

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ASPECTOS FARMACOGNÓSTICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
Tillandsia recurvata L. (Bromeliaceae)**

ALEX LUCENA DE VASCONCELOS

RECIFE 2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Aspectos Farmacognósticos e Atividade Antibacteriana de *Tillandsia recurvata* L.
(Bromeliaceae)**

ALEX LUCENA DE VASCONCELOS

RECIFE 2012

ALEX LUCENA DE VASCONCELOS

**Aspectos Farmacognósticos e Atividade Antibacteriana de *Tillandsia recurvata* L.
(Bromeliaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Karina Perreli Randau
Coorientadora: Profa. Dra. Eulália Azevedo Ximenes

RECIFE. 2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Andréa Marinho, CRB4-1667

V331a Vasconcelos, Alex Lucena de.
Aspectos farmacognósticos e atividade antibacteriana de *Tillandsia recurvata* L. (BROMELIACEAE) / Alex Lucena de Vasconcelos. – Recife: O autor, 2012.
89 folhas : il.: fig. ; 30 cm.

Orientador: Karina Perrelli Randau.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e apêndice.

1. Farmacognosia. 2. Resistência microbiana. 3. Caracterização farmacognóstica. 4. Atividade citotóxica. I. Randau, Karina Perrelli (Orientador). II. Título.

615.321 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-107)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Recife, 27 de fevereiro de 2012

Dissertação a ser defendida em 28 de fevereiro de 2012, cuja Banca Examinadora será constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Karina Perrelli Randau
(Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof^a. Dr^a. Evani de Lemos Araújo

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite

**Aos meus pais por todo amor, incentivo
e dedicação empenhados em mais esta conquista.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, minha força, vitória e sustento, pois sem o seu amor nada seria possível.

À profa. Dra. Karina Perrelli Randau, pela orientação, atenção, paciência, e ajuda, onde além de grande exemplo profissional encontrei suporte e verdadeira amizade. Este trabalho não seria possível sem a sua orientação.

À profa. Dra. Eulália Azevedo Ximenes, que me acolheu em seu laboratório com solicitude e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo desse período.

Ao prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier pela atenção, incentivo, amizade, simpatia e orientação. Pelos ensinamentos e, principalmente, pela paciência durante esse período de convívio.

Às professoras Dra. Rejane Pimentel e Dra. Teresinha Gonçalves Alves de Lima pela colaboração e uso das dependências dos seus laboratórios.

Ao professor Luiz Alberto de Lira Soares pelo seu apoio, ajuda, amizade e orientação sempre à disposição.

Aos amigos de laboratório Alan Lucena, Evanilson Alves e Márcia Maria Barbosa, Luciana Gomes Arrais e Rafaela Damasceno, José Antônio, Gibson Gomes e Gustavo Dimech, pela inestimável amizade, cumplicidade e luta compartilhada.

Aos meus pais, Aurilene Lucena e José Alves, aos meus avós Maria de Lourdes e José Severino e a toda a minha família pelo suporte, amor e torcida, essenciais em todo esse processo.

Aos amigos presentes em minha vida Eduardo Guedes, Ana Paula, Angela Muniz, a todos que fazem parte do grupo refúgio e ao meu amor Josiene Lima, pelo compartilhamento dos momentos difíceis e alegrias vividas.

Agradeço ainda a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

INSTITUIÇÕES

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPE.

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Laboratório de Farmacognosia – UFPE.

Laboratorio de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos - UFPE

AOS PROFESSORES

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Profa. Dra. Eulália Azevedo Ximenes

Prof. Luiz Alberto de Lira Soares

Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier

Profa. Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves Alves de Lima

Prof. Dr. Nicácio H. da Silva

AOS AMIGOS E COLEGAS DE CURSO

Alan Lucena

Rafaela Damasceno

Amanda Mesquita

Risoleta Nogueira

Andrea Vidal

Asaph Santos

Bárbara Nunes

Evanilson Alves

Gibson Gomes

Gustavo Dimech

Hyalyne Barboza

José Antonio Pereira

Lucas Pacheco

Magda Ferreira

Márcia Maria Barbosa

**“Convém que Cristo cresça e eu
diminua, pois até aqui nos ajudou o Senhor...”**

RESUMO

A busca por novos agentes terapêuticos tem sido direcionada por conhecimentos populares, adquiridos ao longo da história, onde as plantas medicinais têm representado um importante arsenal na busca por novas substâncias. Dentre as espécies de potencial terapêutico conhecido, tem-se *Tillandsia recurvata*, caracterizada como uma epífita vascular nativa, encontrada em toda costa do Brasil, popularmente utilizada no tratamento de tosse, febre, dores e infecções. O interesse por esta espécie deve-se ao fato de que, além de ser popularmente conhecida por seus efeitos antimicrobianos e apresentar ampla distribuição em toda América tropical, os escassos estudos existentes na área não foram conclusivos a respeito de qual grupo de moléculas é o responsável pelas propriedades desse *taxa*. Esse trabalho teve como objetivo realizar a análise farmacognóstica desta espécie, abordando assim três pontos: caracterização botânica, fitoquímica e doseamento de polifenóis e flavonóides. Além disso, foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana frente a microrganismos multirresistentes. Para a caracterização botânica, secções transversais e paradérmicas das lâminas foliares foram realizadas, revelando a presença de diversos estômatos e tricomas modificados por toda a superfície, sendo esta uma característica importante para a sua adaptação a ambientes em que a escassez de água e nutrientes é um fator determinante. A partir do perfil fitoquímico traçado, foi possível observar a presença de compostos como terpenos, fenilpropanoglicosídeos e flavonóides resultantes de seu metabolismo secundário, encontrando-se proporções de 14,6% para fenóis totais e 0,021 g% de flavonóides. O ensaio de atividade antimicrobiana revelou uma maior eficiência dos extratos sobre as cepas de microrganismos Gram positivos, sendo mais ativo contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. O ensaio de atividade citotóxica demonstrou que os extratos apresentam atividade moderada para as linhagens neoplásicas testadas, sendo que o extrato hexânico apresenta-se muito ativo contra células de tumor de laringe. Os resultados obtidos permitiram a determinação dos principais aspectos farmacognósticos referentes à espécie citada e contribuíram com a comprovação científica acerca de suas propriedades biológicas, conhecidas pelo uso popular.

Palavras-chave: caracterização farmacognóstica, resistência microbiana, atividade citotóxica.

ABSTRACT

The search for new therapeutic agents has been guided by popular knowledge, acquired throughout the history, where medicinal plants have represented an important body in the search for new substances. Among the species of known therapeutic potential, it has been *Tillandsia recurvata*, characterized as a vascular epiphyte native, found throughout the coast of Brazil, popularly used in the treatment of cough, fever, pain and infection. Interest in this species due to the fact that, besides being popularly known for its antimicrobial effects and have a wide distribution throughout tropical America, the few studies in the area were not conclusive as to which group of molecules is responsible to the properties of this taxa. This work was aimed the pharmacognostic analysis of this species, thereby addressing three points: botany characterization, phytochemistry and determination of the polyphenols and flavonoids. Furthermore, the assessment was conducted of the antimicrobial activity of this rate against multiresistant microorganisms. For the botanical characteristics, paradermic and cross sections of leaf blades was performed revealing the presence of many stomata and modified trichomes over the entire surface, which is an important feature for their adaptation to environments where the scarcity of water and nutrients is a determining factor. From the phytochemical profile, it was possible to observe the presence of compounds such as terpenes, flavonoids and phenylpropane glycosides resulting from their secondary metabolism, being ratios of 14,6% for total phenols and 0,021 g% flavonoids. The assay of antimicrobial activity, revealed a higher efficiency of the extracts on the strains of Gram positive, being more active against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. The cytotoxic assay showed that the extracts have moderate activity for neoplastic strains tested, and the hexane extract has high activity against tumor cells of the larynx. The results helped to determine the main aspects related to the species cited pharmacognostic and contributed to the scientific evidence about its biological properties, known for popular use.

Keywords: Pharmacognostic characterization, bacterial resistance, cytotoxic activity.

LISTA DE ABREVIACÕES

- A.Ac – Ácido acético
- AcOEt – Acetato de etila
- AF – Ácido fórmico
- APG II - The Angiosperm Phylogeny Group
- ATCC – American Type Culture Collection
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EAc – Extrato acetato de etila.
- EHx - Extrato n-hexano
- EMe - Extrato metanólico
- FAA 50 - Ácido fórmico, ácido acético e álcool etílico (5:5:90)
- HEp-2 – Linhagem de células de câncer de laringe humano.
- HT29 – Linhagem de células de câncer de cólon humano.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- LBFM – Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos
- M1 – Molécula purificada, possível fenilpropanóide de baixa polaridade
- MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
- Mss – fração enriquecida do microsublimado
- MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium.
- NCI-H-292 – Linhagem de células de câncer de pulmão humano.
- Rf – fator de retenção
- Tol: Tolueno
- UFC – Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

OBJETIVOS	15
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DE <i>Tillandsia recurvata</i> L.	16
1. Introdução	17
2. Material e Métodos	20
2.1 Material vegetal	20
2.2 Anatomia	20
2.3 Histoquímica	21
3. Resultados e Discussão	21
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE <i>Tillandsia recurvata</i> L.	27
1. Introdução	28
1.1 Aplicação e usos	30
1.2 Química - fitoconstituintes	32
1.2.1. Terpenos	33
1.2.2. Flavonóides	34
1.3.3 Ácidos Cinâmicos e Derivados	34
2. Material e Métodos	38
2.1 Material vegetal	38
2.2 Preparação dos extratos	39
2.3 Ensaio fitoquímico	39
2.3.1 Cromatografia em Camada Delgada	39
2.3.2 Fracionamento de Constituintes químicos de <i>T. recurvata</i>	39
2.3.2.a Cromatografia em Coluna	39
2.3.2.b Microsublimação	41
2.4 Doseamento de Polifenóis e Flavonóides totais	41
2.4.1 Polifenóis Totais	41
2.4.2 Flavonóides Totais	42
3. Resultados e Discussão	44
CAPÍTULO III – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Tillandsia recurvata</i> L.	53
1. Introdução	54
2. Material e Métodos	56
2.1. Material vegetal	56

2.2. Fitoquímica	56
2.2.1 Preparação dos extratos	56
2.2.1.a Maceração	56
2.2.1.b Turbólise	57
2.2.2 Identificação dos Componentes Químicos	57
2.3 Microbiologia	57
2.3.1 Padronização dos extratos e padrões	57
2.3.2 Padronização das cepas	58
2.3.3 Bioautografia	58
2.3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	58
2.3.4.a Etapa 1	59
2.3.4.b Etapa 2	60
3. Resultados e Discussão	60
CAPÍTULO IV - ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DE	70
<i>Tillandsia recurvata</i> L.	
1. Introdução	71
2. Material e Métodos	73
2.1 Material vegetal	73
2.2 Solventes e reagentes	73
2.3 Preparação dos extratos	74
2.4 Ensaio Citotóxico in vitro	74
3. Resultados e Discussão	76
CONCLUSÕES GERAIS	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	

OBJETIVOS

GERAL

Caracterização botânica e fitoquímica com quantificação dos grupos de metabólitos secundários majoritários, além de estudos de atividade biológica (antibacteriana e citotóxica) de *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae).

ESPECÍFICOS

- Caracterizar anatomicamente a espécie;
- Realizar perfil fitoquímico evidenciando os principais grupos de metabólitos secundários;
- Quantificar o teor de polifenóis e flavonóides presentes nesta espécie;
- Avaliar atividade antibacteriana frente a diferentes cepas multirresistentes;
- Determinar a citotoxicidade frente a três linhagens de células tumorais de pulmão, cólon e laringe;

Capítulo I

CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DE
Tillandsia recurvata L.

1. INTRODUÇÃO

Estudos arqueológicos indicam que o epifitismo vascular existe desde, pelo menos, o período carbonífero (há aproximadamente 300 milhões de anos) e, para muitas das espécies atuais, esses padrões antigos ainda persistem. Mais que um estilo de vida, essas estratégias ecológicas e morfológicas permitiram que muitas espécies pudessem sobreviver no *habitat* das copas de florestas (BENNET, 2000). De forma geral, as espécies epífitas podem ser definidas como aquelas que utilizam o seu hospedeiro botânico, ou forófito, apenas como suporte mecânico a fim de conseguir melhores condições de sobrevivência. Além de espécies vegetais serem usadas como suporte, outros tipos de fulcro podem ser usados, tais como formações rochosas, telhados ou até mesmo linhas de transmissão elétrica (BENZING, 1990, 2000; PUENTE *et al.*, 1994).

Segundo Linder (2005), as plantas adaptadas ao epifitismo encontradas em Bromeliaceae evoluíram inicialmente de Poales ancestrais, que cresciam em substratos úmidos e pobres em nutrientes. De todos os representantes desta ordem apenas metade das Bromeliaceae e poucas Rapateaceae conseguiram escapar da competição com outras plantas e sobreviver aos locais temporariamente alagados, fixando-se sobre árvores e rochas e desenvolvendo, paralelamente, uma série de adaptações que possibilitavam sua sobrevivência durante curtos períodos de estresse hídrico, podendo assim habitar o interior das matas úmidas (BENZING, 2000). A partir daí, passaram a ocupar o estrato superior das florestas, cuja atmosfera, com maior disponibilidade de água e nutrientes, favoreceu o desligamento dessas plantas do solo.

As bromeliáceas são notáveis por sua diversidade ecológica e pelo alto poder de adaptação a diferentes *habitats*, podendo ser encontradas em ambientes desérticos, quentes e secos, e até mesmo em florestas úmidas e regiões montanhosas frias (BENZING, 2000). De um modo geral, *Tillandsia recurvata* L. apresenta ampla distribuição em toda América tropical, podendo ser encontrada desde o Sul da América do Norte, na América Central (nas zonas chuvosas que fazem limite entre o golfo do México e as zonas semiáridas do sul da Baixa Califórnia, além do Caribe) e América do Sul (SMITH & DOWNS 1977; PUENTE *et al.*, 1994;).

No Brasil, apesar de ser uma planta nativa, não se trata de uma espécie endêmica, uma vez que não ocorre em todas as regiões. Encontra-se principalmente na costa do país

apresentando como domínios fitogeográficos os biomas de caatinga, cerrado e mata atlântica, distribuindo-se pela região nordeste entre sete estados (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), em todo o sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e nos três estados da região sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Fig.1).

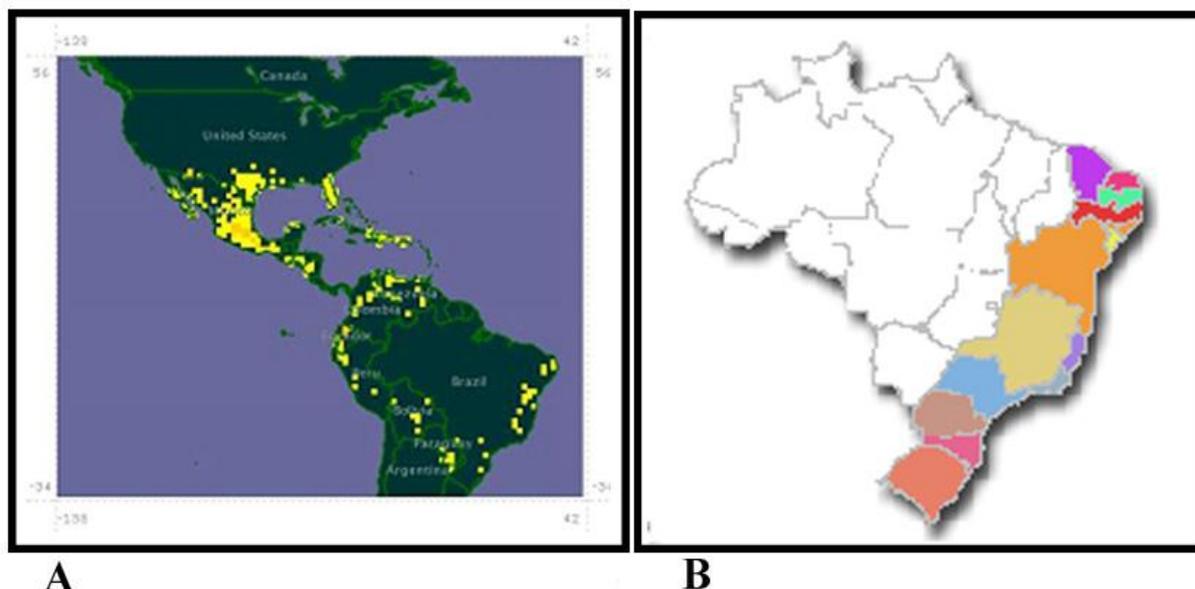


Figura 1: Distribuição Geográfica de *Tillandsia recurvata* L. na América Latina (A) e no Brasil (B).
Fonte: GBIF, 2010; FORZZA, 2010.

Tillandsia recurvata L. (Fig. 2) pode ser caracterizada como uma epífita de 8 a 12 cm de altura, de caule inconspícuo e raízes rígidas. Folhas dísticas, fortemente cinéreas, recurvadas, lâmina com 4,3 a 5 cm de comprimento, aciculada, cinérea, ápice agudo, bainha com 4 a 5,5 × 3 a 4 mm, levemente distinta, membranácea. Escapo ereto, 3,5 a 8,5 cm de comprimento, bracteado. Inflorescência em espiga simples, excedendo as folhas, 1 a 1,5 cm de comprimento, brácteas florais com 7,5 a 8 × 3 a 3,5 mm, vináceas a cinéreas, elíptico-lanceoladas, ápice agudo, menor que as sépalas. Sépalas subconatas na base, 2 × 7,5 cm, elípticas, carenadas, glabras, ápice acuminado. Pétalas com 9 × 1,2 mm, linear, ápice rotundo, lilases; estames inclusos, com 4,5 mm comprimento, soldados na base do ovário; filetes cilíndricos; ovárioca. 3 mm de comprimento, subcilíndrico; estilete 0,8 a 1 mm de comprimento, cônico; estigma simples-ereto. Cápsula com 2,3-2,6 cm comprimento, valvas retas na deiscência; sementes 2 mm comprimento, apêndices 1,8 a 2 cm de comprimento, plumosos (PONTES *et al.*, 2006).



Figura 2 – *Tillandsia recurvata* in situ. Foto: Júlia de Souza, Alex Lucena, 2010.

Diversas espécies do gênero *Tillandsia* são caracterizadas pela relação de epifitismo com o seu hospedeiro, porém, diferentemente de outras espécies, essa se trata de um tipo bem particular. As suas raízes vivem por período curto de tempo e não possuem estruturas anatômicas capazes de reter a água absorvida, como ocorre com as orquídeas epífitas, por exemplo. O papel de captação de água é desempenhado por seus tricomas especializados em forma de escama presentes em grande número recobrendo toda a superfície foliar, podendo-se dizer que alcançaram o mais alto grau de evolução morfológica e funcional. Na constituição dessas estruturas podem-se diferenciar dois grupos celulares característicos, o escudo e as alas (ou asas), que servem como interface entre a planta e o ambiente (PAPINI, 2010).

Associado a essa adaptação extremamente necessária para sua sobrevivência em ambientes com recursos hídricos escassos, encontra-se outro importante fator na manutenção de um estado hídrico favorável: a via do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Trata-se de uma via fotossintética especializada através da qual a planta minimiza a evaporação de água pelo fechamento dos estômatos durante o dia e abertura durante a noite, permitindo, assim, a entrada de gás carbônico e uma reduzida perda de água (ISCAM, 2003).

De acordo com Papini (2010), os tricomas absorventes em *Tillandsia* são constituídos por uma haste que se prolonga para o interior do tecido, formada por 1 a 6 células sobrepostas. Estendendo-se sobre a epiderme encontra-se a cabeça (ou escudo), cujas

células perdem o conteúdo citoplasmático e especializam-se no bombeamento de água. A partir de uma vista frontal desses tricomas modificados é possível observar o disco central e a ala periférica. Esta é composta por numerosas células periféricas, alongadas e dispostas radialmente, que cobrem completamente os estômatos em toda a extensão foliar e acabam sobrepondo-se umas às outras, dando um aspecto escamoso à superfície, sendo por isso também chamadas de escamas. A face adaxial da folha é côncava com elevação central. Possui o clorênquima com 5 a 10 feixes vasculares. A raiz não possui anéis fibrosos e a endoderme é imperceptível. O caule possui estrutura atactostele presente, porém sem células esclerenquimatosas (ARAMBARRI *et al.*, 1999).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As amostras foram coletadas no município de Cuité (6°29'6"S - 36°9'25"W), situado no semiárido paraibano na microrregião do Curimataú Ocidental, durante os meses de maio e junho de 2010. Para confirmação da correta identificação da espécie, a amostra foi identificada por dois diferentes herbários, sendo catalogada no Herbário UFP – Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 63661 e no Herbário IPA - Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, sob o número 86796.

2.2 Anatomia

Após a coleta, suas partes aéreas foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% - 5:5:90) (JOHANSEN, 1940) e, posteriormente, transferidas para água destilada. Para o estudo anatômico, secções transversais e paradérmicas da porção mediana das lâminas foliares foram obtidas à mão livre e submetidas ao processo de dupla coloração com safranina e azul de astra (KRAUS, 1997) e montadas em glicerina sobre lâminas semipermanentes. Para realização desse estudo foram utilizados dois a três indivíduos da mesma espécie. A análise das estruturas internas foi realizada através do uso de microscópio óptico.

2.3 Histoquímica

Para a identificação de compostos fenólicos, foram utilizadas folhas adultas frescas, das quais foram obtidas secções transversais, manualmente, submetidas a uma solução de AlCl_3 (10%) para evidenciação de flavonóides (CHARRIÈRE-LADREIX, 1976). Foi considerado como resultado positivo a identificação de regiões que apresentaram coloração variando entre verde e amarelo. Para confirmação e melhor visualização da presença destes compostos, as secções foram mergulhadas por alguns minutos em reagente de Neu (solução metanólica 1% de difenilboriloxietilamina), sendo considerado como resultado positivo a identificação de regiões fluorescentes, indicando a histolocalização de compostos flavonoídicos diretamente no corte. As análises foram realizadas em imagens obtidas com câmera acoplada a um microscópio óptico de fluorescência, com filtro azul de excitação (420 nm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da observação microscópica das secções paradérmicas, evidencia-se a presença de pêlos do tipo escamas revestindo toda a lâmina foliar, distribuídas aleatoriamente em ambos os lados (Fig. 3a), característica observada também em outras espécies do mesmo gênero (PAPINI, 2010). Os pelos se mostraram inseridos em uma depressão com uma haste constituída por três células (Fig. 3b). No ápice a estrutura está constituída por um disco formado por quatro camadas de células concêntricas, as centrais em número de quatro, a segunda formada por oito células, a seguinte por 16 células e a mais externa constituída por células alongadas e dispostas de modo radiado, formando a ala periférica (Fig. 3a). Estas últimas células recobrem grande parte da superfície, incluindo os estômatos. Isto faz com que os estômatos não estejam sob incidência direta dos raios luminosos, reduzindo a perda de água por evapotranspiração quando os ostíolos estão abertos.

Os resultados encontrados confirmam as mesmas características descritas em trabalhos realizados por Strehl (1983) e Proença (2007), para espécies coletadas no sudeste do país. É interessante ressaltar as características de suas escamas e o fato de encontrarem-se dispostas desta forma, pois se trata de uma apomorfia para esta família, visto que essa sobreposição amplia a área superficial das escamas, aumentando a absorção de água e nutrientes nela dissolvidos, que podem ser encontrados no orvalho ou na chuva, por exemplo. Além desta função vital, os tricomas escamosos exercem funções diversas no

vegetal, como reflexão da radiação solar, redução da transpiração e atração de polinizadores (TOMLINSON, 1969; BENZING, 2000).

No que se refere à obtenção de água, Scatena & Segecin (2005) ao analisarem espécies coletadas no Paraná relataram que suas folhas são do tipo anfiestomáticas, com estômatos anomocíticos, confirmando assim os resultados obtidos para esta espécie analisada no semiárido paraibano (Fig. 3, c/d). Este fato favorece o aumento na condutância de gás carbônico no mesófilo devido à presença dessas estruturas em ambas as superfícies, sendo esta uma característica frequente para as *Tillandsia* atmosféricas.

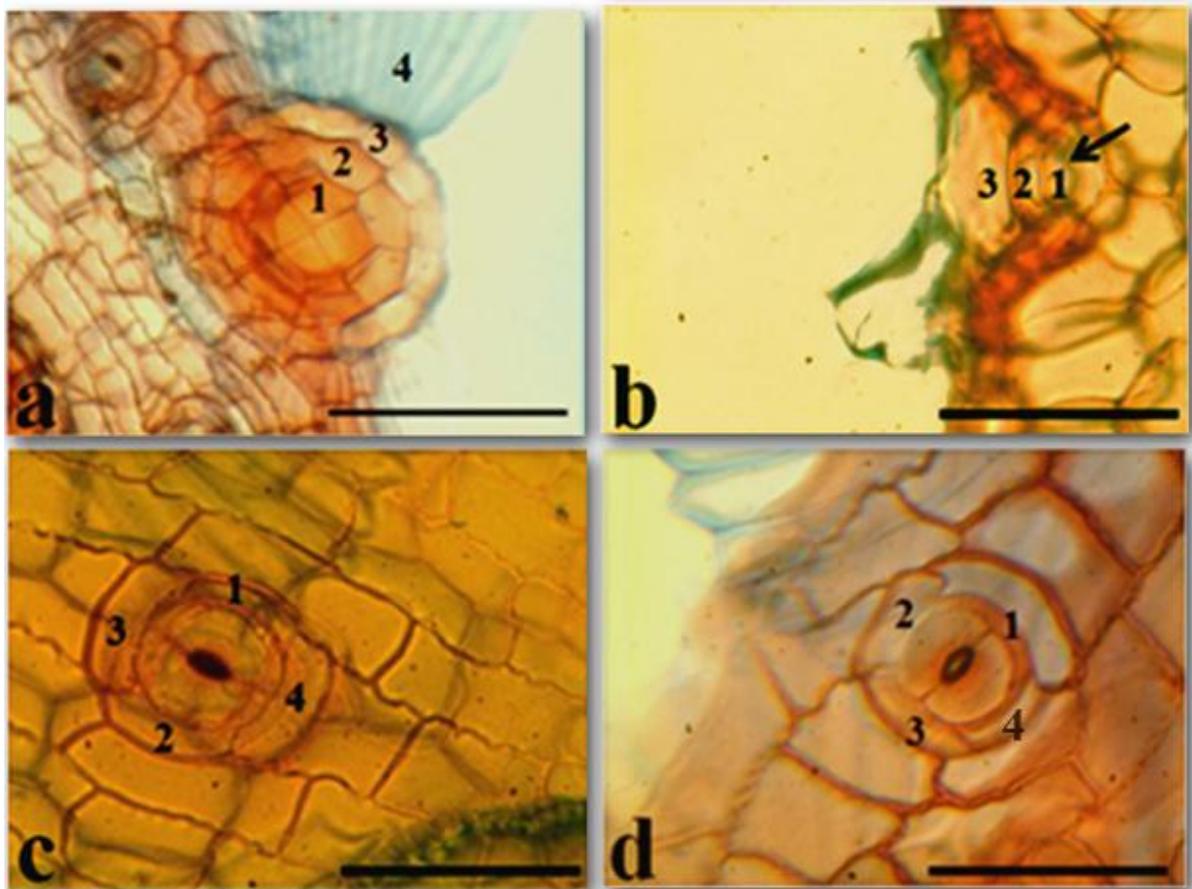


Figura 3. Epiderme foliar de *Tillandsia recurvata* L. **a.** pelo do tipo escama, mostrando discos concêntricos de células; **b.** haste do pêlo escamoso (seta); **c/d.** estômato anisocítico (três células, uma maior que as outras duas, circundando o estômato). Barras: a = 200 μ m; b-c-d = 50 μ m.

As células que compõem a superfície foliar possuem as paredes anticlinais sinuosas, favorecendo assim o aumento da superfície de contato entre elas. Este fato faz com que o tecido epidérmico adquira uma maior resistência, característica importante durante as expansões e contrações foliares decorrentes da variação no turgor das células. A epiderme é unisseriada e revestida por cutícula delgada, apresentando mesofilo homogêneo e compacto, constituído por células de contorno arredondado, algumas vezes elíptico, e com pequenos espaços intercelulares. As células subepidérmicas da face adaxial são maiores que as outras do mesofilo e apresentam menos cloroplastos que as da face abaxial, sendo o parênquima clorofiliano constituído por células arredondadas. Os feixes vasculares são colaterais e se dispõem em uma única série ao longo das lâminas. Geralmente, os feixes maiores se alternam com os menores e são circundados por 1-3 camadas de fibras pericíclicas, cujas paredes são espessadas e lignificadas (Fig. 4).

