



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**  
**DE *Hirtella racemosa* var. *Hexandra* (WILLD. EX SCHULT.) PRANCE**  
**(Chrysobalanaceae)**

**VICTOR HUGO MOREIRA DE LIMA**

**RECIFE**

**2015**

**VICTOR HUGO MOREIRA DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DE *Hirtella racemosa* var. *Hexandra* (WILLD. EX SCHULT.) PRANCE  
(Chrysobalanaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Área de Concentração:** Biotecnologia.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia de Menezes Lima.

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilene da Silva Cavalcanti.

**RECIFE**

**2015**

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

**Lima, Victor Hugo Moreira de**

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica de *Hirtella racemosa* var. *Hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance (*Chrysobalanaceae*). / Victor Hugo Moreira de Lima - Recife: O Autor, 2015.**

**99 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima**

**Coorientadora: Marilene da Silva Cavalcanti.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2015.**

**Inclui referências e apêndice**

**1. Plantas medicinais 2. Bactérias 3. Antioxidantes I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orient.) II. Cavalcanti, Marilene da Silva (coorient.) III. Título**

**615.321**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017-371**

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance (Chrysobalanaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 13/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Orientadora/UFPE)

---

Prof. Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira (UFPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Bianka Santana dos Santos (UFPE)

## AGRADECIMENTOS

Ao se considerar esta etapa vencida como resultado de uma longa caminhada, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco de esquecer alguém, agradeço de antemão a todos que, de alguma forma, passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

A **Deus**. “Senhor, Tu foste nosso abrigo, de geração em geração. Antes que nascessem os montes e fossem engendrados a terra e o mundo, desde sempre e para sempre, Tu és Deus. Ensina-nos a dispor de nossos dias, de modo a adquirirmos um coração sensato! Tem compaixão de teus servos! Sacie-nos, desde a manhã, tua misericórdia e exultaremos de alegria, todos os dias. Dá-nos alegria pelos dias em que nos humilhastes. Que tua obra se manifeste a teus servos, e a teus filhos, o teu esplendor! Desça, sobre nós, a bondade do senhor nosso Deus! Consolida, para nós, a obra de nossas mãos”. (SALMO 90).

Aos meus AMADOS pais, **Rita Moreira da Silva** e **José Moacyr Amaral de Lima**, exemplos de firmeza, caráter, disciplina e amor; pela força, confiança e dedicação na minha formação, sem os quais seria impossível alcançar meus objetivos.

A minha QUERIDA avó, “*in memoriam*”, **Eronita Martins Moreira da Silva**, que partiu antes que este momento tão esperado chegasse. Partiu deixando uma saudade imensa, um vazio, às vezes sufocante.

A minha orientadora, Professora Doutora **Vera Lúcia de Menezes Lima**, pela orientação nos assuntos concernentes a minha pesquisa e muitas sugestões valiosas.

A minha co-orientadora, Professora Doutora **Marilene da Silva Cavalcanti**, pela amizade, estímulo, ajuda, bem como muitas experiências repassadas da prática laboratorial.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas** da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade, confiança e ótima mediação nos processos acadêmicos.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior -CAPES**, pela ajuda financeira na fomentação da bolsa de estudo, a qual tornou possível a manutenção do curso e de toda a pesquisa.

A minha amiga, doutoranda **Raquel Barbosa da Silva**, pela amizade, auxílio em várias dúvidas, pela contínua disposição em ajudar e pela disponibilização de recursos muitas vezes difíceis.

Ao professor Doutor **Antônio Fernando Moraes de Oliveira**, pelo auxílio e disponibilização do Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao professor Doutor **Nicácio Henrique da Silva**, pela disponibilização do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao técnico do Laboratório de Produtos Naturais da UFPE, Sr. **João Antonio Virgínio**, pelas preciosas ajudas e auxílios concernentes às etapas de extração com o Soxhlet.

A curadora do Herbário UFP - Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, **Marlene Carvalho de Alencar Barbosa**, e à curadora do Herbário PEUFR - Vasconcelos Sobrinho, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, **Maria Elizabeth Bandeira-Pedrosa**, pela preciosa ajuda para a inclusão da planta ao acervo do herbário.

A professora Doutora **Carmen Silvia Zickel**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo auxílio na identificação da planta estudada na minha dissertação.

Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que, a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que, a cada pergunta, possamos ter novas respostas; e que, assim, a ciência possa prosperar entre perguntas e respostas.

## *Dedico*

Primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida me proporcionando muita alegria e sempre me dando força para superar as dificuldades;

Aos meus queridos pais **José Moacyr Amaral de Lima** e **Rita Moreira da Silva** pelo imenso amor, carinho, apoio, incentivo e dedicação. Muitíssimo obrigado!

## **Certeza**

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

**(Fernando Sabino)**

## RESUMO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades é uma prática exploratória e largamente difundida no Brasil. Muitas espécies da família Chrysobalanaceae são utilizadas na medicina popular. *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. ex Schuldt.) Prance, popularmente conhecida como ajirú-do-mato, ajururana ou murtinha, é uma planta de porte arbusivo que se desenvolve em biomas como caatinga, restinga e cerrado. Esta planta tem sido popularmente utilizada no Brasil, para o tratamento do diabetes, porém existem poucos estudos fitoquímicos da espécie em questão. Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização fitoquímica e a avaliação da atividade biológica (antimicrobiana, antioxidante e toxicidade) das folhas de *H. racemosa*. Foi realizada a extração dos metabólitos em aparelho de Soxhlet, utilizando solventes de polaridades distintas para posterior avaliação das atividades biológicas. Os métodos empregados para atividade antimicrobiana foram difusão em ágar por disco e poço, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os extratos foram avaliados sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O estudo fitoquímico realizado em CCD (Cromatografia em Camada Delgada) identificou no extrato bruto a presença de fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas. Em geral, a inibição promovida pelos extratos no teste de difusão em ágar por poço foi maior do que os valores obtidos por disco, independentemente do extrato vegetal testado. A CIM variou entre 0,39 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo que para as bactérias Gram-negativas a variação das CIMs foi entre 3,13 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> e de 0,78 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para as Gram-positivas, indicando estas como sendo as bactérias mais suscetíveis. Os percentuais de determinação do sequestro de DPPH variaram de 8,13% a 90,78%. No bioensaio de toxicidade do extrato de *Hirtella racemosa* frente à *A. salina*, a dose letal capaz de matar 50% das larvas (DL<sub>50</sub>) foi de 43,4 mg L<sup>-1</sup>. O valor de DL<sub>50</sub> do extrato indica que ele possui atividade biológica considerada significativa. Nesse estudo, podemos constatar que o extrato apresenta grupos de compostos químicos derivados do metabolismo secundário das plantas, além de apresentar atividade antioxidante e antimicrobiana. O teste de toxicidade contra *A. salina* mostrou que o extrato apresenta toxicidade ativa. Os resultados obtidos nesta pesquisa contribuem para o conhecimento de uma espécie vegetal com potenciais farmacológicos inexplorados, podendo vir a colaborar no desenvolvimento de novas drogas.

Palavras-chave: antimicrobiano, toxicidade, antioxidante, bactérias, *Hirtella racemosa*

## ABSTRACT

The use of medicinal plants for the treatment of diseases is an exploratory practical and widespread in Brazil. Many Chrysobalanaceae family species are used in folk medicine. *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. ex Schuldt.) Prance, popularly known as ajirú-do-mato, ajururana or murtinha, is a arbusivo sized plant that grows in biomes such as scrub, salt marsh and savanna. This plant has been popularly used in Brazil for the treatment of diabetes, but there are few phytochemical studies of the species concerned. This study aimed to carry out the phytochemical characterization and evaluation of biological activity (antimicrobial, antioxidant and toxicity) of *H. racemosa* leaves. Extraction of the metabolites was performed in a Soxhlet apparatus using solvents of different polarities for subsequent evaluation of biological activities. The methods used for antimicrobial activity were spread on agar for disk and well, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The extracts were evaluated on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The phytochemical study in Thin Layer Chromatography identified in the crude extract to The presence of phenols, tannins, anthocyanins, flavonoids, steroids, triterpernóides and saponins. In general, inhibition extracts promoted by the agar diffusion test per well was higher than the values obtained by the disc, regardless of the plant extract tested. The MIC ranged from 0.39 to 100 mg.mL<sup>-1</sup>, and for Gram-negative bacteria variation of MICs was between 3.13 to 12.5 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.78 to 12.5 mg.mL<sup>-1</sup> for Gram-positive, indicating this to be the most susceptible bacteria. The percentages of determination of DPPH abduction ranged from 8.13% to 90.78%. In the bioassay toxicity *Hirtella racemosa* extract opposite the *A. salina*, the lethal dose capable of killing 50% of the larvae (LD<sub>50</sub>) was 43.4 mg L<sup>-1</sup>. The LD<sub>50</sub> value of the statement indicates that it has biological activity considered significant. In this study, we can see that the extract shows groups of chemical compounds derived from secondary metabolism of plants, besides having antioxidant and antimicrobial activity. The toxicity test against *A. salina* showed that the extract shows active toxicity. The results of this research contribute to the knowledge of a plant species with potential untapped pharmacological and may have to collaborate in developing new drugs

Keywords: antimicrobial, toxicity, antioxidant, bacteria, *Hirtella racemosa*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Hirtella racemosa</i> var. <i>hexandra</i> em habitat.....	22
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da quinina, artemisina, quercetina e ácido nordiidroguaiarético.....	39
<b>Figura 3</b> - Inflorescência de <i>H. racemosa</i> var. <i>hexandra</i> .....	45

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Ensaio do potencial antioxidante das frações do extrato foliar de <i>H. racemosa</i> .....	53
<b>Figura 2</b> - Comportamento cinético da <i>H. racemosa</i> var. <i>hexandra</i> determinado espectrofotometricamente a 515 nm, pela reação com uma solução de DPPH 90µM; (a) 1,25 mg/mL; (b) 0,625 mg/mL; (c) 0,312 mg/mL e (d) 0,156 mg/mL.....	55
<b>Figura 3</b> - Porcentagem de larvas de <i>Artemia salina</i> mortas em relação às concentrações do extrato aquoso de <i>H. racemosa</i> .....	57

### APÊNDICES

<b>Figura 1</b> - Exsicata do material botânico depositada no herbário Geraldo Mariz.....	89
<b>Figura 2</b> - Rendimentos dos extratos brutos.....	89
<b>Figura 3</b> - Extração com aparelho de Soxhlet.....	90
<b>Figura 4</b> - Concentração do extrato com rotaevaporador.....	90
<b>Figura 5</b> - Detecção de alcalóides nos extratos foliares de <i>H. racemosa</i> .....	91
<b>Figura 6</b> - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos foliares de <i>H. racemosa</i> .....	91
<b>Figura 7</b> - Revelador dragendorff sendo borrifado na cromatoplaca.....	92

<b>Figura 8</b> - Avaliação da presença de alcalóides após aplicação de dragendorff. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] pilocarpina (padrão).....	92
<b>Figura 9</b> - Avaliação da presença de cumarinas. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] (umbeliferona) padrão.....	93
<b>Figura 10</b> - Avaliação da presença de saponinas. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] saponina (padrão).....	93
<b>Figura 11</b> - Avaliação da presença de triterpenos. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] $\beta$ -amirina, $\beta$ -sitosterol e ác. ursólico (padrão).....	94
<b>Figura 12</b> - Avaliação da presença de flavonóides. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] (luteolina) padrão .....	94
<b>Figura 13</b> - Avaliação da presença de alcalóides. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] pilocarpina (padrão).....	95
<b>Figura 14</b> - Teste disco difusão frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	95
<b>Figura 15</b> - Teste disco difusão frente à bactéria <i>Micrococcus luteus</i> .....	96
<b>Figura 16</b> - Teste disco difusão frente à bactéria <i>Streptococcus mutans</i> .....	96
<b>Figura 17</b> - Teste disco difusão frente à bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	97
<b>Figura 18</b> - Teste disco difusão frente à bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> .....	97
<b>Figura 19</b> - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	98
<b>Figura 20</b> - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria <i>Micrococcus luteus</i> .....	98

**Figura 21** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Streptococcus mutans*.....99

**Figura 22** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis*.....99

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.....34

**Tabela 2** - Moléculas identificadas de espécies de Chrysobalanaceae.....41

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** - Prospecção fitoquímica de *Hirtella racemosa* var. *hexandra*.....52

**Tabela 2** - Atividade antioxidante de *H. racemosa* e suas frações determinada pela redução do radical livre DPPH.....54

**Tabela 3** - Atividade antioxidante dos controles positivos determinada pela redução do radicação livre DPPH.....54

### CAPÍTULO II

**Tabela 1** - Resultado da composição fitoquímica de *H. racemosa* var. *hexandra* em diferentes solventes.....68

**Tabela 2** - Rendimentos (%) dos extratos utilizados no estudo.....68

**Tabela 3** - Medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas (mm) obtidas pelas metodologias de disco e poço utilizando diferentes extratos e antimicrobiano comercial (cloranfenicol).....69

**Tabela 4** - Medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas (mm) obtidas pelas metodologias de disco e poço utilizando diferentes extratos e antimicrobiano comercial (cloranfenicol).....70

**Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) dos extratos de *H. racemosa* e antimicrobiano comercial frente às bactérias Gram-positivas.....70

**Tabela 6** - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) dos extratos de *H. racemosa* e antimicrobiano comercial frente às bactérias Gram-negativas.....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACVr** - Aciclovirresistente

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC** - American Type Culture Collection

**CAT** - Catalase

**CCD** - Cromatografia em camada delgada

**CL<sub>50</sub>** - Concentração Letal 50%

**CLSI** - Clinical and Laboratory Standards Institute

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**DL<sub>50</sub>** - Dose Letal 50%

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**EC<sub>50</sub>** - Concentração efetiva

**ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio

**HSV** - Vírus herpes simplex

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PE** - Pernambuco

**ppm** - partes por milhão

**SOD** - Superóxidos dismutase

**TAS** - Toxicidade em *Artemia salina*

**UFPE** - Universidade Federal de Pernambuco

**UV** - Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>27</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE PRODUTOS NATURAIS .....	27
3.2 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL.....	27
3.3 MICRORGANISMOS E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS .....	29
3.4 APLICAÇÃO DA FITOQUÍMICA .....	31
3.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
3.6 TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH .....	36
3.7 AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS NATURAIS CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO .....	37
3.8 FAMÍLIA CHRYSOBALANACEAE .....	39
3.9 ETNOFARMACOLOGIA DA FAMÍLIA CHRYSOBALANACEAE .....	40
3.10 FITOQUÍMICA DA FAMÍLIA CHRYSOBALANACEAE.....	41
3.11 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FAMÍLIA CHRYSOBALANACEAE.....	43
3.12 ASPECTO BOTÂNICO DE <i>HIRTELLA RACEMOSA</i> VAR. <i>HEXANDRA</i> .....	44
<b>4. CAPÍTULO I .....</b>	<b>47</b>
<b>TRIAGEM FITOQUÍMICA, PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>HIRTELLA RACEMOSA</i> VAR. <i>HEXANDRA</i> (WILLD. EX SCHULT.) PRANCE (CHRYSOBALANACEAE) .....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	49

4.2.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS .....	49
4.2.3	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	49
4.2.4	TESTES PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O RADICAL DPPH.....	50
4.2.5	BIOENSAIO COM AS LARVAS DE <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	51
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.3.1	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	52
4.3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.3.3	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	56
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>4.6</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>63</b>
	<b>ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS FOLIARES DE <i>HIRTELLA RACEMOSA</i> VAR. <i>HEXANDRA</i> (WILLD. EX SCHULT.) PRANCE (CHRYSOBALANACEAE) .....</b>	<b>63</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
5.2.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO E EXTRATOS.....	64
5.2.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS.....	65
5.2.3	PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS BACTERIANOS .....	65
5.2.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	65
5.2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR DISCO E POÇO .....	66
5.2.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	66
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>

5.3.1 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS OBTIDOS.....	67
5.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DIFUSÃO EM ÁGAR PELAS TÉCNICAS DE DISCO E DE POÇO.....	68
5.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) .....	70
<b>5.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>5.6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>5.7 AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>72</b>
<b>5.8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>88</b>

## *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, plantas têm sido usadas não apenas como uma fonte de alimento, mas também como uma rica fonte de remédios. Diversas doenças foram tratadas com chás (infusão, decocção, maceração), sucos, tinturas, banhos, cataplasmos e unguentos, preparados a partir de plantas (ALMEIDA, 1993). Tal abordagem terapêutica remonta principalmente aos povos antigos da China, Egito, Ásia, Roma, em que estudiosos, com base em seu conhecimento, classificaram numerosas espécies de plantas, com a respectiva indicação do uso medicinal. Mais tarde, os gregos estabeleceram o uso racional de plantas na prática médica, seguido por médicos na Europa Ocidental (RIBEIRO, 2008). O conhecimento do uso terapêutico dos recursos naturais pelo homem, ao longo do tempo, garantiu a sua sobrevivência e foi especialmente utilizado pelas populações tradicionais (PINTO et al. 2005).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma prática exploratória e amplamente difundida no Brasil. A maioria das espécies tem sido utilizada de forma extrativista, o crescimento da população humana e a ocupação de áreas naturais têm aumentado a pressão destrutiva sobre essa flora (ROSA & FERREIRA, 2001). A importância das plantas medicinais é decorrente da sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar uma grande oportunidade de obtenção de uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes (YUNES & CALIXTO, 2001).

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse no potencial terapêutico das plantas medicinais (YUNES & CALIXTO, 2001). Este fato é comprovado pela evidência de que hoje, cerca de 30% dos medicamentos produzidos nos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais. Além disso, no período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados no *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e nove eram oriundos de produtos naturais (SILVEIRA et al. 2009). Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que atualmente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas medicinais tradicionais, sendo que 85% dessas práticas envolvem plantas medicinais (ROSA et al. 2011).

No nordeste do Brasil, encontram-se 23 espécies do gênero *Hirtella*, duas variedades de *H. racemosa*: *H. racemosa* Lam. var. *racemosa* e *H. racemosa* Lam. var. *hexandra* (CNIP, 2010). A espécie *Hirtella racemosa* possui distribuição geográfica ocorrendo desde o México até o centro-oeste do Brasil. Foi identificada pela primeira vez por Lamarck em 1789 (PRANCE, 1988). Popularmente conhecida no norte do Brasil como ajururana, ajirú-do-mato, coração de negro ou murtinha, apresenta-se como arbusto (Figura 1), com floração constante ao longo do ano em vegetações de cerrado, caatinga e restinga (PRANCE, 1988).

**Figura 1** - *Hirtella racemosa* var. *hexandra* em habitat.



**Fonte:** Autor.

A escolha da *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex. Schult.) Prance deve-se ao fato de ser popularmente utilizada no Brasil para tratamento do diabetes (COELHO-FERREIRA, 2009) aliado ao fato de existir poucos estudos fitoquímicos relatados da espécie em questão.

Conscientes de que mais de 90% das classes terapêuticas atuais derivam de um protótipo de origem natural (WHO, 2002) e dos aspectos acima apontados das propriedades terapêuticas da espécie *Hirtella racemosa* var. *hexandra*, a abordagem acerca dos constituintes químicos e da atividade biológica da flora em apreço é de grande valia para a comunidade científica visto que a mesma possui indicação popular de uso medicinal, um potencial praticamente inexplorado.

Sabendo-se da inexistência de informações em literaturas técnicas e científicas acerca das atividades biológicas da espécie *Hirtella racemosa* var.

*hexandra*, devido possivelmente ao diminuto e escasso conhecimento etnobotânico nas localidades onde a flora característica está presente, espera-se com este trabalho contribuir para a pesquisa fitoquímica bem como, para possíveis achados de ordem biológica.

*Objetivos*

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os grupos de metabólitos secundários majoritários e avaliar a atividade antibacteriana, antioxidante e a toxicidade das folhas da espécie *Hirtella racemosa* var. *hexandra*, Família Chrysobalanaceae.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar prospecção fitoquímica das folhas de *H. racemosa* var. *hexandra* para os principais grupos de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada.
- Avaliar o potencial antioxidante frente ao radical DPPH.
- Analisar a possível ação tóxica dos extratos foliares de *H. racemosa* var. *hexandra*, utilizando ensaios com microcrustáceo *Artemia salina*.
- Testar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos obtidos através da técnica de difusão em disco e poço frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse médico.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos foliares de *H. racemosa* var. *hexandra* frente às bactérias-testes.

## *Fundamentação Teórica*

---

## **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1 Aspectos gerais sobre produtos naturais**

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. A busca por alívio e cura de enfermidades pela ingestão de ervas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização de tais produtos. A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais como no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações egípcia, greco-romana e chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (BARREIRO; BOLZANI; JÚNIOR, 2006; CRAGG; NEWMANN, 2007).

Cerca de 65% a 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento primário da saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças. A Organização Mundial de Saúde não só reconhece como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso através da distribuição de manuais (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Cragg e Newman (2007) indicam que aproximadamente 25% das prescrições dispensadas nos Estados Unidos durante os últimos 25 anos são relacionadas a medicamentos que contém princípio ativos de origem natural ou semi-sintética, normalmente oriundos de plantas superiores; 13% relativas a medicamentos de fontes microbianas e 2,7% de origem animal. Tais dados evidenciam claramente a importância contemporânea das substâncias naturais para a preservação da saúde e a cura de doenças.

As plantas medicinais podem ser classificadas por categorias, de acordo com sua ação sobre o organismo: estimulantes, coagulantes, diuréticas, sudoríferas, hipotensoras, de função reguladora intestinal, coletérica, depurativa, remineralizantes e reconstituintes (LORENZI & MATOS, 2002).

### **3.2 Uso de plantas medicinais no Brasil**

No Brasil, o uso das plantas como remédio teve influência das culturas indígena, africana e européia (LORENZI & MATOS, 2002). Entre os índios, o pajé utilizava plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que lhe revelaria a erva ou o modo de curar o enfermo e também pela observação de animais que procuram certas plantas quando doentes. Um exemplo é o uso da raiz de ipecacuanha, pelos animais, para alívio de cólicas e diarreias. Os pajés associavam o uso de plantas à ritual de magia e seus tratamentos eram, assim, transmitidos oralmente de uma geração a outra (JORGE & MORAIS, 2003).

Atualmente, as plantas continuam a ser usadas para o tratamento de doenças e novos fármacos continuam a ser desenvolvidos com base na pesquisa dos seus constituintes. Testes de *screening* de elevado rendimento são usados para o fracionamento biomonitorado de extratos, conduzindo ao isolamento de compostos ativos que podem ser usados como agentes terapêuticos, na forma de produtos naturais ou como análogos sintéticos com atividade biológica otimizada e/ou com redução dos efeitos adversos, e o uso das indicações da etnofarmacologia aumentam a eficácia destes *screenings* (HEINRICH et al. 2004; PHILLIPSON, 2001). Em 1996, dos 20 fármacos mais prescritos seis eram produtos naturais (PHILLIPSON, 2001) e durante 2001 e 2002 aproximadamente um quarto dos fármacos mais vendidos em todo mundo foram produtos naturais ou derivado de produtos naturais. Nas últimas décadas observou-se um grande interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (YUNES & CALIXTO, 2001). Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, a definição para plantas medicinais diz que “são aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico”.

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural e urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições. Devido ao aumento no interesse por produtos naturais, o uso de plantas medicinais tornou-se mais difundido. Muitas destas plantas ainda não foram estudadas e podem ser avaliadas quanto à ação antimicrobiana, em contraste com plantas nativas da Europa, que já foram exaustivamente estudadas (DUARTE, 2006).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos.

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta. Com aproximadamente 22% de todas as espécies vegetais conhecidas, possui um patrimônio genético potencial capaz de render-lhe elevados benefícios econômicos. Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais originam medicamentos em menor tempo, com custos muitas vezes inferiores e, conseqüentemente, mais acessíveis à população, que, em geral, encontra-se sem condições financeiras de arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos que possam ser utilizados como parte do atendimento das necessidades primárias de saúde, principalmente porque na maioria das vezes as matérias-primas utilizadas na fabricação desses medicamentos são importadas. Por esses motivos ou pela deficiência da rede pública de assistência primária de saúde, em torno de 80% da população brasileira não tem acesso aos medicamentos ditos essenciais (TOLEDO et al. 2003).

### **3.3 Microrganismos e resistência a antibióticos**

Os antibióticos são produtos do metabolismo natural dos fungos, actinobactérias e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem microrganismos. Dentre os problemas mais comuns que limitam o uso destes antimicrobianos estão os efeitos colaterais produzidos no organismo e o aumento da resistência microbiana (MIMS et al. 1999; BLACK, 2002).

A essência da quimioterapia antimicrobiana é a toxicidade seletiva, ou seja, matar ou inibir o microrganismo sem afetar o hospedeiro. As drogas antimicrobianas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam o microrganismo, ou bacteriostáticas, quando impedem o crescimento do mesmo. No caso das drogas bacteriostáticas, o hospedeiro se defende por si, utilizando mecanismos como a fagocitose e a produção de anticorpos, normalmente destruindo o microrganismo (MIMS et al. 1999).

Segundo Mims et al, (1999), a distinção entre agentes bactericidas e bacteriostáticos tornou-se obscura porque alguns agentes são capazes de destruir algumas espécies, mas são bacteriostáticos para outros, como o cloranfenicol, que inibe o crescimento de *Escherichia coli* e destrói o *Haemophilus influenzae*.

Resistência de um microrganismo a um antibiótico significa que um microrganismo antes susceptível à ação de um antibiótico não é mais afetado por este. Um fator importante no desenvolvimento de cepas de microrganismos resistentes a drogas é que muitos antibióticos são bacteriostáticos em vez de bactericidas. Infelizmente, os microrganismos com maior capacidade de recuperação escapam das defesas e desenvolvem resistência aos antibióticos (BLACK, 2002).

Existem dois tipos de resistência bacteriana, natural ou adquirida. A resistência natural é representada por grupos bacterianos que não são sensíveis a determinados antibióticos, como por exemplo, os microrganismos Gram-negativos resistentes à penicilina G, resistência esta existente antes da antibioticoterapia e é própria da espécie. A resistência adquirida ou secundária ocorre pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa, seja por mutação ou por aquisição de material genético exógeno (AMATO NETO et al. 2000).

O aparecimento de resistência resulta de diversos fatores, tais como: uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, entre outros, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes (CATÃO et al. 2005).

Atualmente, muitas cepas são resistentes a quase todos antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos constitui uma séria preocupação. A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representam um desafio no tratamento de infecções (SCHAECHTER et al. 2002; CATÃO et al. 2005; ALEKSHUN & LEVY, 2007).

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos podem escapar dos efeitos dos antimicrobianos, dentre os quais incluem: alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (CATÃO et al. 2005).

Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. Por isso, medidas devem ser tomadas para resolver este problema, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, ampliar pesquisas para melhorar entender o mecanismo genético de resistência e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (AMOROSO, 2002; NASCIMENTO et al. 2000).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma imensa variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos (ALEKSHUN & LEVY, 2007). O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (DUARTE, 2006).

Durante um longo período de tempo, plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana, especialmente nas últimas décadas, com estudos intensivos para terapia natural. A propósito, o uso de componentes das plantas na área farmacêuticas tem gradualmente aumentando no Brasil (BERTINI et al. 2005).

Assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais como terapêuticos e principalmente com atividade antibiótica devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas.

### **3.4 Aplicação da fitoquímica**

Durante os últimos anos, a atenção da indústria farmacêutica tem se voltado novamente para os produtos naturais, em especial por causa de três novas drogas de origem vegetal; taxol, etoposídeo e artemisinina (PHILLIPSON, 2001).

O taxol é obtido das cascas do *Taxus brevifolia*, sendo sua atividade contra o câncer conhecida desde a década de 60, o taxol teve sua estrutura elucidada em 1971 e apenas na década de 90, que o taxol e seu análogo semi-sintético tiveram sua eficiência comprovada contra o câncer de ovário e seio. Cabe também ressaltar que para obter 1900g de taxol são necessários 27.300 kg de cascas, ou seja, aproximadamente 6.000 árvores (CORDELL, 1995). A busca por uma fonte de taxol

capaz de atender as demandas do mercado culminou na semi-síntese total do taxol, revolucionando a química orgânica sintética (VIEGAS et al. 2006).

O etoposídeo é a principal substância presente na resina da *Podophyllum peltatum*, substância que inibe a divisão celular, sendo seu análogo semi-sintético eficiente no combate ao câncer de pulmão e testículos (PHILLIPSON, 2001).

A artemisinina isolada como princípio ativo da *Artemisia annua*, se mostrou eficaz contra a malária, sendo que a descoberta da mesma impulsionou o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas como:  $\beta$ -arteméter, o arte-éter e o artesunato de sódio todos estes derivados semi-sintéticos da artemisinina (VIEGAS et al. 2006).

