se tornando freqüentes na comunidade. MRSA adquiridos na comunidade é particularmente significativa devido ao seu potencial para a difusão descontrolada dentro das famílias e sua propensão para causar graves infecções da pele e pulmonares. Devido ao resultado desfavorável de muitas infecções causadas por MRSA com a terapia padrão, agentes antimicrobianos pertencentes a várias classes foram introduzidos e foram avaliadas em ensaios clínicos quanto sua eficácia no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes. Além disso, um número de estratégias preventivas também foram sugeridas para conter a propagação de tais infecções (KANAFANI; FOWLER, 2006).

Embora a fração metanólico de *R. niveus* tenha apresentado o melhor resultado de CIM, as frações das espécies *G. achachairu* e *M. velame* é que foram selecionadas e, a partir de processos cromatográficos, estas foram fracionadas na tentativa de isolar os compostos responsáveis pela ação antimicrobiana.

A tabela 4 mostra os resultados de CIM contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* de subfrações obtidas da fração clorofórmio e acetato de etila de *G. achachairu*. Como pode ser observado as subfrações obtidas da fração de acetato de etila não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhum dos micro-organismos testados, isto é todas as CIM foram maiores que 1000 µg/mL. Por outro lado, as subfrações obtidas da fração clorofórmio apresentaram atividade contra *S. aureus*. Como pode ser observado, as subfrações de 12-16, 17-26, 27-49 e 100-119

apresentaram CIM de 500 µg/mL, já as subfrações 50-69, 70-99 e 120-133 apresentaram CIM de 250, 250 e >1000 µg/mL respectivamente. Estes resultados, segundo Holets et al. (2002), indicam atividade antimicrobiana moderada.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de sub-frações de *G. achachairu* obtidas da cromatografia em coluna das frações de clorofórmio e acetato de etila contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. saprophyticus* e *B. subtilis*.

Espécies	Frações	Subfrações	<i>S. aur</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. alb</i>	<i>S. sap</i>	<i>B. sub.</i>	
<i>G. achachairu</i> (Partes aéreas)	Clorofórmio		1000	>1000	>1000	>1000	500	
		12-16	500	>1000	>1000	>1000	250	
	Clo	17-26	500	>1000	>1000	1000	125	
		27-49	500	>1000	>1000	1000	500	
		50-69	250	>1000	>1000	500	250	
		70-99	250	>1000	>1000	500	250	
		100-119	500	>1000	>1000	1000	500	
		120-133	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
		AE	32-53	>1000	>1000	>1000	-	-
			54-78	>1000	>1000	>1000	-	-
			77-103	>1000	>1000	>1000	-	-
			104-108	>1000	>1000	>1000	-	-
	109-118		>1000	>1000	>1000	-	-	
	119-140		>1000	>1000	>1000	-	-	

AE (Acetato de etila), Clo (Clorofórmio); *B. sub* (*Bacillus subtilis*), *C. alb* (*Candida albicans*), *E. coli* (*Escherichia coli*), *S. aur* (*Staphylococcus aureus*), *S. sap* (*Streptococcus saprophyticus*).- (não testados)

Devido a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* apresentada pelas subfrações de clorofórmio de *G. achachairu*, estas foram testadas contra os organismos Gram-positivos, *S. saprophyticus* e *B. subtilis*. Os resultados apresentados também na tabela 4, mostram que a fração clorofórmio apresentou CIM >1000 µg/mL para *S. saprophyticus* e 500 µg/mL para *B. subtilis*. Em relação as subfrações 12-16, 17-26, 27-49, 50-69, 70-99, 100-119, 120-133, estas apresentaram CIM contra *S. saprophyticus* respectivamente de >1000, 1000, 1000,

500, 500, 1000, e >1000 µg/mL. As mesmas subfrações apresentaram CIM contra *B. subtilis* respectivamente de 250, 125, 500, 250, 250, 500 e >1000 µg/mL. As substâncias responsáveis pela atividade contra *B. subtilis* podem estar principalmente na fração 17-26, visto que esta foi a que apresentou menor CIM (125 µg/mL). Estes resultados fornecem atividade antimicrobiana moderada, visto que todos estão na faixa de CIM 100 – 500 µg/mL. A avaliação da atividade biológica da família Clusiaceae tem possibilitado a identificação de moléculas potencialmente capazes de interferir na atividade celular de diferentes organismos, entre eles fungos e bactérias (MARQUES; EL-BACHÁ; CRUZ, 2009).