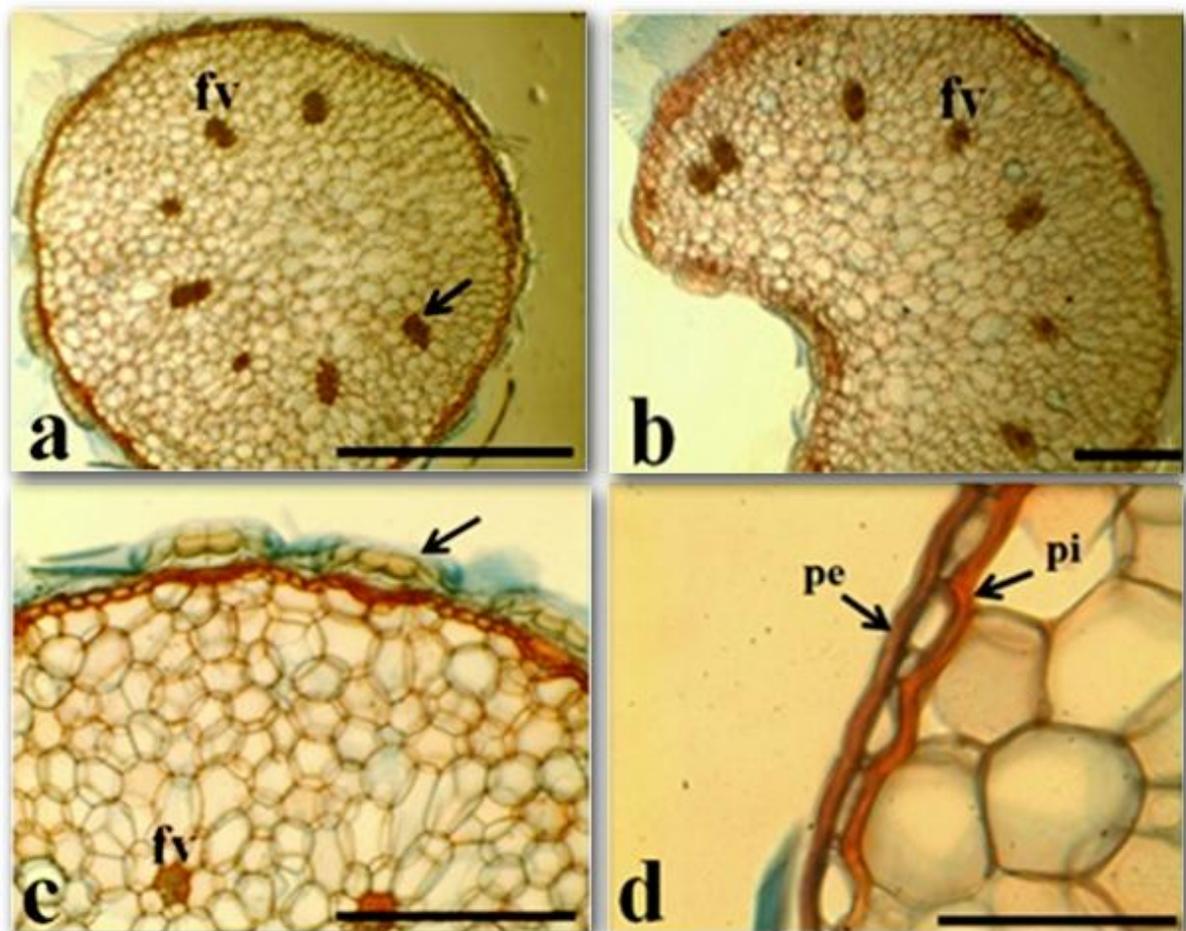


Figura 4. Folha de *Tillandsia recurvata* L. **a.** vista transversal mostrando feixes vasculares (fv, seta) imersos no parênquima; **b.** vista transversal mostrando contorno reniforme; **c.** epiderme com pelos escamosos (seta); **d.** paredes periclinais externas (pe) e internas (pi) espessadas. Barras: **a** = 500 μ m; **b,c** = 200 μ m; **d** = 50 μ m.

Segundo Cunha (2006), a técnica histoquímica apresenta grande importância, pois através dela pode-se realizar o reconhecimento químico dos metabólitos ativos diretamente nas estruturas celulares em que estão alojados, através de reações cromáticas com os reagentes químico-histológicos estabelecidos.

Na bibliografia consultada, não foram encontrados estudos de caracterização histoquímica em *T. recurvata*. A importância desta determinação reside na necessidade de relacionar informações da botânica com a fitoquímica e assim, através desses métodos de análise qualitativos, é possível estabelecer, não somente a presença, mas o sítio de armazenamento das substâncias químicas ou mesmo grupos de compostos do metabolismo secundário nas plantas.

De acordo com o perfil fitoquímico desta espécie, observa-se a presença de compostos fenólicos, como flavonóides e fenilpropanoglicosídeos, além de substâncias de natureza terpênica. Cunha (2006) afirma que os heterosídeos flavônicos encontram-se localizados principalmente nos tecidos superficiais, nas células epidérmicas, no tecido parenquimático, no suco celular em cristais ou precipitados nas células.

O cloreto de alumínio possui a propriedade formar complexos com os flavonóides, onde o cátion Al^{+3} possui três possíveis sítios quelantes, como 3-OH (3-hidroxifenóis), 5-OH (5-hidroxifenóis) ou 3',4'-o-diOH (O-dihidroxifenóis), nos flavonóides encontrados nos tecidos vegetais (Conforme fig.4 - cap.I) (POZZI, 2006).

O difenilboriloxietilamina, ou reagente de Neu, é o revelador de escolha para polifenóis, principalmente flavonóides, devido a sua especificidade. Por apresentar-se em estado oxidativo positivo e ser ávido por elétrons, o difenilborato é atacado pelos elétrons livres da carboxila e hidroxilas formando um complexo com os compostos fenólicos (Fig. 5). Ao serem submetidos à radiação ultra violeta (365nm) possuem a capacidade de emitir luz fluorescente, sendo assim possível identificar esses compostos diretamente em seus sítios de estocagem no vegetal.

A partir das reações de identificação com $AlCl_3$, observa-se que os flavonóides apresentam-se dispostos sobre as células da epiderme, principalmente depositados nas paredes periclinais internas e externas (Fig. 6 a e b). Resultados semelhantes encontra-se em *Gomphrena arborescens* L., onde Carvalho & Ribeiro (2005) através de estudos histoquímicos afirmam que os flavonóides estão geralmente localizados na face externa da cutícula, nas paredes das células basais e intermediárias dos tricomas, nas células-guarda e no mesofilo em contato com a bainha parenquimática.

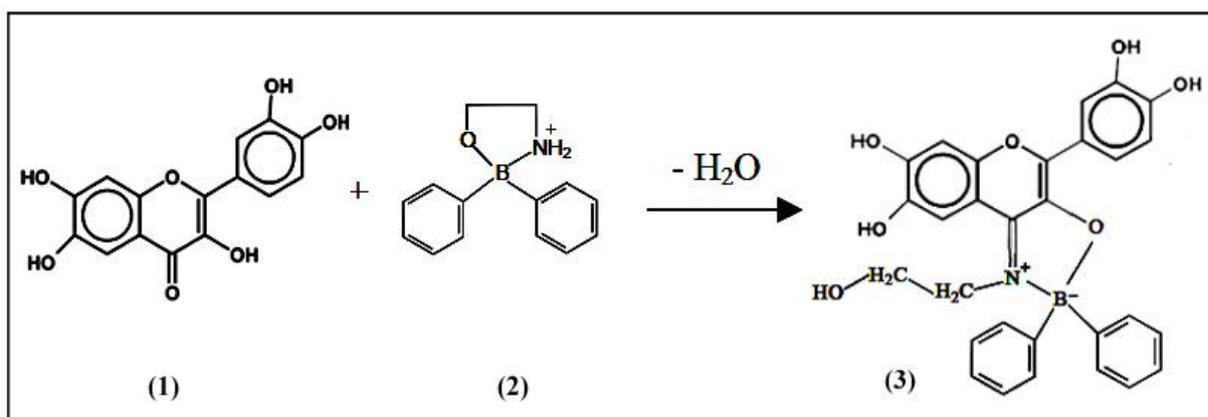


Figura 5 - Reação de complexação do reagente de Neu (2) com compostos fenólicos como a quercetina (1) originando um complexo capaz de emitir fluorescência.

Para confirmação das análises histoquímicas, secções transversais foram submetidas à microscopia de fluorescência, baseando-se no fato de que a amostra a ser analisada possui substâncias que emitem energia detectável como luz visível quando irradiado com luz de baixo comprimento de onda. As imagens obtidas confirmam os resultados obtidos na histoquímica, mostrando intensa fluorescência ao longo das células epidérmicas, nas células da ala que constituem o tricoma peltado e circundando os feixes vasculares (Fig 6. **c,d,e**).

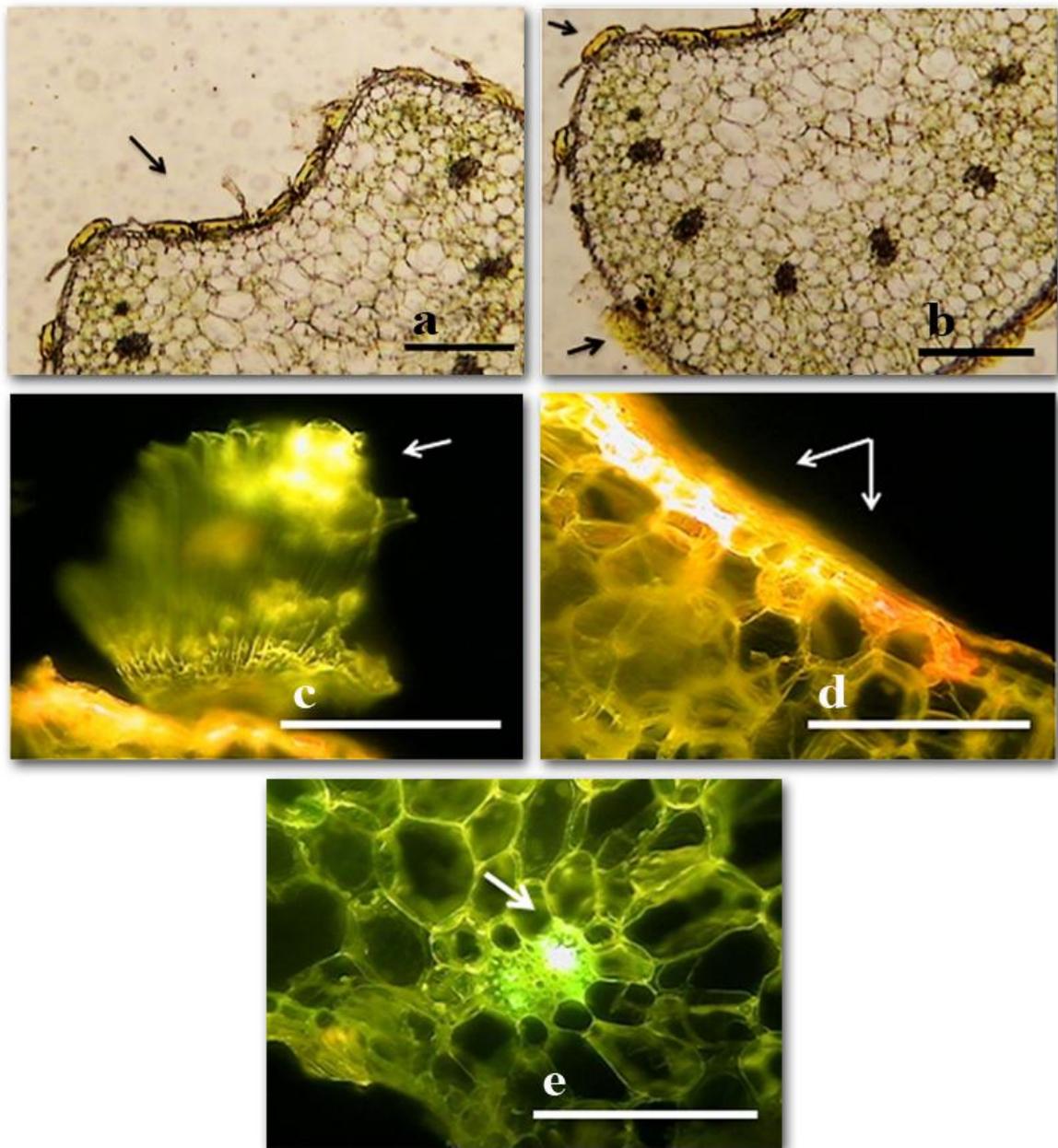


Fig. 6 – Secções Transversais de *T. recurvata* evidenciando a histolocalização de compostos fenólicos. Microscopia óptica: **a,b**, vista transversal mostrando feixes vasculares e acúmulo de flavonóides na epiderme e tricomas (setas). Microscopia de fluorescência: **c**, presença de flavonóides em tricoma peltado. **d**, armazenamento de compostos fenólicos nas paredes periclinais da epiderme (setas). **e**, fluorescência em feixes vasculares. Barras: **a,b** = 200 μm ; **c,d,e** = 50 μm .

Capítulo II

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE
Tillandsia recurvata L.

1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais são caracterizadas por apresentarem um elevado grau de diversidade biológica, sendo consideradas como um dos mais complexos sistemas do planeta que abriga um elevado número de espécies endêmicas (WHITMORE, 1998).

O estrato superior das florestas tropicais também pode ser considerado como uma verdadeira fonte de biodiversidade, pois nesse ambiente de copas pode ser encontrada uma infinidade de espécies epífitas, que usam os seus hospedeiros como suporte para o seu desenvolvimento alternativo distante do solo. Com um total de 29.000 espécies catalogadas, elas contribuem com a imensa diversidade vegetal observada, uma vez que, representam de 8 a 10% do total de plantas vasculares conhecidas e colaboram com 25 a 50% da riqueza vegetal das florestas tropicais (GENTRY, 1987; BENZING, 1990; BENZING 2000). Estas espécies desempenham um importante papel na composição vegetal destes ecossistemas e apresentam elevado grau de endemismo e adaptação a estes ambientes, sendo diretamente influenciadas pelo clima e nível de distúrbio antrópico, que determinam a sua distribuição nos ambientes que as compõem (BENZING, 1990; BONNET, 2007). Apresentam grande importância para os animais que vivem nesse ambiente, seja como alimento (frutos, néctar e pólen), água ou mesmo material para a construção de ninhos, possibilitando assim uma maior variabilidade da fauna (BENZING 1990). Além disso, também exercem grande influência sobre o ciclo hidrológico e de nutrientes no interior das florestas, funcionando como uma zona de captura e posterior incorporação destes materiais para uso por outros vegetais (NADKARNI, 1985). Os representantes das bromélias constituem um grupo de plantas particularmente adaptado à vida epifítica.

A família Bromeliaceae é considerada como uma das mais representativas da flora neotropical, abrangendo 57 gêneros e cerca de 3000 espécies, onde 40% deste total podem ser encontrados no Brasil. Uma grande variedade de hábitos também pode ser observada entre elas, diferenciando-se espécies epífitas, terrestres, ou mesmo rupícolas, o que faz dela uma das mais adaptáveis do mundo (BENZING, 2000; LUTHER 2006; TABARELLI, 2002). A primeira descrição data do século XVII, relatada pelo padre francês Charles Plumier, onde o novo conjunto de espécies descoberto foi batizado em homenagem ao botânico sueco Olaf Bromel, sendo posteriormente chamado de Bromelie (BEZING, 1980). A primeira monografia sobre Bromeliaceae foi proposta por Beer em 1857, antecedendo muitos trabalhos científicos clássicos do século XIX (NOGUEIRA, 2011). Atualmente,

segundo critérios filogenéticos do sistema APG II (2003), pode ser classificada como a maior família de monocotiledôneas angiospermas, pertencente à ordem Poales. Apresenta uma ampla distribuição pela zona neotropical, indo desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Chile e ocupa diferentes *habitats*. No Brasil, ocorre desde as florestas úmidas do sul até as caatingas do Nordeste, onde possui frequência elevada e marcante (SMITH 1934, TABARELLI, 2002). De um modo geral as bromeliáceas são conhecidas no Brasil pelo nome indígena de caraguatá, craguatá ou gravatá, que em tupi-guarani refere-se ao caráter de resistência do vegetal, porém com frutos comestíveis. No Nordeste são conhecidas popularmente como macambira (JOLY, 2002). De acordo com a taxonomia tradicional, ela pode ser dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, diferindo entre si pelo hábito de crescimento, características de tricoma, tipo de fruto e semente e posição do ovário (SMITH & DOWNS 1974; 1977; 1979).

A partir do levantamento histórico da etimologia do gênero *Tillandsia*, sabe-se que para nomear esse grupo de plantas com características tão específicas, Carl Linnaeus decidiu homenagear o seu professor finlandês Elias Tillands. Este tinha adotado esse codinome para mostrar o seu apego a terra e sua extrema aversão à água, por sofrer de enjoos em viagens marítimas, preferindo percorrer longas distâncias por terra firme a viajar em um navio. Lembrando-se disso, Linnaeus achou esse curioso fato apropriado, uma vez que os exemplares deste gênero pareciam preferir a vida longe da água como verdadeiras plantas aéreas, e desta forma passou a chamar esse gênero de *Tillandsia* (SMITH, 1951). Estudos posteriores e mais detalhados mostraram como as espécies que constituem este gênero são capazes de sobreviver aos mais diferentes ambientes com tão pouca água. As adaptações determinantes para essa evolução consistiram na redução estrutural e funcional das raízes e na especialização dos tricomas foliares, que se tornaram capazes de absorver o vapor de água condensado e assim suprir parcial ou totalmente a função absorptiva das raízes (GILMARTIN 1972, BENZING, 1973, BENZING, 1978; BENZ, 2006).

Poucas informações têm sido publicadas na literatura científica a respeito do metabolismo nutricional deste gênero. Os seus integrantes possuem forma de crescimento altamente especializada, pois apresentam a superfície foliar repleta de escamas epidérmicas foliares (tricomas modificados), enquanto que os minerais necessários são provenientes da poeira que os alcança, de insetos que ficam presos no emaranhado de suas estruturas foliares, através de relações mutualistas com algum inseto, do tipo mirmecofilia ou mesmo do lavado foliar que escorre pelas copas das árvores (WALDEMAR, 2003).

Dentro desse gênero, pode-se encontrar *Tillandsia recurvata* como exemplo de epífita extremamente adaptada aos diferentes fatores de estresse que incidem sobre ela como radiação solar, aporte hídrico e mesmo a escassez de nutrientes. Além das adaptações citadas, alguns estudos também apontam para uma possível associação com alguns microrganismos como forma de suprir a falta de alguns nutrientes, já que não possuem contato direto com o solo, tais como *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzohabitans*, *Rahnella aquatilis* e *Erwinia* spp. Localizados na superfície vegetal, essa microbiota possui a capacidade de fixar o nitrogênio do ar, sendo estes os responsáveis por suprir parte das necessidades desse mineral para a planta, compondo a filosfera dessa espécie (PUENTE, 1994; BRIGHIGNA, 1992, ABRIL, 2005). A capacidade que possuem de sobreviver a condições de elevado estresse baseia-se em fatores morfofisiológicos modificados ao longo do tempo. Espécies como esta, possuem raízes adventícias reduzidas (ou mesmo ausentes), desprovidas da capacidade absorptiva, apresentando unicamente a função de aderência ao substrato, permitindo assim uma elevada independência do solo e grande adaptabilidade a ambientes extremos (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009).

1.1 APLICAÇÕES E USOS

Além do elevado número de espécies e da alta adaptabilidade das bromeliáceas, seus representantes também têm chamado atenção por suas diferentes utilizações, estando associados à história de diferentes etnias e utilizados como fonte de alimento, com finalidades terapêuticas ou mesmo místicas, por muitas culturas tradicionais neotropicais. Algumas espécies são úteis para a extração de fibras, como *Aechmea magdalenae*, *Puya chilensis*, *Bromelia laciniosa*, *Tillandsia usneoides*, usadas para a fabricação de redes, cordas, barbantes e até mesmo linha de pesca pelos nativos. Outras espécies de *Puya* e *Tillandsia* são utilizadas ainda como combustível para queima de fogueiras nos Andes e desertos costeiros Peruanos e Equatorianos ou mesmo usados como cercas vivas para demarcação de território. Outros representantes são utilizados como fonte de alimento na ração animal, como é o caso de *Aechmea tessmannii*, *Puya sodiroana*, *Pepinia pulchella* e *Tillandsia recurvata*. Na alimentação humana destaca-se *Ananas comosus*, apreciado no mundo todo por seu sabor e aroma característicos. Na medicina popular é muito utilizado por suas propriedades como estomáquico, carminativo, diurético e anti-inflamatório, sendo também indicado para problemas das vias respiratórias e para neurastenia (LORENZI & MATOS, 2002; BONNET, 2000).

Comunidades de espécies epífitas têm sido utilizadas no monitoramento das condições atmosféricas. Por apresentarem um metabolismo intimamente atmosférico, pois não possuem o solo como substrato, as bromeliáceas, como *Tillandsia recurvata*, têm a capacidade de fixar e acumular nutrientes dispersos na atmosfera. Conseqüentemente, óxido de nitrogênio, dióxido de enxofre, monóxido de carbono e outros poluentes presentes no ar também acabam sendo absorvidos durante o metabolismo da planta. Por esta razão essas espécies são consideradas como bioindicadores, cuja avaliação do conteúdo de seus tecidos reflete a contaminação atmosférica (GRACIANO, 2003; PIGNATA, 2002, ASPIAZU et al. 2007)

Muitas espécies de bromélias também têm sido alvo de pesquisas devido ao seu elevado potencial farmacológico. Dentre as espécies representantes do gênero *Tillandsia*, pode-se destacar *T. recurvata*, que também pode ser identificada por outras sinônimas como *Diaphoranthema recurvata* Beer, *Diaphoranthema uniflora* Beer, *Tillandsia bartrami* Ell. Scketch, *Tillandsia uniflora* HBK.

Popularmente é conhecida como *small ball moss* ou *bunch moss*, nos Estados Unidos; *barba de úcar*, em Cuba; *clavel del aire* ou *flor del aire*, na Argentina e no Uruguai; sendo conhecida no Brasil como ninho, salambaia, samambaia de bola, barba de velho ou barba de bode pequeno (PIO CORRÊA, 1978; ALBUQUERQUE, 2007). Na Argentina, ela é usada tradicionalmente no tratamento de hemorróidas. Em Curaçao, Caribe, o decocto de suas folhas é considerado como emenagogo e útil no tratamento de problemas da vesícula biliar (MORTON, 1981). No Uruguai, as partes aéreas são empregadas como antiespasmódico e útil no tratamento de infecções oculares (PAZ, 1995). No Equador, é usada no tratamento de distúrbios da vesícula hepática, tosse, febre, dor de cabeça e dores no peito (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009). Além disso, Lowe e colaboradores (2010) evidenciaram o potencial farmacológico dessa espécie, através de algumas atividades biológicas, como antitumoral e anti-inflamatória, comprovadas cientificamente.

1.2 QUÍMICA - FITOCONSTITUINTES

Muitos representantes de Bromeliaceae têm sido alvo de estudos químicos e farmacológicos, permitindo o isolamento e identificação de muitos compostos até então desconhecidos. Um bom exemplo é *Ananas comosus*, considerado uma das espécies mais estudadas quimicamente, em função do seu alto valor comercial, consumido em várias partes do mundo. A partir de extração aquosa do seu caule e frutos imaturos, foi possível o

isolamento da bromelina, uma enzima proteolítica da classe das hidrolases que apresenta diversas atividades *in vivo* como antiedematosa, anti-inflamatória, antitrombótica e antifibrinolítica (MAURER, 2001).

Visando facilitar a visualização da distribuição desses compostos no âmbito da família e gênero, os percentuais relativos a essas substâncias estão representados nas figuras 1 e 2. Dentre os compostos encontrados, observam-se como substâncias majoritárias diferentes tipos de flavonóides, além de terpenos e esteróides, fenilpropanóides (como o ácido cinâmico e seus derivados), lignanas e outros compostos fenólicos (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009).

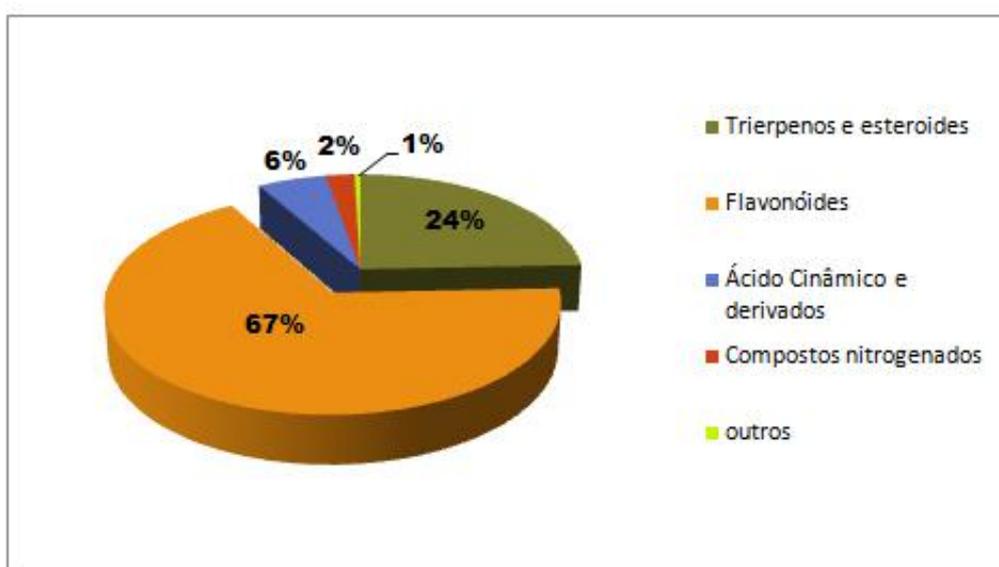


Figura 1 – Representação gráfica da constituição química em Bromeliaceae.

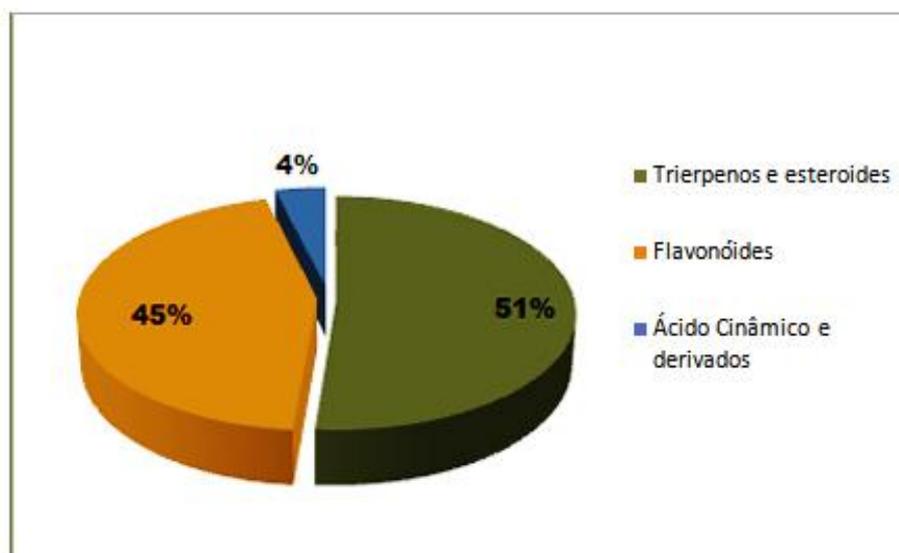


Figura 2 – Representação gráfica dos principais constituintes químicos do gênero *Tillandsia*.

No gênero *Tillandsia*, apesar dos escassos estudos existentes, diferentes classes de metabólitos secundários foram relatadas. Em *T. recurvata*, por exemplo, substâncias como flavonóides, terpenos e derivados do ácido cinâmico podem ser detectadas:

1.2.1 Terpenos

Muitos triterpenos são encontrados entre os representantes desta família, apresentando uma maior predominância em *Tillandsioideae*. Uma grande variedade de cicloartanos pode ser identificada nos representantes do gênero *Tillandsia*, como os hidroperoxicicloartanos identificados em *Tillandsia recurvata* e *T. usneoides* (CABRERA, 1995,1997) (Quadro 1). O processo de hidroperoxidação desses cicloartanos pode ser atribuído a uma foto-oxidação natural do cicloartenol, fenômeno responsável pela biogênese de alguns cicloartanos (HERZ, 1985). Esse processo pode ser explicado pelas condições adversas a que estas espécies estão expostas, por serem espécies epífitas, como alta exposição solar e baixa umidade. Assim, essas substâncias poderiam ser consideradas como parte do sistema de defesa dessas plantas (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009; CABRERA, 1995).

1.2.2 Flavonóides

Os flavonóides podem ser considerados como um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural, pois apresentam ampla distribuição na natureza (ROCHA, 2010). Além de possuírem importantes funções biológicas para a planta, muitos deles também apresentam variadas atividades farmacológicas (antitumoral, antimicrobiana, antioxidante) (ZUANAZZI, 2007), podendo inclusive ser considerados como potenciais marcadores quimiotaxonômicos.

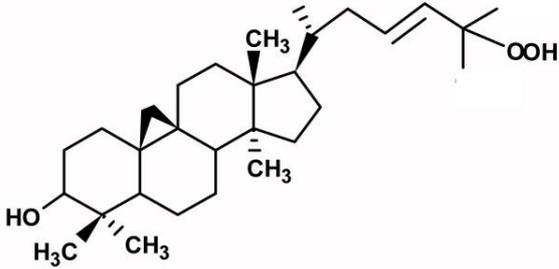
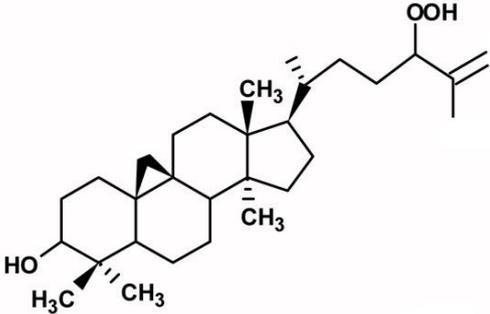
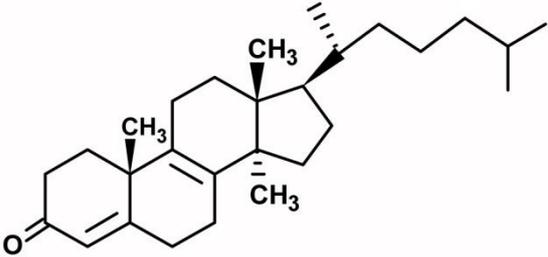
Apesar de diferentes classes de flavonóides estarem presentes em Bromeliaceae, os compostos mais notáveis são aqueles que apresentam um padrão de substituição no carbono seis, por hidroxilação ou metoxilação, sendo este tipo de configuração única, indicando que ela ocupa uma posição à parte em relação a outras famílias de monocotiledôneas (WILLIAMS, 1978). Frequentemente, a ocorrência de um padrão de substituição específico, para determinado metabólito, é indicativo de um avanço filogenético. Dessa forma, o padrão de substituição nos carbonos seis ou oito (por um radical hidroxí ou metoxi) para os flavonóides caracteriza-os como grupos quimicamente avançados, resultantes de uma etapa biossintética extra para sua formação, fazendo com que, *Tillandsioideae* seja vista como a subfamília quimicamente mais evoluída (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009). Dentre os compostos deste tipo, pôde-se obter através da extração clorofórmica realizada das partes aéreas de *Tillandsia recurvata* uma substância oleosa e amarelada, a partir da qual, através de tratamentos cromatográficos, constatou-se ser uma flavanona (Quadro 1). De acordo com métodos espectrométricos foi possível identificar a substância isolada como 5,3'-Dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavanona, até então não descrita para esta espécie (QUEIROGA, 2004).