As pesquisas com o taxol, etoposídeo e artemisinina impulsionaram as indústrias farmacêuticas a investirem novamente em pesquisas com produtos naturais, sendo que a maior parte dos esforços tem como objetivo a descoberta de novas drogas anti-câncer. Um reflexo disto é que no período de 1983-1994, 61% das novas drogas anti-câncer provinham de produtos naturais (CORDELL, 2000). No entanto, o principal interesse das pesquisas com produtos naturais, atualmente, não é produzir drogas melhores do que as que já existem no mercado e sim fornecer novas alternativas. Dentre os milhares de exemplos que podem ser dados existem três que convêm serem destacados: *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Gossypium* sp (VIEGAS et al. 2006).

O *Ginkgo biloba* utilizado no controle de problemas vasculares cerebrais, de memória e com propriedades neuroprotetoras, ilustra um exemplo de fitoterápico de sucesso. A partir dos extratos dessa planta, Nakanishi e colaboradores isolaram os ginkolídeos-A, B, C e M que demonstraram importantes propriedades antitrombóticas (VIEGAS et al. 2006).

Do extrato da erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*), foi isolada a hipericina, utilizada como antidepressivo. Aparentemente, as propriedades atribuídas a este extrato devem-se à hiperforina, que compreende uma mistura de tautômeros. Atualmente, na Alemanha para cada 30 mil receitas de fluoxetina (Prozac<sup>®</sup>), são emitidas 200 mil de *Hypericum* sp. (FILHO & YUNES, 2001).

O gossipol, obtido do óleo de semente do algodão (*Gossypium* sp.), foi amplamente utilizado na China como contraceptivo masculino, propriedade que foi confirmada em 1980 (VIEGAS et al. 2006).

Desta maneira, a fitoquímica desempenha um papel importante, pois à medida que ocorre o isolamento, purificação e identificação estrutural de substâncias químicas, implementa-se a literatura com informações que podem ser utilizadas, após estudos biológicos, como fontes alternativas frente às drogas existentes no mercado, além de fornecer novos modelos de fármacos, para química medicinal (modelagem molecular).

### **3.5 Metabólitos secundários e atividade antimicrobiana**

Historicamente, os compostos produzidos pelas plantas têm sido separados em metabólitos ou produtos primários e secundários. Os metabólitos primários, por definição, são moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucleicos.

Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, e outros seres. Nas plantas o conjunto de compostos secundários é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outros, que são variáveis.

Os metabólitos secundários, ao contrário, são restritos em sua distribuição, tanto dentro da planta quanto entre diferentes espécies de plantas. São importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem. Alguns exemplos de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcaloides. Esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas; e também apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (LÓPEZ, 2006). Apresentam importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. Por outro lado, esses compostos, ao serem incorporados ao organismo animal, produzem variados efeitos e, quando benéficos, caracterizam as plantas que os possuem. Muitos desses compostos ou grupos podem provocar reações nos organismos, esses são os princípios ativos. Algumas dessas substâncias podem ou não ser tóxicas, isto depende muito da

dosagem em que venham a ser utilizadas. Assim, planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica (LORENZI & MATOS, 2002).

Entre as explicações sobre a origem de metabólitos secundários produzidos pelos organismos, está a pressão seletiva natural que inclui resposta a interações de competição, parasitismo, e modificações ambientais, tais como as micotoxinas. Micotoxinas são produzidas por fungos, cuja ação pode impedir os insetos predadores, a ação dos antibióticos na defesa territorial e o odor usado para atrair insetos para dispersão de esporos (LÓPEZ, 2006).

Nem sempre os princípios ativos de uma planta são conhecidos, mas mesmo assim ela pode apresentar atividade medicinal satisfatória e ser usada desde que não apresente efeito tóxico. Existem vários grupos de princípios ativos, alguns de maior importância são abordados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.

<b>Princípio Ativo</b>	<b>Propriedades Medicinais ou Tóxicas</b>
Alcalóides	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais.
Mucilagens	Cicatrizante, antiinflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmótico.
Flavonóides	Antiinflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, antidematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano.
Taninos	Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas.
Óleos essenciais	Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmótico.

**Fonte:** Adaptada de Lorenzi & Matos (2002).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN, 1999; SOUZA et al. 2003). Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas às referidas substâncias relevância no mecanismo de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus,

parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores. Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata a agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematoides ou em função de determinados estímulos, como radiações, agentes químicos e outras injúrias (YUNES & CALIXTO, 2001).

As plantas que contêm compostos aromáticos são usadas tradicionalmente na medicina popular, na indústria farmacêutica, na indústria de alimentos aumentando a vida útil dos alimentos, mostrando inibição de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, na medicina alternativa e na de terapias naturais (SARTORATTO et al. 2004). O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma das mais antigas formas de aplicação medicinal da humanidade. A OMS estima que mais de 65% da população dos países desenvolvidos utilizem plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde. Graças à atividade metabólica secundária dos vegetais superiores, estes produzem substâncias antibióticas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (VEIGA JUNIOR et al. 2005).

Os óleos essenciais e os extratos de diversas espécies de planta podem controlar o crescimento dos microrganismos relacionados à pele, à cárie dental, incluindo as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SARTORATTO et al. 2004). Rauha (2000) demonstrou a atividade antimicrobiana de extratos de 29 espécies, comercializadas ou coletadas em diferentes locais da Finlândia, ricos em flavonoides, frente a nove microrganismos, sendo esses efetivos contra Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*; e Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e também fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, e leveduras tais como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Existe um número significativo de famílias e espécies de vegetais que foram estudadas recentemente. Entretanto, se levarmos em conta a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, muito trabalho ainda tem de ser feito. Para a maioria das plantas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram estudados. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que também na forma

pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação estar incipientemente caracterizados, estes parece estar associado ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células. As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE, 2006).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacteriana. Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil desde a colonização e incorporadas na medicina popular (BUSSMANN, 2004).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais. Esta sequência de eventos resultou em uma legislação “*sui generis*” a respeito da biodiversidade e conhecimento tradicionais associados, agora colocados em prática (FERREIRA, 2007).

### **3.6 Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach**

*Artemia salina* é um microcrustáceo amplamente utilizado na aquicultura como alimento para as diversas fases larvais e pós-larvais de peixes e crustáceos por apresentar um alto valor nutritivo, além de não possuir carapaça rígida de quitina, facilitando a alimentação dos peixes e camarões (PEREIRA, 2001).

*Artemia* sp. apresenta importantes características: contém uma ampla adaptabilidade e salinidade (5 - 250 gL<sup>-1</sup>) e temperatura (6 - 35°C), ciclo de vida

curto (21 dias), alta adaptabilidade a condições ambientais adversas, alta fecundidade, estratégia de reprodução assexuada/sexuada, tamanho reduzido, adaptabilidade a variação nutricional (NUNES et al. 2006).

Quando comparado a outros organismos-alvo que vão desde equinodermos, moluscos até microalgas, sob as mesmas condições experimentais, *Artemia* se mostrou mais resistente, o que o torna um dos mais valiosos organismos-teste disponíveis para bioensaios toxicológicos e ecotoxicológicos, sendo por isso considerado um bioindicador (NUNES et al. 2006). Além disso, significativa correlação ( $r=0,85$ ,  $p<0,05$ ) foi estabelecida entre o sistema TAS e o teste sobre toxicidade oral em camundongos sugerindo o uso de *Artemia* como teste preliminar de baixo custo para avaliação de toxicidade em mamíferos (PARRA et al. 2001).

O teste de toxicidade em *Artemia salina* (TAS) é um dos mais utilizados para a realização de um fracionamento guiado por bioatividade de extratos vegetais (TASKOVAA et al. 2003; MOREIRA et al. 2003; NOLDIM et al. 2003). A validade e confiabilidade deste tipo de teste fazem com que seja capaz de convergir para o isolamento de substâncias bioativas correlacionadas com outros tipos de atividades biológicas como antitumoral, antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanocida (SIQUEIRA et al. 1998).

### **3.7 Avaliação antioxidante de Produtos Naturais contra o estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é um desequilíbrio químico da célula a um estado pró-oxidativo em que há uma grande formação de radicais livres; responsáveis pela gênese de diversas patologias ligadas ao processo de envelhecimento, como as doenças cardiovasculares, aterosclerose, diabetes, cegueira, doença neurodegenerativas e cânceres (FLOYD, 1999). Dentre os radicais livres, moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados, as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) representam a classe mais importante de radicais gerados pelos sistemas biológicos e são capazes de causar danos a biomoléculas (BARREIROS et al. 2006; VALKO et al. 2007).

Nas proteínas, as ERO's atacam preferencialmente as cadeias laterais da cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, inativando-as. Nos resíduos de ácido graxo dos fosfolipídeos de membrana há uma extrema sensibilidade à peroxidação comprometendo a integridade física da célula. No DNA as ERO's

reagem com as bases púricas e pirimídicas além de reagir também com o esqueleto açúcar-fosfato através da abstração de hidrogênio causando ruptura na cadeia desoxirribonucleotídica (BARREIROS et al. 2006; VALKO et al. 2007). Modificação permanente no material genético resultante desse dano oxidativo é o primeiro passo para formação de cânceres os quais são a terceira maior causa de morte no Brasil (SASSE, 2006).

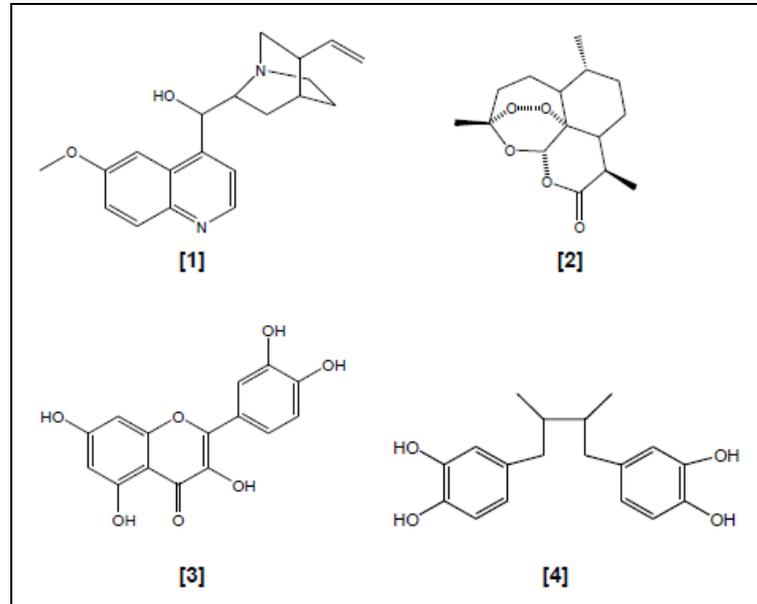
Os antioxidantes, por sua vez, são substâncias que diminuem a formação de radicais livres ou previnem o dano causado por eles e podem ser divididos em dois grandes grupos: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. Enquanto os enzimáticos são produzidos endogenamente e incluem na sua maioria enzimas tais como superóxidos dismutase (SOD) e catalase (CAT), os não enzimáticos representam compostos que são obtidos diretamente da dieta (RATNAM et al. 2006).

Nesse contexto desenvolveu-se a ideia dos alimentos funcionais ou nutracêuticos. Alimentos que contém níveis significativos de componentes biologicamente ativos que trazem benefícios à saúde, além da nutrição básica. São aproveitados no próprio consumo dos alimentos *in natura* ou então isolados e inseridos em outro produto passando então a ser enriquecido com nutrientes. Os polifenóis representam a classe mais importante de compostos naturais com propriedades antioxidantes obtidos diretamente da dieta (PLANETA, 2006).

O flavonoide quercetina (Figura 2) é um grande exemplo de polifenol amplamente distribuído no reino vegetal cuja propriedade antioxidante é capaz de suprimir a carga oxidativa de neutrófilos polimorfonucleares além de proteger a membrana celular contra peroxidação lipídica (ZIELINSKA et al. 2001; NAKAGAWA et al. 2000). O ácido nordiidroguaiarético (Figura 2), uma neolignana, apresenta atividade antimicrobiana e antineoplásica e, durante anos, foi utilizada como antioxidante e adicionado em alimentos (GOTTLIEB, 1988). As estruturas da quercetina e do ácido nordiidroguaiarético estão ilustradas na figura 2.

Além disso, a oxidação lipídica pode promover a rancidez que é um dos maiores problemas encontrados na estocagem de alimentos ricos em ácidos graxos. Extratos de plantas ou isolados podem ser utilizados como aditivos úteis na promoção da estabilidade nutricional e na qualidade dos alimentos (MEDINA et al. 2003).

**Figura 2** - Estrutura química da Quinina [1], Artemisina [2]; Representam metabólitos secundários úteis no tratamento da malária. Estrutura química da quercetina [3] e do ácido nordiidroguaiarético [4]; úteis para a redução do estresse oxidativo.



**Fonte:** Fonte: adaptado de Karle & Karle, 2002.

### 3.8 Família Chrysobalanaceae

A família Chrysobalanaceae foi descrita pela primeira vez pelo botânico Robert Brown em seu estudo "*Observations, systematical and geographical, on the herbarium collected by Professor Christian Smith, in the vicinity of the Congo, during the expedition to explore that river, under the command of Captain Tuckey, in the year 1816*" (SALISBURY, 1818). É uma família composta por 17 gêneros e 525 espécies. São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, encontradas em regiões pantropical, principalmente na América (YAKANDAWALA; MORTON; PRANCE, 2010). No Brasil ocorrem sete gêneros e cerca de 250 espécies, a maioria na Amazônia (LORENZI & MATOS, 2008). A madeira é de pouco valor comercial devido ao alto teor de sílica, mas várias espécies têm frutos comestíveis (PRANCE, 1988).

As plantas da família Chrysobalanaceae têm folhas inteiras, duras, alternadas, simples, com estípulas, margem inteira. Inflorescência racemosa, paniculada ou cimosa; flores pequenas, vistosas, bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, diclamídeas, com receptáculo desenvolvido em sépalas e pétalas; cálice

com 4-5mera, dialipétala, prefloração imbricada; estames 2, 5 ou numerosos, às vezes dispostos unilateralmente, livres ou unidos entre si, anteras rimosas; disco nectarífero presente; ovário súpero, bi-tricarpelar, bi-trilocular ou hexalocular, pelo desenvolvimento de falsos septos, às vezes unilocular, placentação ereta, lóculos uniovulados, estilete geralmente inserido na base do ovário. O fruto é do tipo drupa (LORENZI & MATOS, 2008).