Estudos envolvendo atividade antimicrobiana de espécies de *Garcinia* têm sido realizados. Negi, Jayaprakasha e Jena (2008) demonstraram que as frações de hexano e clorofórmio de cascas e frutos de *Garcinia cowa* e *Garcinia pedunculata* apresentaram atividade antibacteriana contra diversas bactérias patogênicas como *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*. A CIM variou de 15 à 500 µg/mL para *G. cowa* e de 30-1250 µg/mL para *G. pedunculata*. A atividade antibacteriana de todos os extratos foi mais intensa contra as bactérias Gram-positivas do que a bactéria Gram-negativa testada. Este mesmo resultado pode ser observado com as amostras de *G. achachairu* onde houve atividade somente contra os micro-organismos Gram-positivos. Além disso melhores resultados foram obtidos com esta espécie visto que as frações apresentaram valores de CIM abaixo de 1000 µg/mL, uma vez que acima desse valor foi considerado inativo, e permaneceram em uma faixa de 100 – 500 µg/mL.

Os *Bacillus* são micro-organismos que pertencem à um grupo heterogêneo de Gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e são formadores de endósporos. Estes endósporos são estruturas termo-tolerantes, resistentes a radiação ultravioleta e solventes orgânicos (MACHADO et al., 2010).

Estudos químicos sobre o gênero *Garcinia* têm apresentado uma grande diversidade de classes estruturais. Dentre elas se pode citar benzofenonas polisopreniladas, flavonóides, cumarinas e xantonas (TAHER et al., 2005). Outro estudo envolvendo a *G. mangostana*, demonstrou que o pericarpo é uma fonte de xantonas e outras substâncias bioativas e seus extratos possuem ação antioxidante, antitumoral, antialérgicos, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais (PEDRAZA-CHAVERRI et al, 2008).

Assim como *G. achachairu*, o extrato de *R. niveus* também apresentou atividade contra *S. aureus* e foram testados contra outros micro-organismos Gram-positivos. O extrato metanólico e as frações de hexano, clorofórmio e acetato de etila de *R. niveus* não apresentaram atividade contra *B. subtilis*, isto é, o valor de CIM encontrado foi maior que 1000 µg/mL. A única fração que apresentou atividade contra *S. saprophyticus* foi a de acetato de etila com CIM de 1000 µg/mL. Algumas espécies *Rubus* são conhecidos por terem propriedades antimicrobianas contra Gram-positivos, principalmente devido ao seu alto teor em compostos fenólicos (SISTI et al., 2008). Os resultados concordam com estes autores já que a fração mais promissora foi a de acetato de etila a qual poderia apresentar estas classes de substâncias devido sua polaridade.

S. saprophyticus é um micro-organismo frequente nas infecções do trato urinário em mulheres (LE BOUTER, 2011; ORDEN-MARTINEZ, MARTINEZ-RUIZ, MILLÁN-PÉREZ, 2008). Também é o agente causador de muitas pielonefrites, prostatites e endocardites (LE BOUTER, 2011).

Estudos revelam que o extrato de *R. niveus* além de apresentar elevado teor de vitamina C e betacaroteno, é rico em compostos fenólicos além de ácido elágico o que justifica a ação antibacteriana (SCHAKER; ANTONIOLLI, 2009). Em estudos anteriores realizados nos laboratórios com outra espécie pertencente ao mesmo gênero, *Rubus imperialis*, foi demonstrado que o extrato metanólico das raízes apresentou perfil antimicrobiano com valores de CIM de 900, 1200, 800 e 900 µg/mL para as bactérias *B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. agalactiae*, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente trabalho são importantes tendo em vista a carência de estudos realizados com esta espécie. Na literatura facilmente se encontra pesquisas com outras espécies de *Rubus*. Em estudo realizado por Hong et al. (2010) foi analisado os efeitos hepatoprotetores de extratos de *R. aleaefolius* através de fracionamento bioguiado onde se verificou a presença de seis componentes o β-sitosterol, ácido-1β hidroxieuscafico, ácido oleanólico, ácido miriantico, ácido euscafico, e ácido tomentico. O ácido-1β hidroxieuscafico se mostrou o composto mais potente e seletivo contra a lesão hepática aguda.