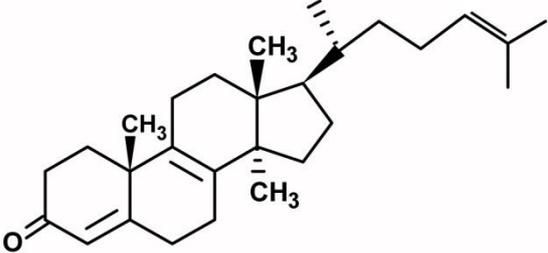
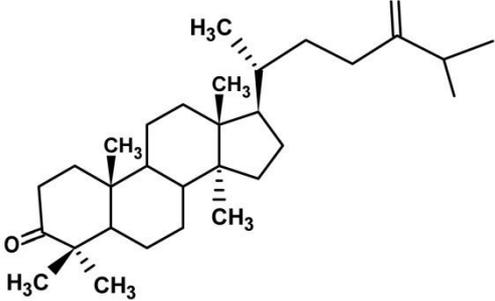
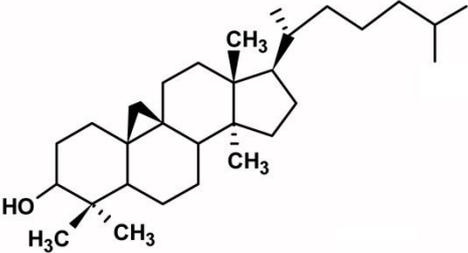
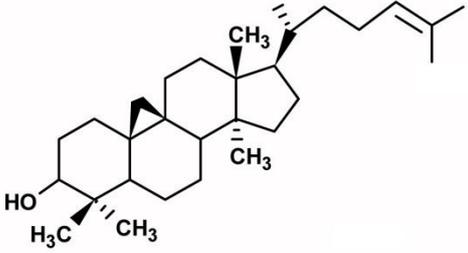
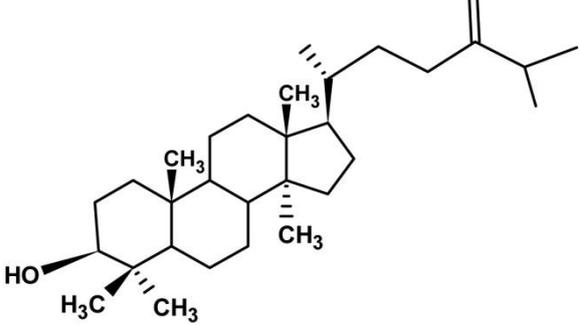
1.2.3 Ácidos cinâmicos e derivados

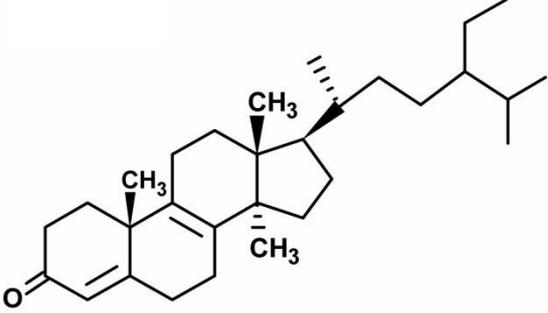
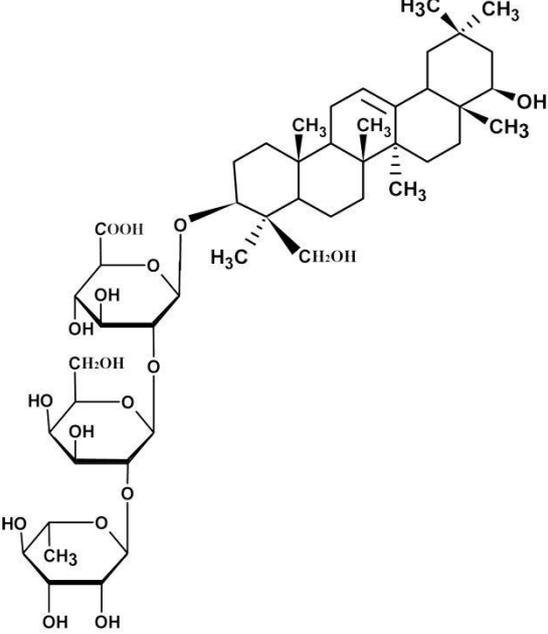
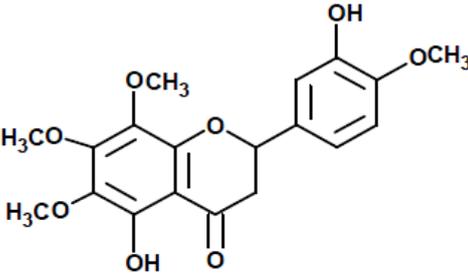
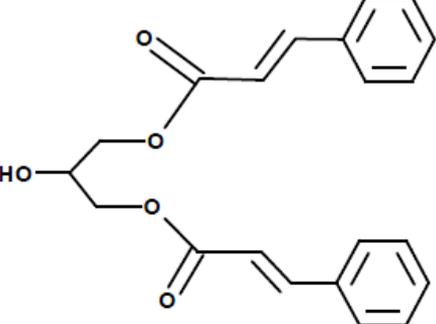
Esse grupo de metabólitos encontra-se amplamente distribuído no reino vegetal sob a forma esterificada fazendo parte da parede celular, tendo como principais representantes os ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (CARVALHO, 2003). Os ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres são bastante comuns, sendo encontrados em quase todos os tecidos vegetais. Contudo, o 1,2- e 1,3 - diglicerídeo fenilpropenato, derivado do ácido cinâmico, são raros, restritos a apenas algumas espécies, como *T. recurvata* (Quadro 1). Assim, Queiroga e colaboradores (2004) obtiveram a partir da extração clorofórmica das

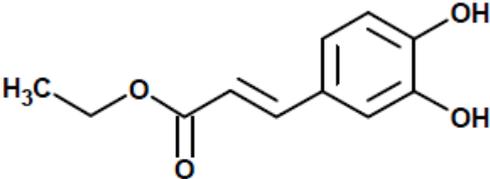
partes aéreas desta espécie e posteriores tratamentos cromatográficos, um éster do ácido cinâmico na forma de um pó branco amorfo, quimicamente denominado 1,3-di-O-cinamoilglicerol. Além desta substância também foi confirmada a presença do éster etílico do ácido caféico.

Quadro1 – Metabólitos secundários isolados de *Tillandsia recurvata* L.

CLASSE DE METABÓLITO	COMPOSTOS/ REFERÊNCIA	ESTRUTURAS
Terpeno	25-hidroperoxicicloart-23-en-3 β -ol (CABRERA, 1995)	
Terpeno	24-hidroperoxicicloart-25-en-3 β -ol (CABRERA, 1995)	
Terpeno	Cicloartanona (CABRERA, 1995)	

Terpeno	Cicloartenona (CABRERA, 1995)	
Terpeno	24- metilenocicloartano na (CABRERA, 1995)	
Terpeno	Cicloartanol (CABRERA, 1995)	
Terpeno	Cicloartenol (CABRERA, 1995)	
Terpeno	24- metilenocicloartanol (CABRERA, 1995)	

<p>Terpeno</p>	<p>24-etilcolest-4-en-3-ona (CABRERA, 1995)</p>	
<p>Terpeno</p>	<p>Ácido Siálico (Lowe, 2010)</p>	
<p>Flavonóide</p>	<p>5,3'-Dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavanona (Queiroga, 2004)</p>	
<p>Derivado Cinâmico</p>	<p>1,3-di-O-cinamoilglicerol (Queiroga, 2004)</p>	

Derivado Cinâmico	Éster etílico do ácido caféico (Queiroga, 2004)	
-------------------	--	--

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Para a realização dos ensaios fitoquímicos, o material vegetal foi coletado no município de Cuité e catalogado nos herbários Geraldo Mariz e IPA - Dárdano de Andrade Lima sob os números 63661 e 86796, respectivamente (*vide* Cap. I).

2.2. Preparação dos extratos

Depois de seca à sombra, durante cinco dias à temperatura ambiente, a amostra foi reduzida a pequenos fragmentos e devidamente pesada. Após pesagem e cominuição das partes aéreas vegetais, um total de 1 Kg da planta foi submerso em diferentes solventes aquecidos, submetido ao processo de maceração durante quinze dias para cada solvente utilizado, com agitação e renovação do solvente. O processo foi realizado utilizando-se solventes diferentes em ordem crescente de polaridade, para a obtenção de frações extrativas enriquecidas com os metabólitos aos quais possuem afinidade. Ao final deste procedimento os diferentes extratos foram levados à secura utilizando-se um rotaevaporador sob pressão reduzida obtendo-se assim os respectivos extratos brutos secos hexânico (EHx), acetato de etila (EAc) e metanólico (EMe). Os rendimentos obtidos para cada solvente estão expressos no quadro 2.

Quadro 2 - Rendimento dos extratos brutos secos de *Tillandsia recurvata*.

SOLVENTES	VOLUME UTILIZADO (L)	RENDIMENTO (%)
Hexano	12	0,606
Acetato de Etila	12	2,171
Metanol	18	5,2

2.3 Ensaios Fitoquímicos

2.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

Para o estudo fitoquímico, os extratos obtidos foram submetidos à filtração simples em papel e posteriormente analisados por cromatografia em camada delgada (Kieselgel 60, 0.2 mm, Merck), empregando-se sistemas e reveladores adequados a cada pesquisa com algumas modificações, apoiados nos estudos de HARBORNE (1998) e WAGNER & BLADT (1996) (Quadro. 3). Para pesquisa de saponinas foi realizado o teste preliminar de afrogenicidade.

2.3.2 Fracionamento de Constituintes químicos de *Tillandsia recurvata*

2.3.2.a Cromatografia em Coluna

A partir da análise dos ensaios cromatográficos realizados, optou-se pela tentativa de isolamento de algumas moléculas presentes em maior proporção nos extratos EHx e EAc. No extrato hexânico, procedeu-se o isolamento de uma molécula representada por uma substância de intensa fluorescência esverdeada de Rf 0,8 (M1), caracterizada como um possível fenilpropanóide de baixa polaridade, e uma substância terpênica de coloração avermelhada de Rf 0,9 (T1). No extrato de acetato de etila, optou-se pelo isolamento do flavonóide, caracterizado pela coloração amarelada de Rf 0,1 (F1) (Fig. 3).

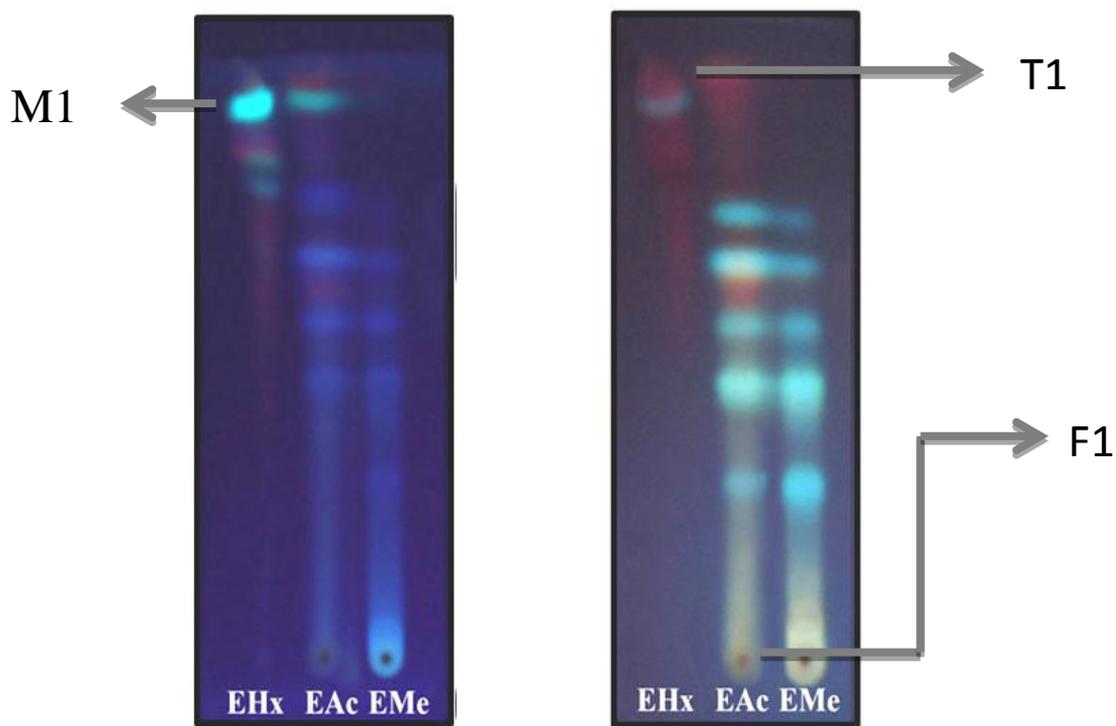


Figura 3 - Placa cromatográfica realizada para escolha das moléculas a serem isoladas de *Tillandsia recurvata*. Sistema - Tol: AcEt: A.F (6:4:1), UV 365 nm.

Para o extrato EHx, cerca de 1,5 g do extrato bruto seco foram submetidos à cromatografia em coluna (180 mm×30 mm) de gel de sílica (0.063–0.200 mm), eluída gradualmente com éter de petróleo e em seguida com misturas de éter de petróleo/ acetato de etila, no intuito de aumentar gradativamente a polaridade do sistema. Foram coletadas um total de 180 frações de 100 mL, que foram evaporadas em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (35°C) e analisadas em CCD.

Para o extrato EAc, foi realizado inicialmente placas preparativas em sílica gel, para o fracionamento dos flavonóides. Em seguida, 300 mg da fração enriquecida foram cromatografadas em coluna (180 mm×30 mm) usando como fase estacionária celulose microcristalina (Merk art. 2331) eluída gradualmente com água destilada, seguida por solução de ácido acético (10 %), para desprendimento das substâncias retidas. Foram coletadas 25 frações de 200 mL, que após eliminação do solvente, foram analisadas em CCD.

2.3.2.b Microsublimação

Esta metodologia foi empregada no intuito de se realizar a separação de moléculas que possuem a capacidade de sublimar quando expostas a temperaturas elevadas (COSTA, 2001). Para obtenção do extrato a ser submetido a microsublimação, realizou-se inicialmente uma extração metanólica através da infusão de cerca de 100 g de material vegetal fresco. Depois de filtrado, adicionou-se 7,73 g de terra de diatomáceas (celite) e procedeu-se a total retirada do solvente utilizando-se rotaevaporador sob pressão reduzida. Após aquecimento desse extrato adsorvido em celite droga na câmara de microsublimação (cápsula metálica coberta por uma placa de vidro) a 100°C, obteve-se o microsublimado sob a forma de cristais aciculares depositados sobre a placa de vidro, sendo então solubilizados em metanol.

2.4 Doseamento de Polifenóis e Flavonóides totais

2.4.1 Polifenóis Totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes na amostra de *Tillandsia recurvata* foi realizada por meio de espectroscopia na região do comprimento de onda visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (SOUSA, 2007). Portanto, 25 mg do extrato seco de acetato de etila foi solubilizado em metanol e transferido para balão volumétrico de 25 mL, onde o volume final foi completado. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi adicionada a um balão de 25 mL, contendo 1 mL do reagente de Folin Ciocalteu e 10 mL de água destilada; em seguida o volume foi complementado com solução de Na₂CO₃ a 10,75%. Após 15 minutos, sob o abrigo da luz, a absorbância das amostras foi mensurada (780 nm) utilizando-se cubetas de quartzo e como “branco” água destilada. O teor de polifenóis totais (FT) foi calculado e expresso em porcentagem (p/p) de ácido gálico, através da fórmula:

$$PT = \frac{Cp \cdot Aa \cdot Tp}{Ca \cdot Ap}$$

Onde: Cp = Concentração do padrão utilizado (µg/ mL);
 Aa = Absorbância determinada para a amostra;
 Tp = Teor do padrão (%);
 Ca = Concentração da amostra (µg/ mL);
 Ap = Absorbância determinada para o padrão;

2.4.2 Flavonóides Totais

A presença de flavonóides na mesma solução extrativa supracitada foi avaliada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio, através da quantificação espectrofotométrica a 316 nm (CHANG *et al.*, 2002). Uma alíquota (20 mg) da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, ao qual foi adicionado 2 mL de solução etanólica de AlCl_3 (5% m/v) e o volume final foi completado. Após 30 minutos, a absorvância foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se como branco uma solução de compensação (solução diluída do extrato sem adição do cloreto de alumínio), obtida nas mesmas condições da amostra. O valor de Flavonóides totais é calculado e expresso em percentual (p/p) de quercetina pela equação abaixo:

$$\text{FT} = \frac{\mathbf{A} \cdot \mathbf{FD}}{\mathbf{m} \cdot \mathbf{A}_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

Onde: FT = Flavonóides Totais;
 A = Absorvância determinada;
 FD = Fator de diluição;
 m = massa da amostra;
 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Absorção específica do complexo quercetina – AlCl_3

Quadro 3 – Parâmetros utilizados para abordagem fitoquímica.

METABÓLITO	SISTEMA ELUENTE	PROPORÇÃO	REVELADOR	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	ESPECTRO DE OBSERVAÇÃO	PADRÃO
Alcalóides	AcOEt ¹ : A.F ² : A.Ac ³ : H ₂ O	(100:11:11:27)	Dragendorff	Bandas de coloração alaranjada	visível	Pilocarpina
Mono e Sesquiterpenos	Tol ⁴ : AcOEt ¹	(97:3)	vanilina sulfúrica e aquecimento (100°C - 5 minutos)	Bandas de coloração rosa, roxo ou azul escuro	visível	Timol
Triterpenos e Esteróides	Tol ⁴ : AcOEt ¹	(90:12)	Liebermann - Buchard e aquecimento (100°C - 5 minutos)	Bandas de coloração levemente rósea a avermelhada	visível	β-amirina, β-sitosterol e Ácido ursólico
Cumarinas	Tol ⁴ : AcOEt ¹ : A.F ²	(3:2:0,5)	Vapores de amônia	Bandas de fluorescência azul	Ultra-violeta (365nm)	Umbeliferona
Fenilpropanoglicosídeos	Tol ⁴ : AcOEt ¹ : A.F ²	(6:4:1)	Neu	Bandas de fluorescência verde-limão	Ultra-violeta (365nm)	Verbascosídeo
Derivados Cinâmicos	Tol ⁴ : AcOEt ¹ : A.F ²	(6:4:1)	Neu	Bandas de fluorescência azul intenso	Ultra-violeta (365nm)	Ácido caféico
Flavonóides	Tol ⁴ : AcOEt ¹ : A.F ²	(6:4:1)	Neu	Bandas de fluorescência vermelha, amarela laranja ou verde	Ultra-violeta (365nm)	Quercetina
Taninos Hidrolisáveis	AcOEt ¹ – A.F ² – A.Ac ³ – H ₂ O	(100:11:11:27)	Neu	Bandas de fluorescência azul	Ultra-violeta (365nm)	Ácido gálico e Elágico
Taninos Condensados	AcOEt ¹ – A.F ² – A.Ac ³ – H ₂ O	(100:11:11:27)	Vanilina clorídrica	Bandas de coloração vermelha	visível	Epicatequina

1 - Acetato de etila, 2 - Ácido Fórmico, 3 - Ácido Acético, 4 – Tolueno

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 4 expressa os resultados obtidos após as análises cromatográficas do perfil fitoquímico a partir dos extratos EHx, EAc, EMe obtidos.

Quadro 4 – Metabólitos majoritários encontrados em *Tillandsia recurvata*.

METABÓLITOS	EXTRATOS		
	EHx	EAc	EMe
Alcalóides	-	-	-
Mono e Sesquiterpenos	+++	-	-
Triterpenos e esteróides	+++	++	++
Saponinas	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Fenilpropanoglicosídeos	++	+	+
Derivados Cinâmicos	-	++	++
Flavonóides	-	++	+
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-
Taninos Condensados	-	-	-

Expressão dos resultados de acordo com a quantidade de bandas visualizadas no cromatograma: fortemente positivo (+++), positivo (++), pouco positivo (+), negativo (-). EHx: extrato bruto hexânico, EAc: extrato bruto de acetato de etila, EMe: extrato bruto metanólico.

A partir dos dados apresentados no quadro acima, constata-se a presença de triterpenos e esteroides, fenilpropanoglicosídeos, derivados cinâmicos e flavonóides. A pesquisa para alcalóides, cumarinas, taninos hidrolisáveis e condensados apresentou-se negativa, como esperado para esta espécie. Para a pesquisa de saponinas, o teste de afrogenicidade foi realizado de forma preliminar, constatando também a ausência destes compostos. De acordo

com MANETTI (2009), apenas traços de alcalóides do tipo betaínas foram descritos em algumas espécies de bromeliáceas submetidas à análise, sendo sua presença rara. Na pesquisa de mono e sesquiterpenos pode-se observar a maior predominância destas substâncias no EHx, onde há presença de pelo menos cinco diferentes bandas. No EHx pode-se observar várias bandas, embora nenhuma apresente Rf correspondente ao padrão de timol (0,6) (Fig. 3).

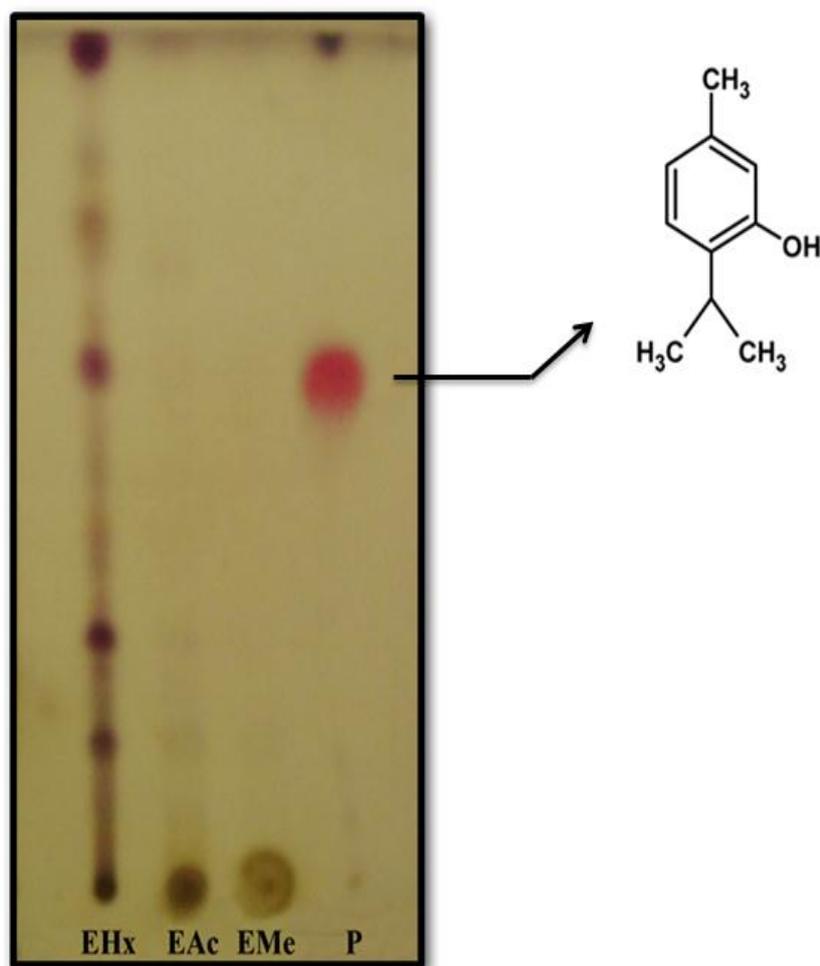


Figura 4 – Placa cromatográfica para pesquisa de mono e sesquiterpenos nos extratos obtidos de *T. recurvata*. **EHx**: extrato bruto hexânico, **EAc**: extrato bruto acetato de etila, **EMe**: extrato bruto metanólico, **P**: Padrão

Na família Bromeliaceae, diversos tipos de compostos terpênicos podem ser encontrados, como cicloartanos, lanostanos, labdanos, derivados do arborinol e friedelina. A incidência dessas substâncias é mais proeminente no gênero *Tillandsia*, onde 51% do total de terpenos isolados estão distribuídos (Fig. 2) (MANETTI, DELAPORTE & JÚNIOR, 2009).

Assim, diferentes espécies deste gênero confirmam essa presença, como em *T. usneoides*, *T. streptocarpa* e *T. fasciculata*, onde diferentes tipos de cicloartanos foram isolados e caracterizados estruturalmente (CABRERA, GALLO & SELDES, 1996; DELAPORTE *et al*, 2004; CIAU, LOEZA & QUIJANO, 2001).

A partir da análise da cromatoplaca para pesquisa de triterpenos e esteroides, é possível observar que existe maior concentração destes compostos no extrato hexânico, devido à polaridade do solvente, sendo possível verificar a presença mais pronunciada neste extrato de bandas correspondentes a β -amirina (Rf 0,7) e β -sitosterol (Rf 0,5), quando comparado aos outros. Não é possível a observação de bandas com o mesmo Rf do ácido ursólico (Rf 0,4), porém, há presença de outras bandas amareladas de Rf inferior a ele, presentes em ambas as amostras. A partir deste resultado pode-se inferir a presença de cicloartanos na espécie analisada, uma vez que estes compostos isolados por Cabrera (1995) são estruturalmente semelhantes ao padrão utilizado (Fig. 4).

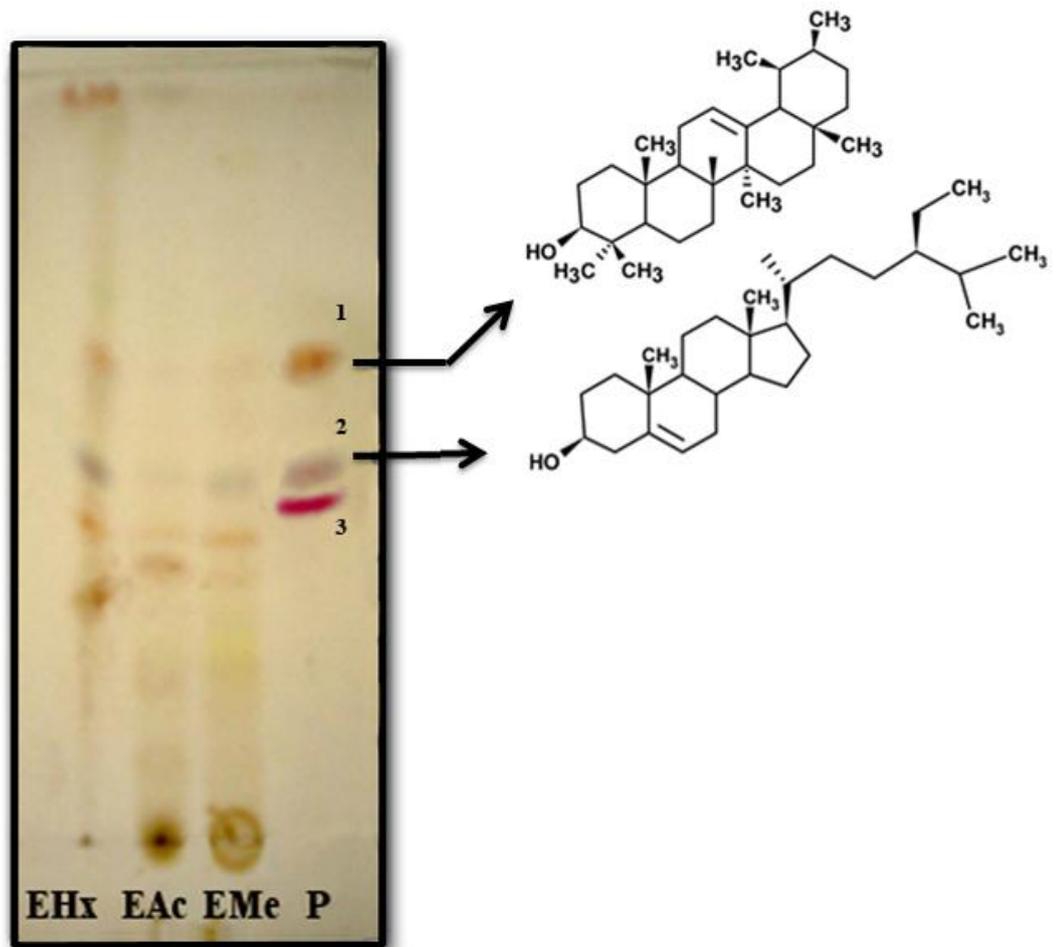


Figura 4 – Placa cromatográfica para pesquisa de triterpenos em *Tillandsia recurvata*, evidenciando estruturas químicas do padrão utilizado. **EHx**: extrato hexânico, **EAx**: extrato acetato de etila, **EMe**: extrato metanólico, **P**: Padrão com β -amirina (1), β -sitosterol (2) e Ácido ursólico (3).

A síntese de fenilpropanóides pelo vegetal pode sofrer um incremento diante de diferentes situações, como, defesa contra herbívoros, ataque de microrganismos ou mesmo invasão por outras espécies (GÁLVEZ, CORDERO & AYUSO, 2006). A presença de derivados cinâmicos foi observada nos extratos EAc e EMe, onde observam-se pelo menos quatro bandas distintas de fluorescência azul intensa (Fig. 5B). É possível verificar também a presença de fenilpropanoglicosídeos (coloração azul esverdeada) e terpenos (coloração avermelhada) predominantes no extrato hexânico, indicando assim a sua baixa polaridade (Fig. 5A). Observa-se que as amostras EAc e EMe quando comparadas ao padrão de ácido caféico apresentam correspondência de duas dessas bandas, sendo possivelmente derivados do ácido cinâmico (*cis e trans*) (Fig. 5B). Segundo Carvalho (2007), os derivados deste ácido mais encontrado na natureza possuem conformação *trans* e são mais estáveis. Porém, sob ação da luz eles podem ser convertidos em sua forma *cis*, podendo ser visualizada a separação dessas conformações em CCD através da eluição com ácidos orgânicos diluídos, como o ácido acético. A partir de pesquisas realizadas por Benzing (2000), foi possível caracterizar a presença de ácido p-cumárico, ferúlico e sinápico na hipoderme das folhas de *Tillandsia purpurea* e *Tillandsia usneoides*. A presença de diglicerídeos naturais dos ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres é rara, restrita apenas a algumas espécies. Porém, Delaporte *et al.* (2006) comprovaram a presença em *Tillandsia streptocarpa* de 4 derivados do ácido 1,3-O-dicinatoilglicerol, sendo este descrito anteriormente em *Tillandsia recurvata* por Queiroga *et al.* (2004).