### 3.9 Etnofarmacologia da família Chrysobalanaceae

Na medicina popular, as espécies da família Chrysobalanaceae são utilizadas para vários fins. Entre as de uso popular, as espécies do gênero *Licania* mostram o maior número de atividade biológica, e são amplamente utilizadas na Venezuela como um anti-inflamatório (PITTIER, 1978). A maioria das espécies é cultivada por causa dos seus frutos comestíveis (TOLETO et al. 1982).

Nos cerrados brasileiros e nas matas amazônicas as espécies do gênero *Licania*, algumas conhecidas como oiticicas, tem as suas folhas usadas para o tratamento de diabetes (AGRA et al. 2007), dores no estômago (ALBUQUERQUE et al. 2007), diarreia e disenteria (CARTAXO et al. 2010). No nordeste do Brasil, são utilizadas como potencial forrageiro as espécies: *Chrysobalanus icaco*, *Couepia impressa*, *C. rufa*, *C. uiti*, *Licania parviflora*, *L. salzmännii* e *L. tomentosa*. Na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, utilizam-se como forrageiras as espécies: *Couepia impressa* e *C. rufa* e no litoral, *Chrysobalanus icaco* e *Licania tomentosa* (TABARELLI; SILVA, 2002). A casca do caule de *Parinari excelsa*, que é amplamente utilizado no Senegal (NDIAYE et al. 2008), é também utilizado para o tratamento da diabetes, assim como a espécie *Hirtella racemosa*, que é comumente conhecida no Brasil como “ajirú-do-mato” (COELHO-FERREIRA, 2009).

*Chrysobalanus icaco*, também conhecido como “abajetu”, é um arbusto nativo de tamanho médio da costa americana, sendo utilizado na medicina popular para o tratamento de leucorréia, sangramento e diarreia crônica, e também é conhecido por seus efeitos diuréticos, hipoglicemiantes e anti-angiogênicos (COSTA, 1977; PAULO et al. 2000; VARGAS-SIMON et al. 1997), no norte do Brasil, sua raiz é usada para tratar diabetes (COELHO-FERREIRA, 2009).

As espécies *Parinari curatellifolia* e *P. excelsa* são tradicionalmente usadas na África como um remédio para doenças como disenteria, epilepsia, malária, dor de

dente e venérea (UYS et al. 2002; ARNOLD & GULUMIAN, 1984). As folhas de *P. curatellifolia* são indicadas para o tratamento de dores de estômago em Uganda Austral (SSEGAWA & KASENENE, 2007). A casca do caule de *P. excelsa* é utilizada na Guiné para tratar doenças infecciosas (MAGASSOUBA et al. 2010). Na África ocidental, a casca do caule é popularmente conhecida como antihelmíntico, e o seu fruto é utilizado para tratar diabetes (DIEHL et al. 2004). Na Tanzânia, é utilizado como um anti-séptico e para o tratamento de malária (KAMUHABWA et al. 2000). *P. polyandra* também é utilizado para tratar a malária em Gana (ASASE et al. 2005).

A casca do caule de *Maranthes floribunda*, no oeste da África, é empregada no tratamento de diarreia e disenteria (KONÉ et al. 2004), *Atuna racemosa*, na Polinésia, é utilizada para tratar a náusea da gravidez (OSTRAFF et al. 2000), e no Senegal, é preparado um cigarro da casca do caule de *Neocarya macrophylla* como remédio para mordida de cobra (MOHAGHEGHZADEH et al. 2006).

### 3.10 Fitoquímica da família Chrysobalanaceae

Existem poucos estudos que abordam a composição química das espécies da família Chrysobalanaceae, além dos gêneros *Licania* e *Parinari*. Nota-se que não existem estudos com outros gêneros da família como *Hirtella*, *Dactyadenia*, *Exellodendron* ou *Grangeria*.

Estudos fitoquímicos ocorreram nos anos 60 e descreveu a presença de flavonoides agliconas em espécies de Rosaceae, incluindo dois taxa de Chrysobalanaceae: *Chrysobalanus icaco* e *Licania rigida*, onde foi identificado o mirecítina (CHAFFAUD & EMBERGER, 1960). Mais tarde, em uma investigação com 31 espécies de *Parinari* em 1985, foi observada predominância de glicosídeos flavonoides baseado em miricetina, quercetina e campferol (CORADIN et al. 1985). Outros estudos fitoquímicos do gênero *Parinari* levou a isolamento e identificação de flavonoides e glicosídeos (CHISHOLM & HOPKINS, 1966; CORADIN et al. 1985). As moléculas identificadas em Chrysobalanaceae são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Moléculas identificadas de espécies de Chrysobalanaceae.

Espécie	Molécula	Referência
<i>Licania apetala</i>	kaempferol-3-rutinoside, myricetin-3-rhamnoside, myricetin-4'-rhamnoside, quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3-arabinoside, quercetin-3-galactoside, quercetin 3-glucoside,	(Braca et al. 2002)

	rutin, taxifolin-3-rhamnoside	
<i>Licania arianeae</i>	acid 3-O-[6'-O-4-hydroxybenzoyl]- $\beta$ -D-galactopyranosyl- ursa-12-en-28- $\acute{o}$ ico, acid flavone-6-sulphonic, 4'-O-methyl- 5,7-diidroxy-flavone-6-sulphonic	(Carvalho & Da Costa, 2009)
<i>Licania densiflora</i>	myricetin, myricetin-3-rhamnoside, myricetin-3-glucoside, myricetin-3-galactoside, yricetin-4'-methoxy-3-rhamnoside, myricetin-3',5'-dimethylether-3-rhamnoside, myricetin-3'- methylether-3-galactoside, myricetin-3'-methylether-3- glucoside, myricetin-3',5'-dimethylether-3-O-glucoside, myricetin-3-O- $\alpha$ -L-(2''-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- rhamnopyranoside-3',4'-dimethylmyricetin-3-O- $\beta$ -D- glucopyranoside, quercetin, quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3-glucoside, narigenin-8-hydroxy-4'-methyl ether, catechin	(Braca et al. 1999a; Braca, 2001b)
<i>Licania heteromorpha</i>	myricetin-3-galactoside, myricetin-4'-methoxy-3- rhamnoside, myricetin-3,4'-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, myricetin-4'-methyl ether-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside, myricetin-4'-methoxy-3-galactoside, myricetin-4'-methoxy- 3-glucoside, myricetin-7-methyl ether-3,4'-di-O- $\alpha$ -L- rhamnopyranoside, betulinic acid, aliphatic acid	(Braca et al. 1999b; Braca et al. 1999c)
<i>Licania licaniaeflora</i>	kaempferol-3-(2''-xylosyl)-rhamnoside, kaempferol-3- rhamnoside, myricetin-3-arabinsoside, myricetin-3- galactoside, dihidromyricetin-3-rhamnoside, quercetin-3- rhamnoside, quercetin-3-arabinsoside, 8-hydroxy-narigenin, taxifolin-3-rhamnoside, oleanolic acid, maslinic acid, oleanolic acid 3-O-arabinsoside, betulinic acid, arjunetin, tomentic acid glucosyl ester, pomolic acid, olean-12-en- 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol	(Braca et al. 2002, Braca et al. 2001a, Bilia et al. 1996a)
<i>Licania pittieri</i>	quercetin (2), quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3- arabinsoside, quercetin-3-galactoside, quercetin 3-glucoside, catechin, epicathechin, ursolic acid, oleanolic acid	(Bilia et al. 1996a; Mendez et al. 1995)
<i>Licania pyrifolia</i>	kaempferol (3), kaempferol-3-rhamnoside, kaempferol-3- arabinsoside, kaempferol-3-(2''-xylosil)rhamnoside, hypoletin, 8-hydroxy-eriodictyol, 8-hydroxy-narigenin, myricetin (1), myricetin-3-rhamnoside, myricetin-3-(2''- xylosyl)rhamnoside, quercetin (2), quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3-arabinsoside, quercetin-3-(2''- xylosyl)rhamnoside	(Bilia et al. 1996a)
<i>Licania tomentosa</i>	betulinic acid, licanolide, palmitoic acid, oleanolic acid, stigmasterol, sitosterol, lupeol, tomentic acid, ursolic acid	(Castilho & Kaplan, 2008)
<i>Licania carii</i>	myricetin-3-rutinoside, myricetin-3-glucoside, myricetin-3- (2''-xylosyl)rhamnoside, quercetin-3-(2''- xylosyl)rhamnoside, quercetin-3-galactoside, quercetin 3- glucoside, rutin, 2 $\alpha$ -hydroxy ursolic acid, betulinic acid, maslinic acid.	(Bilia et al. 1996b)
<i>Parinari campestris</i>	kaempferol-3-rutinoside, 15-oxozoapatlin-13 $\alpha$ -yl-10' $\alpha$ ,16' $\alpha$ - dihydroxy-9' $\alpha$ -methyl-20'norkauran-19'-oic acid $\gamma$ -lactone- 17'-oate, 13-hydroxy-15-oxozoapatlin, 10 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17- tetrahydroxy-9 $\alpha$ -methyl-15-oxo-20-nor-kauran-19-oic acid $\gamma$ -lactone, 2 $\alpha$ ,10 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17-pentahydroxy-9 $\alpha$ -methyl-15- oxo-20-nor-kauran-19-oic acid (19,10)- lactone,3 $\alpha$ ,10 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17-pentahydroxy-9 $\alpha$ -methyl-15- oxo-20-nor-kauran-19-oic acid $\gamma$ -lactone,1 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17- trihydroxy-ent-kaurane.	(Coradin et al. 1985; Braca et al. 2005)
<i>Parinari curatellifolia</i>	15-oxozoapatlin, 13-methoxy-15-oxozoapatlin, 13-hydroxy- 15-oxozoapatlin.	(Lee et al. 1996)
<i>Chrysobalanus icaco</i>	pomolic acid.	(Fernandes et al. 2003)

Estudos fitoquímicos com o gênero *Licania* mostraram semelhanças com outros gêneros da família Chrysobalanaceae, resultando no isolamento e caracterização de dois compostos: flavonoides e triterpenos (CASTILHO et al. 2005). Isocartamidina e ácido 4-hidroxibenzóico foram isolados do pó da haste de *P. anamense* (WERAWATTANACHAI & KAEWAMATAWONG, 2010). De *Parinari curatellifolia*, diterpenos com núcleo molecular derivado ent-kaurene de 15-oxozoapatlina foram isoladas e apresentam atividade citotóxica (LEE et al. 1996). Em outras espécies, *P. campestris*, também foram isolados seis diterpenos kaurane (BRACA et al. 2005).

O estudo da composição fitoquímica dos outros gêneros da família pode contribuir para a caracterização dos principais constituintes em Chrysobalanaceae.

### 3.11 Atividade biológica da família Chrysobalanaceae

Há estudos que mostram a propriedade anti-hiperglicêmica de algumas espécies de Chrysobalanaceae, como *Chrysobalanus icaco* (PRESTA & PEREIRA, 1987) e *P. excelsa*, confirmando seu uso na medicina tradicional (NDIAYE et al. 2008).

A atividade biológica é observada no ácido pomólico de *Chrysobalanus icaco*. Betulínico e ácido oleanólico de *Licania tomentosa*, mostram capacidade para inibir o crescimento e induzir a apoptose na linha de células de eritroleucemia (K562), e também para evitar a proliferação de Lucena 1, um derivado vincristina resistente para K562 (FERNANDE et al. 2003). O extrato de raiz de *L. michauxii* tem citotoxicidade contra hepatoma humano cultivado (Hep G2) e câncer de cólon.

Ent-kaurane diterpenos isolados a partir da raiz de *P. curatellifolia*, mostraram citotoxicidade *in vitro* contra várias linhas celulares de câncer (LEE et al. 1996). *P. capensis* tem citotoxicidade moderada contra linhagens de células de câncer de pulmão, câncer renal e melanoma (FOUCHÉ et al. 2008). A presença de citotoxicidade pode ser indicativa de ação anticancerígena destes compostos, mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo de ação responsável pela citotoxicidade e na avaliação *in vivo* estas moléculas e extratos. A presença de agentes com atividade citotóxica de diterpenos kaurane é discutido em muitos estudos em espécies diferentes (HE et al. 2009; HUESO-FALCÓN et al. 2010; LIN et al. 2012); diterpenos encontrados em *P. capensis* possui atividade antifúngica

(GARO et al. 1997) e atividade antimalárica, mas têm elevada toxicidade (UYS et al. 2002). O extrato hexânico de *Couepia grandiflora* tem atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e do extrato etanólico contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ZUQUE et al. 2004).

Diterpenos de *Chrysobalanus icaco* têm atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al. 1991), e extrato aquoso de folhas têm um efeito genotóxico potente (FERREIRA-MACHADO et al. 2004). Outras atividades do gênero *Licania* foram descritos. Flavonóides quercetina obtidos a partir de folhas de *L. licaniaeflora* e *L. heteromorpha* expõem atividade antioxidante (BRACA et al. 2001a; Montoro et al. 2005). *Licania carii*, *L. pittieri* e *L. pyrifolia* são tóxicas contra *Biomphalaria glabrata* Say, um molusco envolvido no ciclo vital de *Schistosoma mansoni* Sambon (BILIA et al. 2000). O extrato de *L. tomentosa* tem a capacidade para inibir o vírus herpes simplex tipo I aciclovirresistente (ACVr-HSV1) e interferir com o processo inicial de infecção em concentrações citotóxicas (MIRANDA et al. 2002). Os frutos da *Atuna racemosa* apresenta atividade anti-inflamatória por inibição da biossíntese de prostaglandinas (DUNSTAN et al. 1997). Embora, espécies de *Licania* apresentem indicação popular como anti-inflamatória, existem poucos estudos para apoiar este uso.