Em outro estudo realizado com *R. ulmifolius* foi verificado que as frações ricas em ácidos fenólicos e taninos apresentaram uma alta atividade antimicrobiana (PANIZZI et al., 2002). O extrato metanólico foi testado contra 37 fungos

potencialmente patogênicos das quais 70% foram sensíveis ao extrato metanólico de *R. ulmifolius* (SISTI et al., 2008). Desta mesma espécie foram isoladas 3 antronas (rubantrona A, B e C) sendo que a rubantrona A apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* a 4,5 mg/mL (FLAMINI et al., 2002). Este resultado demonstra excelente atividade quando comparado ao obtido pela *R. niveus* no presente estudo, visto que esta apresentou CIM de 250 µg/mL contra *S. aureus*, isto é CIM cerca de 18 vezes menor, sendo assim mais potente e também vale ressaltar que valores de CIM acima de 1000 µg/mL foram considerados inativos. Além disso, o resultado de CIM da *R. niveus* foi obtido do extrato metanólico, enquanto que a CIM de 4,5 mg/mL obtido no estudo de Flamini et al. (2002) foi do composto isolado da *R. ulmifolius*. Outra atividade biológica foi descrita para a espécie *R. ulmifolius* sendo ela ação antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, onde se verificou que esta possui potente atividade contra este micro-organismo (MARTINI et al., 2009).

Dando continuidade a triagem microbiológica e considerando que a fração acetato de etila obtida de *M. velame* apresentou o melhor perfil antimicrobiano, com CIM de 125 µg/mL (tabela 3), esta foi submetida a um fracionamento cromatográfico. Sendo assim, 30 g da fração foi cromatografada utilizando coluna de sílica gel e eluída com uma mistura de diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade obtendo-se as subfrações denominadas de MVAK 3-6, MVAK 7-10, MVAK 15 e MVAK 19-29. Posteriormente foram avaliadas a CIM destas subfrações contra o *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. saprophyticus*. Além destes, foi testado também a CIM contra *E. coli* e *C. albicans*, representando respectivamente o micro-organismo Gram-negativo e fungo (tabela 5). Como pode ser observado, as subfrações não apresentaram atividade contra *E. coli* e *C. albicans*, isto é, a CIM foi maior que 1000 µg/mL. Por outro lado, contra *S. aureus* todas as subfrações apresentaram atividade. A subfração 3-6, 7-10, 15 e 19-29 apresentaram CIM contra *S. aureus* de 250, 500, 125 e 250 µg/mL respectivamente. Também se mostraram ativas contra *B. subtilis* de 500, >1000, 500 e 1000 µg/mL respectivamente. Finalmente a CIM das subfrações contra *S. saprophyticus* foram de 500, >1000, 500 e 500 µg/mL respectivamente.

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) de sub-frações obtidas das partes aéreas da fração de acetato de etila de *M. velame* contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *S. saprophyticus* e *E. coli*.

Espécie	Sub- Frações	Micro-organismos				
		<i>S. aur</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. alb</i>	<i>S. sap</i>	<i>B.sub</i>
<i>M. velame</i> (partes aéreas)	MVAK 3-6	250	>1000	>1000	500	500
	MVAK7-10	500	>1000	>1000	>1000	>1000
	MVAK 4 (15)	125	>1000	>1000	500	500
	MVAK 19-29	250	>1000	>1000	500	1000

B. sub (*Bacillus subtilis*), *C. alb* (*Candida albicans*), *E. col* (*Escherichia coli*), *S. aur* (*Staphylococcus aureus*), *S. sap* (*Streptococcus saprophyticus*).

A análise fitoquímica de *M. velame* revelou a presença de flavonóides, compostos fenólicos, triterpenóides pentacíclicos, saponinas, cumarinas, catequinas e taninos catéquicos (RIBEIRO et al., 2010).

A carência de estudos científicos a respeito da espécie *M. velame* é notável. Na busca por estudos não foi encontrado informações sobre atividade antimicrobiana como relatado neste trabalho. Assim, surge a importância de continuar a análise com *M. velame* devido sua notável atividade antimicrobiana frente a micro-organismos Gram-positivos.

O intuito de purificar a fração de acetato de etila era a possibilidade de se encontrar as substâncias responsáveis pela atividade encontrada na fração. No entanto, embora se tenha isolado quatro substâncias puras, nenhuma apresentou valor de CIM menor do que a fração de partida isso nos leva a sugerir um possível sinergismo ou também existe a possibilidade de não ter isolado a substância mais ativa.