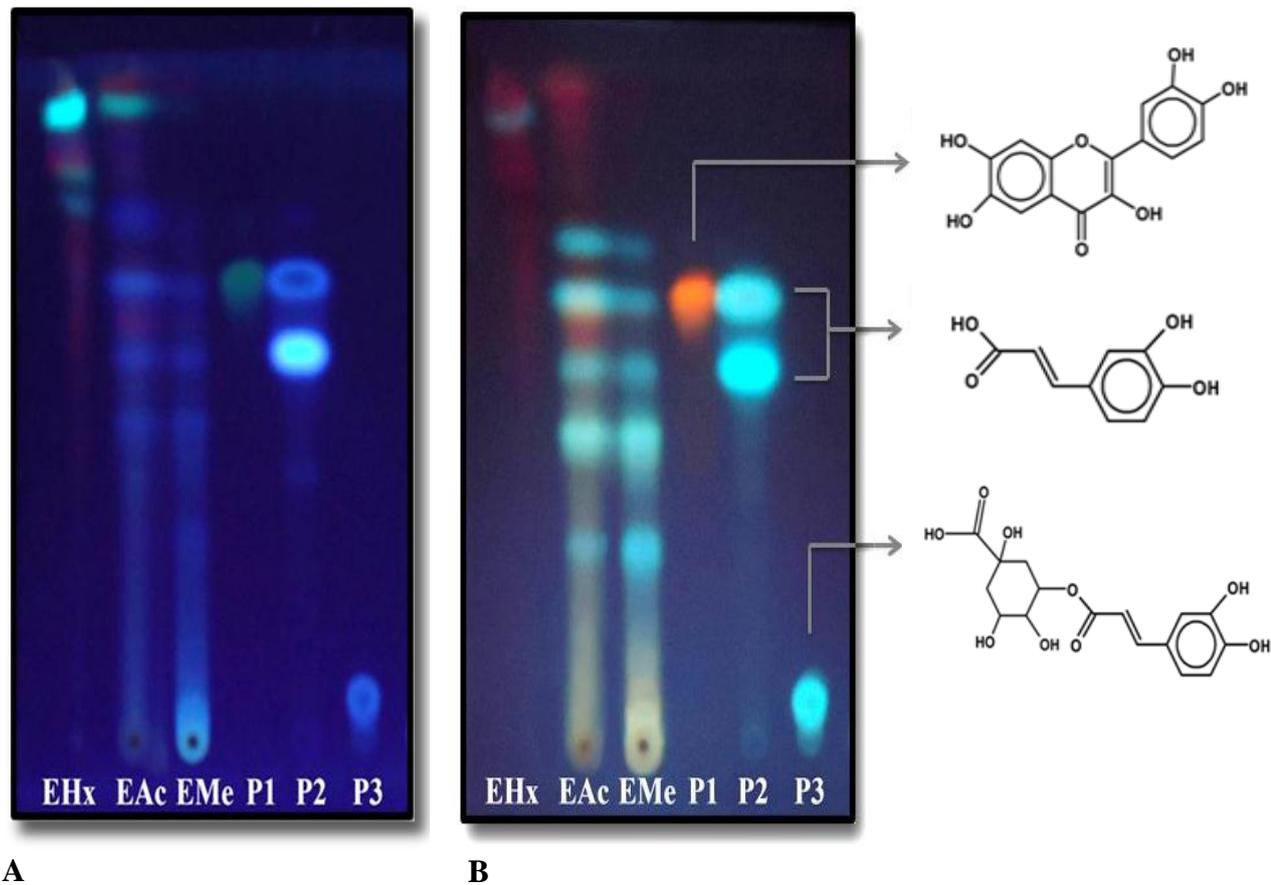


Fig 5 - Placa cromatográfica para pesquisa de Fenilpropanóides, derivados cinâmicos e flavonóides em *Tillandsia recurvata* (UV 365 nm). **A** - sem revelador. **B** - revelada com Neu, evidenciando estruturas químicas dos padrões utilizados. **EHx**: extrato hexânico, **EAc**: extrato acetato de etila, **EMe**: extrato metanólico, **P1**: padrão de quercetina, **P2**: padrão de ácido caféico (*cis e tras*), **P3**: padrão de ácido clorogênico.

Os flavonóides constituem um dos grupos fenólicos mais diversificados e ubíquos do reino vegetal, pois apresentam ampla distribuição e estão relacionados a diversas funções biológicas (ZUNAZZI, 2007). Apresentam-se em Bromeliaceae como compostos majoritários e, segundo Benzing (2000), flavonóides, flavonol e flavonas podem ser encontrados nas folhas de *Tillandsia*. Em pesquisa realizada por Manneti (2009) foram identificados nas espécies analisadas deste gênero flavanóis (3%), flavanonas (4%), flavonas (34%), flavonóis (33%) e antocianinas (26%).

A partir da análise dos ensaios realizados em *T. recurvata*, observa-se a presença de flavonóides nos extratos EAc e EMe, sendo mais proeminente no primeiro, caracterizando-se por uma banda de coloração amarelada com Rf de 0,3. No extrato EAc, porém, pode-se notar a presença de um flavonóide de coloração alaranjada e Rf próximo ao padrão de quercetina (Fig. 5b). Apesar das poucas pesquisas existentes sobre flavonóides neste gênero, outros autores confirmam a presença de flavononas em diferentes espécies de *Tillandsia*, como *T. usneoides*, *T. utriculata* e *T. purpúrea* (SCOTTY & MABRY, 1977; ULUBELEN &

MABRY, 1982; ARSLANIAN & STERMITZ, 1986). Recentemente, Delaporte e colaboradores (2006) confirmaram este resultado, obtendo-se através de processos cromatográficos 5 mg de quercetina a partir do extrato de acetato de etila em *Tillandsia streptocarpa*.

Analisando-se por CCD as frações obtidas na tentativa de isolamento, verificou-se a obtenção de frações enriquecidas de F1 e M1 (Fig. 6), não sendo possível obtê-las em estado de pureza adequado para obtenção de dados espectroscópicos, dada a sua grande dificuldade de ser purificado pelos diversos procedimentos cromatográficos efetuados. A amostra T1, apesar de saber tratar-se de um monoterpreno, a partir dos resultados espectrométricos parciais obtidos, ainda não foi possível sua determinação estrutural. Através do método da microsublimação foram obtidos cristais de substâncias fluorescentes visíveis sob UV 365nm (Mss – Fig.6).

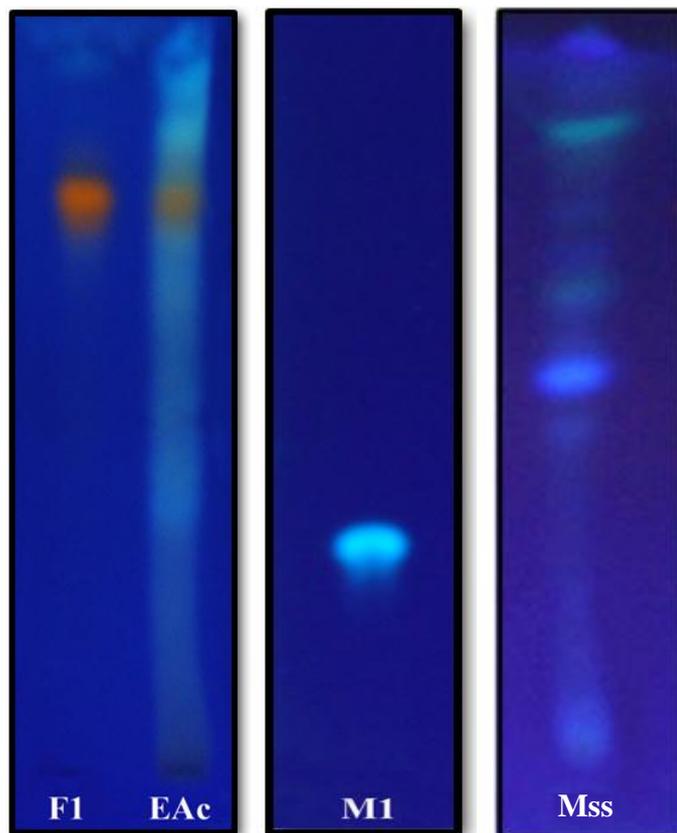


Fig. 6 - Placas cromatográficas evidenciando frações enriquecidas obtidas: **F1** - flavonóide purificado. Sistema AcOEt – Ác.F – Ác.A – H₂O (100:11:11:27), revelado com Neu (365 nm). **M1** - molécula purificada do extrato hexânico. Sistema tolueno: acetato de etila (90:10), UV 365nm. **Mss** - moléculas flurescentes obtidas por microsublimação do extrato metanólico. Sistema tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (6:4:1), UV 365nm.

A técnica espectrofotométrica para doseamento de substâncias químicas é uma das análises utilizadas frequentemente em análises farmacêuticas, sendo um dos métodos analíticos mais usados para quantificação de flavonóides e fenóis totais em material vegetal. Este fato se deve de à sua robustez, custo relativamente baixo, rapidez quando comparado a outras técnicas e grande número de aplicações (POZZI, 2006; KOMAROVA et al., 2009).

Os compostos fenólicos formam uma grande classe de compostos, na qual estão incluídas diversas substâncias aromáticas que possuem caráter antioxidante. Este fato se deve principalmente às propriedades redutoras de sua estrutura química, desempenhando um papel importante na neutralização de radicais livres. A quantificação espectrofotométrica destas substâncias utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, que por possuir estado de oxidação positivo, interage com os agentes redutores fenólicos, formando-se um complexo de coloração azul que permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, sendo assim possível mensurar a presença destas substâncias nos tecidos vegetais (Fig. 9) (CARVALHO, GOSMANN & SCHENKEL; SOUZA et al., 2007).

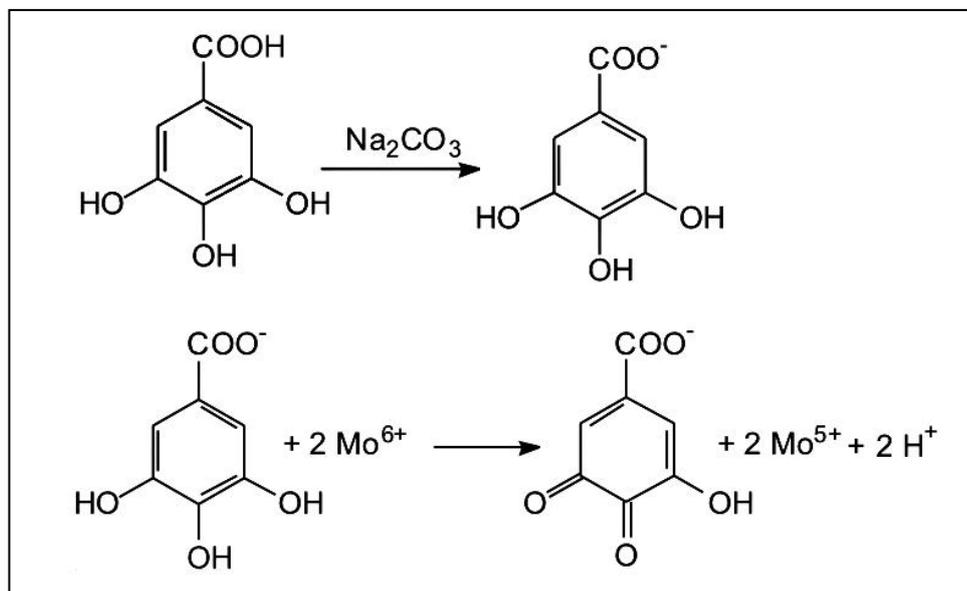


Figura 9 - Reação do molibdênio (presente no reagente de Folin) com compostos de origem fenólica (ácido gálico *e.g.*).

O uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) na espectrometria UV-VIS de flavonóides baseia-se na propriedade do cátion alumínio (Al^{+3}) de formar complexos estáveis com flavonóides em metanol, ocorrendo assim uma intensificação da absorção devido a extensão do sistema conjugado após a complexação, sendo este o princípio que permite o doseamento destas substâncias (Fig. 10).

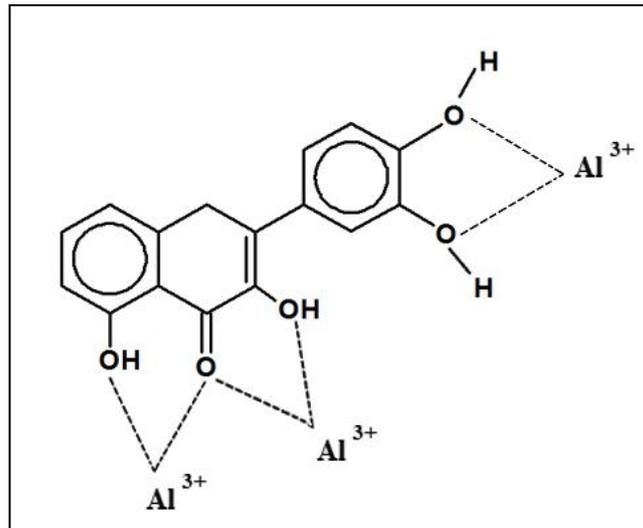


Figura 10 – Representação esquemática da complexação Al^{3+} -Flavonóide.

Os comprimentos de onda com absorvância máxima observados nos espectros de absorção da amostra foram 0,846 em 779nm e 0,629 em 208nm, para polifenóis e flavonóides totais, respectivamente (Fig. 11a e b).

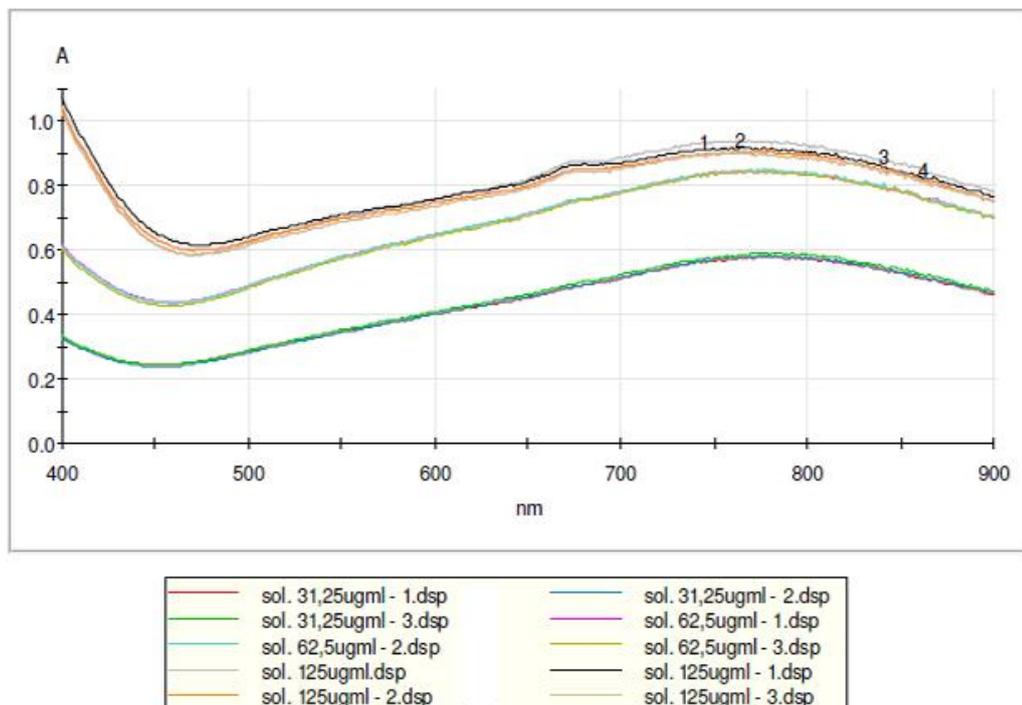


Figura 11a – Curva obtida por espectroscopia para Polifenóis totais no EAc de *T. recurvata*.

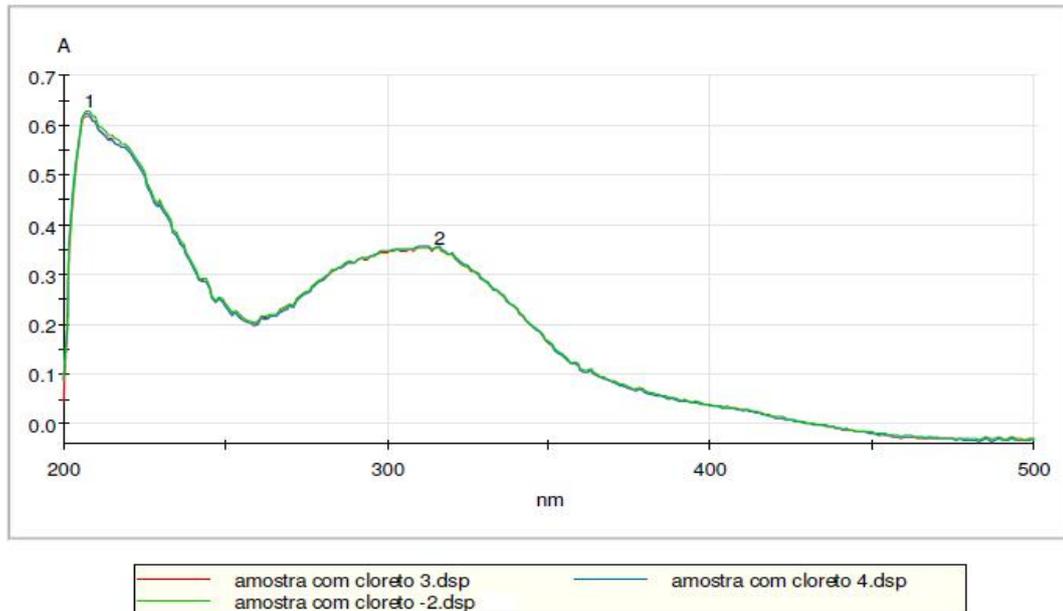


Fig 11 – Curvas obtidas por espectroscopia para Polifenóis e Flavonóides totais no EAc em *T. recurvata*.

Diante do perfil fitoquímico apresentado para esta espécie, testes espectrométricos foram realizados no intuito de mensurar a concentração destes compostos. Os resultados obtidos na determinação dos polifenóis totais (PT) pelo método Folin – Ciocalteu foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG), em gramas de extrato bruto por grama de material vegetal, revelando um teor de 14,6% desses compostos na amostra de acetato de etila analisada, enquanto que a concentração de flavonóides totais determinada para o mesmo analito, foi de 0,021 g% de quercetina ($0,00017 \pm 0,080$).

Capítulo III

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
Tillandsia recurvata L.

1. INTRODUÇÃO

Apesar da indústria farmacêutica ter aumentado a produção de antibióticos nas últimas três décadas, a resistência bacteriana também tem aumentado proporcionalmente, tornando-se um problema crescente de âmbito mundial (NASCIMENTO, 2000). O surgimento das primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de penicilases, há meio século, logo após a entrada da penicilina no mercado, deu início a uma busca crescente pela descoberta de novas alternativas para debelar esse processo. Originalmente, o fenômeno de resistência aos antibióticos pelos microrganismos pode ser entendido como um processo de seleção natural, onde, após a exposição, os microrganismos mais vulneráveis perecem, restando apenas os mais resistentes. Porém, este se tornou um processo irrefreável, resultante do uso excessivo e irrestrito dos antimicrobianos no tratamento das enfermidades humanas, animais e até mesmo na aquicultura e agricultura (WHO, 2000). Dessa forma, o uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos aliado ao elevado número de pacientes graves e imunocomprometidos nos sistemas de saúde tem levado ao desenvolvimento de cepas de microrganismos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus*. Estas cepas representam um sério problema para os pacientes hospitalizados, visto que estes microrganismos conseguiram desenvolver com sucesso inúmeras estratégias de resistência, permanecendo imunes à ação de diversos agentes antibióticos. Portanto, observa-se a importância da busca por novos agentes terapêuticos capazes de debelar as infecções causadas por esses microrganismos (BLANCO, 2009).

As plantas são conhecidas por produzirem uma gama de substâncias, sejam para se adaptarem ao meio em que vivem ou como resposta a ataques de predadores, podendo incluir patógenos ou mesmo microrganismos oportunistas (SANTOS, 2007). Dessa forma, a planta e os produtos de seu metabolismo secundário constituem uma fonte promissora no fornecimento de compostos bioativos com estruturas diversas, com potenciais atividades farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana (CHUNG, 2011). Portanto a busca na etnofarmacologia por protótipos estruturais que possam ser fonte para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos tem se tornado cada vez mais intensa (DEMO, 2008).

Por estas razões a comunidade científica tem sido impulsionada na busca por efeitos antimicrobianos em espécies vegetais, como alternativa aos antibióticos comumente usados na terapêutica (LIMA, 2001).

Diversos registros apontam o uso de uma grande variedade de plantas ao longo da história a partir do conhecimento empírico da medicina tradicional. Documentos como o papiro de Ebers no Egito, manuscritos de Pent-Sao na china e mesmo os tratados de Teofrasto, em sua obra “História das plantas” comprovam que o conhecimento acerca do potencial das plantas na cura de diversas doenças é relatado há mais de 3000 anos antes da era cristã (CUNHA, 2006). Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e seus derivados, o que pode ser ilustrado pelas farmacopeias da época (SCHENKEL, 2007). As propriedades antibióticas de alguns produtos naturais, já são reconhecidas empiricamente há séculos. Por volta de 1870 Tyndall, Pasteur e Roberts relataram os efeitos antagonistas de alguns microrganismos sobre outros. Porém a era dos antibióticos só começou em 1929 com a descoberta da penicilina por Fleming, isolada a partir dos metabólitos secundários de um fungo (TABAREZ, 2005)

Por um longo período de tempo, as plantas têm sido uma valiosa fonte de produtos naturais para a manutenção da saúde humana, especialmente na última década, com estudos mais intensivos de terapias naturais. Paralelamente, a busca por terapias que produzam menos efeitos adversos pela população, tem acarretado em um incremento na utilização da fitomedicina em todo o mundo desenvolvido (Barnes, 2007). Muitas drogas vegetais e seus derivados têm mostrado atividade biológica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostrando o interesse pela pesquisa na medicina tradicional, com foco em quais os componentes são responsáveis por essa ação. Países como Brasil, Índia, Mexico e Cuba são exemplos de países com elevado potencial para descoberta de novas substâncias, baseado no fato de possuírem uma grande diversidade biológica ainda pouco explorada (DEMO, 2008).

No Brasil, o início das pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal se deu com Cardoso & Santos em 1948, onde foram avaliados extratos de 100 diferentes plantas em relação às propriedades antimicrobianas que possuíam. Atualmente, estudos sobre as atividades antimicrobianas de diversas plantas nativas têm sido relatados em muitos países da América Latina, como exemplo o Brasil, que possui uma flora diversificada e uma rica tradição no uso dessas espécies (LOGUERCIO, 2005; ANESINI, 1993).

Tillandsia recurvata L. (Bromeliaceae), popularmente conhecida como “ninho” devido a sua aparência, é uma epífita nativa localizada em toda a costa do Brasil e distribuída por toda a América Latina (FORZZA, 2010; GBIF,2010). Poucos estudos, porém, têm sido realizados a respeito das atividades farmacológicas desta espécie, conhecida tradicionalmente na medicina popular por suas propriedades no tratamento de alguns transtornos como dores, tosse e febre, além de ser utilizada pela população no tratamento de infecções oculares

(MANETTI, 2009). Alguns estudos preliminares comprovam o potencial desta espécie como agente antimicrobiano (PAZ, 1995), porém estudos mais detalhados seriam necessários. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de *T. recurvata* frente a cepas de microrganismos multirresistentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a realização das análises, amostras de *T. recurvata* foram coletadas no município de Cuité e catalogadas em dois diferentes herbários de Pernambuco (*vide cap. II*).

2.2 Fitoquímica

2.2.1 Preparação dos extratos

Depois de seca à sombra, a temperatura ambiente, a amostra foi reduzida a pequenos fragmentos e devidamente pesada. Para a extração foram realizadas duas metodologias: primeiramente a maceração, utilizada para realização da triagem inicial e a turbólise utilizada na segunda parte dos ensaios.

2.2.1.a Maceração

Após pesagem e cominuição das partes aéreas vegetais, um total de 1 Kg da planta foi submerso em diferentes solventes aquecidos, submetido ao processo de maceração durante duas semanas para cada solvente utilizado, com agitação e renovação do solvente. Assim, foram obtidos os respectivos extratos brutos secos hexânico (EHx), acetato de etila (EAc) e metanólico (EMe), conforme capítulo II.

Com base nos usos etnofarmacológicos desta planta, foi preparado adicionalmente um extrato aquoso a partir da planta fresca através do processo de infusão, para que também fosse avaliado o seu comportamento frente às bactérias.

2.2.1.b Turbólise

Para este método extrativo, 30 gramas da amostra foram submetidos à turboextração (temperatura < 40°C) utilizando-se solução etanólica a 50% como solvente extrator. Os extratos foram filtrados através de papel filtro sob pressão reduzida e em seguida a eliminação total do solvente foi realizada em um vaporizador rotativo padrão. Dessa forma, foram obtidos 7,2% de extrato bruto seco hidroalcoólico (EHA). A partir deste foram realizadas lavagens, utilizando solventes de polaridade crescente no intuito de promover a separação das moléculas de acordo com suas afinidades químicas pela polaridade dos solventes. Ao final do processo as soluções extrativas foram evaporadas sob pressão reduzida e assim obtidos os extratos brutos secos.

2.2.2 Identificação dos Componentes Químicos

Os extratos de *T. recurvata* foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), com o objetivo de fornecer informações sobre quais metabólitos secundários estariam presentes nos extratos testados. Para isto, as amostras foram aplicadas sobre cromatoplasmas de sílica gel (Kieselgel 60, 0.2 mm, Merck), utilizando como fase móvel o sistema composto por Tolueno: Ácido acético: Ácido fórmico (6:4:1) (Wagner & Bladt 1996). As placas foram analisadas sob luz ultravioleta (365 nm) após revelação com o reagente de NEU (difetilboriloxietilamina).

2.3 Microbiologia

2.3.1 Padronização dos extratos e padrões

Para realização dos ensaios antibacterianos, os extratos foram solubilizados em um sistema composto por DMSO (dimetil sulfóxido 10%)/ Tween80/ água (1:1:8), obtendo assim soluções estoque padronizadas de concentração igual a 1000 µg/mL. Essas soluções foram esterilizadas por filtração através de membranas milipore® de porosidade de 0,22 µm

Também foram incluídas nos ensaios amostras obtidas a partir do isolamento e purificação químicos (conforme cap. I): microsublimado (Mss) e uma molécula purificada esverdeada obtida do extrato hexânico (M1), padronizados sob as mesmas condições que os extratos citados. Os agentes antimicrobianos de referência de Ciprofloxacino, Teicoplanina, Polimixina B, Imipenem e Oxacilina foram cedidos pela Eurofarma Laboratório LTDA - Brasil. A resistência dos microrganismos frente aos padrões foram definidas em cada caso,

obtendo-se os valores de CIM a partir de diluições em série num intervalo de concentração de 512 a 4 µg/ mL.

2.3.2 Padronização das cepas

Os microrganismos utilizados neste ensaio foram oriundos de isolados clínicos, com comprovação de multirresistência bacteriana, adquiridos a partir de lavados e secreções teciduais. As cepas padrão utilizadas foram obtidas do American Type Culture Collection. As colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em caldo Mueller-Hinton (Acumedia Manufacturers, Baltimore, EUA), a uma turbidez de 10^7 UFC/ mL. Depois disso, a suspensão foi diluída em água (1:10) para obtenção de uma solução final de 10^6 UFC/ mL (COURVALIN *et al*, 1985)

2.3.3 Bioautografia

Após o desenvolvimento das cromatoplas no sistema eluente supracitado, elas foram secas durante doze horas em temperatura ambiente, para total evaporação dos solventes utilizados. Em uma placa de Petri, contendo cerca de 2 mL de meio de cultura (Müller Hinton ágar), as placas cromatográficas foram acondicionadas e sobre elas foi vertido 1 mL do mesmo meio, contendo 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* LFBM 02. As placas foram incubadas durante 24 horas a 32° C e em seguida reveladas com uma solução de cristal violeta. Para desenvolvimento da cor, incubaram-se as placas a 35° C, durante 1 h. As áreas que apresentavam zonas de inibição de crescimento foram comparadas com o Rf das moléculas relacionados, observadas na CCD.

2.3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *T. recurvata* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações estabelecidas pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), com modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em forma de “U”. Um volume de 200 µL das soluções extrativas estéreis foi inoculado nos orifícios de 1 a 12 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos inicialmente apenas com 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Sequencialmente, foram retirados 100 µL dos poços que continham o extrato e adicionados aos poços da linha seguinte até a última linha, de modo que fosse realizada uma

diluição em série para criar um gradiente de concentração de 1000 µg/ mL a 3,9 µg/ mL. A cada coluna foram adicionados 5 µL de uma determinada cepa de microrganismos (10⁶ UFC/ mL), perfazendo um total de 11 cepas diferentes já que a coluna 1 não os possuía, sendo o nosso controle negativo.

O preparo de outra placa foi realizado sob as mesmas condições, com exceção da adição dos extratos. Após incubação por 24 horas, as absorbâncias das microplacas foram determinadas através de um leitor de ELISA automático de bandeja ajustada (Thermo plate – TP Reader®) a 450 nm. A inibição do crescimento foi demonstrada pela densidade óptica, considerando o crescimento total (100%) na placa controle e o percentual de redução à diferença dos outros poços em comparação àquele. A CIM foi descrita como a mais baixa concentração dos extratos ou agentes antimicrobianos que inibiu o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C, o que ocorreu quantitativamente nos poços que mostraram percentagem de inibição de crescimento maior ou igual que 70%. Os ensaios de atividade foram realizados em duas etapas: inicialmente foi realizada uma triagem preliminar, para determinação do perfil antibacteriano da espécie, e na etapa seguinte as análises foram realizadas com foco nos microrganismos que apresentaram maior sensibilidade a ação dos extratos. Todos os microrganismos testados nestas etapas foram padronizados a 10⁷ UFC/mL.