### **3.12 Aspecto botânico de *Hirtella racemosa* var. *hexandra***

Possui folhas que variam em tamanho de 3,5 cm a 16,5 cm de comprimento por 1,5 cm a 7 cm de largura, com forma elíptica a oblonga, tendo aspecto semelhante a couro e base subcordada a cuneada; ápice acuminado com 1 mm a 14 mm de comprimento. As folhas na face abaxial apresentam nervuras secundárias que vão de 6 a 10 pares proeminentes, e na face adaxial promínulas. O pecíolo são teretes, eglandulosos, glabros ou pubérulos com comprimento de 1 mm a 3 mm. Estípulas lineares, eglandulosas, persistentes, glabras ou pubescentes com comprimento de 1,5 mm a 5 mm. Sua inflorescência é ramificada (racemosa) terminal e axilar que vai de 5 cm a 29 cm de comprimento com ráquis pubérulo ou glabrescente. Flores que variam de 3,5 cm a 6 cm de comprimento, com sépalas agudas e pouco pubérulas externamente, porém pubérulas internamente. Pétalas em tons roxos e glabras. O ovário é inserido na margem do disco, de natureza pilosa-tomentosa (Figura 2). O fruto é do tipo drupa, tem formato elipsoide com

epicarpo glabro e mesocarpo delgado, carnososo, endocarpo delgado, duro e hirsuto internamente (PRANCE, 1988).

**Figura 3** - Inflorescência de *H. racemosa* var. *hexandra*.



**Fonte:** Autor.

*Capítulo I*

---

## 4. CAPÍTULO I

### Triagem fitoquímica, propriedade antioxidante e avaliação de toxicidade dos extratos de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance (Chrysobalanaceae)

#### Resumo

A utilização de plantas medicinais é um método antigo, predominante em países subdesenvolvidos, utilizado como uma alternativa terapêutica aos problemas de saúde. Muitas plantas, que já foram testadas cientificamente, são de grande importância à contribuição da alopatia e fitoterapia, na qual podem prevenir, aliviar ou até mesmo curar processos patológicos. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi realizar a triagem fitoquímica, determinar a propriedade antioxidante e a toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos orgânicos da porção aérea de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance. O teste fitoquímico foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Matos (2007). A determinação da atividade antioxidante seguiu o método sequestrador de radicais livres de DPPH. Quanto ao ensaio de toxicidade, adotou-se a metodologia proposta por Meyer (1982). Nos resultados encontrados para o teste fitoquímico, o extrato bruto apresentou fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas. Os percentuais de determinação do sequestro de DPPH variaram de 8,13% a 90,78%. No bioensaio de toxicidade do extrato de *Hirtella racemosa* frente à *A. salina*, a dose letal capaz de matar 50% das larvas (DL<sub>50</sub>) foi de 43,4 mg L<sup>-1</sup>. O valor de DL<sub>50</sub> do extrato indica que ele possui atividade biológica considerada significativa. Nesse estudo, podemos constatar que o extrato apresenta grupos de compostos químicos derivados do metabolismo secundário das plantas, além de apresentar atividade antioxidante. O teste de toxicidade contra *A. salina* mostrou que o extrato apresenta toxicidade ativa. Contudo, por se tratar de um estudo pioneiro para essa espécie, faz-se necessário uma pesquisa mais específica das atividades biológicas, a fim de avaliar a aplicabilidade das mesmas.

**Palavras-chave:** fitoquímica, plantas medicinais, toxicidade, antioxidante

#### 4.1 Introdução

Os compostos produzidos pelos vegetais podem ser reunidos genericamente em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos e os secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos

metabólitos primários, tais como: compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides, entre outros (SIMÕES et al. 1995). Esses compostos secundários é que são, em sua maioria, responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos das plantas, além de apresentarem grande importância ecológica, pois atuam na atração de polinizadores e na ativação da defesa química da planta contra estresse ambiental (CALIXTO & YUNES, 2001).

Dentre todas as fontes de substâncias biologicamente ativas existentes, as plantas são certamente uma das estratégias mais bem empregadas. A caracterização fitoquímica tem por finalidade conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais através da identificação dos metabólitos secundários, assim chamados os produtos naturais das plantas (DIXON, 2001).

O método de análise com *Artemia salina* é proposto como um simples bioensaio para pesquisa preliminar da atividade de produtos naturais. Por esse método, é possível determinar a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>%) de componentes ativos e extratos em um meio salino (CAVALCANTE et al. 2000). A atividade do teste é manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extratos de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina*. Esse simples organismo pode ser usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, seguro e acessível (MEYER et al. 1982; ALVES et al. 2000).

A família Chrysobalanaceae é composta por 17 gêneros e cerca de 525 espécies. Estas são plantas lenhosas, arbustivas e árvores encontradas em regiões pantropical, principalmente na América. No Brasil ocorrem sete gêneros e cerca de 250 espécies, a maioria na Amazônia (NCBI, 2012).

A espécie *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance que é comumente conhecida no Brasil como “ajirú-do-mato”, é utilizada para o tratamento da diabetes (COELHO-FERREIRA, 2009). *H. racemosa* é uma espécie com potencial farmacológico inexplorado, mas possui o precedente bastante favorável de outros exemplares da família Chrysobalanaceae que são ricos em indicações de usos populares e atividades biológicas.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a espécie *H. racemosa* var. *hexandra* utilizando extratos e frações obtidas das folhas para a realização de prospecção fitoquímica preliminar, guiada pelos ensaios biológicos de toxicidade frente à *Artemia salina* e seu potencial antioxidante.

## **4.2 Materiais e Métodos**

### **4.2.1 Coleta e identificação do material botânico**

As folhas de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* foram coletadas no parque metropolitano Armando de Holanda Cavalcanti, Cabo de Santo Agostinho, Estado de Pernambuco, com coordenadas: 8°21'17.97" S, 34°57'00.30" W, e identificadas no Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A coleta foi realizada no mês de março de 2014, em indivíduos adultos e floridos. Exsicatas do material botânico encontram-se depositadas no Herbário UFP - Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, obtendo o seu número de registro UFP 77.053 e no Herbário PEUFR – Professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco com o número PEUFR 52.112.

### **4.2.2 Obtenção dos extratos brutos**

As folhas da planta foram separadas, secas ao ar livre e trituradas a pó (mesh 2,5 mm) em um moinho tipo faca e armazenadas ao abrigo da luz em frascos de vidro. O material depois de pulverizado (200 g de folhas de *H. racemosa*) foi submetido à extração sequencial com 800 mL de solventes de polaridade crescente (ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol) em aparelho de Soxhlet até o líquido extrator não apresentar mais coloração. Após a evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório, e remoção da água residual em liofilizador quando necessário obteve-se os respectivos extratos brutos. Esses extratos foram mantidos em freezer a -20°C até a realização dos bioensaios.

### **4.2.3 Prospecção fitoquímica**

A presença dos constituintes ativos foi detectada através de perfis cromatográficos em cromatografia em camada delgada, utilizando-se como suporte, Sílica GF<sub>254</sub> (230-400 mesh, Merck, Alemanha) e Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia). A quantidade utilizada do adsorvente foi de 20 a 30 vezes a quantidade em massa da amostra; a coluna de Sephadex (5 cm de diâmetro x 20 cm

de altura), com placas de vidro revestidas com gel de sílica, ativadas em estufa a 120°C por 30 minutos.

As placas foram eluídas em cubas cromatográficas utilizando sistemas de solvente e reveladores específicos para fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides, saponinas, alcalóides e cumarinas, segundo metodologias descrita por Matos (1997).

#### **4.2.4 Testes para a atividade antioxidante com o radical DPPH**

Para esses testes foram utilizados o extrato bruto das folhas de *H. racemosa* e as frações em ciclohexano, em clorofórmio, em acetato de etila e em metanol oriundo da extração sequencial em aparelho de Soxhlet.

##### **4.2.4.1 Ensaio qualitativo**

Inicialmente foram preparadas soluções estoque contendo 5 mg.mL<sup>-1</sup> de material em metanol. Para o composto puro a concentração foi de 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Para evitar uma coloração de fundo que mascarasse a reação com o DPPH, as soluções estoque foram diluídas na proporção de 1:1 em metanol de modo que foram obtidas as concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg.mL<sup>-1</sup>.

A capacidade de capturar radicais dessas amostras em relação ao DPPH foi testada usando placas cromatográficas de sílica, nas quais foram aplicadas uma gota (2 µL) de cada solução-teste e após a evaporação do solvente, a placa cromatográfica foi emersa em uma solução de DPPH a 90 µM em metanol por 10 segundos.

O aparecimento de uma coloração amarela foi tomado como indicativo de um resultado positivo para a atividade antioxidante. A intensidade da coloração depende da quantidade e natureza da capacidade de capturar radicais das substâncias presentes na amostra testada.

Utilizou-se metanol puro como controle negativo e os flavonóides (-)-catequina, (-)-galato de epicatequina e (-)-galato de epigalocatequina como controles positivos.

#### 4.2.4.2 Ensaio quantitativo

A porcentagem total do radical DPPH (90  $\mu\text{M}$ ) que reage com o antioxidante no estado estacionário (20 min) é chamado de porcentagem de inibição (PI). Para a determinação dos valores da porcentagem de inibição das amostras foram efetuadas análises espectrofotométricas. Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  de cada solução-teste foi misturada com solução metanólica do radical DPPH para um volume final de 1,5 mL em uma cubeta. Um volume igual de metanol puro foi adicionado a cubeta controle. O desaparecimento do radical DPPH na mistura reacional foi calculado usando-se duas curvas de calibração com as seguintes equações de regressão linear: ( $r = 0,99789$ ):  $A_{515 \text{ nm}} = 0,01 [\text{DPPH}] - 0,00659$  e ( $r = 0,99904$ ) (EMI),  $A_{515 \text{ nm}} = 0,01035 [\text{DPPH}] - 0,01127$  (ciclohexano e clorofórmio) e  $A_{515 \text{ nm}} = 0,01008 [\text{DPPH}] - 0,01736$  (acetato de etila, metanol e composto puro), onde o valor [DPPH] é expresso em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

A porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH<sub>REM</sub>) foi calculada de acordo com Brand-Williams et al. (1995), da seguinte forma:  $\% \text{DPPH} = [\text{DPPH}]_t / [\text{DPPH}]_{t_0} \times 100$ , onde  $t$  é o tempo quando absorvância foi determinada e  $t_0$  é o tempo zero.

A porcentagem de inibição (PI) foi calculada de acordo com a seguinte expressão:  $\text{PI} = [(A_{t_0} - A_{t_s}) / A_{t_0}] \times 100$ , onde  $A_{t_0}$  é a absorvância no tempo zero e  $A_{t_s}$  é a absorvância no tempo estacionário (20 min).

As equações de regressão linear foram estabelecidas usando-se o Origin™ versão 6.0 (Microcal, Northampton, MA, USA).

O composto EMI foi testado nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,312  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Os extratos de ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona e metanol foram testados nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156  $\text{mg.mL}^{-1}$  enquanto que as frações em acetato de etila e o composto puro foram testados nas concentrações de 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 e 0,078  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

#### 4.2.5 Bioensaio com as larvas de *Artemia salina*

Para o bioensaio com as larvas de *A. salina*, utilizou-se a metodologia de Meyer (1982) adaptada por Ruiz et al. (2005). Preparou-se uma solução salina (com sal marinho) na concentração 3,5% (m/v). O pH foi ajustado entre 8,0 – 9,0 adicionando-se gotas de uma solução 0,1 M NaOH (Merck®). Esta solução foi

utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das outras diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25°C.

Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato: 0,1, 1, 10, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h. A morte do microcrustáceo é evidenciada pela sedimentação do crustáceo. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo.

O teste foi acompanhado de controle negativo, somente com água salina, e positivo com uma solução 0,33 mM de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Dicromato de potássio). A DL<sub>50</sub> foi estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Prospecção fitoquímica

A marcha fitoquímica realizada em cromatoplasas auxiliou na detecção de algumas classes químicas presentes na planta em estudo. Constatou-se a presença dos metabólitos: fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas nos extratos foliares. O resultado da cromatografia em camada delgada pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1** - Prospecção fitoquímica de *Hirtella racemosa* var. *hexandra*.

Metabólitos	Ciclohexano	Diclorometano	Clorofórmio	Acetona	Acetato de etila	Metanol
Fenóis	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
Antocianinas	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	-	-	+	+	+	+

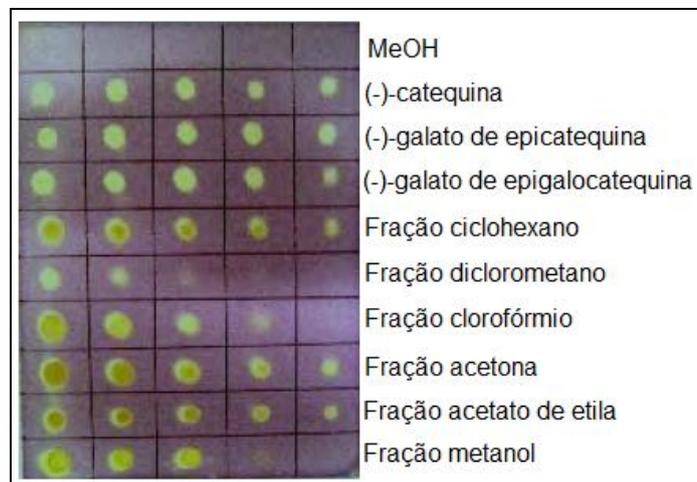
Esteróides livres	-	-	+	+	+	+
Triterpenóides	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Curmarinas	-	-	-	-	-	-

+ = detectado; - = não detectado

#### 4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante

O ensaio qualitativo antioxidante foi realizado em placas cromatográficas de sílica usando-se como revelador uma solução de DPPH a 90 $\mu$ M e revelou que as frações ciclohexano, acetona e acetato de etila, provenientes do processo de extração sequencial, reagiram rápida e fortemente com o radical DPPH, de forma semelhante aos controles positivos. A fração diclorometano, no entanto, promoveu uma fraca reação que progrediu lentamente quando comparada à forte atividade dos flavonóides utilizados como controles (Figura 1).

**Figura 1** - Ensaio do potencial antioxidante das frações do extrato foliar de *H. racemosa*.



Os valores da concentração de inibição  $CI_{50}$  (concentração necessária para diminuir em 50% a concentração do radical DPPH) e da porcentagem de inibição (PI) caracterizam a capacidade antioxidante de compostos puros, mas esses parâmetros podem ser usados também para indicar quais extratos e frações são mais adequados como fontes de antioxidantes e podem ser usados para guiar processos de isolamento e purificação. Nesse estudo, foi utilizada a medida da

porcentagem de inibição para determinar a intensidade da atividade antioxidante das amostras testadas.

A intensidade da capacidade de sequestrar radicais livres das amostras avaliadas usando-se o valor da porcentagem de inibição pode ser vistos na tabela 2. Em todas as amostras, o estado estacionário foi alcançado em até 20 minutos. A tabela 3 mostra os resultados da porcentagem de inibição dos controles.