5.3 Ensaio de sinergismo

A real eficácia de uma planta medicinal pode não ser devido a um componente ativo principal, mas a ação combinada de diferentes compostos originalmente na planta. Em estudos para análise de antibacterianos foi observado

que as interações menores *in vitro* podem não resultar em sinergismo significativo *in vivo*, mas podem fazer a diferença para a duração de um efetivo nível do fármaco *in vivo*. Como essas respostas podem muito facilmente ocorrer em extratos de plantas naturais, é importante selecionar uma mistura sinérgica de ativos com as melhores propriedades terapêuticas (NENAAH, 2010). Neste aspecto o ensaio de sinergismo foi realizado.

Na tentativa de verificar a possibilidade de sinergismo entre os compostos de *M. velame* foram realizados testes de CIM de misturas em diferentes concentrações frente a *S. aureus*. Foram realizados os testes somente contra *S. aureus* visto que este foi o escolhido para representar o grupo dos micro-organismos Gram-positivos (única classe de micro-organismo que foi inibida nos testes preliminares). A escolha da *M. velame* para o ensaio de sinergismo foi devido a mesma ter apresentado menores valores na CIM.

Os resultados das combinações podem ser observados na tabela 6. Valores de CIF menores que 0,5 são considerados indicativos de sinergismo (STAPLETON, 2006). Porém, segundo Davidson e Parisch (1989), valores de CIF menores que 1 indicam sinergismo e maior que 1 antagonismo.

Tabela 6: Concentração Inibitória Fracional ($\mu\text{g/mL}$) das combinações dos compostos de *M. velame* contra *S. aureus*.

COMBINAÇÃO	ΣCIF
MVAK 3-6 +MVAK 7-10	1,12
MVAK 3-6 + MVAK 15	2,0
MVAK 3-6 + MVAK 19-29	1,25
MVAK 7-10 + MVAK 15	2,0
MVAK 7-10 + MVAK 19-29	0,75
MVAK 15 + MVAK 19-29	2,06

De acordo com a tabela 6 as combinações MVAK 3-6 +MVAK 7-10, MVAK 3-6 + MVAK 15, MVAK 3-6 + MVAK 19-29, MVAK 7-10 + MVAK 15, MVAK 7-10 + MVAK 19-29 e MVAK 15 + MVAK 19-29 apresentaram Concentração Inibitória Fracional (CIF) de 1,125, 2,0, 1,25, 2,0, 0,75, 2,06 respectivamente. Analisando estes valores de acordo com Stapleton (2006) não houve sinergismo entre nenhuma das combinações uma vez que todas apresentaram CIF acima de 0,5. Porém, de acordo com Davidson e Parisch (1989) houve sinergismo na combinação MVAK 7-10 com MVAK 19-29 visto que esta apresentou CIF de 0,75 e o critério para ser considerado sinérgico segundo os autores é de CIF abaixo de 1,0.

Embora segundo Stapleton (2006) seja considerado sinergismo somente combinações que apresentem CIF abaixo de 0,5, e esta seja uma referência mais recente, considera-se que realmente houve sinergismo entre as amostras MVAK 7-10 e MVAK 19-29. Isto deve-se ao fato de que os valores para considerar sinergismo de Stapleton é em relação a antimicrobianos comercial utilizados na clínica e, para plantas medicinais, onde apenas se quer identificar se há ou não efeito sinérgico não ocorre a necessidade de tanta rigidez.

5.4 Toxicidade frente *Artemia salina*

Análise geral de toxicidade é um dos bioensaios preliminares fundamentais quando o assunto é o estudo de substância com propriedades farmacológicas. Os organismos utilizados para análise são seres extremamente simples, que proporcionam avaliar apenas um parâmetro: morte ou vida (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG 2006). Neste trabalho, o micro-crustáceo utilizado para análise de toxicidade foi *A. salina*. Existe, de acordo com a literatura, uma correlação entre a toxicidade apresentada no ensaio com *A. salina* com a ação biológica como atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e outros (CHAN-BACAB et al., 2003). Além disso alguns estudos também relatam a utilização dos resultados deste bioensaio para analisar previamente atividade anti-tumoral de substâncias (SIQUEIRA et al., 1998).

Como pode ser observado na tabela 7, segundo Dolabela (1997), somente o extrato de *M. velame* (xilopódio) apresentou toxicidade, visto que foi observado

morte dos micro-crustáceos. De acordo com Dolabela (1997), as substâncias com CL_{50} menores de 80 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas altamente tóxicas, valores de CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxicas e acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ baixa toxicidade ou não tóxica. Das amostras analisadas somente o extrato metanólico de *M. velame* (xilopódio) apresentou elevada toxicidade, visto que apresentou CL_{50} de 27,01 $\mu\text{g/mL}$. As demais não foram consideradas tóxicas até a concentração máxima testada de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 7: Valores de CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos dos extratos metanólicos das espécies estudadas através do método de Probitos, frente ao ensaio de toxicidade com *A. salina*.