Segundo Sartoratto *et al* (2004), a atividade antimicrobiana é considerada como forte quando encontramos CIM com valores entre 50 – 500 µg /mL, atividade moderada para valores entre 600 – 1500 µg /mL e atividade fraca quando os valores obtidos estão acima de 1500 µg /mL.

2.3.4.a Etapa 1

Para a realização da triagem antibacteriana foram utilizados 11 microrganismos diferentes, incluindo Gram positivos e Gram negativos, alguns deles obtidos a partir de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de resistência para diversos agentes antimicrobianos. As cepas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (LFBM 26), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Pseudomonas aeruginosa* (LFBM 05), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Enterococcus faecalis* (LFBM 02), *Enterococcus faecalis* (ATCC 27212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (LFBM 01), *Escherichia coli enterohemorrágica* (O157:H7-INCQS 0071), *Proteus mirabilis* (LFBM 02).

2.3.4.b Etapa 2

A partir dos resultados obtidos com a triagem preliminar, foram selecionadas as cepas que se apresentaram mais sensíveis aos extratos testados. Dessa forma, foram escolhidas cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* (LFBM – 03,15, 16, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 33), as quais foram avaliadas frente ao extrato de acetato de etila (EAc), microsublimado (Mss) e à molécula purificada (M1), e *Enterococcus faecalis* (LFBM – ATCC, 01, 02, 03, 04, 08, 10, 12, 14, 19, 21) avaliadas frente ao extrato de acetato de etila.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos extratos obtidos por maceração, utilizados na triagem inicial, obtiveram-se extratos brutos secos de hexano (EHex – 0,606%), acetato de etila (EAc – 2,171%), metanol (EMe – 5,2%) e aquoso (EAq - 15,6%). Através das análises cromatográficas é possível observar que os extratos analisados apresentam em sua composição diferentes compostos fenólicos, como fenilpropanoglicosídeos, derivados cinâmicos e flavonóides, além da presença de terpenos verificada no extrato hexânico (Fig. 1), corroborando os estudos de Cabrera & Seldes (1995) e Queiroga *et al* (2004). Resultados semelhantes foram encontrados por Delaporte e colaboradores (2006) em *Tillandsia streptocarpa*, onde terpenos e fenilpropanóides também foram verificados.

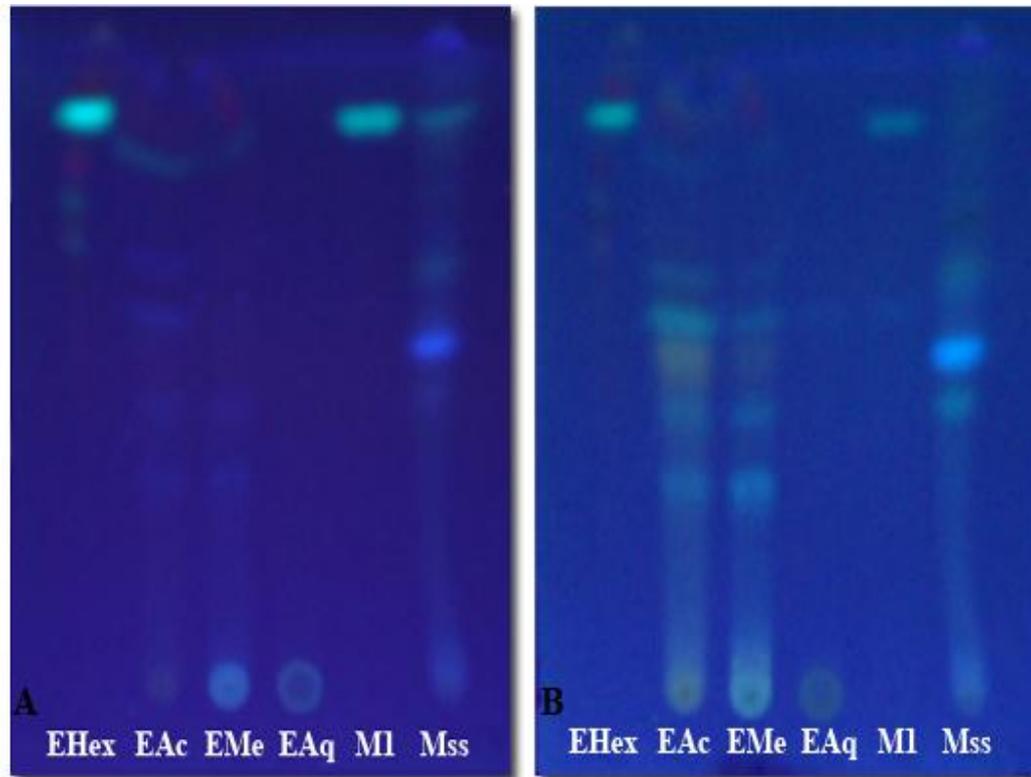


Figura 1 – Cromatografia em camada delgada de amostras testadas na triagem antibacteriana, visualizada sob UV 365 nm. A – sem revelação; B – após revelação com o reagente de NEU.

A capacidade de inibir o crescimento microbiano é uma característica conhecida para a família Bromeliaceae. Para os representantes do gênero *Tillandsia*, muitas espécies já possuem comprovação sobre esta atividade, como *Tillandsia aëranthos*, *T. capillaris* f. *cordobensis* (Hieron), *T. strepctaorpa* Baker, *T. usneoides* L. e *T. imperialis* E. Morr. ex Mez (PAZ, 1995; BARBOZA, 2009; POSADAS, 2011; ALVES, 2011).

De uma forma geral, os compostos fenólicos possuem ação efetiva contra vírus, bactérias e fungos. O mais provável mecanismo de ação destes compostos sobre a atividade antibacteriana envolve a inibição enzimática pela oxidação de seus componentes através de reações com os grupamentos sulfidrilas e de interações inespecíficas (relacionadas com o caráter hidrofóbico dessas moléculas) com os grupamentos tiol das proteínas (DEMO, 2008; COWAN, 1999, GIBBONS, 2004). Segundo Fernández (1996), os derivados do ácido cinâmico presentes em algumas espécies de *Scrophularia* sp. são responsáveis pela atividade antimicrobiana desse vegetal, cuja potencia é proporcional à concentração desses compostos, mostrando-se ativos principalmente contra microrganismos Gram-positivos. Para Narasimhan

(2004), essas substâncias desempenham um papel importante na inibição de microrganismos, apresentando um incremento notável desse efeito quando ocorre a halogenação da cadeia lateral da estrutura, quando comparadas com a hidroxilação da mesma. Para os flavonóides, a sua atividade antimicrobiana demonstra que possuem diferentes alvos de ação celular, ao invés de um único sítio específico. Esses recursos estruturais podem ser necessários para facilitarem a aproximação ou absorção dessas moléculas pela célula bacteriana.

Os compostos de origem terpênic formam uma classe diversificada de substâncias naturais, constituídos por unidades de isoprenos, sendo este o critério de classificação. Eles podem ocorrer como hemiterpenos (C5), sesquiterpenos (C15), di, tri ou tetraterpenos (C20, C30, e C40). Quando estes compostos possuem sua estrutura oxigenada, são denominados terpenóides. Eles apresentam importantes atividades terapêuticas contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O mecanismo de ação destas substâncias não está totalmente definido, mas agem contra os microrganismos devido ao caráter lipofílico de suas moléculas, facilitando a interação da membrana com estas estruturas, ocasionando a desorganização e ruptura da membrana citoplasmática (DEMO, 2008; COWAN, 1999). Estudos indicam a ação de diferentes terpenos, dentre eles cicloartanos, mostrando-se ativos contra microrganismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Candida albicans* e *Micrococcus luteus* (LUGO, 2002; TOGASHI, 2008; SANTOS, 2010).

Uma das indiscutíveis funções dos flavonóides está baseada no seu papel de proteção das plantas contra a invasão microbiana, a partir da acumulação dessas substâncias como fitoalexinas, em resposta a ataques microbianos. Sua ação se deve provavelmente à sua habilidade de se complexar com as proteínas extracelulares solúveis e com a parede celular bacteriana, complexando irreversivelmente com os aminoácidos nucleofílicos. Os flavonóides de caráter mais lipofílicos podem agir diretamente sobre a membrana microbiana, causando a sua ruptura (DEMO, 2008; COWAN, 1999; HARBONE, 2000).

A partir de estudos realizados Tsuchiya e colaboradores (1996) para determinação da ação de flavonóides sobre cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), foi possível observar que a dihidroxilação nas posições 2', 4' ou 2', 6' do anel B e a dihidroxilação dos carbonos 5 e 7 do anel A da estrutura da flavanona apresentam grande importância para a atividade anti-MRSA. Além disso, observou-se que a substituição dos carbonos 6 e 8 por uma cadeia longa alifática, como lavandulil (5 - metil - 2 - isopropenil - hex - 4 - enil) ou geranil (trans - 3, 7 - dimetil - 2, 6 - octadienil), também são responsáveis pelo aumento dessa atividade. Alcaraz *et al.* (2000) confirmaram posteriormente a importância da hidroxilação do carbono 5 das flavanonas e flavonas na atividade contra

MRSA. De acordo com Ward e colaboradores (1981), os derivados 3 - metileno flavanona, obtidos por síntese através da halogenação do anel B, foram responsáveis pelo aumento significativo da atividade contra *S. aureus* e mais proeminente contra *E. faecalis*.

Analisando-se as respostas obtidas pelos extratos nessa etapa inicial da pesquisa, observa-se um perfil de atividade predominante sobre as Gram positivas (Tab. 1). Segundo Ikgai e colaboradores (1993) estes microrganismos apresentam-se mais sensíveis à ação de flavonóides, pois os Gram negativos apresentam na estrutura de sua parede celular lipossacarídeos, que são carregados negativamente, dificultando assim a sua interação com os compostos presentes no extrato. Os extratos EHex, EAc e EMe apresentaram-se ativos contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, com valores de CIM variando entre 7,8 a 1000 µg/mL, necessitando de uma concentração quase nove vezes menor para inibir o seu crescimento, quando comparados com o padrão de ciprofloxacina (64 µg/mL). As cepas de *S. aureus* revelaram um perfil de resistência contra muitos agentes antimicrobianos, como os antibióticos β-lactâmicos. Outro destaque importante é a forte atividade contra *Enterococcus faecalis*, onde os extratos EHex, EAc, EMe e EAq apresentaram valores de CIM inferiores a do agente antimicrobiano usado como referência, teicoplanina (8 µg/mL), num intervalo de 7,8 a 1000 µg/mL. Este resultado pôde ser comprovado através da bioautografia, onde a zona de inibição formada pelo extrato de acetato de etila na placa de CCD correspondia ao Rf das bandas representativas dos compostos fenólicos observados (bandas amarelas e azuis, Rf 0,1 a 0,5). Apesar do comportamento semelhante dos extratos em relação à suas atividades sobre *S. aureus* e *E. faecalis*, do ponto de vista químico o extrato de acetato de etila apresenta uma maior concentração de fenilpropanóides, observados pela coloração mais intensa na CCD, além do que, nesse extrato existe a presença de flavonóides que não se encontram com a mesma intensidade que nos outros (Fig. 1). Estes resultados preliminares apresentam grande relevância, tendo em vista que as cepas utilizadas em sua maioria são de microrganismos multirresistentes a diversos agentes antimicrobianos, demonstrando, assim, uma forte atividade dos extratos testados contra os microrganismos Gram positivos.

S. aureus é considerado o patógeno humano mais importante do gênero *Staphylococcus*. Apresentam ampla distribuição na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte de mamíferos. Porém, devido ao fenômeno de resistência encontrado atualmente, a frequência de infecções ocasionadas por estas cepas meticilina resistente (MRSA) tem representado um aumento contínuo a nível mundial (RATTI & SOUZA, 2009). Eles estão envolvidos em diversas infecções nosocomiais oportunistas, de origem hospitalar ou mesmo comunitária, como foliculite, impetigo, furúnculos e até mesmo

infecções sistêmicas potencialmente fatais em diferentes sítios de colonização, como pregas cutâneas, axilas, orofaringe, períneo e vagina (DAVENPORT *et al.*, 1986).

O gênero *Enterococcus* inclui diversas espécies que fazem parte da microbiota própria do trato gastrointestinal, da vagina e da cavidade bucal, sobrevivendo através de relações comensalísticas com seu hospedeiro. Porém, *Enterococcus* abrangem também espécies patogênicas, sobretudo *E. faecalis*, onde as características microbiológicas bem como os fatores de virulência determinam a sua patogenicidade (PARADELLA, KOGA-ITO & JORGE, 2007). Esses microrganismos são resistentes a diversos antibióticos, como tetraciclina, gentamicina e teicoplanina (SEDGLEY *et al.*, 2005), e sabe-se que são responsáveis por mais de 90% das infecções humanas enterocócicas, podendo ser o agente etiológico de infecções como urinárias, endocardites e endodônticas (KAYAOGLU & ORSTAVIK, 2004).

Com base nos resultados obtidos no ensaio preliminar, foram escolhidos os extratos que apresentaram melhor desempenho frente às bactérias e, com o objetivo de potencializar a extração dessas substâncias, foi realizada uma segunda metodologia extrativa. Para Naczk (2004), a solubilidade dos compostos fenólicos é dependente da polaridade do solvente utilizado, de sua polimerização ou mesmo da interação destes com os outros constituintes da planta. Foi escolhido assim o método da turboextração, que consiste na extração com simultânea redução do tamanho das partículas, através de forças mecânicas. Neste processo, além da difusão das substâncias dissolvidas pela membrana, ocorre em primeiro plano a ruptura das células, o que favorece a rápida dissolução das substâncias ativas, considerado um processo extrativo que leva ao esgotamento vegetal (SONAGLIO *et al.*, 2007). Com este procedimento, foram obtidos um total de 0,824% de extrato bruto seco hexânico (EHex), 7,42% de extrato bruto seco de acetato de etila (EAc) e 49,5% de extrato bruto seco aquoso (EAq) e 10,92% de extrato bruto seco metanólico (EMe). Dessa forma, pode ser observado um incremento considerável no rendimento dos extratos obtidos, alterando-se apenas o processo extrativo, onde o EAc apresentou um rendimento final aproximadamente três vezes maior, quando comparado ao rendimento obtido pela maceração (Fig. 2). Esse aumento do poder extrativo pode ser percebido também através da CCD, onde observam-se bandas fluorescentes mais espaçadas e de coloração mais intensa, demonstrando uma maior predominância de compostos fenólicos mais polares resultantes do solvente utilizado neste tipo de extração (Fig. 3). Esse resultado foi confirmado por Lagos (2006), que realizou um estudo comparativo de metodologias extrativas e verificou que o método da turbólise usando

etanol a 50% é o método mais eficiente na extração de compostos fenólicos, uma vez que contribui para um maior rendimento extrativo.

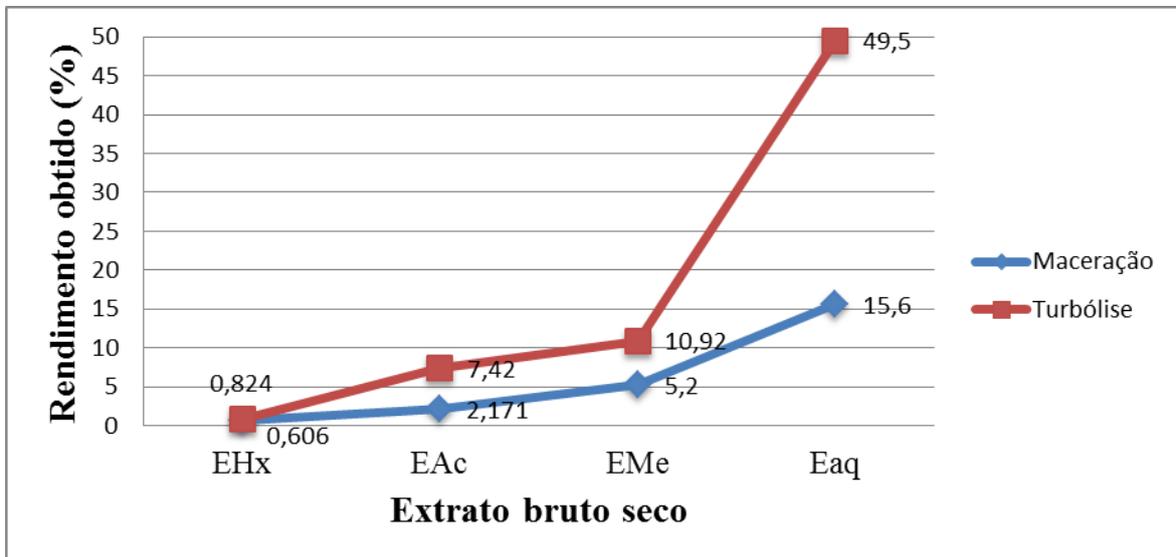


Figura 2 - Comparação entre os métodos extrativos de *Tillandsia recurvata* em relação ao rendimento obtido para os extratos obtidos: EHx – extrato bruto hexânico, EAc – extrato bruto de acetato de etila, EMe – extrato metanólico, Eaq – extrato aquoso.

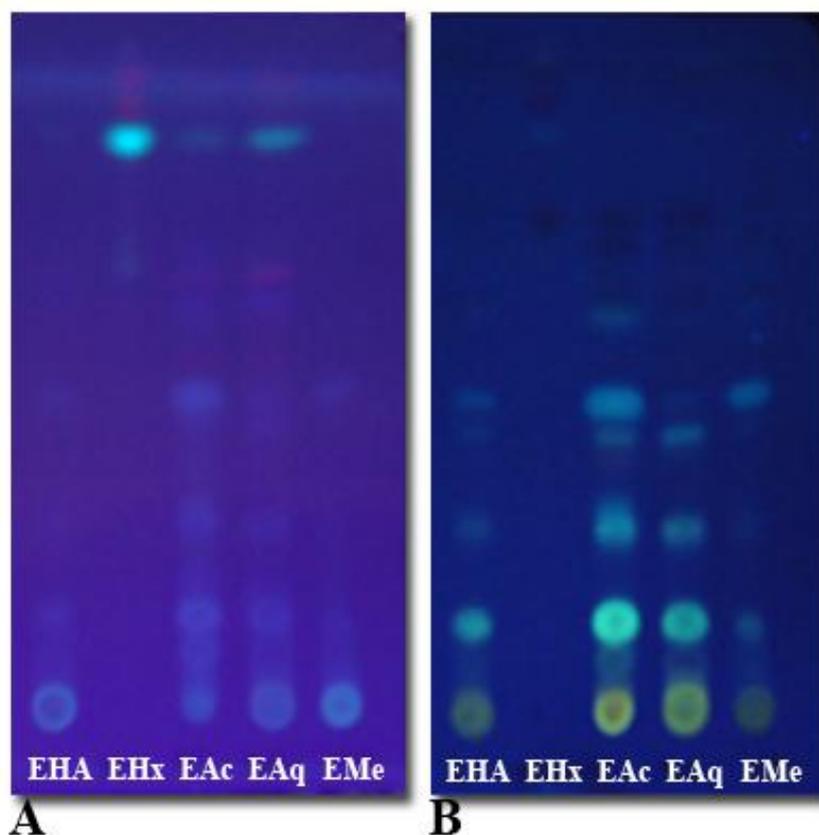


Figura 3 – Cromatografia em camada delgada de amostras testadas na etapa 2 dos ensaios antimicrobianos, visualizados sob UV 365 nm. A – sem revelação; B – após revelação com o reagente de NEU.

Como os extratos analisados na primeira etapa dos ensaios apresentaram um perfil de atividade mais pronunciado contra os microrganismos Gram-positivos, a segunda etapa do teste de atividade concentrou as análises para as cepas bacterianas que se apresentaram mais sensíveis à ação dos extratos, *S. aureus* e *E. faecalis*, sendo testados 22 microrganismos diferentes, a maioria com perfil de multiresistência aos agentes antimicrobianos usados comumente na clínica. A escolha desses microrganismos se deu devido ao perfil de resistência que apresentam, além de serem os clinicamente mais relevantes, estando envolvidos em infecções nosocomiais graves. Para os extratos testados frente à *S. aureus*, as três amostras apresentaram valores de CIM bem abaixo do padrão de oxacilina utilizado (800 µg/mL) contra a cepa LFBM 26, sendo a amostra Mss muito ativa (15,6 µg/ mL) (Tab. 2). Quando o EAc foi testado contra *E. faecalis* observou-se uma forte atividade contra a maioria das cepas testadas (LFBM 01, 02, 03, 04, 10, 12, 21) apresentando CIM que vão de 3,9 a 7,8 µg/ mL. Observam-se concentrações oito vezes menores que o necessário para a teicoplanina para as cepas LFBM 04 e 21. Para as cepas LFBM 01, 02 e ATCC é necessário o dobro da quantidade de teicoplanina para causar a inibição dessas cepas quando comparada com o extrato de acetato de etila, apresentando-se tão eficiente quanto o padrão na inibição das cepas LFBM 12 e 03 (Tab. 3).

Os resultados obtidos corroboram os estudos de Paz (1995), Mercedez (2003), Carmen (2008) e Alves (2011), realizados em espécies do Uruguai, México e sul do Brasil, mostrando o alto potencial antibacteriano da espécie analisada contra esses microrganismos. Porém, diferentemente da literatura consultada, a espécie aqui estudada apresentou-se pouco ativa para as Gram negativas.

Tabela 1 – Valores de CIM dos extratos de *T. recurvata* e antibióticos frente a microrganismos Gram positivos e negativos.

MICROORGANISMO	ORIGEM	CIM DOS EXTRATOS TESTADOS (µg/mL)						PADRÃO (CMI - µg/mL)
		EHex	EAc	EMe	EAq	Mss	M1	
								CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 26	Hemocultura	1000	500	500	1000	1000	1000	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	< 7,8	7,8	< 7,8	1000	< 7,8	< 7,8	64
								TEI
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 02	Hemocultura	< 7,8	< 7,8	< 7,8	< 7,8	1000	1000	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	< 7,8	< 7,8	< 7,8	< 7,8	1000	1000	0,25
								POL B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM 05	Hemocultura	1000	1000	1000	1000	1000	1000	4
								CIP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≤ 0,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≤ 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 01 (produtora de carbapenemase)	Hemocultura	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≤ 0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	ATCC	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≥ 4
<i>Escherichia coli</i> O157:H7- INCQS 0071	Fiocruz –RJ	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≤ 4
								IMI
<i>Proteus mirabilis</i> LFBM 02	Urocultura	1000	1000	1000	1000	1000	1000	≥ 16

CIM: Concentração Mínima Inibitória; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos; Extratos de *T. recurvata* testados - EAc: extrato de acetato de etila; EAq: Extrato aquoso; EHa: extrato hidroalcoólico; EHex: extrato hexânico; EMe: extrato metanólico; Mss: microssublimado; M1: molécula isolada; Antibióticos Padrão – CIP: Ciprofloxacino; TEI: Teicoplanina; POL B: Polimixina B; IMI: Imipinem

Tabela 2- Valores de CIM dos extratos de *T. recurvata* e antibiótico padrão frente à cepas MRSA.

MICRORGANISMO <i>Staphylococcus aureus</i>	ORIGEM	CIM DOS EXTRATOS TESTADOS ($\mu\text{g/mL}$)			PADRÃO (CMI - $\mu\text{g/mL}$)
		EAc	M1	Mss	OXA
LFBM 16	Hemocultura	500	500	500	0,77
LFBM 28	Secreção Traqueal	500	500	500	12,5
LFBM 15	Escarro	500	500	500	250
LFBM03	Alimento	500	500	500	155
LFBM 29	Sangue	500	500	500	12,5
LFBM 24	Hemocultura	250	500	500	155
LFBM33	Hemocultura	500	500	500	200
LFBM 30	Secreção traqueal	500	500	500	12,5
LFBM 25	Hemocultura	500	500	500	200
LFBM 26	Hemocultura	125	500	15,62	800

CIM: Concentração Mínima Inibitória; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; Extratos de *T. recurvata* testados - EAc: extrato de acetato de etila; Mss: microssublimado; M1: molécula isolada; Padrão OXA: Oxacilina.

Tabela 3 - Valores de CIM para EAc de *T. recurvata* e teicoplanina frente à cepas resistentes de *Enterococcus faecalis*.

MICROORGANISMO <i>E. faecalis</i>	ORIGEM	CIM do EAc ($\mu\text{g/mL}$)	PADRÃO (CMI - $\mu\text{g/mL}$) TEI
LFBM 01	Hemocultura	7,8	16
LFBM 02	Hemocultura	3,9	8
LFBM 03	Hemocultura	7,8	8
LFBM 04	Hemocultura	3,9	32
LFBM 08	Hemocultura	3,9	0,25
LFBM 10	Hemocultura	7,8	32
LFBM 11	American Type Culture Collection	3,9	8
LFBM 12	Hemocultura	3,9	4
LFBM 14	Hemocultura	125	0,25
LFBM 19	Hemocultura	500	8
LFBM 21	Hemocultura	3,9	32

CIM: Concentração Mínima Inibitória; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; EAc: extrato de acetato de etila de *T. recurvata*; Padrão TEI: Teicoplanina.

Capítulo IV

**ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE
Tillandsia recurvata L.**

1. INTRODUÇÃO

O câncer configura-se um dos principais problemas de saúde pública mundial, podendo ser definido como uma patologia que acomete o material genético celular, resultante do acúmulo progressivo de mutações, caracterizado pela perda nos mecanismos de controle celular de proliferação e diferenciação, poder de invasão sobre outros tecidos e metástases (KUMAR & BHAT, 2011; OTAKE, 2006).

Dentre os tumores malignos que mais acometem a população, um dos mais comuns é o de pulmão, sendo este o segundo maior sítio anatômico de metástases (JOHNSTON, 2005). Este tipo de neoplasia tem apresentado um aumento anual de 2% em sua incidência mundial, onde em 2009 foi responsável por mais de 21 mil óbitos no Brasil, com uma perspectiva de 27.320 novos casos somente este ano (INCA, 2011).

As neoplasias que acometem o cólon e o reto representam o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo, após o câncer de mama, com uma estimativa de 2,4 milhões de casos nos últimos cinco anos, onde grande parte desses tumores se inicia a partir de lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso, chamadas pólipos. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer do cólon e reto é o quinto tipo mais frequente de neoplasias para homens da região nordeste. Em 2009, cerca de 12 mil pessoas foram mortas por este tipo de câncer no Brasil (INCA, 2004,2011).

Conforme dados do Instituto Nacional de Câncer, do Ministério da Saúde, o câncer da laringe é o segundo mais frequente do trato respiratório superior, sendo responsável por 25% dos tumores malignos da cabeça e pescoço e 2% do total das neoplasias malignas. Por se tratar de uma patologia que atinge principalmente os homens, as projeções de incidência para o ano de 2012 não conseguiram estimar os valores para a morbidade feminina desta doença. Ocorre predominantemente em homens sob o tipo histológico carcinoma epidermóide, chegando a uma taxa de mortalidade de 3,5 mil óbitos em 2009 (MANFRO, 2006; INCA, 2011).

A figura 1 relaciona as estimativas para o ano de 2012 na incidência dessas neoplasias.

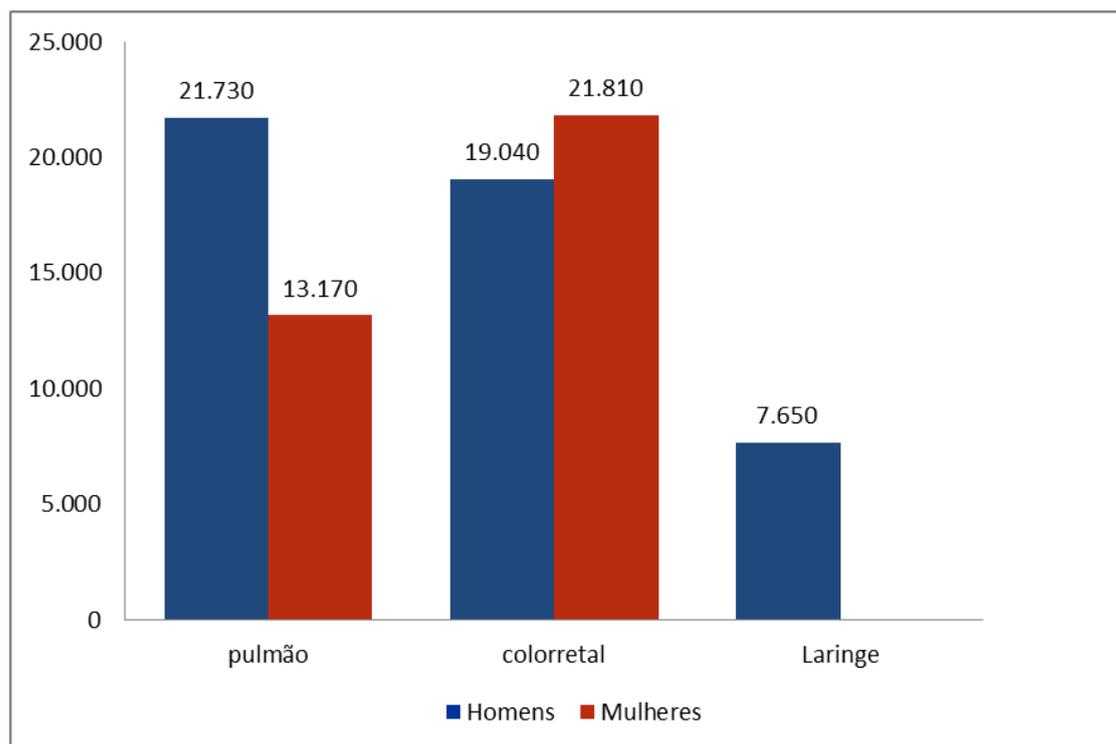


Figura 1 - Estimativas para o ano de 2012 da incidência de novos casos de câncer. Fonte: INCA (2011).