**Tabela 2** - Atividade antioxidante de *H. racemosa* e suas frações determinada pela redução do radical livre DPPH\*.

Amostra	PI% 2,5 mg/mL	PI% 1,25 mg/mL	PI% 0,625 mg/mL	PI% 0,312 mg/mL	PI% 0,156 mg/mL	PI% 0,078 mg/mL
Fração ciclohexano	90,78	89,12	88,21	87,32	57,12	-
Fração diclorometano	53,46	19,88	16,33	10,23	8,13	-
Fração clorofórmio	90,23	89,23	84,21	52,36	23,45	-
Fração acetona	-	89,78	89,32	87,64	71,36	25,91
Fração acetato de etila	91,64	90,12	87,22	89,37	66,28	-
Fração metanol	-	90,36	87,07	86,98	78,14	-

\*Os valores de PI foram calculados no tempo estacionário (20min) (definido como o estado em que a absorbância da amostra torna-se estacionária).

**Tabela 3** - Atividade antioxidante dos controles positivos determinada pela redução do radicação livre DPPH\*.

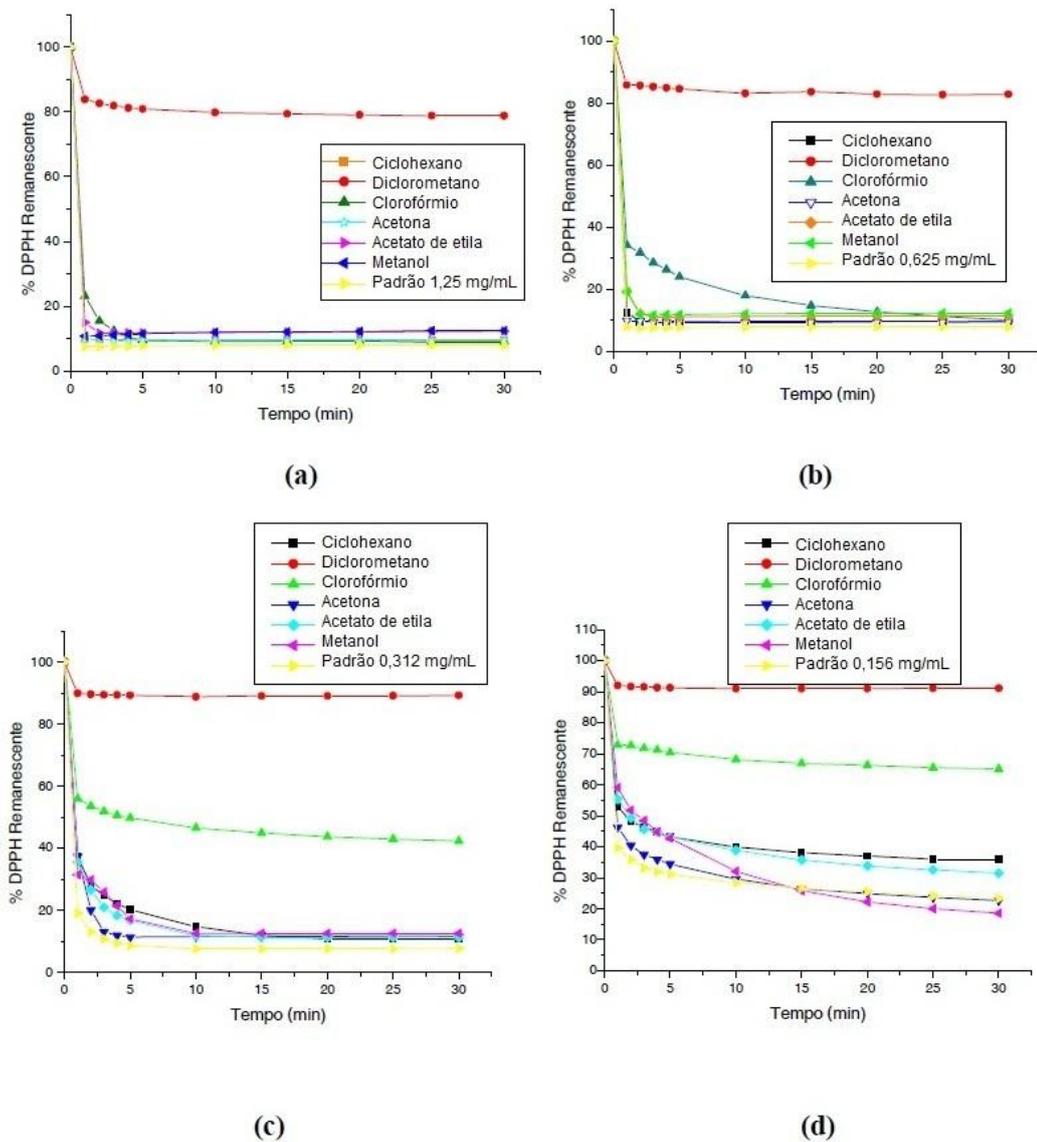
Amostra	PI% 1,25 mg/mL	PI% 0,625 mg/mL	PI% 0,312 mg/mL	PI% 0,156 mg/mL	PI% 0,078 mg/mL
Epicatequina	90,58	90,64	90,72	73,89	54,23
Galato de epicatequina	91,24	90,89	90,97	84,78	15,87
Galato de epigalocatequina	91,16	91,03	92,36	87,25	53,17

\*Os valores de PI foram calculados no tempo estacionário (20min)

De acordo com os valores exibidos na tabela 2, para *H. racemosa*, a porcentagem de inibição do radical DPPH é baixa para a fração diclorometano, comparada aos valores obtidos para as frações ciclohexano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol. Para as concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625 mg/mL as porcentagens de inibição das frações ciclohexano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol são semelhantes entre si e comparáveis aos controles, entretanto, a

partir da concentração de 0,312 mg/mL a atividade da fração clorofórmio é significativamente menor que a atividade das demais amostras. Os resultados indicam ainda que dentre as frações obtidas, a fração acetona parece ser a mais ativa e, portanto a mais rica em compostos antioxidantes. O resultado quantitativo da capacidade para sequestrar o radical DPPH para as frações ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol é mostrado na figura 2.

**Figura 2** - Comportamento cinético da *H. racemosa* var. *hexandra* determinado espectrofotometricamente a 515 nm, pela reação com uma solução de DPPH 90 $\mu$ M; (a) 1,25 mg/mL; (b) 0,625 mg/mL; (c) 0,312 mg/mL e (d) 0,156 mg/mL.



Como as atividades dos controles são muito próximas apenas a (-)-epicatequina-galato foi utilizada para a comparação gráfica.

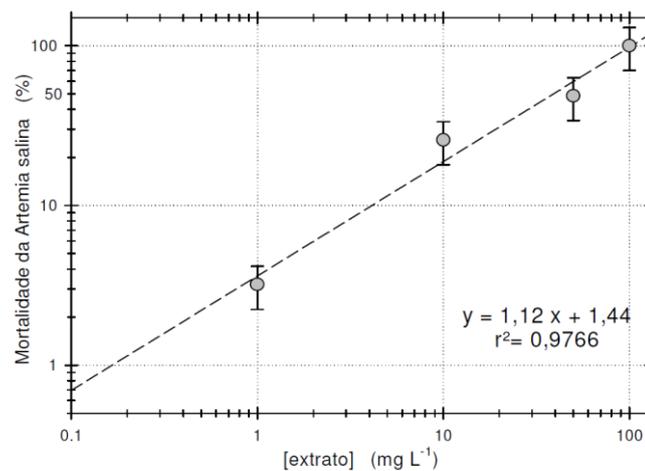
Os gráficos na figura 2 indicam que outros compostos antioxidantes de diferentes polaridades podem ainda ser obtidos de *H. racemosa*. A prospecção fitoquímica mostrou um resultado positivo para a presença dos compostos fenólicos em geral e compostos da classe dos flavonóides.

#### **4.3.3 Avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina***

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* constitui um modelo de baixo custo e prático para análises de substâncias tóxicas devido a sua alta sensibilidade a quaisquer alterações do meio, o que permitiu verificar no decorrer do teste uma mortalidade crescente, sendo quase instantânea para concentrações, tanto mais elevadas do extrato, quanto para o controle positivo, podendo inferir que o uso de concentrações maiores que as adaptadas seriam letais para estripe de *Artemia* sp., ao passo que nas proporções menores não se verificou morte dos indivíduos.

O extrato aquoso das folhas de *Hirtella racemosa* foi submetido ao bioensaio com *Artemia* sp., onde o mesmo proporcionou a relação de organismos (vivos e mortos) no final do ensaio, dispostos na Figura 3. Correlacionando os dados de porcentagem de morte *versus* concentração de extrato, a regressão linear entre esses dois parâmetros nos permite estimar uma  $DL_{50} = 43,4 \text{ mg L}^{-1}$  para o extrato. Esse valor indica uma expressiva toxicidade do extrato levando-se em consideração os dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que considera tóxica a substância que apresenta valores de  $DL_{50} < 103 \text{ mg L}^{-1}$  frente à *Artemia salina* (MEYER et al. 1982). A maior atividade tóxica concentrou-se em torno de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  onde houve a morte de 100% da população analisada.

**Figura 3** - Porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas em relação às concentrações do extrato aquoso de *H. racemosa*.



#### 4.4 Discussão

A espécie avaliada nesse estudo foi coletada em região litorânea, durante o mês de março de 2014, sendo utilizada pela população para fins medicinais. As condições ambientais (luz, umidade, temperatura e predadores) podem representar um importante fator diferencial na produção de metabólitos secundários que irão refletir diretamente na eficácia terapêutica, tais como substâncias com alto poder antioxidante, fenólico, capazes de neutralizar radicais livres (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A maioria das espécies da família Chrysobalanaceae estudadas apresentam fenóis, triterpenos, antocianinas, flavonóides e saponinas como marcadores químicos (CORADIN; GIANNASE; PRANCE, 1985).

Na família Chrysobalanaceae há registros de saponinas isoladas, tal como o ácido 3-O-[6'-O-4-hidroxibenzoil]-β-D-galactopiranosil-ursa-12-em-28-óico, saponina isolada de *Licania arianae* (CARVALHO; DA COSTA, 2009). A composição fitoquímica de *H. racemosa* var. *hexandra* é semelhante a de outros exemplares da mesma família, tal como *Licania macrophylla*, onde se observa a presença de terpenos, flavonoides e saponinas (GOMES et al. 2006).

Para avaliar a atividade antioxidante de extratos e moléculas, o ensaio com o radical DPPH é um método bastante utilizado, por ser de fácil execução e ocorrer em um espaço de tempo curto quando comparado a outros métodos. A reação pode

ser observada visualmente usando-se cromatografia em camada delgada (ensaio qualitativo) e sua intensidade pode ser avaliada por ensaios cromométricos ou espectrofotométricos (SÁNCHEZ-MORENO et al. 1998; SOLER-RIVAS et al. 2000). O radical DPPH é sequestrado pelos antioxidantes através da doação de hidrogênio para formar a molécula estável do DPPH na forma reduzida (ARGOLO et al. 2004).

Os radicais desempenham um papel importante na origem da vida e evolução biológica, produzindo efeitos benéficos nos organismos. Por exemplo, radicais oxigenados exercem ações essenciais, tais como transdução de sinais e transcrição de genes. O NO, é um dos sinalizadores mais difundidos do corpo. Entretanto, os radicais livres causam a oxidação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, lipídeos e DNA, levando a sérios danos celulares e até a morte (TEPE et al. 2005).

A capacidade de estabilizar esses radicais livres é atribuída à formação de seus esqueletos carbônicos, principalmente quando se leva em consideração o grau de hidroxilação dessas substâncias (SILVA et al. 2007). Desta maneira, a presença de compostos fenólicos, e dentre eles os flavonóides, podem estar relacionados ao potencial antioxidante das plantas.

Moreira et al, (2007) ao realizarem estudos de toxicidade frente à *Artemia salina*, verificou que a fração dos extratos analisados que continham triterpenos apresentaram uma maior ação citotóxica. Tal fato indica uma correlação entre a presença destas classes de metabólitos secundários no extrato aquoso de *H. racemosa* e a toxicidade observada frente à *Artemia salina*, ou seja, que esta atividade pode derivar ou ser causada pela presença dessas classes de compostos, onde a literatura tem mostrado que as atividades antioxidantes podem estar relacionadas ao tipo de compostos fenólicos presentes em uma ampla variedade de vegetais, fato que motivou a possibilidade de se associar a atividade antioxidante (OLIVEIRA et al. 2007).

A toxicidade da *Artemia salina* tem mostrado uma boa correlação com atividades antitumoral, inseticida e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al. 2000) para substâncias que apresentam uma  $DL_{50} < 103$  mg/L (MEYER et al. 1982; RUIZ et al. 2005).

#### 4.5 Conclusão

Com a realização da caracterização fitoquímica de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* foi possível constatar grupos de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário (fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas).

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante revelaram o potencial da espécie *Artemia salina* como fonte de substâncias antioxidantes naturais que podem ser utilizadas como agentes promissores no sequestro de radicais livres e, conseqüentemente, no tratamento de doenças relacionadas. Estudos adicionais devem ser realizados para a determinação de propriedades terapêuticas desta espécie.

#### 4.6 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Aos departamentos de Bioquímica, Botânica e Micologia (docentes e corpo técnico) por terem gentilmente facilitado a realização das análises. Ao Laboratório Central de Saúde Pública – Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN/PE) pelo apoio técnico durante a execução da parte experimental desse trabalho.

#### 4.7 Referências

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; JÚNIOR, A.S.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(3): 367-73, 2000.

ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresour. Technol.*, 95: 229 – 233, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u-Technol* 28: 25-30. 1995.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001.

CARVALHO, M.G.; DA COSTA, P.M. Outros constituintes isolados de *Licania arianeae* (Chrysobalanaceae). *Brazil J Pharmacogn* 19(1B):290-293. 2009.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a Artemia salina Leach, *Química nova*, V. 23, p. 20-22, 2000.

CHRYSOBALANACEAE. *Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)*. 2012. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has\\_linkout&id=22973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=22973). Acesso em: 8 de novembro de 2014.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal, Knowledge and Plant Utilization in an Amazonian costal Community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* 126: 159-175, 2009.

CORADIN, L.; GIANNASI, D.E.; PRANCE, A.T. Chemosystematic studies in the Chrysobalanaceae. Flavonoids in Parinari. *Britton* 37:169-178. 1985.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, p.411, p.843–847, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, N.M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006.

MATOS, F.J. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC. p. 141, 1997.

MEYER, B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45:31-4, 1982.