Amostras*	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança
<i>M. velame</i> (p. aéreas)	>1000	-
<i>M. velame</i> (xilop.)	27,01	16,38 – 37,64
<i>R. niveus</i>	>1000	-
<i>G. achachairu</i>	>1000	-
<i>P. microphylla</i>	>1000	-

M. velame - p. aéreas (*Microsiphonia velame* partes aéreas), *M. velame* –xilop. (*Microsiphonia velame* xilopódio), *R. niveus* (*Rubus niveus*), *G. achachairu* (*Garcinia achachairu*), *P. microphylla* (*Pilea microphylla*).

Por outro lado, alguns testes utilizando *A. salina* têm sido sugeridos como um método válido para avaliação de atividade citotóxica de extratos de plantas (HISEM, 2011), uma vez que, segundo Siqueira et al. (1998), valores de CL_{50} abaixo de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentam alta possibilidade de atividade contra células tumorais. Neste aspecto, os resultados encontrados para os xilopódios de *M. velame* não podem ser descartados uma vez que podem apresentar substâncias com alta atividade antitumoral.

Vários fitoterápicos utilizados hoje na medicina popular carecem de estudos de controle de qualidade, uma vez que diversas destas plantas podem apresentar substâncias tóxicas.

5.5 Ensaio de citotoxicidade e mutagenicidade em *Saccharomyces cerevisiae*

A citotoxicidade e mutagenicidade são outros dois ensaios que avaliam o potencial tóxico de compostos. O primeiro analisa a inviabilização do metabolismo microbiano, enquanto o segundo analisa um possível dano genético causado pelos compostos testados sob as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados obtidos não apresentaram dados significantes que indicam ação citotóxica e mutagênica dos extratos testados. Isto é, considerando os resultados obtidos no controle negativo não houve crescimento de micro-organismo nos meios com ausência de aminoácidos, o que resulta em extratos não mutagênicos. Em relação a citotoxicidade não houve alteração significativa no número de micro-organismos que se desenvolveram nas diferentes concentrações testadas indicando ausência de citotoxicidade. Isto indica que as plantas estudadas podem ser utilizadas na clínica com segurança, uma vez que não apresentam efeitos tóxicos.

Estes resultados condizem com os obtidos no ensaio com *A. salina*, no qual não foi observado potencial tóxico, exceto para *M. velame* xilopódio. Esta toxicidade encontrada para *M. velame* xilopódio, deve-se principalmente ao fato de que o teste de toxicidade com *A. salina* é considerado teste preliminar de toxicidade. Assim, existe a necessidade de confirmação com testes mais específicos que é o caso dos testes com *S. cerevisiae*. Sendo assim, as espécies testadas podem ser utilizadas como possíveis medicamentos visto que não apresentam toxicidade, uma vez que esta foi confirmada com o presente teste.

6 CONCLUSÕES

. Os extratos e frações de *Garcinia achachairu*, *Rubus niveus* e *Macrosiphonia velame* apresentaram atividade contra micro-organismos Gram-positivos que variaram de 125 – 1000 µg/mL.

. A análise fitoquímica revelou através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas o isolamento e identificação de proantocianidinas 2 do tipo 2β-O-7'→4β-8' e 2β-O-7'→4β-6'.

. O extrato e frações de *Pilea microphylla* não apresentaram atividade contra bactérias e fungos.

. Frente à avaliação da atividade antifúngica não foi observado atividade em nenhum dos extratos e frações até a concentração máxima testada de 1000 µg/mL.

. No teste de sinergismo ocorreu efeito sinérgico entre os compostos isolados de *Macrosiphonia velame* MVAK (7-10) com MVAK (19-29).

. Apenas o extrato de *M. velame* xilopódio apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os demais extratos não apresentaram efeitos tóxicos quando testados até a concentração máxima de 1000 µg/mL.

. No teste de mutagenicidade pode-se observar que todos os extratos testados não foram capazes de induzir diretamente a mutagenicidade e nem citotoxicidade na linhagem XV 185-14c de *Saccharomyces cerevisiae* em nenhuma das doses testadas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; KINOSHITA, L. S. Ontogenia e estrutura do pericarpo de *Prestonia riedelii* (Müll. Arg.) Markgr. (Apocynaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 729-737, 2009.