Compostos de origem natural têm mostrado significativa diversidade estrutural além de apresentar novos mecanismos de atividade biológica, desempenhando um importante papel como fonte de novos agentes citotóxicos na busca pelo tratamento do câncer (CRAGG, KINGSTON & NEWMAN, 2005). Dessa forma, os princípios ativos de muitas espécies, como *Angelica gigas*, *Catharanthus roseus*, *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodii*, *Taxus brevifolia*, *Ocrosia elliptica*, e *Campototheca acuminata*, têm sido utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, sendo muitos deles usados como protótipos estruturais para elaboração de novos quimioterápicos (PATEL, SUTHAR & PATEL 2009). Uma análise dos agentes antineoplásicos utilizados nos países ocidentais, demonstrou que do total de 155 compostos introduzidos no mercado desde 1940, cerca de 47% apresentam-se como derivados de produtos naturais ainda em comercialização (NEWMAN & CRAGG, 2007). Muitas pesquisas da área farmacêutica realizadas em países tecnologicamente desenvolvidos, como Alemanha, França, Estados Unidos, Japão e China, tem buscado o desenvolvimento de fitoterápicos de melhor qualidade a serem utilizados no tratamento do câncer, visto que muitas plantas possuem a propriedade de proteger o corpo devido ao reforço de suas funções antioxidantes (SAKARKAR & DESHMUKH, 2011).

Os agentes etiológicos da neoplasia podem apresentar diferentes origens, tais como a radiação ionizante luz ultravioleta, tabagismo, ozônio ou óxidos de nitrogênio no ar poluído, podendo assim ser os responsáveis pelos danos ao DNA celular. Esses agentes acabam por induzir o incremento na produção dos radicais livres, que desenvolvem um importante papel na carcinogênese através da danificação do material genético, alterando a expressão gênica ou afetando o crescimento e diferenciação da célula (DEMEULE *et al.*, 2002).

Muitos compostos do metabolismo secundário vegetal, como flavonas, flavonóides, isoflavonas, catequinas, e taxanos, produzidos inicialmente para o combate contra microrganismos invasores ou em resposta ao estresse fotossintético, apresentam-se ativos farmacologicamente na prevenção ou tratamento de diferentes tumores (MEDINA, 2006). Devido a sua capacidade antioxidante, muitos compostos fenólicos, como flavonóides, ou mesmo alguns terpenos, possuem a capacidade de neutralizar essas espécies reativas de oxigênio, desempenhando um importante papel anticancerígeno sobre determinadas células (DEMEULE *et al.*, 2002, WONG, KADIR, & LING, 2012).

Diante dos dados apresentados, observa-se a necessidade de estudos que evidenciem o potencial anticancerígeno de *Tillandsia recurvata*, uma vez que não existem estudos sobre esta espécie contra as linhagens aqui testadas. Desta forma realizaram-se ensaios de citotoxicidade *in vitro* de extratos e frações purificadas da espécie citada contra três tipos de neoplasias clinicamente relevantes, sejam elas carcinoma de cólon, de laringe e de pulmão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a realização dos ensaios, amostras de *Tillandsia recurvata* foram coletadas no município de Cuité, e depositadas em dois diferentes herbários (*vide* capítulo I).

2.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados no processo extrativo foram de grau analítico: n-hexano, acetato de etila, metanol (Cinética[®]). Para o ensaio citotóxico foram utilizados dulbecco's modified eagle medium (Gibco[®]), soro fetal bovino (Gibco[®]), L - glutamina

(Sigma[®]), penicilina (FlukaChemie[®]), estreptomicina (Sigma[®]) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (Sigma[®]).

2.3 Preparação dos extratos

A obtenção dos extratos foi realizada através da maceração das partes aéreas de *T. recurvata* em solventes de polaridade crescente (*vide* capítulo I) para obtenção frações hêxanica (**EHx**), acetato de etila (**EAc**), metanólica (**EMe**), além da molécula purificada (**M1**). Baseado nos usos etnofarmacológicos desta espécie, foi preparado adicionalmente um extrato aquoso (**EAq** - *vide* capítulo II) a partir da infusão da planta fresca, para que também fosse avaliado frente às linhagens de células testadas. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 50 µg/mL para extratos ou frações.

2.4 Ensaio Citotóxico *in vitro*

A atividade citotóxica foi avaliada através do método MTT, que baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio em azul de formazan a partir da ação das enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Este método descrito inicialmente por Mossman (1983) é amplamente utilizado atualmente pela sua rapidez, sensibilidade e baixo custo, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, atuando como um indicador de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999) (Fig. 2). O estudo citotóxico pelo método do MTT trata-se de um método colorimétrico quantitativo, permitindo assim definir facilmente a citotoxicidade, porém não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

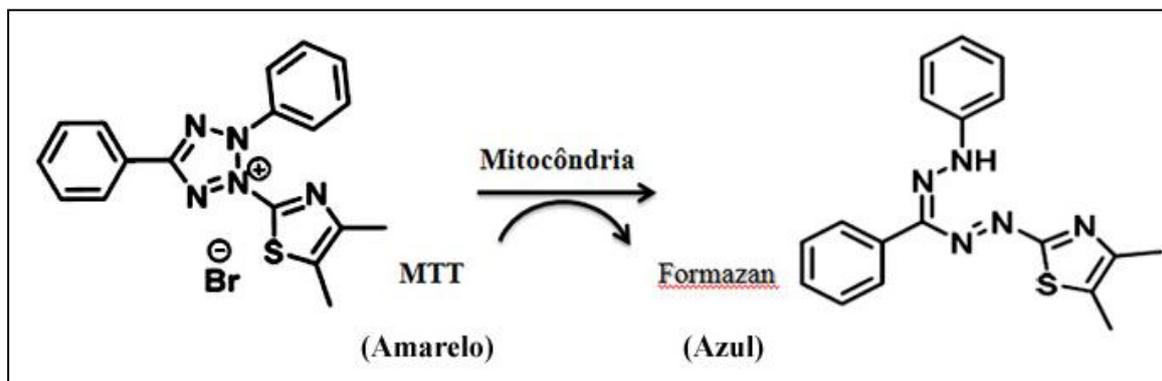


Figura 2 – Reação de formação do azul de formazan através da ação enzimática das mitocôndrias sobre o MTT.

As linhagens antitumorais utilizadas foram HT-29 (carcinoma humano de cólon), HEP-2 (carcinoma humano de laringe) e NCI-H292 (carcinoma humano de pulmão). Elas foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo dulbecco's modified eagle medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%), L – glutamina (1%), penicilina (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e estreptomicina (250 $\mu\text{L}/\text{mL}$). As placas foram incubadas durante 24h a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂, para obtenção de concentração final de 1 x 10⁵ células/mL. Após esse período, as células foram tratadas com os extratos em concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As placas foram incubadas novamente por 72 horas a 37°C sob as mesmas condições anteriores e, depois desse período, foi adicionado como indicador uma solução tampão salina de MTT (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido de incubação por mais 3 horas. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas Thermoplate –TP Reader[®] a 595 nm, após a total dissolução dos cristais de formazan com 100 μL de dimetilsulfóxido estéril (WONG, KADIR, & LING, 2012). A densidade óptica média das amostras foi comparada com a densidade do controle e cada amostra foi realizada em duplicata.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios no programa Graph Pad Prism. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas e os resultados expressos em percentual de inibição de crescimento. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%) (FOUCHE *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do método extrativo de maceração foram obtidos diferentes extratos brutos secos (EHx, EAc, EMe, EAq) com rendimentos de 0,606; 2,171; 5,2 e 15,6%, respectivamente (*vide* capítulo III). Os estudos fitoquímicos (cap.I) revelam forte presença de flavonóides, fenilpropanoglicosídeos além de diversos compostos de origem terpênica. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo amplamente utilizada no programa de triagem do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), usada como processo de triagem e seleção de compostos para a realização de posteriores ensaios pré-clínicos e clínicos, mostrando-se ser um método eficaz na verificação desta atividade (SKEHAN *et al.*, 1990; BOYD & PAULL, 1995, KOFFI *et al.*, 2009). Os resultados obtidos para os ensaios de citotoxicidade estão agrupados na Tabela 1.

Tabela 1- Percentual de inibição do crescimento celular \pm desvio padrão das linhagens testadas frente às amostras de *Tillandsia recurvata*.

AMOSTRAS	LINHAGENS		
	NCI-H-292	HT-29	HEp-2
EHx	49,9 \pm 5,1	13,9 \pm 0,2	76 \pm 0,3
EAc	36,8 \pm 3,1	42,6 \pm 1,1	48,2 \pm 6,6
EMe	35,9 \pm 0,8	21,8 \pm 0,5	47,5 \pm 0,3
EAq	39,8 \pm 2,9	48,7 \pm 1,5	27,2 \pm 1,9
M1	44,9 \pm 8	-	54,3 \pm 3

NCI-H-292 (carcinoma de pulmão), HT-29 (carcinoma de cólon), HEp-2 (carcinoma de laringe), EHx - extrato hexânico, EAc - extrato acetato de etila, EMe - extrato metanólico, EAq - extrato aquoso, M1 - molécula purificada.

A partir dos dados apresentados, observa-se que as amostras EAc, EMe, EAq apresentam pouca atividade frente às linhagens de carcinoma humano de cólon, laringe e pulmão testadas. A amostra M1 apresentou atividade moderada para o carcinoma de laringe e o extrato hexânico mostrou uma alta atividade contra essa mesma linhagem de neoplasia, sendo o extrato mais ativo (Fig. 3)

Diversas publicações têm sido descritas relatando o potencial dos metabólitos secundários na inibição da carcinogênese, sendo úteis não só no tratamento, mas também na prevenção das neoplasias (YANG *et al.*, 2001). Huang *et al.* (1997), relatam a ação de alguns fenilpropanóides como os ácidos caféico, ferúlico, clorogênico e curcumina em ensaios *in vivo* sobre tumores de pele impedindo a proliferação celular. Esses mesmos derivados cinâmicos juntamente com o ácido gálico apresentaram ação sobre tumores de língua em camundongos (TANAKA *et al.*, 1993). Ensaio de citotoxicidade *in vivo* foram realizados em ratos com melanoma, demonstrando que a aplicação intraperitoneal de quercetina e apigenina era responsável pela ação antiproliferativa do tumor (CALTAGIRONE *et al.*, 2000).

Muitos compostos de origem terpênica também têm sido descritos por apresentarem essa propriedade, como monoterpos encontrados em *Cymbopogon citratus*, triterpenos e esteroides em *Clitoria ternatea* e nove diferentes triterpenos em *Gardenia sootepensis* (KOFFI *et al.*, 2009; NUANYAI *et al.*, 2009; WONG, KADIR, & LING, 2012; KUMAR & BHAT, 2011). Dos terpenos isolados desta última espécie, cinco eram do tipo 3,4-seco-cicloartanos e foram testados contra diferentes linhagens de câncer de mama, pulmão, fígado estômago e cólon, apresentando ampla citotoxicidade para todas as linhagens analisadas. Esses mesmos compostos foram encontrados em *Tillandsia usneoides* (CABRERA, GALLO & SELDES, 1995), mostrando a capacidade de triterpenos cicloartanos serem os possíveis agentes antineoplásicos no gênero *Tillandsia*.

Segundo estudos realizados por Lowe (2010) com uma espécie originária da Jamaica, observa-se que *T. recurvata* apresenta alta atividade anticancerígena contra os tumores testados através da indução da morte de células tumorais por apoptose, além de possuir potencial anti-inflamatório. As linhagens utilizadas neste ensaio foram de melanoma B16, considerado um bom modelo para estudos de tumores metastáticos, tendo afinidade quase que exclusiva para o tecido pulmonar (HOSSNE, 2002). Esta atividade foi atribuída à presença de glicosídeos de ácido siálico, conjugados a estruturas triterpênicas, compondo uma família química estruturalmente única composta por monossacarídeos contendo de 8 a 9 carbonos. Sua interação com a membrana celular, de caráter lipídico, é facilitada devido à natureza da polaridade deste composto.

Dessa forma, os resultados obtidos nos ensaios realizados com essa espécie originária do semiárido paraibano, corroboram os estudos apresentados, uma vez que o

extrato que apresentou maior atividade (EHx), por possuir menor polaridade, é o detentor da maior parte desses terpenos, apresentando-se como amostra mais ativa.

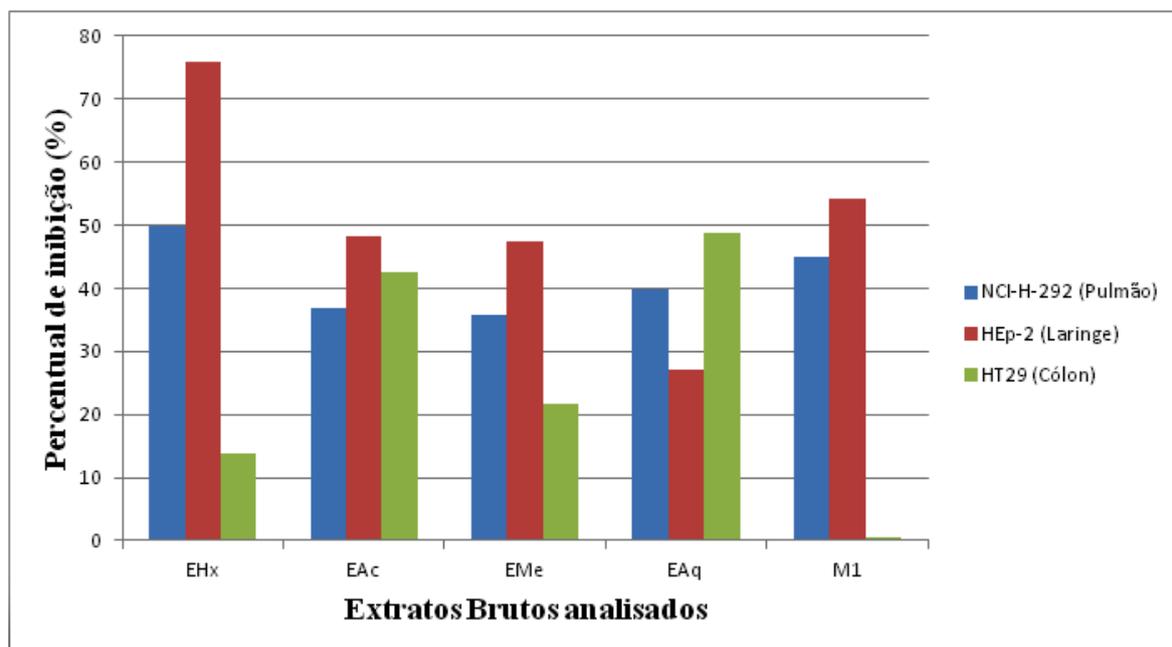


Figura 3- Comparação do percentual de inibição dos extratos brutos de *Tillandsia recurvata* testados contra linhagens de células neoplásicas. EHx: extrato hexânico; EAc: extrato acetato de etila; EMe: extrato metanólico; EAq: extrato aquoso; M1: molécula purificada do extrato hexânico.

CONCLUSÕES GERAIS

A família Bromeliaceae apresenta uma grande diversidade de espécies em sua composição com inúmeros metabólitos descritos. Dentre as epífitas presentes, as do gênero *Tillandsia* são responsáveis pela presença de flavonóides, terpenos e derivados cinâmicos, além de várias atividades biológicas, demonstrando o interesse no estudo destas espécies. Representam assim, uma fonte pouco explorada, pois os escassos estudos existentes na área não foram conclusivos a respeito de qual grupo de moléculas é o responsável pelas propriedades desse *taxa*. Dessa forma, estudos farmacobotânicos, farmacocômicos, antibacteriano e citotóxico foram realizados em *T. recurvata* com o objetivo de contribuir cientificamente com os conhecimentos farmacognósticos e terapêuticos a respeito desta espécie.

Do ponto de vista químico, evidenciou-se a presença de triterpenos e esteróides, possivelmente da classe dos cicloartanos, flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos, em concordância com a literatura pertinente. Quanto ao teor de

compostos fenólicos e flavonóides nesta espécie, os testes espectrométricos revelaram um teor de 14,6% de polifenóis totais e 0,021 g% de quercetina ($0,00017 \pm 0,080$), podendo-se mensurar a presença dessas substâncias.

Através da identificação botânica e descrição morfológica foi possível a correta caracterização botânica da espécie, evidenciando-se através de cortes transversais e paradermicos as características anatômicas desenvolvidas por esta espécie, essenciais no processo evolutivo de adaptação desta epífita aos diferentes *habitats* em que se encontra. A histoquímica das secções transversais revelou que os compostos fenólicos também detectados na fitoquímica apresentam-se distribuídos ao longo das células epidérmicas, na superfície das paredes periclinais internas e externas, sendo este resultado confirmado pela microscopia de fluorescência. Estes compostos, por apresentarem alta capacidade antioxidante e fotoprotetora, desempenham um papel de proteção contra os diversos estresses ambientais a que estão expostas.

Além da determinação destes aspectos, ensaios antibacteriano e citotóxico foram realizados, demonstrando que essa espécie possui um perfil antibacteriano efetivo contra microrganismos Gram positivos, principalmente *S. aureus* e *E. faecalis* multirresistentes, além de possuir um alto efeito citotóxico contra linhagens tumorais de câncer de laringe.

Diante dos resultados obtidos, é possível inferir que *Tillandsia recurvata* é uma espécie promissora com propriedades antibacterianas e citotóxicas, podendo ser considerada como alternativa na busca por novos agentes eficazes contra doenças infecciosas e neoplásicas, como fonte de biomoléculas de interesse. Os resultados encontrados corroboram o uso popular, fornecendo comprovação científica acerca de suas propriedades desta espécie, de ocorrência natural e de ampla distribuição, sendo, porém necessários maiores estudos para sua utilização terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A.B.; TORRES, P.A.; BUCHER, E.H. **The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland.** Journal of Tropical Ecology. v. 21. n. 103. p. 107, 2005.
- ALBUQUERQUE UP, MEDEIROS PM, ALMEIDA AL, MONTEIRO JM, NETO EMLF, MELO JG, SANTOS JP. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach.** Journal of Ethnopharmacology. v. 114. p. 325 - 354, 2007.
- ALVES, C.F.S.; CUNHA J.; BIANCHIN N.; ZAGO, A.C.R.; LOPES, L.Q.S.; SCHNEIDER T.; PAZ, M.B.; CHRIST, R.V.S. **Atividade antimicrobiana de *Tillandsia recurvata*.** In: Anais do V simpósio Brasileiro de Microbiologia aplicada. 5, 2011. *Resumos*. Porto Alegre: 103 p.
- ANESINI C.; PEREZ C. **Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity.** Journal of Ethnopharmacology. v. 39. p. 119 - 128, 1993.
- APG - The Angiosperm Phylogeny Group. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering plants: APG II.** Botanical Journal of the Linnean Society. v. 141. p. 399 - 436, 2003.
- ARAMBARRI AM, MANDRILE EL. ***Tillandsia* L. (Bromeliaceae): Anatomy and Ethnopharmacology.** Acta Horticulturae. v. 503, 1999.
- ARSLANIAN, R.L.; STERMITZ, F.R.; **3-Methoxy-5-Hydroxyflavonols from *Tillandsia purpúrea*.** Journal of Natural Products. v. 49. n. 6, 1986.
- ASPIAZU J, CERVANTES L, RAMÍEZ J, LÓPEZ J, RAMOS R, MUÑOZ R, VILLASEÑOR P. Temporal and spatial trends studied by lichen analysis: atmospheric deposition of trace elements in Mexico. *Revista Mexicana de Física*. v. 53. p. 87 - 96, 2007.
- BARBOZA, G.E.; CANTERO, J.J.; NÚÑEZ, C.; PACCIARONI, A, ESPINAR, L.A. **Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora.** Kurtziana. v. 34. n.1-2. p. 7 - 365, 2009.
- BARNES, J.; ANDERSON, L.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicines.** 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.

- BENNET, BC. **Ethnobotany of Bromeliaceae**. In: BENZING, D. H. Profile of an adaptative radiation. Cambridge University. 2000; 14.
- BENZ, B.W.; MARTIN, C.E. **Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic Tillandsia (Bromeliaceae)**. Brazilian Journal of Plant Physiology. v. 163. p. 648 – 656, 2006.
- BENZING DH, SEEMAN J, RENFROW A. **The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection**. American Journal of Botany. v.65. p. 359 – 365, 1978.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. USA: Cambridge University Press, 2000.
- BENZING, D.H. **Vascular Epiphytes**. Cambridge University Press.1990.
- BENZING, DH. **The Biology of Bromeliads**. Mad River Press.1980.
- BENZING, D.H. **The monocotyledons: their evolution and comparative biology. I. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae**. The Quarterly Review of Biology. v. 48. p. 277 – 290, 1973.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* **The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts**. Biochemica. v. 4, p. 14-19. 1996.
- BLANCO, M.G.; MEJIA, C.; ISTURIZ, R.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZOE, E.; LABARCA, J.; LUNA, C.M; NORIEGA, E.R., SALLES, M. J.C.; ZURITA , J.; SEAS C. **Epidemiology of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Latin America**. International Journal of Antimicrobial Agents. v. 34. p. 304 – 308, 2009.
- BONNET A, CURCIO GR, GALVÃO F. **Epifíticas vasculares e suas relações com fatores ambientalismo rio Tibagi, Paraná, Brasil**. In: Anais do 8. Congresso de Ecologia do Brasil. 2007 set. 23-28; Minas Gerais, Brasil.
- BOYD, M.R.; PAULL, K.D. **Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute *in vitro* Anticancer Drug Discovery Screen**. Drug Developmente Resarch. v. 34. p. 91 - 109, 1995.
- BRIGHIGNA L, MONTAINI P, FAVILLI F, TREJO AC. **Role of The Nitrogen-Fhxing Bacterial Microflora in The Epiphytism of Tillandsia (Bromeliaceae)**. American Journal of Botany. v.79. n. 7. p. 723 – 727, 1992.
- CABRERA GM, SELDES AM. **Short side - chain Cycloartanes from Tillandsia usneoides**. Phytochemistry.; .v 45. n 5. p. 1019 – 1021, 1997.

- CABRERA GM, SELDES AM. **Hydroperoxycycloartanes from *Tillandsia recurvata***. Journal of Natural Products. v. 58. n. 12. p. 1920- 1924, 1995.
- CABRERA, G.M.; GALLO M.; SELDES, A.M. **Cycloartane Derivatives from *Tillandsia usneoides***. Journal of Natural Products. v. 59. p. 343 – 347, 1996.
- CALTAGIRONE, S.*et al.* **Flavonoidsapigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential**. International Journal of Cancer. v. 87. p. 595 – 600, 2000.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos**. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. UFSC, 2003.
- CHANG, C.C.; YANG M.H.; WEN H.M.; CHERN, J.C. **Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods**. Journal of Food and Drug Analysis. v. 10. n. 3. p. 178 – 182, 2002.
- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. **Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L**. Planta. v.129. p. 167 - 174, 1976.
- CHUNG P.Y, NAVARATNAM P., CHUNG L.Y. **Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains**. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. v. 10. p. 25. 2011
- CIAU, Z.C.; LOEZA, W.B.; QUIJANO, L. **Triterpenoids from *Tillandsia fasciculata***. Journal of Natural Products. v. 64. n. 7. p. 953 – 955, 2001.
- CLSI – CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing *M100-S20*.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia Volume III**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- COURVALIN P, *et al.*
- CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. **Anticancer Agents from Natural Products**. CRC Press; Boca Raton, FL: 2005.
- CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2006.
- DAVENPORT, D.S.; MASSANARI, R.M.; PFALLER, M.A.; BALE, M.J.; STREED, S.A.; HIERHOLZER, W.J.J. **Usefulness of a test for smile production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative Staphylococci**. Journal of Infectious Diseases. v. 153. p. 332-339, 1986.

- DELAPORTE R.H.; GUZEN K.P.; JUNIOR A.L.; SANTOS A.R.; SARRAGIOTTO M.H. **Phenylpropanoid glycerols from *Tillandsia streptocarpa* Baker (Bromeliaceae)**. *Biochemical Systematics and Ecology*. v.34. p. 599 - 602, 2006.
- DELAPORTE, R.H.; SARRAGIOTTO, M.H.; TAKEMURA, O.S.; SANCHEZ, G.M.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. **Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae**. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 95. p. 229, 2004.
- DEMEULE, M.; LEVESQUE, J.M.; ANNABI, B.; GINGRAS, D.; BOIVIN, D.; JODOIN, J.; LAMY, S.; BERTRAND, Y.; BÉLIVEAU, R. **Green Tea Catechins as Novel Antitumor and Antiangiogenic Compounds**. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. v. 2. p. 441 - 463, 2002.
- DEMO, M.S.; OLIVA M.M. **Antimicrobial activity of medicinal plants from South America**. In: Preedy, V.; Watson, R. *Botanical Medicine and Clinical Practice*. Oxford USA Professio. United States: 2008.
- FERNÁNDEZ, M.A; GARCIA, M.D; SÁENZ, M.T. **Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia***. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 53. p. 11-14, 1996.
- FORZZA, R.C., COSTA, A., SIQUEIRA FILHO, J.A., MARTINELLI, G. 2010. **Bromeliaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [Acesso em 01 out. 2010]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006399>>
- FOUCHE, G. *et al.* **In vitro anticancer screenin of South African plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, n. 3, p. 455 - 461, 2008.
- FRESHNEY, R. I. *Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide*. New York, 1999.
- GÁLVEZ, M.; CORDERO, C.M.; AYUSO, M.J. **Pharmacological activities of phenylpropanoids glycosides**. *Atta-ur-Rahman: Studies in Natural Products Chemistry*. v. 33. p . 675 – 718, 2006.
- GBIF - Global Biodiversity Facility. **Species: *Tillandsia recurvata* L.** [Acesso em 13 out. 2010]. Disponível em: <http://www.gbif.org/>
- GENTRY, A.H.; DODSON, C. *Contribution to Nontrees to Species Richness of a Tropical Rain Forests*. *Biotropica*. v. 19. p. 149 – 156, 1987.

- GIBBONS, S. **Anti-staphylococcal plant natural products**. Natural Product Reports. 2004.
- GILMARTIN AJ. **Trichomes of some equadorian Bromeliaceae**. Morris Arboretum Bulletin. v. 23. p. 19 – 23, 1972.
- GRACIANO, C.L, FERNÁNDEZ, V. CALDIZ, D.O. **Tillandsia recurvata L. as a bioindicator of sulfur atmospheric pollution**. Ecología austral. v. 13. p. 3 – 14, 2003.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992**. Phytochemistry. v. 55. p. 481 - 504, 2000.
- HERZ W, WATANABE K, KULANTHAIVEL P, BLOUNT JF. **Cycloartanes from Lindheimera Texana**. Phytochemistry. v. 24. p. 2645, 1985.
- HOSSNE, R.S. **Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho. Implantação do modelo no Brasil**. Acta Cirurgica Brasileira. v.17. n. 4, 2002.
- HUANG, M.T. *et al.* **Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light induced complete carcinogenesis in SKH- 1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea**. Cancer Research. v. 57. p. 2623 – 2629, 1997.
- IKIGAI, H., NAKAE, T., HARA, Y. AND SHIMAMURA, T. **Bactericidal catechins damage the lipid bilayer**. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1147. p. 132 – 136, 1993.
- ISCAM - The International Society of Crassulacean Acid Metabolism. **Protocol for demonstration of Crassulacean Acid Metabolism - Induction in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum***. 2003. Acesso em: 04/10/10. Disponível em: <<http://www.ag.unr.edu/cam/education.htm>>.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw-Hill Book Company; 1940.
- JOHNSTON MR, PERROT M. **Metastatic cancer to the lung**. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. Philadelphia: J. B. Lippincott; 2005. p. 2337-51.
- JOLY, AB. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora nacional; 2002.

- KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. **Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease**. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. v. 15. p. 308-20. 2004.
- KOFFI, K.; KOMLA S.; CATHERINE G.; CHRISTINE R.; PIERRE, C.J. LAURENCE, N. **In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo**. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. v. 4. p. 29 - 34, 2009.
- KOMAROVA, N.I. *et al.*, **Quantitative HPLC determination of main flavonoid content in *Rhododendron adamsii* leaves and stems**. *Chemistry of Natural Compounds*. v. 45. n. 1, 2009.
- KRAUS, JE, ARDUIN M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, Edur. 1997.
- KUMAR, S. BHAT, K.I. **In vitro cytotoxic activity studies for *Clitoria ternatea* Linn flower extracts**. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. v. 6. n. 2, 2011.
- LAGOS, J.B. **Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas de *Trichilia catigua* A. JUSS. MELIACEAE**. 2006. 99 p. Dissertação (Dissertação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: Yunes, RA; Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Santa Catarina: Argos Editora Universitária, p. 481-501. 2001.
- LINDER PL, RUDALL PJ. **Evolutionary History of Poales**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. v. 36. p. 107 – 124, 2005.
- LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. **Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells)**. *Ciência Rural*, v.35, n.2, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. *Plantarum*. 2002.
- LOWE H. **Anti-tumor and anti-inflammatory extracts of plant biomass and their uses**. *United States Patent Application*. 2010.

- LUGO, M.T.G.; SINGH, M.P.; MAIESE, W.M.; TIMMERMANN, B.N. **New Antimicrobial Cycloartane Triterpenes from *Acalypha communis***. *Journal of Natural Products*. v. 65. p. 872 - 875, 2002.
- LUTHER, HE. **An Alphabetical List of Bromeliad Binomials**. 10th ed. The Bromeliad Society International. 2006.
- MANETTI, L.M; Delaporte, R.H.; Junior, A.L. **Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae**. *Química Nova*. v. 32.n. 7. 2009.
- MANFRO, G.; DIAS, F.L.; SOARES, J.R.N.; LIMA, R.A.; REIS, T. **Relação entre idade, sexo, tratamento realizado e estágio da doença com a sobrevida em pacientes terminais com carcinoma epidermóide de laringe**. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 52. n. 1. p. 17 - 24, 2006.
- MAURER, HR. **Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use**. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v. 58. n. 1234 – 1245, 2001.
- MEDINA, E.J.; LORA, A.G.; PACO, L.; ALGARRA, I.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. **A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation**. *BMC Cancer*. v. 6. p.119, 2006.
- MERCEDEZ, E.S.I. **Análisis Fitoquímico y Actividad Antibacteriana de *Tillandsia recurvata***. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico, 2003.
- INCA - MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevalência e Vigilância. Estimativa 2005: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): 2004.
- INCA - MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevalência e Vigilância. Estimativa 2012: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): 2011.
- MORTON JF. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatan**. Charles C. Thomas Publisher. 1981.
- MOSSMAN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63. 1983.
- NACZK, M., SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food**. *Journal of Chromatography*. v. 1054, p. 95 -111, 2004.
- NADKARNI NM. **Epiphyte biomass and nutrient capital of a neotropical elfin forest**. *Biotropica*. v. 16. n. 4. p. 249 – 256, 1985.