MOREIRA, I.C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, n.1, p.55-58, 2007.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 17: 466-476, 2007.

RUIZ, A.; MAGALHAES, E.G.; MAGALHAES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHAES, E.M.; MAGALHAES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 98-102, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270–276, 1998.

SILVA, H.R.; SILVA, C.C.S.M.; NETO, L.B.C.; LOPES, J.A.D.L.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Quím. Nova*. v. 30. n. 8, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STHEMANN, J.R. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. 4.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/Editora da UFSC, 1995.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J.C.; WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem Analysis* 11: 1-9, 2000.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem*. 90: 333-340, 2005.

*Capítulo II*

---

## 5. CAPÍTULO II

### **Atividade antibacteriana de extratos foliares de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance (Chrysobalanaceae)**

#### **RESUMO**

As plantas utilizadas na medicina tradicional estão cada vez mais estudadas por serem possíveis fontes de substâncias com atividade antimicrobianas. A espécie *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult.) Prance, popularmente conhecida como ajirú-do-mato, é uma planta muito utilizada no Brasil para o tratamento do diabetes quando usada na forma de infuso de suas folhas. Neste trabalho, foi realizada a caracterização fitoquímica e a análise da atividade antibacteriana dos extratos orgânicos (ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol) das folhas de *H. racemosa*. Para a identificação dos compostos que fazem parte do metabolismo secundário, utilizou-se cromatografia em camada delgada de sílica gel com reveladores para cada classe de metabólitos. Os métodos empregados para atividade antimicrobiana foram difusão em ágar por disco e poço, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os extratos foram avaliados sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A análise fitoquímica indicou a presença de fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas. Em geral, a inibição promovida pelos extratos no teste de difusão em ágar por poço foi maior do que os valores obtidos por disco, independentemente do extrato vegetal testado. A CIM variou entre 0,39 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo que as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis. Os resultados obtidos comprovam que *Hirtella racemosa* apresenta potencial antimicrobiano contra bactérias de importância médica.

**Palavras-chave:** medicina tradicional, *Hirtella racemosa*, microrganismos, antibacteriana

#### **5.1 Introdução**

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública, sendo necessária a pesquisa de novos agentes antimicrobianos para o combate de infecções (COSTELLOE et al. 2010; SIBANDA & OKOH, 2007). Drogas constituídas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina popular podem ser fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (XING et al. 2011).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos microrganismos patogênicos, estudos buscam por novos agentes antimicrobianos

provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais com maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos (ZHAO et al. 2011).

No Brasil, encontram-se cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO), facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças no país (DRUMOND et al. 2004).

A espécie *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. ex Roem. & Schult.) Prance, conhecida no norte do Brasil como ajururana, ajirú-do-mato, coração de negro ou murtinha (Chrysobalanaceae), apresenta-se distribuída desde o centro do México até a Colômbia, Venezuela, Guianas, Bolívia e o nordeste do Brasil (PRANCE, 2001). Popularmente a infusão das folhas é usada para o tratamento do diabetes (COELHO-FERREIRA, 2009)

De acordo com a literatura, a utilização de extratos naturais no tratamento de doenças infecciosas é promissora, entretanto, o estudo da atividade antimicrobiana de diferentes extratos deve ser ampliado. Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi verificar os principais compostos fitoquímicos e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos foliares de *Hirtella racemosa* var. *hexandra*.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Obtenção do material botânico e extratos

As folhas de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* foram coletadas no parque metropolitano Armando de Holanda Cavalcanti no município do Cabo de Santo Agostinho (PE), coordenadas: 8°21'17.97" S, 34°57'00.30" W, no mês setembro de 2014. Exsicatas do material botânico encontram-se depositadas no Herbário UFP - Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, obtendo o seu número de registro UFP 77.053 e no Herbário PEUFR – Professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco com o *voucher* PEUFR 52.112.

Após coleta das folhas, estas foram secas à sombra e submetida à trituração com o auxílio de um moinho de facas do Tipo *Willye*, até a obtenção de pó de granulometria inferior a 0,42 mm. Para obtenção dos extratos, adicionou-se 800 mL de solvente orgânico de polaridade crescente (ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol) em 200 g de folhas trituradas, em aparelho de Soxhlet, promovendo assim a separação de compostos em diferentes classes químicas. Em seguida, os extratos foram rotaevaporados e desidratados. Os extratos foram armazenados em freezer a -18°C até o momento do uso.

### **5.2.2 Prospecção fitoquímica dos extratos**

Os extratos foliares de *Hirtella racemosa* foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de Matos, 1997. A análise fitoquímica foi realizada para detecção de fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides livres, triterpenóides, saponinas, alcalóides e curmarinas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

### **5.2.3 Padronização dos inóculos bacterianos**

As culturas de microrganismos foram mantidas a 4°C em ágar nutriente. As amostras foram recuperadas em caldo Mueller-Hinton e incubadas sem agitação durante 24 horas a 36°C. Posteriormente, os inóculos foram repicados em placas de ágar Mueller-Hinton 24 horas antes do teste. Foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina estéril 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>).

### **5.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana**

Os testes foram realizados com cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 2225), *Streptococcus mutans* (ATCC 700610), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665), obtidas da coleção de microrganismos do

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os extratos foram diluídos e avaliados nas concentrações que variaram de 100 a 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>.

Foram utilizados os métodos de difusão em ágar por poço e por disco, realizadas conforme recomendações do CLSI (2009a). Utilizaram-se como controle positivo o antimicrobiano cloranfenicol (CLSI, 2009b).

### **5.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por disco e poço**

Previamente à realização dos experimentos, as amostras bacterianas foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36°C por 18 horas. Avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com o método de disco-difusão, de acordo com recomendações do CLSI (2009a), com adaptações. Para tal, discos estéreis de papel filtro (6 mm Ø) receberam uma alíquota de 20 µL de cada extrato a ser testado e, em seguida, o disco foi aplicado com pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH), previamente inoculada com o microrganismo a ser testado. Para o teste de difusão em disco foram considerados com atividade inibitória os halos com diâmetro ≥ 6 mm.

O teste de difusão por poço foi realizado conforme atualizações do CLSI (2009a), com adaptações. Foram realizados três orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar Mueller-Hinton em placas de Petri, com o auxílio de um molde formando os poços. As placas foram inoculadas na superfície pelos microrganismos com o auxílio de um suabe e, então, os poços foram preenchidos com 20 µL do extrato na concentração a ser testada.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada.

Os dados obtidos na avaliação de difusão em ágar foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey, ambos a 5% de significância, utilizando-se o programa SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2007).

### **5.2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

As amostras foram recuperadas em caldo BHI a 36°C por 18 horas antes do teste. Foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços, 150 µL de Mueller-Hinton (concentração dupla), em todos os poços. Foram adicionados à primeira coluna 150 µL de extrato; depois, foram homogeneizados e retirados 150 µL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna 12, obtendo-se, então, as concentrações do extrato (100 a 0,04 mg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 15 µL do inóculo em cada poço da microplaca e incubou-se a 35°C por 24 horas. Decorrido o tempo, foram acrescidos a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5%, e as microplacas foram novamente incubadas a 36°C por mais 3 horas.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato em mg.mL<sup>-1</sup>, capaz de impedir o crescimento microbiano. Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada com base na metodologia de Santurio et al. (2007). A partir dos extratos testados nos quais não houve crescimento bacteriano visível, retirou-se uma alíquota de 10 µL, a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 36°C e, após 24 horas, foi definida a Concentração Bactericida Mínima (CBM) como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios de CIM e CBM foram realizados em triplicata.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Composição fitoquímica dos extratos obtidos

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento e identificação dos constituintes majoritários mais importantes das plantas, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsável, ou não, pela ação biológica desejada.

No que diz respeito à prospecção fitoquímica de *H. racemosa*, os resultados da identificação das classes de compostos são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** - Resultado da composição fitoquímica de *H. racemosa* var. *hexandra* em diferentes solventes.

Metabólitos	Ciclohexano	Diclorometano	Clorofórmio	Acetona	Acetato de etila	Metanol
Fenóis	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+
Antocianinas	+	+	+	+	+	+
Flavonóides	-	-	+	+	+	+
Esteróides livres	-	-	+	+	+	+
Triterpenóides	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Curmarinas	-	-	-	-	-	-

(+) resultado positivo e (-) resultado negativo.

O peso do extrato bruto foi determinado, e seu rendimento foi calculado em porcentagem, em relação à quantidade de material vegetal seco de partida utilizado para a extração. O resultado do rendimento está demonstrado na tabela 2, a seguir:

**Tabela 2** - Rendimentos (%) dos extratos utilizados no estudo.

Extratos	Rendimentos (%)
Ciclohexano	2
Diclorometano	2,3
Clorofórmio	1,8
Acetona	1,67
Acetato de Etila	1,59
Metanol	3,38
Total	12,74

### 5.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana por difusão em ágar pelas técnicas de disco e de poço

Nos bioensaios de difusão em ágar pelo método do poço, verificou-se que os extratos inibiram todas as bactérias, com formação de halos de inibição ao redor dos poços onde foram depositadas as soluções testadas (tabela 3 e 4). Na técnica do

disco, foi possível observar que o número de bactérias inibidas pelos extratos foi menor quando comparado ao poço ( $p < 0,05$ ).

Verificou-se a presença do halo de inibição nas concentrações dos extratos entre 50 e 100 mg.mL<sup>-1</sup>, e, para a comparação das medidas dos halos entre as técnicas de difusão por poço e por disco, utilizou-se a média do diâmetro dos halos na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup>, em teste de Tukey (significância de 5%) (Tabela 3).

Observou-se que em 59,5% das medidas dos halos de inibição, utilizando a metodologia de disco, e 57,1% da metodologia do poço, o coeficiente de variação ficou abaixo de 5%. Houve diferença significativa em 26% das medidas dos halos de inibição entre as metodologias testadas, observando melhor performance dos extratos com a utilização da técnica de poço.

**Tabela 3** - Medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas (mm) obtidas pelas metodologias de disco e poço utilizando diferentes extratos e antimicrobiano comercial (cloranfenicol).

Solvente	Microrganismos					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Staphylococcus mutans</i>	
	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço
Ciclohexano	5,3 ± 3,4 a cv = 8,03%	6,8 ± 2,5 a cv = 5,66%	6,2 ± 1,3 a cv = 2,8%	7,0 ± 1,5 a cv = 4,5%	6,3 ± 0,5 a cv = 4,1%	6,8 ± 1,1 a cv = 4,53%
Diclorometano	6,2 ± 1,1 a cv = 4,1%	6,5 ± 0,0 a cv = 3,4%	6,9 ± 2,3 a cv = 2,5%	7,4 ± 0,5 a cv = 4,1%	7,1 ± 1,5 a cv = 4,5%	7,5 ± 0,5 a cv = 9,23%
Clorofórmio	7,3 ± 2,3 a cv = 3,2%	8,8 ± 1,4 a cv = 4,1%	7,6 ± 1,0 a cv = 4,5%	8,3 ± 2,6 a cv = 2,7%	8,2 ± 2,3 a cv = 6,24%	9,4 ± 0,5 a cv = 9,25%
Acetona	6,6 ± 1,5 a cv = 5,1%	8,3 ± 2,6 a cv = 0,5%	8,4 ± 2,3 a cv = 2,7%	9,5 ± 1,7 a cv = 1,6%	9,6 ± 0,5 a cv = 8,03%	9,8 ± 1,1 a cv = 8,10%
Acetato de etila	8,2 ± 0,5 a cv = 5,5%	10,7 ± 1,5 a cv = 4,6%	9,2 ± 1,70 a cv = 1,6%	14,9 ± 2,0 b cv = 1,9%	11,3 ± 0,5 a cv = 9,56%	12,9 ± 2,5 a cv = 5,53%
Metanol	9,2 ± 0,5 a cv = 1,3%	15,8 ± 0,5 b cv = 5,3%	11,6 ± 1,5 a cv = 1,9%	17,3 ± 1,1 b cv = 4,6%	12,2 ± 0,5 a cv = 8,03%	13,6 ± 1,1 a cv = 4,49%
Cloranfenicol	27,0 ± 2,0 a cv = 7,41%	46,6 ± 1,5 b cv = 3,27%	36,0 ± 1,0 a cv = 2,78%	44,0 ± 1,0 b cv = 2,27%	29,0 ± 2,6 a cv = 9,12%	41,0 ± 1,7 b cv = 4,22%

cv: coeficiente de variação; Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha: 0,05$ ).

**Tabela 4** - Medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das bactérias Gram-negativas (mm) obtidas pelas metodologias de disco e poço utilizando diferentes extratos e antimicrobiano comercial (cloranfenicol).

Solvente	Microrganismos					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Echerichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço
Ciclohexano	4,6 ± 1,1 a cv = 4,53%	6,3 ± 1,1 a cv = 6,29%	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
Diclorometano	5,6 ± 0,5 a cv = 2,62%	7,4 ± 1,5 a cv = 3,52%	0,0 ± 0,0 a	5,3 ± 0,5 b cv = 8,03%	4,3 ± 1,1 a cv = 2,75%	5,7 ± 1,1 a cv = 2,27%
Clorofórmio	7,3 ± 1,0 a cv = 4,53%	8,2 ± 1,7 a cv = 6,24%	6,0 ± 3,2 a cv = 3,4 %	7,8 ± 2,3 a cv = 4,2 %	6,2 ± 1,1 a cv = 4,23%	7,6 ± 2,3 a cv = 6,24%
Acetona	9,6 ± 0,5 a cv = 8,03%	13,2 ± 1,7 a cv = 5,66%	8,6 ± 2,8 a cv = 8,96%	10,4 ± 1,5 a cv = 4,6%	8,3 ± 2,5 a cv = 4,23%	9,6 ± 1,1 a cv = 5,3%
Acetato de etila	8,6 ± 1,1 a cv = 4,17%	11,0 ± 2,3 a cv = 4,66%	9,3 ± 1,6 a cv = 1,6%	15,4 ± 2,0 b cv = 4,19%	11,6 ± 2,8 a cv = 4,96%	13,0 ± 1,7 a cv = 5,66%
Metanol	13,0 ± 1,7 a cv = 5,33%	16,3 ± 1,5 a cv = 8,46%	16,6 ± 0,5 a cv = 7,32%	23,4 ± 2,0 b cv = 5,19%	17,6 ± 1,5 a cv = 3,52%	28,0 ± 2,6 b cv = 9,45%
Cloranfenicol	33,6 ± 0,0 a cv = 1,71%	45,0 ± 0,0 a cv = 1,0%	28,0 ± 2,6 a cv = 9,45%	34,3 ± 0,5 b cv = 1,68%	36,0 ± 1,0 a cv = 2,78%	44,0 ± 1,0 b cv = 2,27%

cv: coeficiente de variação; Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre as metodologias de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha$ : 0,05).