AL HARONI, M. Bacterial resistance and the dental professionals role to halt the problem. **Journal of Dentistry**, v. 36, p. 95-103, 2008.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.

ALDERMAN, D. J.; SMITH, P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, v. 196, p. 211-243, 2001.

ALHO, C. J. R. The value of biodiversity. **Brazilian Journal Biological**, v. 68, p. 1115-1118, 2008.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasilienses* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v.15, p. 886-891, 2008.

ALVAREZ, C. et al. Resistencia Antimicrobiana en Unidades de Cuidado Intensivo de Bogotá, Colombia, 2001–2003. **Revista de Salud Pública**, v. 8, n. 1, p. 86-101, 2006.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1221-1229, 2008.

AYRES, M. C. C et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 90-97, 2003.

ATAIDES, F. S. et al. Identificação de espécies de *Candida* em saliva de profissionais da saúde. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 498-501, 2010.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, New York, 1989.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BARBOSA, E.; ARTIOLI, F. A. **A fruta achachairu**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/achachairu/index.htm>. Acesso em: 13 jan. 2010.

BARBOSA, W. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de Plântulas de achachairu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 263-266, 2008.

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

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BECKER, H.; SCHER, J. M.; SPEAKMAN, J. B. ; ZAPP, J. Bioactivity Guided Isolation of Antimicrobial Compounds from *Lythrum salicaria*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 580-584, 2005.

BEECHER, G. R. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 2-20, 2004.

BELLA CRUZ, A. B. et al. Métodos “*In Vitro*” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. 7. p. 175-205.

BIAVATTI, M. W. Sinergia: um novo paradigma, uma velha sabedoria em Farmacoterapia. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. 8. p. 207-225.

BOTZ, L.; NAGY, S.; KOCSIS, B. Detection of Microbiologically Active Compounds. In: Nyiredy, S. **Planar Chromatography**. Hungary: Springer, p. 489-516, 2001.

BRUTTI, R. S. O novel instituto da biopirataria dentro do Ordenamento Jurídico Pátrio. **Revista Jus Vigilantibus**, 2008.

BUTLER, M. S. Natural products o drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nature Reviews drug Discovery**, v. 22, 162, 2005.

BUTLER, M. S. Natural products o drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nature Reviews drug Discovery**, v. 25, 415, 2008.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BUSH, K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. **Clinical Microbiology Infection**, v. 10, 10, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five ears of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, 131, 2005.

CANTON, E.; VIUDES, A.; PERMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por leveduras. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 18, p. 51-55, 2001.

CAPANEMA, L. X. L. A Indústria Farmacêutica Brasileira e a atuação do BNDES. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, v. 23, 193, 2006.

CARVALHO, G. J. A. de et al. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 24-26, 2001.

CAVALCANTE, M.F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHAN-BACAB, M.J. et al. Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 243–247, 2003.

- CHATTOTADHYAY, D. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 229-237, 2002.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- COLEMAN, K. Recent advances in the treatment of Gram-positive infections. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 4, p. 455 -460, 2004.
- COS, P. et al. Anti-infective potencial of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, 290, 2006.
- COUTINHO et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, v. 6, p. 77-85, 2004.
- COUTO, A. G.; VITORINO, J. C.; SILVA, R. M. L. da. Tecnologia e Garantia da Qualidade de Fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. 10. p. 241-308.
- COSTA, V., FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001.
- CUNHA, B. A. Antimicrobial therapy of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*, Vancomycin-resistant *Enterococci*, and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Méd. Clin. North Am.**, v. 90, 1165, 2006.
- CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. YUNES, R. A. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org). Itajaí: UNIVALI, cap. 3, 2007.
- DAL MOLIN, M. M. **Isolamento, identificação e avaliação farmacológica de extratos, frações e compostos obtidos das partes aéreas da *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae)**, 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.
- DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, 1989.
- DELLE MONACHE, F. Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear In: CALIXTO, J.B. E YUNES R. A. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Ed. Argos, 2001, p.101 - 146.
- DIXON R. A.; XIE D.; S. B. SHARMA. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist**, v. 165, p. 9-28, 2005.
- DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti *Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substancias sintéticas**. 1997. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte, 1997.
- ESPINEL-INGROF, A.; PFALLER, M.A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. Washington: ASM, 1995.

FEBRAFARMA. Disponível em : <www.febrafarma.org.br>, acessada em novembro 2009.

FIOCRUZ. Disponível em:

<<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=2&infoid=84>>, acessado em Janeiro de 2010.

FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia fundamentos e diagnóstico**. Rio de Janeiro: Reviter, 2001.

FLAMINI, G. et al. Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 8, p. 873-876, 2002.

FOXMAN, B. Contributions of Molecular Epidemiology to the Understanding of Infectious Disease Transmission, Pathogenesis, and Evolution. **Annals of Epidemiology**, v. 17, p. 148-156, 2007.

FRATIANNI, F. et al. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* Black truffle: A preliminary study. **Food Chemistry**, v. 102, p. 471-474, 2007.

FREITAS, F.C.L. et al. Controle Químico de Brilhantina (*Pilea microphylla*) no cultivo de Orquídeas. **SBCPD**, v. 25, n. 3, p. 589-593, 2007.

FRUTUOSO, V. S. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Rheedia longifolia* Planch & Triana. **Memoria Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 91-96, 2007.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidantes e mutagenica/antimutagenica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79f. Dissertacao de Conclusao de Curso (Mestrado) - Programa de Pos-Graduacao em Diagnostico Genetico e Molecular. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GIBBONS, S. Plants as a source of Bacterial Resistent Modulators and anti-infective agents. **Revista Phytochemistry**, v. 4, 63, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of medicine**, v. 27, n. 1, 2006.

HISEM, D. et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxinon**, v. 57, p. 76-83, 2011.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HONG, Z. et al. Hepatoprotective effects of *Rubus aleaefolius* Poir. and identification of its active constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, 2010.

- HOSTETTMANN, K. Sample Preparation and Purification. In: Preparative **chromatography techniques**: Applications in natural product isolation. New York, 2^o ed., p.4-14, 1997.
- IDOWU, T. O. et al. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. **Phytochemistry**, n. 71, p. 2092–2098, 2010.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**, 21 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- JOUAD, H.; MARHRANI, M.; EDDOUKS, M. Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n.3, p.351-6, ago, 2002.
- KAMATOU, G. P. P. et al. **South African Journal of Botany**, n. 72, p. 634, 2006.
- KANAFANI, Z. A.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 24, n. 3, p. 182-193, 2006.
- KARAMAN, I. et al. activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.
- KATO, M. J. Global Phytochemistry: the Brazilian Approach. **Phytochemistry**, v. 57, p. 621-623, 2001.
- KIM T. G.; KANG S. Y.; JUNG, K. K.; KANG, J. H.; LEE, E.; HAN, H. M.; KIM, S. H. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. **Phytother Research**, v. 15, n. 8, p.718-20, 2001.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.
- LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. PMID: 17362507 [PubMed – indexed for MEDLINE].
- LE BOUTER, A. Infections à *Staphylococcus saprophyticus* . **Journal des Anti-infectieux**, v. 13, n. 1, p. 12-19, 2011.
- LEITÃO, S. G. et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 6-11, 2006.
- LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.
- LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, 137, 2006.

- LLOP, C.; PUJOL, I.; AGUILAR, C.; SALA, J.; RIBA, D.; GUARRO, J. Comparison of tree methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 239-242, 2000.
- LIU, L., XIE, B., CAO, S., YANG, E., XU, X., GUO, S. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity. **Food Chemistry**, 105, 1446-1451, 2007.
- LORENZI, H.; SANTOS, H. M. dos. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 1999.
- LOU, H.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; UCHIDA, M.; TANAKA, H.; OKA, S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. **Phytochemistry**, 51, p. 297-308, 1999.
- MACHADO, A. P. et al. Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with a *Bacillus subtilis* isolate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, 2010.
- MACHADO, K. E. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharm. Biol.**, 43, 636, 2005.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, C. A.; VEIGA, J. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-238, 2002.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608p.
- MALTESE, F.; DER KOOY, F. V.; VERPOORTE R. Solvent Derived Artifacts in Natural Products Chemistry. **Nat. Prod. Comm.** v. 4, n. 3, p. 447 – 454, 2009.
- MARQUES, E. J.; EL-BACHÁ, R. S.; CRUZ, F. G. Citotoxicidade de benzofenona e triterpeno isolado de *C. criuva* contra células GL-15 de glioblastoma humano. 32^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.
- MARTINE, M.; ELOFF, J. N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 255-263, 1998.
- MARTINI, S. et al. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 50-59, 2009.
- MEDINA, L.F.C. et al., Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 650, n. 2, p. 140-149, 2008.
- MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MICHEL, C.; BLANC, G. Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: the temperature effect. **Aquaculture**, v. 196, p. 311-318, 2001.
- MOURA, D. J. **Estudos dos alcaloides β -carbolicos em diferentes modelos biológicos**. 2006. 118f. Dissertação de Conclusão de Curso (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MURRAY, P. R. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed., ASM Press: Washington, 1999.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1857-1861, 2008.