- NARASIMHAN B, BELSARE D, PHARANDE D, MOURYA V, DHAKE A. **Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations.** European Journal of Medicinal Chemistry. v. 39. p. 827–834, 2004.
- NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Twelfth Informational Supplement M100-S12 NCCLS. Wayne, PA. , 2002
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years.**Journal of Natural Products. v. 70. p. 461 – 477, 2007.
- NOGUEIRA, M.G.C.; **Bromeliaceae na Reserva Biológica Municipal do Poço D’anta, Juiz de Fora, MG.** 2011. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Centro e Ensino Superior de Juiz de Fora, Minas Gerais.
- NUANYAI, T.; SAPPAPAN, R.; TEERAWATANANOND, T.; MUANGSIN, N.; PUDHOM, K.**Cytotoxic 3,4-seco-Cycloartane Triterpenes from *Gardenia sootepensis*.** Journal of Natural Products. v. 72. p. 1161 – 1164, 2009.
- OTAKE, A.H. **Câncer: novos alvos para o tratamento.** Ciência Hoje. v. 38. n. 223, p. 28-33. 2006.
- PAPINI, A.; TANI, G.; FALCO, P.D.I.; BRIGHIGNA, L. **The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome.** Flora. v. 205. p. 94 – 100, 2010.
- PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. **Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas.** Revista de Odontologia da UNESP.v. 36. n. 2. p.163-68, 2007.
- PATEL, S.R.; SUTHAR, A.P.; PATEL, R.M. **In Vitro Cytotoxicity Activity of *Semecarpus anacardium* Extract Against Hep 2 Cell Line and Vero Cell Line.** International Journal of PharmTech Research.v.1. n.4.p. 1429 - 1433, 2009.
- PAZ, E. A.; CERDEIRAS, M. P.; FERNANDEZ, J.; FERREIRA, F.; MOYNA P.; SOUBES M.; VAZQUEZ A.; VERO S.; ZUNINO L. **Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity.** Journal of Ethnopharmacology. v. 45. p. 67-70, 1995.
- PIGNATA ML, GUDIÑO GL, WANNAZ ED, PLÁ RR, GONZÁLEZ CM, CARRERAS HA, ORELLANA L. **Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor.** Environmental Pollution. v. 120. n. 59 – 68, 2002.

- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional. 1978; 6.
- PONTES RAS, AGRA MF. **Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae)**. Rodriguésia. v. 57. n. 1. p. 47 – 61, 2006.
- POSADAS, J.A.V.; FRANCO, A.E.B.; HERNÁNDEZ, G.L.; BRIBIESCA, M.G.R.; FERNÁNDEZ, H.R.O. **Morphoanatomical Characterization and Antimicrobial Activity of *Tillandsia imperialis* (Bromeliaceae)**. Polibotanica. v. 31. p. 21-29, 2011.
- POZZI, A.C.S.; **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em química analítica) – Programa de pós-graduação em química analítica. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2006.
- PROENÇA, S. L.; SAJO, M.G. **Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil**. Acta Botanica Brasilica. v. 21. n. 3. p. 657 – 673, 2007.
- PUENTE ME, BASHAN Y. **The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbours the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri***. Canadian Journal of Botany. v. 72, 1994.
- QUEIROGA MA, ANDRADE LM, FLORÊNCIO KC, AGRA MF, SILVA MS, FILHO JMB, CUNHA EVL. **Chemical constituents from *Tillandsia recurvata***. Fitoterapia. v. 75. p. 423 – 425, 2004.
- RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. ***Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 30. n. 2. p. 137-143, 2009.
- ROCHA FD, YANO M, CUNHA MR, GABRIEL FT, CORDEIRO RSB, MENEZES FS, KAPLAN MAC. **Brazilian Bromeliaceae species: isolation of arylpropanoid acid derivatives and antiradical potential**. Brazilian Journal of Pharmacognosy. v. 20. n. 2. p. 240 – 245, 2010.
- SAKARKAR, D.M.; DESHMUKH, V.N. **Ethnopharmacological Review of Traditional Medicinal Plants for Anticancer Activity**. International Journal of Pharm Tech Research. v. 3. n.1. p. 298 - 308, 2011.
- SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, C.A.N.; MATOS, L.V.A.P.; TEREZAN, A.P.; LEITE, A.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; GRAÇAS, M.F.; SILVA, F.; PIRANI, J.

- Constituintes Químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (SAPINDACEAE).** Química Nova. v. 33. n. 10. p. 2080 - 2082, 2010.
- SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários.** In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.
- SARTORATTO A, MACHADO A.L.M, DELARMELINA C. *et al.* **Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology. v. 35. p. 275-280, 2004.
- SCATENA VL, SEGECIN S. **Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica. v. 28. n 3. p. 635 – 649, 2005.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.
- SCOTT, D.; MABRY, T.J. **3,6,3',5'- tetrametroxy-5,7,4'-trihydroxyflavone from *Tillandsia usneoides*.** v.16. n. 7. p. 1114 - 1115, 1977.
- SEDGLEY, C.M.; NAGEL, A.C.; SHELBURNE, C.E.; CLEWELL, D.B.; APPELBE, O.; MOLANDER, A.L. **Quantative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans.** Archives of Oral Biology. v. 50. p. 575-83, 2005.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. **New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening.** Journal of the National Cancer Institute. v. 82. n. 13. p. 1107 - 1112, 1990.
- SMITH LB, DOWNS RJ. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. v. 14. n 1. p. 662, 1974.
- SMITH, LB. & DOWNS, RJ. **Bromelioideae (Bromeliaceae).** Flora Neotropica. v. 14. n 1493 – 2142, 1979.
- SMITH, LB. & DOWNS, RJ. **Tillandsioideae (Bromeliaceae).** Flora Neotropica. v. 14. n. 663. p. 1492, 1977.
- SMITH, LB. **The Seasick *Tillandsia*.** Bromeliad Society International Journal. v. 4. Acesso em: 20/11/11. 1951. Disponível em: <<http://journal.bsi.org/V01/4/>>.

- SMITH LB. **Geographical Evidences on the Lines of Evolution in the Bromeliaceae.** Botanischer Jahrbücher. v.66. n. 446 – 468, 1934.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVIK, P.R.; BASSANI, V.L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos.** In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; JÚNIOR, G.M.V.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. **Fenóis Totais e Atividade Antioxindadnte de Cinco Plantas Medicinais.** Química Nova. v. 30. n. 2. p. 351 - 355, 2007.
- STREHL, T. **Forma, Distribuição e Flexibilidade dos Tricomas Foliares Usados na Filogenia de Bromeliáceas.** Iheringia, Série Botânica. v. 31. p. 105 – 119, 1983.
- TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. orgs. **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco.** Apresentação Cláudio Marinho. vol. 2. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente. Editora Massangana. 2002.
- TABAREZ, M.R.; **Discovery of the new antimicrobial compound 7-O-malonyl macrolactin A.** 2005. 165p. *Tese* (Tese em Produtos Naturais). Braunschweig: Universität Carolo-Wilhelmina, 2005.
- TANAKA, T.*et al.* **Inhibition of 4- nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolicscaffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids.** Carcinogenesis. v. 14. p. 1321 – 1322, 1993.
- TOGASHI, N.; INOUE, Y.; HAMASHIMA, H.; TAKANO, A. **Effects of Two Terpene Alcohols on the Antibacterial Activity and the Mode of Action of Farnesol against Staphylococcus aureus.** Molecules. v. 13. p. 3069 - 3076, 2008,.
- TOMLINSON, PB. COMELINALES - ZINGIBERALES. In: METCALFE, C.R. & CHALCK. **Anatomy of the monocotyledons: III.** 1969; Claredon Press: 193-294.
- TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. **Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** Journal of Ethnopharmacology. v. 50. p. 27-34, 1996.
- ULUBELEN, A.; MABRY T.J. Revista Latino americana de Química. v. 13. n. 35, 1982.

- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
- WALDEMAR, C.C.; IRGANG, B.E. **A Ocorrência do Mutualismo Facultativo entre *Dyckia marítima* Backer (Bromeliaceae) e o Cupim *Cortaritermes silvestrii* (Holmgren), Nasutitermitinae, em Afloramentos Rochosos no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS**. Acta Botanica Brasilica. v. 17. n. 1. p. 37 – 48, 2003.
- WARD, F.E.; GARLING, D.L.; BUCKLER, R.T.; LAWLER, D.M.; CUMMINGS, D.P. **Antimicrobial 3-methyleneflavanones**. Journal of Medicinal Chemistry. v. 24. p. 1073 – 1077, 1981.
- WHITMORE, TC. **An introduction to Tropical Rain Forest**. New York: Oxford University Press., 1998.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO: report on infectious diseases 2000: overcoming antimicrobial resistance**. Geneva: 2000. acesso julho 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/>>
- WILLIAMS, C.A. **The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the bromeliaceae**. Original Research Article. Phytochemistry. v. 17. n. 4. p. 729 – 734, 1978.
- WONG, Y.H.; KADIR, H.A.; LING, S.K. **Bioassay-Guided Isolation of Cytotoxic Cycloartane Triterpenoid Glycosides from the Traditionally Used Medicinal Plant *Leea indica***. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012.
- YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds**. Annual Review of Nutrition. v. 21. p. 381 – 406, 2001.
- ZUANAZZI JAS, MONTANHA JA. **Flavonóides**. In In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.

Apêndice

ASPECTOS FARMACOGNÓSTICOS DE *Tillandsia recurvata* L.

(BROMELIACEAE)

(Artigo submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas)

RESUMO

A cobertura superior das florestas tropicais, formada pelas copas das árvores, constitui um ambiente de extrema diversidade vegetal. Contribuindo com a grande riqueza dessas florestas encontram-se as espécies botânicas epífitas, cuja importância pode ser observada do ponto de vista ecológico, faunístico, etnobotânico e até mesmo farmacológico. Dentre as espécies adaptadas à vida epifítica podemos citar as bromeliáceas, que compõem uma das famílias mais representativas dessa flora com elevada variabilidade genética. O gênero *Tillandsia* é formado por representantes que apresentam uma organização morfometabólica altamente especializada, podendo sobreviver aos mais diferentes tipos de ambientes extremos. *Tillandsia recurvata* é uma espécie epífita cosmopolita adaptada a *habitats* áridos, utilizada para o tratamento de diversas doenças, mas pouco se tem publicado a respeito das comprovações científicas de suas propriedades. Assim, observa-se a necessidade de trabalhos que informem a importância biológica e o potencial terapêutico acerca dos metabólitos desta espécie, promissora, porém pouco explorada farmacologicamente.

Palavras-chave: epífitas medicinais, bromélias, revisão.

**PHARMACOGNOSTICAL ASPECTS OF *Tillandsia recurvata* L.
(BROMELIACEAE)**

ABSTRACT

The upper cover of tropical forests, formed by the treetops, constitutes an environment of extreme plant diversity. Contributing to the great richness of these forests are epiphytes, whose importance can be seen from the ecological, faunal, ethnobotanical and even pharmacological standpoint. Among the species adapted to the epiphytic life we can cite the bromeliads, forming one of the most representative families of that flora and with high genetic variability. The genus *Tillandsia* is composed of representatives who have a highly specialized morphometabolic organization and can survive for many different types of extreme environments. A good example is *Tillandsia recurvata*, a cosmopolitan epiphyte adapted to a arid habitats weather, traditionally used to treat various diseases, little has been published about the scientific evidence of its properties. Thus, there is a need to work to inform the biological importance and therapeutic potential about the metabolites of this species, which is promising, but unexplored pharmacologically.

Key words: medicinal epiphytic, bromeliads, review.

1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais são caracterizadas por apresentarem um elevado grau de diversidade biológica, sendo consideradas como um dos mais complexos sistemas do planeta que guarda um elevado número de espécies endêmicas (WHITMORE, 1998).

O estrato superior das florestas tropicais também pode ser considerado como uma verdadeira fonte de biodiversidade, pois nesse ambiente de copa pode ser encontrada uma infinidade de espécies epífitas, que usam os seus hospedeiros como suporte para o seu desenvolvimento alternativo longe do solo. Com um total de 29.000 espécies catalogadas, elas contribuem com a imensa diversidade vegetal observada, uma vez que, representam de 8 a 10% do total de plantas vasculares conhecidas e colaboram com 25 a 50% da riqueza vegetal das florestas tropicais (Gentry, 1987; Benzing, 1990, 2000). Estas espécies desempenham um importante papel na composição vegetal destes ecossistemas e apresentam elevado grau de endemismo e adaptação a estes ambientes, sendo diretamente influenciadas pelo clima e nível de distúrbio antrópico, que determinam a sua distribuição nos ambientes que as compõem (Benzing, 1990; Bonnet, 2007). Apresentam grande importância para os animais que vivem nesse ambiente, seja como alimento (frutos, néctar e pólen), água ou mesmo material para a construção de ninhos, possibilitando assim uma maior variabilidade da fauna (Benzing 1990). Além disso, também exercem grande influência sobre o ciclo hidrológico e de nutrientes no interior das florestas, funcionando como uma zona de captura e posterior incorporação destes materiais para uso por outros vegetais (Nadkarni, 1985). Os representantes das bromélias constituem um grupo de plantas particularmente adaptado à vida epifítica.

A família Bromeliaceae, considerada como uma das mais representativas da flora neotropical, abrange 57 gêneros e cerca de 3000 espécies, onde 40% deste total pode ser

encontrado no Brasil. Uma grande variedade de hábitos também podem ser observados entre elas, diferenciando-se espécies epífitas, terrestres, ou mesmo rupícolas, o que faz dessa família uma das mais adaptáveis do mundo (Benzing, 2000; Luther 2006; Tabarelli, 2002). A primeira descrição data do século XVII, relatada pelo padre francês Charles Plumier, onde o novo conjunto de espécies descoberto foi batizado de bromélias em homenagem ao botânico sueco Olaf Bromel (Benzing, 1980). Atualmente, segundo critérios filogenéticos do sistema APG II (2003), pode ser classificada como a maior família de monocotiledôneas angiospermas, pertencente à ordem Poales. Apresenta uma ampla distribuição pela zona neotropical, indo desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Chile e ocupa diferentes *habitats*. No Brasil, ocorre desde as florestas úmidas do sul até as caatingas do Nordeste, onde possui frequência elevada e marcante (Smith 1934, Tabarelli, 2002). De um modo geral as bromeliáceas são conhecidas no Brasil pelo nome indígena de caraguatá, craguatá ou gravatá, que em tupi-guarani refere-se ao caráter de resistência do vegetal, porém com frutos comestíveis. No Nordeste são conhecidas popularmente como macambira (Joly, 2002). De acordo com a taxonomia tradicional, ela pode ser dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, diferindo entre si pelo hábito de crescimento, características de tricoma, tipo de fruto e semente e posição do ovário (Smith & Downs 1974; 1977; 1979).

As bromeliáceas são notáveis por sua diversidade ecológica e pelo alto poder de adaptação a diferentes *habitats*, podendo ser encontradas em ambientes desérticos, quentes e secos, e até mesmo em florestas úmidas e regiões montanhosas frias (Benzing, 2000). De forma geral, as espécies epífitas podem ser definidas como aquelas que utilizam o seu hospedeiro botânico, ou forófito, apenas como suporte mecânico a fim de conseguir melhores condições de sobrevivência. Além de espécies vegetais serem usadas como suporte, outros tipos de fulcro podem ser usados, tais como formações

rochosas, telhados ou até mesmo linhas de transmissão elétrica (Benzing, 1990, 2000; Puente, 1994).

De acordo com Linder (2005), as plantas adaptadas ao epifitismo encontradas nessa família evoluíram inicialmente das Poales ancestrais, que cresciam em substratos úmidos e pobres em nutrientes.

De todos os representantes desta ordem apenas metade das Bromeliaceae e poucas Rapateaceae conseguiram escapar da competição com outras plantas e sobreviver aos locais temporariamente alagados, fixando-se sobre árvores e rochas e desenvolvendo, paralelamente, uma série de adaptações que possibilitavam sua sobrevivência durante curtos períodos de estresse hídrico, podendo assim habitar o interior das matas úmidas (Benzing, 2000). A partir daí, passaram a ocupar o estrato superior das florestas, cuja atmosfera, com maior disponibilidade de água e nutrientes, favoreceu o desligamento dessas plantas do solo.

A partir do levantamento histórico da etimologia do gênero *Tillandsia*, sabe-se que para nomear esse grupo de plantas com características tão específicas, Carl Linnaeus decidiu homenagear o seu professor finlandês Elias Tillands. Este tinha adotado esse codinome para mostrar o seu apego a terra e sua extrema aversão à água, por sofrer de enjoos em viagens marítimas, preferindo percorrer longas distâncias por terra firme a viajar em um navio. Lembrando-se disso, Linnaeus achou essa pequena brincadeira apropriada, uma vez que os exemplares deste gênero pareciam preferir a vida longe da água como verdadeiras plantas aéreas, e desta forma passou a chamar esse gênero de *Tillandsia* (Smith, 1951). Estudos posteriores e mais detalhados mostraram como as espécies que constituem este gênero são capazes de sobreviver aos mais diferentes ambientes com tão pouca água. As adaptações determinantes para essa evolução consistiram na redução estrutural e funcional das raízes e na especialização

dos tricomas foliares, que se tornaram capazes de absorver o vapor de água condensado e assim suprir parcial ou totalmente a função absorptiva das raízes (Gilmartin 1972, Benzing, 1973, Benzing, 1978; Benz, 2006).

Poucas informações têm sido publicadas na literatura científica a respeito do metabolismo nutricional deste gênero. Os seus integrantes possuem forma de crescimento altamente especializada, pois apresentam a superfície foliar repleta de escamas epidérmicas foliares (tricomas modificados), enquanto que os minerais necessários são provenientes da poeira que os alcança, de insetos que ficam presos no emaranhado de suas estruturas foliares, através de relações mutualistas do tipo mirmecofilia (Waldemar, 2003) ou mesmo do lavado foliar que escorre pela copa das árvores.

Dentro desse gênero, pode-se encontrar *Tillandsia recurvata* como exemplo de epífita extremamente adaptada aos diferentes fatores de estresse que incidem sobre ela como radiação solar, aporte hídrico e mesmo a escassez de nutrientes. Além das adaptações citadas, alguns estudos também apontam para uma possível associação com alguns microrganismos como forma de suprir a falta de alguns nutrientes, que não possuem contato direto com o solo, tais como *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas oryzohabitans*, *Rahnella aquatilis* e *Erwinia* spp. Localizados na superfície vegetal, essa microbiota possui a capacidade de fixar o nitrogênio do ar, sendo estes os responsáveis por suprir parte das necessidades desse mineral para a planta, compondo a filosfera dessa espécie (Puente, 1994; Brighigna, 1992, Abril 2005). A capacidade que possuem de sobreviver a condições de elevado estresse baseia-se em fatores morfofisiológicos modificados ao longo do tempo. Espécies como esta, possuem raízes adventícias reduzidas (ou mesmo ausentes), desprovidas da capacidade absorptiva, apresentando unicamente a função de aderência ao substrato, permitindo assim uma

elevada independência do solo e grande adaptabilidade a ambientes extremos (Manetti, 2009).

2. APLICAÇÕES E USOS

Além do elevado número de espécies e da alta adaptabilidade das bromeliáceas, seus representantes também têm chamado atenção por suas diferentes utilizações, estando associados à história de diferentes etnias e utilizados como fonte de alimento, com finalidades terapêuticas ou mesmo místicas, por muitas culturas tradicionais neotropicais. Algumas espécies são úteis para a extração de fibras, como *Aechmea magdalenae*, *Puya chilensis*, *Bromelia laciniosa*, *Tillandsia usneoides*, usadas para a fabricação de redes, cordas, barbantes e até mesmo linha de pesca pelos nativos. Outras espécies de *Puya* e *Tillandsia* são utilizadas ainda como combustível para queima de fogueiras nos Andes e desertos costeiros Peruanos e Equatorianos ou mesmo usados como cercas vivas para demarcação de território. Outros representantes são utilizados como fonte de alimento na ração animal, como é o caso de *Aechmea tessmannii*, *Puya sodiroana*, *Pepinia pulchella* e *Tillandsia recurvata*. Na alimentação humana destaca-se *Ananas comosus*, apreciado no mundo todo por seu sabor e aroma característicos. Destaca-se na medicina popular por suas propriedades como estomáquico, carminativo, diurético e anti-inflamatório, sendo também indicado para problemas das vias respiratórias e para neurastenia (Lorenzi, 2002; Bennet, 2000).

Comunidades de espécies epífitas têm sido utilizadas no monitoramento das condições atmosféricas. Por apresentarem um metabolismo intimamente atmosférico, pois não possuem o solo como substrato, os representantes dessa família, como *Tillandsia recurvata*, têm a capacidade de fixar e acumular nutrientes dispersos na atmosfera. Consequentemente, óxido de nitrogênio, dióxido de enxofre, monóxido de

carbono e outros poluentes presentes no ar também acabam sendo absorvidos durante o metabolismo da planta. Por esta razão essas espécies são consideradas como bioindicadores, cuja a avaliação do conteúdo de seus tecidos reflete a contaminação atmosférica (Graciano, 2003; Pignata, 2002, Aspiazu *et al.* 2007)

Muitas espécies de bromélias também têm sido alvo de pesquisas devido ao seu elevado potencial farmacológico. Dentre as espécies representantes do gênero *Tillandsia*, pode-se destacar *T. recurvata*, que também pode ser identificada por outras sinonímias como *Diaphoranthema recurvata* Beer, *Diaphoranthema uniflora* Beer, *Tillandsia bartrami* Ell. Scketch, *Tillandsia uniflora* HBK.

Popularmente é conhecida como *small ball moss* ou *bunch moss*, nos Estados Unidos; *barba de úcar*, em Cuba; *clavel del aire* ou *flor del aire*, na Argentina e no Uruguai; sendo conhecida no Brasil como ninho, salambaia, samambaia de bola, barba de velho ou barba de bode pequeno (Correa, 1978; Albuquerque, 2007). Na Argentina, ela é usada tradicionalmente no tratamento de hemorróidas. Em Curaçao, Caribe, o decocto de suas folhas é considerado como emenagogo e útil no tratamento de problemas da vesícula biliar (Morton, 1981). No Uruguai, as partes aéreas são empregadas como antiespasmódico e útil no tratamento de infecções oculares (Paz, 1994). No Equador, é usada no tratamento de distúrbios da vesícula hepática, tosse, febre, dor de cabeça e dores no peito (Manetti, 2009). Além disso, Lowe e colaboradores (2010) evidenciaram o potencial farmacológico dessa espécie, através de algumas atividades biológicas como antitumoral e anti-inflamatória, comprovando cientificamente as suas propriedades.

3. DISTRIBUIÇÃO

De um modo geral, *Tillandsia recurvata* L. apresenta ampla distribuição em toda América tropical, podendo ser encontrada desde o Sul da América do Norte, na América Central (nas zonas chuvosas que fazem limite entre o golfo do México e as zonas semiáridas do sul da Baixa Califórnia, além do Caribe) e América do Sul (Smith & Downs 1977; Puente et al, 1994;). No Brasil, apesar de ser uma planta nativa, não se trata de uma espécie endêmica, uma vez que não ocorre em todas as regiões. Encontrase principalmente na costa do país apresentando como domínios fitogeográficos os biomas de caatinga, cerrado e mata atlântica, distribuindo-se pela região nordeste entre sete estados (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), em todo o sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e nos três estados da região sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Forzza, 2010- Fig.1).

4. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA

Estudos arqueológicos indicam que o epifitismo vascular existe desde, pelo menos, o período carbonífero e, para muitas das espécies atuais, esses padrões antigos ainda persistem. Mais que um estilo de vida, essas estratégias ecológicas e morfológicas permitiram que muitas espécies pudessem sobreviver no *habitat* das copas das florestas (Bennet, 2000). Sendo assim, *Tillandsia recurvata* (Fig. 2) pode ser caracterizada como uma epífita de 8 a 12 cm de altura, de caule inconspícuo e raízes rígidas. Folhas dísticas, fortemente cinéreas, recurvadas, lâmina com 4,3 a 5 cm de comprimento, aciculada, cinérea, ápice agudo, bainha com 4 a 5,5 × 3 a 4 mm, levemente distinta, membranácea. Escapo ereto, 3,5 a 8,5 cm de comprimento, bracteado. Inflorescência em espiga simples, excedendo as folhas, 1 a 1,5 cm de comprimento, brácteas florais com 7,5 a 8 × 3 a 3,5 mm, vináceas a cinéreas, elíptico-lanceoladas, ápice agudo, menor que as sépalas. Sépalas subconatas na base, 2 × 7,5 cm, elípticas, carenadas, glabras, ápice

acuminado. Pétalas com $9 \times 1,2$ mm, linear, ápice rotundo, lilases; estames inclusos, com 4,5 mm comprimento, soldados na base do ovário; filetes cilíndricos; ovárica. 3 mm de comprimento, subcilíndrico; estilete 0,8 a 1 mm de comprimento, cônico; estigma simples-ereto. Cápsula com 2,3-2,6 cm comprimento, valvas retas na deiscência; sementes 2 mm comprimento, apêndices 1,8 a 2 cm de comprimento, plumosos (Pontes et al., 2006).

Diversas espécies do gênero *Tillandsia* são caracterizadas pela relação de epifitismo com o seu hospedeiro, porém, diferentemente de outras espécies, essa se trata de um tipo bem particular. As suas raízes vivem por período curto de tempo e não possuem estruturas anatômicas capazes de reter a água absorvida, como ocorre com as orquídeas epífitas, por exemplo. O papel de captação de água é desempenhado por seus tricomas especializados em forma de escama presentes em grande número recobrando toda a superfície foliar, podendo-se dizer que alcançaram o mais alto grau de evolução morfológica e funcional. Na constituição dessas estruturas podem-se diferenciar dois grupos celulares característicos, o escudo e as alas (ou asas), que servem como interface entre a planta e o ambiente (Papini, 2010). Associado a essa adaptação extremamente necessária para sua sobrevivência em ambientes com recursos hídricos escassos, encontra-se outro importante fator na manutenção de um estado hídrico favorável: a via do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Trata-se de uma via fotossintética especializada através da qual a planta minimiza a evaporação de água pelo fechamento dos estômatos durante o dia e abertura durante a noite, permitindo, assim, a entrada de gás carbônico e uma reduzida perda de água (ISCAM, 2003).

A partir da observação microscópica das secções paradérmicas evidencia-se a presença de pêlos do tipo escamas (Fig. 3a) revestindo toda a lâmina foliar, distribuídas aleatoriamente em ambos os lados. De acordo com Papini (2010), os tricomas

absorventes em *Tillandsia* são constituídos por uma haste (Fig. 3b) que se prolonga para o interior do tecido, formada por 1 a 6 células sobrepostas. Estendendo-se sobre a epiderme encontra-se a cabeça (ou escudo), cujas células perdem o conteúdo citoplasmático e especializam-se no bombeamento de água. A partir de uma vista frontal desses tricomas modificados é possível observar o disco central e a ala periférica (Fig. 3c). Esse disco é formado por quatro células centrais, em torno das quais estão dois anéis celulares, sendo o interno constituído por oito células, denominado pericentral, e o externo formado por dezesseis células, chamado de subperiférico (Fig. 3a). O escudo das escamas apresenta um arranjo assimétrico devido aos diferentes comprimentos das células da ala (Fig. 3a). Estas são compostas por numerosas células periféricas, alongadas e dispostas radialmente, que cobrem completamente os estômatos em toda a extensão foliar e acabam sobrepondo-se umas às outras, dando um aspecto escamoso à superfície, sendo por isso também chamadas de escamas. O material em estudo apresentou as mesmas características descritas em Strehl (1983) e Proença (2007), para espécies coletadas no sudeste do país.

As células que compõem a superfície foliar possuem as paredes anticlinais levemente sinuosas (Fig. 3c), favorecendo o aumento da superfície de contato entre elas. Este fato faz com que o tecido epidérmico adquira uma maior resistência, característica importante durante as expansões e contrações foliares decorrentes da variação no turgor das suas células.

Em vista transversal, a epiderme se mostra unisseriada e revestida por cutícula delgada e paredes periclinais externas e internas espessadas (Fig. 4). O mesofilo é homogêneo e compacto, constituído por células de contorno arredondado, algumas vezes elíptico, e pequenos espaços intercelulares.

As células subepidérmicas da face adaxial são maiores que aquelas do mesófilo imediatamente abaixo, contendo menor quantidade de cloroplastos que as da face abaxial, sendo o parênquima clorofiliano constituído por células arredondadas. O mesófilo é homogêneo e compacto, constituído por células de contorno arredondado, algumas vezes elíptico, com reduzidos espaços intercelulares. Os feixes vasculares são colaterais, dispostos em uma única série ao longo da lâmina. Geralmente, os feixes maiores se alternam com os menores e estão circundados por 1-3 camadas de fibras, com paredes espessadas e lignificadas (Proença, 2007). A face adaxial da folha é côncava com elevação central. Possui o clorênquima com 5 a 10 feixes vasculares. A raiz não possui anéis fibrosos e a endoderme é imperceptível. O caule possui estrutura atactostele presente, porém sem células esclerenquimatosas (Arambarri *et al.*, 1999).

5. PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA DE TILLANDSIA RECURVATA

Metodologia

A amostra foi coletada no município de Cuité (6° 29' 6" S - 36° 9' 25" W), situado no semiárido paraibano na microrregião do Curimataú Ocidental, durante os meses de maio e junho de 2010. A planta foi identificada e catalogada no Herbário UFPE – Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 63661. Após a coleta, suas partes aéreas foram fixadas em FAA 50 (ácido fórmico, ácido acético e álcool etílico 5:5:90) (JOHANSEN, 1940) e, posteriormente, transferidas para água destilada. Para o estudo anatômico, secções transversais e paradérmicas da porção mediana das lâminas foliares foram obtidas à mão livre e submetidas ao processo de dupla coloração com safranina e azul de astra (Kraus, 1997) e montadas em glicerina sobre lâminas semipermanentes. Para realização desse estudo foram utilizados dois a

três indivíduos da mesma espécie. A análise das estruturas internas foi realizada através do uso de microscópio óptico.