NENAAH, G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. **Fitoterapia**, v. 81, p. 779–782, 2010.

NIERO, R. Fármacos, fitofármacos e Fitoterápicos: Abordagem econômica e de mercado. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. cap. 1. p. 1-14.

NIERO, R. et al. Apectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. p. 11-56, 2003. In: **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. Therapeutic Potential and Chemical Composition of Plants from the Genus *Rubus*: A Mini Review of the Last 10 Years. **Natural Product Communications** (Online). 3, 437-444, 2008.

NOGUEIRA, E.; VASSILIEFF, V. S. Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABAA-system. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.275-280, jul, 2000.

NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OKUSA, P. N. et al. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 112, p. 476, 2007.

ORDEN-MARTINEZ, B., MARTINEZ-RUIZ, R., MILLÁN-PÉREZ, R. ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*?. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 8, p. 495-499, 2008.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANIZZI, L. et al. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 165-168, 2002.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2001.

PATEL, A.V.; ROJAS-VERA, J.; DACKER, C.G. Therapeutic constituents and actions of *Rubus species*. **Curr Med Chem**. v.11,n.11, p. 1501-12, 2004.

PEDRAZA-CHAVERRI, J. et al. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*) . **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3227-3239, 2008.

PENNA, C. et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40, 2001.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p., 2003.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. **Clinical Microbiology Infection**, v.10, p. 23, 2004.

Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília –DF, 2007.

RAHALISON, L. et al. Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v. 60, p. 41-43, 1994.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RASKIN, I. et al.. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RIBEIRO, R. V. et al. Antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of hydroethanolic extract from *Macrosiphonia velame* (A. St.-Hil.) M. Arg. in animal models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, 2010.

RICHARDS R. M.; DURHAM, D. G.; LIU, X. Antibacterial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. **Planta Medica**, v.60, n.5, p.471-3, out, 1994.

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

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Planta Medica**, v.8, n.2, p.1-7, 2006.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 7-11, 2006.

ROSA, D.D. A fast DNA extraction method for bacteria. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p.259-261, 2008.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana – interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

RUIZ, A.L.T.G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.

SANTANA, D. L. et al. Plantas com propriedades terapêuticas, utilizadas na comunidade de Campos, Amélia Rodrigues, Bahia, Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 218-230, 2008.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**, 3 ed. Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, 2002.

SCHAKER, P. D. C.; ANTONIOLLI, L. R. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós-colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.15, n.1-4, p.11-15, 2009.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Rev Esc Enf USP**, v.35, n. 1, p. 28-34, mar. 2001.

SERRACARBASSA, Pedro Duraes and DOTTO, Patrícia. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, vol.66, n.5, pp. 701-707, 2003.

SILVA, E. C. B. F. et al. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **Anal Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 52, n. 2, 2007.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, 1998.

SISTI, M. et al. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 946-950, 2008.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 95-100, 2005.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville (Leguminosae-mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.

SOUZA, M.M. et al. Métodos de Avaliação de Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2003. 239p.

STAPLETON P.D, et al., Modulation of lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **Int. J. Antimic. Agents**. v. 23, n. 5, p.462-467, 2004.

SPRINGFI, E. L. D. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, p. 434-439, 2003.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 3 ed. São Paulo. Atheneu, 2001.

TAHER, M.; IDRIS, M. S.; AHMAD, F.; ARBAIN, D. A polyisoprenylated ketone from *Calophyllum enervosum*. **Phytomedicine**, v. 66, p. 723-726, 2005.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TIBA, M. B.; NOGUEIRA, G. P.; LEITE, D. S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes

com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58-62, 2009.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 23-28, 2006.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. 2. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; MUSTAFA, N. R.; KIM, H. K. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Reviews**. v.7, p. 525–537, 2008.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, R. C. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. Resultados da primeira reunião técnica. Brasília: **EMBRAPA**: Recursos genéticos e Biotecnológico/ Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), p. 54, 2002.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CARNEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 66-68, 2003.

VIVAS, N., GLORIES Y. A complete structural and conformational investigation of procyanidin A2 dimer. *Phytochemistry*. v. 37, n. 12, p. 2015-2018, 1996.

XAVIER, C. A. C. et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39, n. 3, p. 165-168, 2007.