Resultados e Discussão

As amostras da folha de *Tillandsia recurvata* mostraram, em vista frontal de sua superfície, pêlos do tipo escama (Fig. 3a), característico de outras espécies do mesmo gênero (Papini, 2010). Os pêlos se mostraram inseridos em uma depressão com uma haste constituída por três células (Fig. 3b). No ápice a estrutura está constituída por um disco formado por quatro camadas de células concêntricas, as centrais em número de quatro, a segunda formada por oito células, a seguinte por 16 células e a mais externa constituída por células alongadas e dispostas de modo radiado (Fig. 3a). Estas últimas células recobrem grande parte da superfície, incluindo os estômatos. Isto faz com que os estômatos não estejam sob incidência direta dos raios luminosos, reduzindo a perda de água por evapotranspiração quando os ostíolos estão abertos.

Os resultados encontrados confirmam as mesmas características descritas em trabalhos realizados por Strehl (1983) e Proença (2007). É interessante ressaltar as características de suas escamas e o fato de encontrarem-se dispostas desta forma, pois se trata de uma apomorfia para esta família, visto que essa sobreposição amplia a área superficial das escamas, aumentando a absorção de água e nutrientes nela dissolvidos, que podem ser encontrados no orvalho ou na chuva, por exemplo. Além desta função vital, os tricomas escamosos exercem funções diversas no vegetal, como reflexão da radiação solar, redução da transpiração e atração de polinizadores (Tomlinson, 1969; Benzing, 2000). No que se refere à obtenção de água, Scatena & Segecin (2005) ao analisarem espécies coletadas no Paraná relataram que suas folhas são do tipo anfiestomáticas, com estômatos anomocíticos. Assim, em conformidade com a literatura

consultada, esta espécie encontrada no semiárido paraibano apresentou, além das estruturas citadas, estômatos do tipo anisocítico (circundados por três células de tamanhos diferentes) (Fig. 3, c/d). Este fato favorece o aumento na condutância de gás carbônico no mesófilo devido à presença dessas estruturas em ambas as superfícies, sendo esta uma característica frequente para as *Tillandsia* atmosféricas extremas.

As células que compõem a superfície foliar possuem as paredes anticlinais sinuosas, favorecendo assim o aumento da superfície de contato entre elas. Este fato faz com que o tecido epidérmico adquira uma maior resistência, característica importante durante as expansões e contrações foliares decorrentes da variação no turgor das células. A epiderme é unisseriada e revestida por cutícula delgada, apresentando mesófilo homogêneo e compacto, constituído por células de contorno arredondado, algumas vezes elíptico, e com pequenos espaços intercelulares.

As células subepidérmicas da face adaxial são maiores que as outras do mesófilo e apresentam menos cloroplastos que as da face abaxial, sendo o parênquima clorofiliano constituído por células arredondadas. O mesófilo é homogêneo e compacto, constituído por células de contorno arredondado, algumas vezes elíptico, e com pequenos espaços intercelulares. Os feixes vasculares são colaterais e se dispõem em uma única série ao longo das lâminas. Geralmente, os feixes maiores se alternam com os menores e são circundados por 1-3 camadas de fibras pericíclicas, cujas paredes são espessadas e lignificadas (Proença, 2007; Fig. 4).

6. QUÍMICA - FITOCONSTITUINTES

Muitos dos representantes da família Bromeliaceae têm sido alvo de estudos químicos e farmacológicos, permitindo o isolamento e identificação de muitos compostos até então desconhecidos. Um bom exemplo é *Ananas comosus*, considerado

uma das espécies mais estudadas quimicamente desta família, em função do seu alto valor comercial, consumido em várias partes do mundo. A partir de extração aquosa do seu caule e frutos imaturos, foi possível o isolamento da bromelina, uma enzima proteolítica da classe das hidrolases que apresenta diversas atividades *in vivo* como antiedematosa, anti-inflamatória, antitrombótica e antifibrinolítica (Maurer, 2001). No gênero *Tillandsia*, apesar dos escassos estudos existentes, diferentes classes de metabólitos secundários foram relatadas, como flavonóides, terpenos, saponinas e derivados de ácidos cinâmicos.

5.1 TERPENOS

Muitos triterpenos são encontrados na família Bromeliaceae, apresentando uma maior predominância na subfamília *Tillandsioideae*. Uma grande variedade de cicloartanos pode ser identificada nos representantes do gênero *Tillandsia*, como os hidroperoxicicloartanos identificados em *Tillandsia recurvata* e *T. usneoides* (Cabrera, 1995,1997) (Quadro 1). O processo de hidroperoxidação desses cicloartanos pode ser atribuído a uma foto-oxidação natural do cicloartenol, fenômeno responsável pela biogênese de alguns cicloartanos (Herz, 1985). Esse processo pode ser explicado pelas condições adversas a que estas espécies estão expostas, por serem espécies epífitas, como a alta exposição solar e a baixa umidade. Assim, essas substâncias poderiam ser consideradas como parte do sistema de defesa dessas plantas (Manetti, 2009; Cabrera, 1995).

5.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides podem ser considerados como um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural. Essa classe de

metabólitos possui uma ampla distribuição na natureza sendo muitos deles descritos na família Bromeliaceae (Rocha, 2010). Além de possuírem importantes funções biológicas para a planta, muitos deles também apresentam variadas atividades farmacológicas (antitumoral, antimicrobiana, antioxidante) (Zuanazzi, 2007), podendo inclusive ser considerados como potenciais marcadores quimiotaxonômicos.

Apesar de diferentes classes de flavonóides estarem presentes nesta família, os compostos mais notáveis são aqueles que apresentam um padrão de substituição no carbono seis, por hidroxilação ou metoxilação, sendo este tipo de configuração única, indicando que esta família ocupa uma posição à parte em relação a outras famílias de monocotiledôneas (Williams, 1978). Frequentemente, a ocorrência de um padrão de substituição específico, para determinado metabólito, é indicativo de um avanço filogenético. Dessa forma, o padrão de substituição nos carbonos seis ou oito (por um radical hidroxí ou metoxi) para os flavonóides caracteriza-os como grupos quimicamente avançados, resultantes de uma etapa biossintética extra para sua formação, fazendo com que, dentre as três subfamílias que compõem Bromeliaceae, Tillandsioideae seja vista como a quimicamente evoluída dentro desta família (Manetti, 2009). Dentre os compostos deste tipo, pôde-se obter através de uma extração clorofórmica realizada em *Tillandsia recurvata* uma substância oleosa e amarelada, a partir da qual, através de tratamentos cromatográficos, constatou-se ser uma flavanona (Quadro 1). De acordo com métodos espectrométricos foi possível identificar a substância isolada como 5,3'-Dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavanona, até então não descrita para esta espécie (Queiroga, 2004).

5.3 ÁCIDOS CINÂMICOS E DERIVADOS

Esse grupo de metabólitos encontra-se amplamente distribuído no reino vegetal sob a forma esterificada fazendo parte da parede celular, tendo como principais representantes os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (Carvalho, 2003). Os ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres são bastante comuns em todo o reino vegetal, sendo encontrados em quase todos os tecidos vegetais. Contudo, o 1,2- e 1,3 - diglicerídeo fenilpropenato, derivado do ácido cinâmico, são raros, restritos a apenas algumas espécies, como *T. recurvata* (Quadro 1). Assim, Queiroga e colaboradores (2004) obtiveram, a partir da extração clorofórmica das partes aéreas desta espécie e posteriores tratamentos cromatográficos, um éster do ácido cinâmico na forma de um pó branco amorfo, quimicamente denominado 1,3-di-O-cinamoilglicerol. Além desta substância também foi confirmada a presença do éster etílico do ácido caféico.

6. CONCLUSÕES

As epífitas contribuem largamente com a imensa diversidade vegetal encontrada no dossel das florestas tropicais. Sua importância pode ser observada do ponto de vista ecológico, faunístico, popular e farmacológico. Muitas dessas espécies adaptadas à vida epifítica podem ser encontradas em Bromeliaceae, considerada uma família amplamente distribuída e com alta variabilidade genética. O gênero *Tillandsia* é formado por representantes que apresentam uma organização morfometabólica altamente especializada, podendo sobreviver aos mais diferentes tipos de ambientes extremos. Dessa forma, *Tillandsia recurvata* é uma epífita cosmopolita adaptada a um clima de *habitats* áridos, onde algumas modificações

morfometabólicas ao longo de sua evolução permitiram que sobrevivesse com a mínima quantidade de água dispersa na atmosfera sob a forma de vapor.

Esta espécie apresenta uma ampla distribuição em toda América tropical, sendo encontrada em toda costa do país nos ecossistemas de caatinga, cerrado e mata atlântica, apresentando um grande potencial terapêutico, verificado empiricamente na medicina popular americana. Apesar de ser amplamente utilizada tradicionalmente pouco se tem publicado a respeito da comprovação científica de suas atividades. Algumas pesquisas, porém, evidenciam o potencial farmacológico desta espécie em algumas atividades como antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana, atribuídas à presença de ácidos siálicos em sua composição, corroborando o uso popular. De modo geral, a diversidade de metabólitos e as atividades biológicas observadas em Bromeliaceae justificariam o interesse no estudo de espécies desta família. Do ponto de vista químico, embora algumas substâncias tenham sido isoladas em *Tillandsia recurvata*, os estudos existentes na área não correlacionam a estrutura química com a resposta biológica que as mesmas exercem. Diante da escassez de estudos científicos que informem a importância biológica e o potencial terapêutico acerca dos metabólitos desta espécie, é importante a realização de trabalhos com esta, conhecida do ponto de vista etnobotânico, porém pouco explorada farmacologicamente.

7. REFERÊNCIAS

Abril AB, Torres PA, Bucher EH. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. *J Trop Ecol.* 2005; 21:103–107.

- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida AL, Monteiro JM, Neto EMLF, Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114: 325–354.
- APG - The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc.* 2003; 141: 399–436.
- Aspiazu J, Cervantes L, Ramírez J, López J, Ramos R, Muñoz R, Villaseñor P. Temporal and spatial trends studied by lichen analysis: atmospheric deposition of trace elements in Mexico. *Rev. Mex. Fis.* 2007; 53: 87-96.
- Arambarri AM, Mandrile EL. *Tillandsia* L. (Bromeliaceae): Anathomy and Ethnopharmacology. *Act. Hort.* 1999; 503.
- Bennett, BC. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: Profile of an adaptative radiation; Benzing, D. H., ed.; Cambridge University. 2000; 14.
- Benz BW, Martin CE. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Braz. J. Plant Physiol.* 2006; 163: 648-656.
- Benzing DH. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. *Cambridge University Press.* 2000.
- Benzing, DH.; The Biology of Bromeliads. *Mad River Press.* 1980.
- Benzing DH. Vascular Epiphytes. *Cambridge University Press.* 1990.
- Benzing DH. The monocotyledons: their evolution and comparative biology. I. Mineral nutrition and related phenomena in Bromeliaceae and Orchidaceae. *Q Rev Bio.* 1973; 48: 277-290.

- Benzing DH, Seeman J, Renfrow A. The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany*. v.65. p. 359 – 365, 1978.
- Bonnet A, Curcio GR, Galvão F. Epifíticas vasculares e suas relações com fatores ambientalno rio Tibagi, Paraná, Brasil. In: Anais do 8. Congresso de Ecologia do Brasil. 2007 set. 23-28; Minas Gerais, Brasil.
- Brighigna L, Montaini P, Favilli F, Trejo AC. Role of The Nitrogen-Fhxing Bacterial Microflora in The Epiphytism of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Am J Bot*. 1992; 79(7): 723-727.
- Cabrera GM, Seldes AM. Hydroperoxycycloartanes from *Tillandsia recurvata*. *J Nat Prod*. 1995; 58(12): 1920-1 924.
- Cabrera GM, Seldes AM. SHORT SIDE-Chain Cycloartanes from *Tillandsia usneoides*. *Phytochemistry*. 1997; 45(5): 1019-1021.
- Carvalho JCT, Gosmann G, Schenkel EP. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. UFSC, 2003.
- Correa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. *Imprensa Nacional*. 1978; 6.
- Fahn A, Cutler, DF. Xerophytes. In: *Encyclopedia of plant anatomy*. Gebrüder Borntraeger.1992: 1-171.
- Forzza, RC, Costa, A, Siqueira Filho, JA, Martinelli, G. 2010. Bromeliaceae. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. [Acesso em 01 out. 2010]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006399>
- Gentry AH, Dodson C. Contribution to Nontrees to Species Richness of a Tropical Rain Forests. *Biotropica*. 1987; 19: 149–156.

- Gilmartin AJ. Trichomes of some equadorian Bromeliaceae. *Morris Arboretum Bulletin*. 1972; 23:19-23.
- Global Biodiversity Facility - GBIF. Species: *Tillandsia recurvata* (L.) L. [Acesso em 13 out. 2010]. Disponível em: <http://www.gbif.org/>
- Graciano CL, Fernández V, Caldiz DO. *Tillandsia recurvata* L. as a bioindicator of sulfur atmospheric pollution. *Ecol Austral*. 2003; 13: 3-14.
- Herz W, Watanabe K, Kulanthaivel P, Blount JF. Cycloartanes from *Lindheimeria Texana*. *Phytochemistry*. 1985; 24: 2645.
- ISCAM - The International Society of Crassulacean Acid Metabolism. Protocol for demonstration of Crassulacean Acid Metabolism - Induction in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. 2003. [Acesso em: 04/10/10]. Disponível em: <http://www.ag.unr.edu/cam/education.htm>
- Johansen, D.A. Plant microtechnique. New York: *MacGraw-Hill Book Company*; 1940
- Joly, AB. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 13. ed. São Paulo: *Companhia Editora nacional*; 2002.
- Kraus, JE, Arduin M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. *Seropédica*, Edur. 1997
- Linder PL, Rudall PJ. Evolutionary History of Poales. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2005; 36: 107-124.
- Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. *Plantarum*. 2002.
- Lowe H. Anti-tumor and anti-inflammatory extracts of plant biomass and their uses. *United States Patent Application*. 2010.

- Luther, HE. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials, 10th ed. *The Bromeliad Society International*. 2006.
- Madison M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana*. 1977; 5(2): 207-213.
- Manetti LM, Delaporte RH, Junior AL. Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae. *Quim. Nova*. 2009; 32 (7).
- Maurer, HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci*. 2001; 58: 1234–1245.
- Morton JF. Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatan. *Charles C. Thomas Publisher*. 1981.
- Nadkarni NM. Epiphyte biomass and nutrient capital of a neotropical elfin forest. *Biotropica*. 1985; 16(4): 249-256.
- Papini, A, Tani, G, Falco PDi; Brighigna, L. The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora*. 2010; 205: 94-100.
- Paz, EA, Cerdeiras, MP, Fernandez, J, Ferreira, F, Moyna P, Soubes M, Vazquez A, Vero S, Zunino L. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol*. 1995; 45: 67-70.
- Pignata ML, Gudiñoa GL, Wannaz ED, Plá RR, González CM, Carreras HA, Orellana L. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environ Pollut*. 2002; 120: 59-68.
- Pontes RAS, Agra MF. Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae). *Rodriguésia*. 2006; 57 (1): 47-61.
- Proença S L.; Sajo MG. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta bot. bras*. 2007; 21(3): 657-673.

- Puente ME, Bashan Y. The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbours the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Can. Jan. Bot.* 1994; 72.
- Queiroga MA, Andrade LM, Florêncio KC, Agra MF, Silva MS, Filho JMB, Cunha EVL. Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia.* 2004; 75: 423–425.
- Rocha FD, Yano M, Cunha MR, Gabriel FT, Cordeiro RSB, Menezes FS, Kaplan MAC. Brazilian Bromeliaceae species: isolation of arylpropanoid acid derivatives and antiradical potential. *Braz J Pharmacognosy.* 2010; 20(2): 240-245.
- Scatena VL, Segecin S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Rev Bras. Bot.* 2005; 28 (3): 635-649.
- Smith LB, Downs RJ. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica.* 1974; 14: 1-662.
- Smith, LB. & Downs, RJ. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica.* 1977; 14: 663-1492.
- Smith, LB. & Downs, RJ. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica.* 1979; 14: 1493-2142.
- Smith, LB. The Seasick Tillandsia. *Bromeliad Society International Journal.* 1951; 4. Acesso em: 20/11/11. Disponível em: <http://journal.bsi.org/V01/4/>
- Smith LB. Geographical Evidences on the Lines of Evolution in the Bromeliaceae. *Botanischer Jahrbücher.* 1934; 66: 446-468.
- Strehl, T. Forma, Distribuição e Flexibilidade dos Tricomas Foliare Usados na Filogenia de Bromeliáceas. *Iheringia, Série Botânica.* 1983; 31: 105-119.
- Tabarelli M, Silva JMC orgs. Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. Apresentação Cláudio Marinho. vol. 2. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente. Editora Massangana. 2002.

- Tomlinson, PB. Comelinales - Zingiberales. In: C.R. Metcalfe. Anatomy of the monocotyledons: III. 1969; Clarendon Press: 193-294.
- Waldemar CC, Irgang BE. A Ocorrência do Mutualismo Facultativo entre *Dyckia marítima* Backer (Bromeliaceae) e o Cupim *Cortaritermes silvestrii* (Holmgren), Nasutitermitinae, em Afloramentos Rochosos no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. *Acta bot. bras.* 2003; 17(1): 37-48.
- Williams CA. The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the bromeliaceae. Original Research Article. *Phytochemistry.* 1978; 17(4): 729-734.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.
- Whitmore, TC. An introduction to Tropical Rain Forest. *Oxford University Press.* New York. 1998.

ANEXOS – FIGURAS E QUADROS

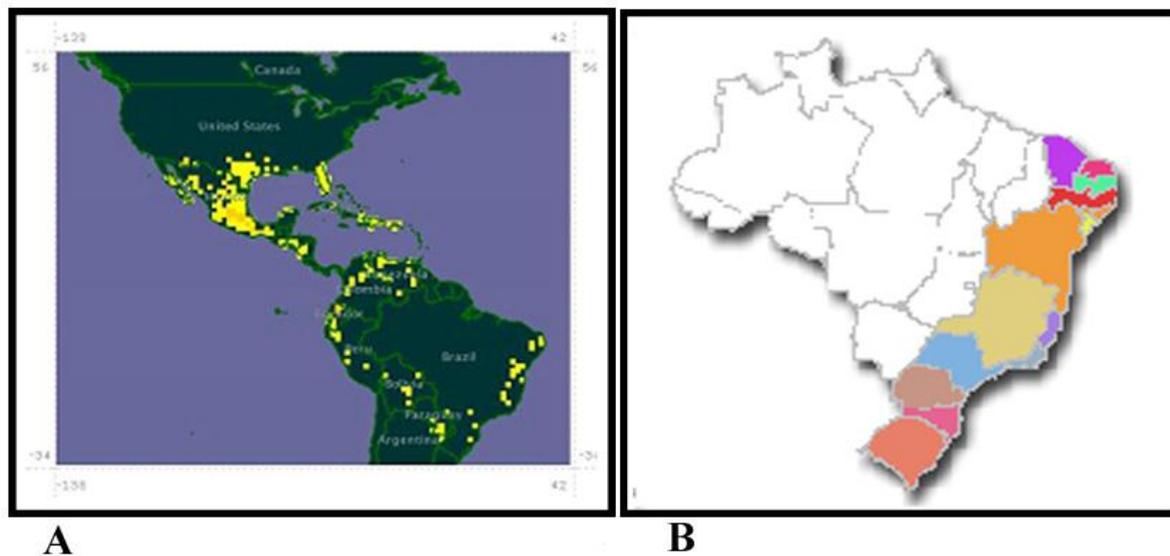


Figura 1: Distribuição Geográfica de *Tillandsia recurvata* L. na América Latina (A) e no Brasil (B). Fonte: GBIF, 2010; Forzza, 2010.



Fig. 2 – *Tillandsia recurvata* in situ. Foto: Júlia de Souza, Alex Lucena, 2010.

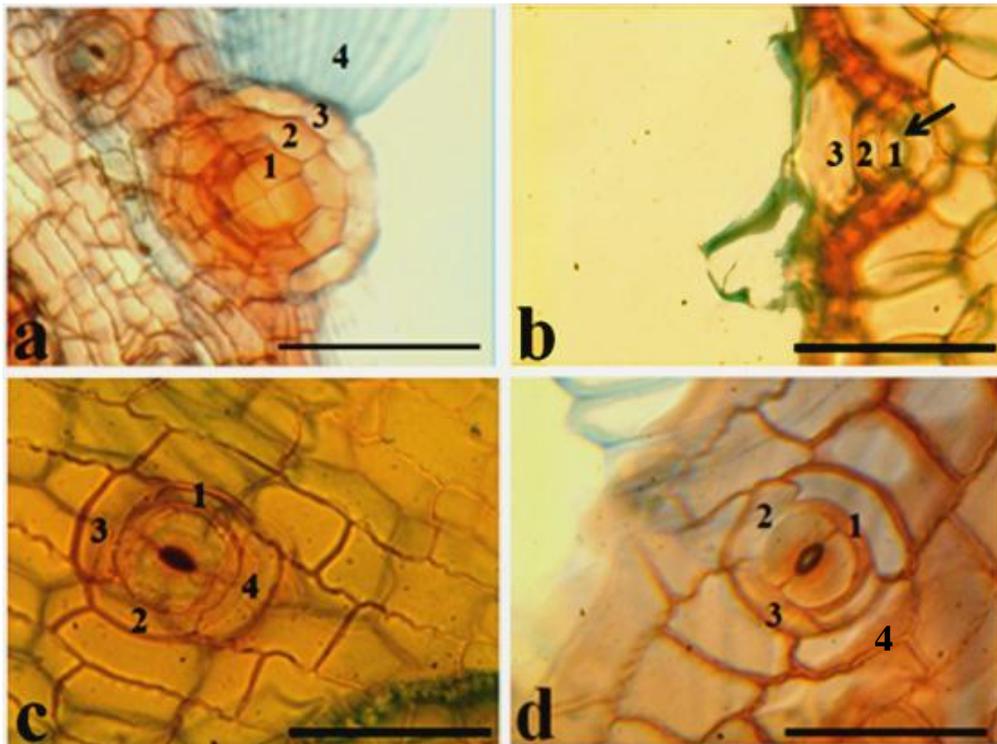


Figura 3. Epiderme foliar de *Tillandsia recurvata* Lam. **a.** pêlo do tipo escama, mostrando discos concêntricos de células; **b.** haste do pêlo escamoso (seta); **c/d.** estômato anisocítico (três células, uma maior que as outras duas, circundando o estômato). Barras: a = 200 μ m; b-d = 50 μ m.

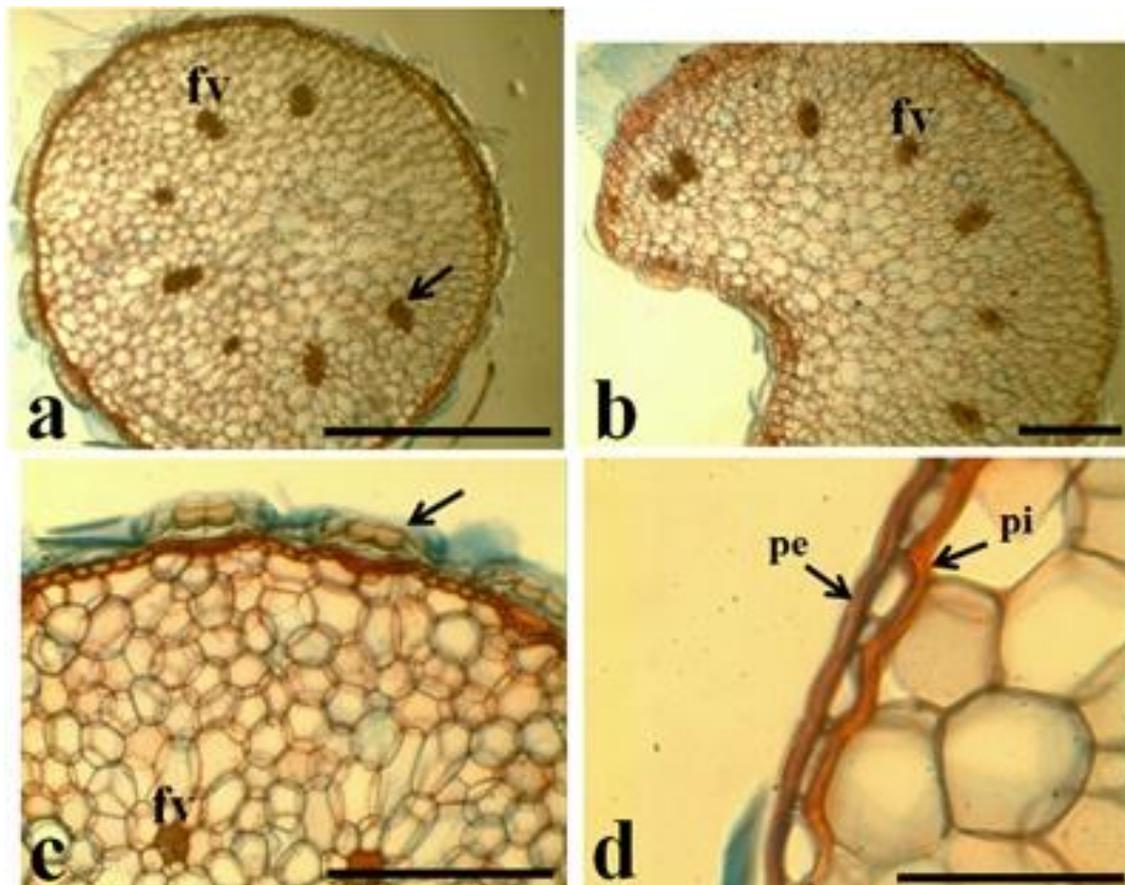
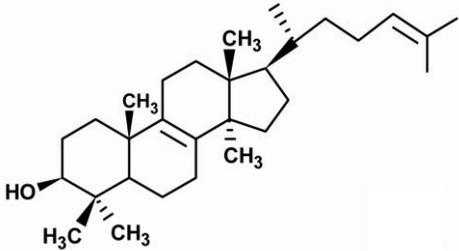
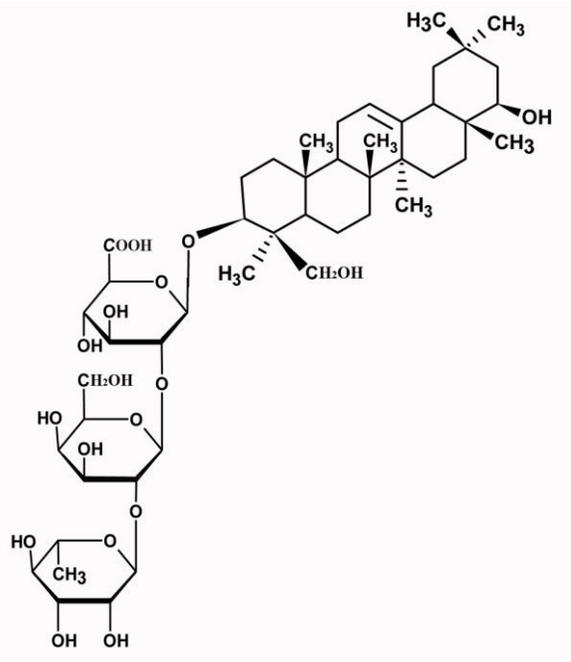
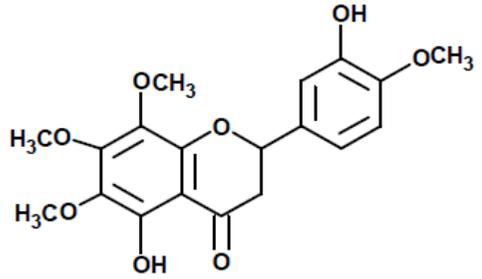
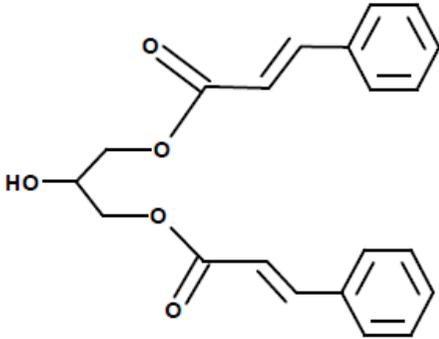
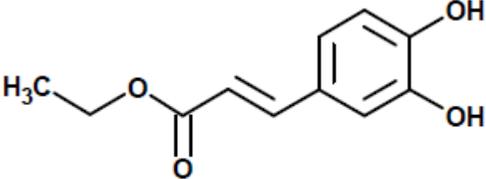


Figura 4. Folha de *Tillandsia recurvata* Lam. **a.** vista transversal mostrando feixes vasculares (fv, seta) imersos no parênquima; **b.** vista transversal mostrando contorno reniforme; **c.** epiderme com pêlos escamosos (seta); **d.** paredes periclinais externas (pe) e internas (pi) espessadas. Barras: a = 500 μ m; b,c = 200 μ m; d = 50 μ m.

Quadro1 – Metabólitos secundários isolados de *Tillandsia recurvata* L.

ESPÉCIE	CLASSE DE METABÓLITO	COMPOSTOS		REFERÊNCIA
<i>Tillandsia recurvata</i> L.	Terpeno	25-hidroperoxicicloart-23-en-3 β -ol, 24-hidroperoxicicloart-25-en-3 β -ol, cicloartanona, cicloartenona, 24-metilenocicloartanona, cicloartanol, cicloartenol, 24-metileno cicloartanol, lanosterol, colest-4-en-3-ona-24-metil	 <p style="text-align: center;">lanosterol</p>	CABRERA, 1995

		Ácido Siálico		Lowe, 2010
	Flavonóide	5,3'-Dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavanona		Queiroga, 2004

	Derivado Cinâmico	1,3-di-O-cinnamoilglicerol	 <p>The structure shows a glycerol backbone with a hydroxyl group (HO) on the first carbon. The second and third carbons are esterified with cinnamic acid groups. Each cinnamic acid group consists of a carbonyl group (C=O) attached to a vinyl group (C=C), which is further attached to a phenyl ring.</p>	Queiroga, 2004
		Éster etílico do ácido caféico	 <p>The structure shows an ethyl ester group (H₃C-CH₂-O-C=O) attached to a vinyl group (C=C), which is further attached to a 3,4-dihydroxyphenyl ring (catechol ring).</p>	Queiroga, 2004