### 5.3.3 Determinação da atividade antibacteriana pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Em geral, a CIM variou entre 0,39 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo que para as bactérias Gram-negativas a variação das CIMs foi entre 3,13 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> e de 0,78 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para as Gram-positivas, indicando estas como sendo as bactérias mais suscetíveis (Tabela 5 e 6).

Em relação ao antimicrobiano comercial utilizado como controle positivo, foi capaz de inibir o crescimento microbiano em baixas concentrações.

**Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos de *H. racemosa* e antimicrobiano comercial frente às bactérias Gram-positivas.

Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Staphylococcus mutans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Ciclohexano	12,5	ND	6,25	ND	6,25	ND
Diclorometano	12,5	6,25	6,25	ND	6,25	6,25
Clorofórmio	1,56	3,13	3,13	6,25	3,13	3,13
Acetona	1,56	1,56	1,56	1,56	3,13	3,13

Acetato de etila	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
Metanol	0,78	0,78	1,56	1,56	0,78	0,78
Cloranfenicol	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04

ND: não determinada na faixa de concentração testada.

**Tabela 6** - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) dos extratos de *H. racemosa* e antimicrobiano comercial frente às bactérias Gram-negativas.

Extratos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Echerichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Ciclohexano	6,25	6,25	12,5	ND	12,5	ND
Diclorometano	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	ND
Clorofórmio	6,25	6,25	6,25	ND	12,5	12,5
Acetona	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	12,5
Acetato de etila	3,13	3,13	6,25	6,25	3,13	6,25
Metanol	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
Cloranfenicol	0,4	0,4	0,04	0,04	0,04	0,04

ND: não determinada na faixa de concentração testada.

## 5.4 Discussão

Não foram encontradas publicações referentes à atividade antimicrobiana das folhas de *Hirtella racemosa* com a utilização dos métodos de difusão em ágar frente a microrganismos de referência. A atividade bacteriostática e bactericida de *Hirtella racemosa* pode estar relacionada à presença de compostos da classe do seu principal constituinte, os taninos, substâncias que apresentam atividade antimicrobiana relevante atribuída à propriedade destes em se complexar com proteínas, podendo atuar na inativação de enzimas (MARTINS et al. 2000; MELLO; SANTOS, 2002).

O controle realizado com antimicrobiano comercial comprovou que, na metodologia de poço, houve melhor difusão do antimicrobiano, o que possibilitou a medição de halos maiores do que no teste de disco. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato da metodologia do poço propiciar mais facilidade de contato entre os antimicrobianos e os microrganismos testados (ALVES et al. 2008).

Verifica-se que os resultados de CIM e CBM obtidos nesse estudo refletem o efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento celular dos microrganismos em caldo. A confirmação da presença de células vivas com o uso do cloreto de 2,3,5-

trifeniltetrazólio ou a presença de células viáveis em ágar exclui a necessidade da utilização de outros testes em base ágar. Zgoda; Porter (2001) avaliaram extratos orgânicos das plantas *Lemma minor* L. e *Illex cornuta* Lindl. pela metodologia de microdiluição em caldo e afirmaram que esse método se mostrou confiável para a triagem de produtos naturais contra bactérias, permitindo realizar triagem antimicrobiana e determinando a CIM em testes com um grande número de extratos, pela utilização de uma escala de nanogramas a microgramas dos compostos a serem testados.

## 5.6 Conclusões

Os resultados deste estudo confirmam o grande potencial das plantas medicinais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Nos resultados da atividade antibacteriana dos extratos foliares de *Hirtella racemosa*, utilizando-se o método de difusão em ágar houve diferença significativa entre as metodologias de difusão em ágar analisadas, sendo que o ensaio de difusão em ágar pela técnica do poço demonstrou melhor desempenho, já que houve inibição da maioria das bactérias testadas. Novos estudos devem ser realizados, a fim de isolar os constituintes fitoquímicos responsáveis por tal atividade, por meio do fracionamento biomonitorado destes extratos, visando melhorar a seletividade destes produtos e, conseqüentemente, o uso racional como recurso terapêutico.

## 5.7 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado. Ao departamento de Bioquímica e Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pelas análises fitoquímica e determinação da atividade antibacteriana.

## 5.8 Referências

ALVES, R.R.N.; SILVA, C.C.; ALVES, H.N. Aspectos sócio econômicos do comercio de plantas e animais medicinais em áreas metropolitanas do Norte e Nordeste do Brasil. Revista de Biologia e Ciências da Terra, 8: 181-18, 2008.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009b.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Para State (Brazil), *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p.159-175, 2009.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LOVERING, A.; MANT, D.; HAY, A. *Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: Systematic review and meta-analysis*. *BMJ* 340: c2096. 2010.

DRUMMOND, D.C.; KOUIMTSIDIS, C.; REYNOLDS, M.; RUSSELL, I.; GODFREY, C.; MCCUSKER, M.; COULTON, S.; PARROTT, S.; DAVIS, P.; TARRIER, N.; TURKINGTON, D.; SELL, L.; WILLIAMS, H.; ABOU-SALEH, M.; GHODSE, H.; PORTER, S. The effectiveness and cost effectiveness of cognitive behaviour therapy for opiate misusers in methadone maintenance treatment: a multicentre randomised controlled trial (UKCBTMM). 2004.

FERREIRA, D.F. 2007. Sistema Sisvar para análises estatísticas. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/danielff/software.s.htm>. Acesso em 18 nov. 2014.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. 3ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 220, 2000.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMOES, C.M.O. (Ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ª ed. Florianópolis/Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. p.527-540, 2002.

PRANCE, G.T. Discovering the plant world. *Taxon* 50(2):345-359. 2001.

SIBANDA, T.; OKOH, A.I. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents, *African J. Biotechnology*, 6(25):2886-2896. 2007.

XING, L.D.; MAYOR, A.; CHEN, Y.; HARRIS, J.D.; BURNS, M.E. The folklore of Dinosaur trackways in China: impact on paleontology. *Ichnos* 18(4), 213–220. 2011.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, Philadelphia, v.39, n.3, p.221-225, 2001.

ZHAO, Y.; SHAY, J.W.; WRIGHT, W.E. Telomere G-overhang length measurement method 1: the DSN method. *Methods Mol Biol.* 2011.

*Conclusões*

---

## 6. CONCLUSÕES

A família Chrysobalanaceae ainda é pouco explorada na busca de novos agentes que possam contribuir com a terapêutica. Diante disso, novos caminhos na descoberta de moléculas com atividade biológica podem ser explorados. Os estudos farmacobotânico, fitoquímico e atividades biológicas de *Hirtella racemosa* var. *hexandra* (Willd. Ex Schult) Prance contribuem para o conhecimento de uma espécie ainda pouco explorada.

A análise dos resultados obtidos a partir dos objetivos propostos e sob as condições em que foram realizados os experimentos, permite as seguintes conclusões: a espécie foi caracterizada fitoquimicamente, evidenciando a presença de fenóis, taninos, antocianinas, flavonóides, esteróides, triterpenóides e saponinas, tal como a maioria dos representantes da família Chrysobalanaceae.

Quanto à toxicidade pelo bioensaio com *Artemia salina*, as concentrações tiveram  $DL_{50} < 1000$  do extrato, o que indica atividade citotóxica do extrato-teste. Foi observada atividade antimicrobiana em todos os extratos testados. Utilizando-se o método da concentração inibitória mínima, ficou demonstrada uma maior sensibilidade desta técnica; sendo que os resultados obtidos pelo CIM (organismos mais sensíveis) corroboraram com os achados da metodologia da difusão em disco. Pela técnica do CIM os seis extratos (ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol) demonstraram atividade, com concentrações variando de 0,39 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo mais eficiente contra às cepas gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus mutans*.

Estudos futuros poderão contribuir com o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos e a realização de testes farmacológicos bioguiados ajudarão a identificar quais são as moléculas responsáveis pelas atividades investigadas neste trabalho, bem como para maior compreensão dos mecanismos.

## *Referências*

---

## 7. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140. 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol* doi:10.1016/j.jep.2006.09.010. 2007.

ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance, *Cell*, v128, p1037-1050. 2007.

ALMEIDA, E.R. *Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos*. São Paulo: Hemus. 1993.

AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. *Antibióticos na Prática Médica*. Editora Rocca, São Paulo, 2000.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*. 16: 189-203. 2002.

ARNOLD, H.J.; GULUMIAN, M.J. Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *J Ethnopharmacol* 12: 35-74. 1984.

ASASE, A.; OTENG-YEBOAH, A.A.; ODAMTTEN, G.T.; SIMMONDSB, M.S.J. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *J Ethnopharmacol* 99:273-279. 2005.

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

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma* 17: 80-83. 2005.

BILIA, A.R.; BRACA, A.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Molluscicidal and piscicidal activities of Venezuelan Chrysobalanaceae plants. *Life Sci* 66: 53-59. 2000.

BILIA, A.R.; CIAMPI, L.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. *Pharm Acta Helv* 71: 199-204. 1996a.

BILIA, A.R.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharm Act Helv* 71: 191-197. 1996b.

BLACK, J.G. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.

BRACA, A.; BILIA, A.R.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Three flavonoids from *Licania densiflora*. *Phytochemistry* 51: 1125-1128. 1999a.

BRACA, A.; DE TOMASSI, N.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Flavonoids and triterpenoids from *Licania heteromorpha* (Chrysobalanaceae). *Biochem Syst Ecol* 27: 527-530. 1999b.

BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; MENDEZ, J.; MORELLI, I.; PIZZA, C. Three flavonoids from *Licania heteromorpha*. *Phytochemistry* 51: 1121-1124. 1999c.

BRACA, A.; SORTINO, C.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Triterpenes from *Licania licaniaeflora*. *Fitoterapia* 72: 585-587. 2001a.

BRACA, A.; BILIA, A.R.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Myricetin glycosides from *Licania densiflora*. *Fitoterapia* 72: 182-185. 2001b.

BRACA, A.; LUNA, D.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Flavonoids from *Licania apetala* and *Licania licaniaeflora* (Chrysobalanaceae). *Biochem Syst Ecol* 30: 271-273. 2002.

BRACA, A.; ABDEL-RAZIK, A.F.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. A new kaurane diterpene dimer from *Parinari campestris*. *Fitoterapia* 76: 614-619. 2005.

BUSSMAN, R.W. *Ethnobotany and Biodiversity and Conservation*. 2004.

CARTAXO, S.L., SOUZA, M.M.A., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 131, n.2, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, M.G.; DA COSTA, P.M. Outros constituintes isolados de *Licania arianeae* (Chrysobalanaceae). *Brazil J Pharmacogn* 19(1B): 290-293. 2009.

CASTILHO, R.O.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. *Fitoterapia* 76: 562-566. 2005.

CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae). *Quim Nova* 31: 66-69. 2008.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. *RBAC*, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CECHINEL, F.V.; YUNES, R.A. *Breve Análise Histórica da Química de Plantas Mediciniais: sua Importância na Atual Concepção de Fármaco Segundo os Paradigmas Ocidental e Oriental*. In: *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001, p. 18-46.

CHAFFAUD, M.; EMBERGER, L. *Traité de Botanique Systematique* Vol. II. Paris: Masson, p. 1338-1340. 1960.

CHISHOLM, M.J.; HOPKINS, C.Y. Kamloenic acid and other conjugated fatty acids in certain seed oils. *J Am Oil Chem Soc* 43: 390-392. 1966.

CHRYSOBALANACEAE. *Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)*. 2012. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has\\_linkout&id=22973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=22973). Acesso em: 8 de maio de 2014.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal, Knowledge and Plant Utilization in an Amazonian costal Community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* 126: 159-175. 2009.

CORADIN, L.; GIANNASI, D.E.; PRANCE, A.T. Chemosystematic studies in the Chrysobalanaceae. Flavonoids in Parinari. *Britton* 37: 169-178. 1985.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, v.40, p.1585-612, 1995.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55: 463-480. 2000.

COSTA, O.A. Brazilian plants with hypoglycaemic effects. *Leandra* 7: 63-75. 1977.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. *Atividade antimicrobiana de produtos naturais*. Conceitos 5: 77-85. 2004.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. *Biodiversidade um component essencial na descoberta de fármacos*. In: YUNES, R.A.; CECHINEL, V.F. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 2 ed. Itajaí: UNIVALI, 2007, p. 51-79.

DIEHL, M.S.; ATINDEHOU, K.K.; T'ER'E, H.; BETSCHAT, B. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *J Ethnopharmacol* 95: 277-284. 2004.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista MultiCiência*, n. 7, 2006.

DUNSTAN, C.A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; COX, P.A.; PEREIRA, P.; BOHLIN, L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rate ear oedema assays. *J Ethnopharmacol* 57: 35-36. 1997.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; COSTA, M.R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett* 190: 165-169. 2003.

FERREIRA, B.L.A. *Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal*. 2007. 110f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) - Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FERREIRA-MACHADO, S.C.; RODRIGUES, M.P.; NUNES, A.P.M.; DANTAS, F.J.S.; DE MATOS, J.C.P.; SILVA, C.R.; MOURA, E.G.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicol Lett* 151: 481-487. 2004.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Ed. Argos, 2001. 523p.

FLOYD, R. A. *Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 222, p. 236-245, 1999.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J Ethnopharmacol* 119: 455-461. 2008.

GARO, E.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K.; STOECKLI-EVVANS, H.; MAVI, S. Absolute configuration of a diterpene lactone from *Parinari capensis*. *Helv Chim Acta* 80: 538-544. 1997.

GOOTTLIEB, O.R. Lignóides de plantas amazônicas: investigações biológicas e químicas. *Acta Amazônica*, v. 18, n. ½, p. 333-344, Suplemento, 1988.

GUSTAFSON, K.R.; MUNRO, M.H.G.; CARDELLINA, J.H.; MC MALON, J.B.; GULAKOWSHI, R.J.; CRAGG, G.M.; COX, P.B.; LINDA, S.J. HIV inhibitory natural products. 3. Diterpenes from *Homalantus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* 47: 4547-4554. 1991.

HAMBURGER, M.; K. HOSTETTMANN. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30: 3864-3874. 1991.

HE, F.; XIAO, W.L.; PU, J.X.; WU, Y.L.; ZHANG, H.B.; LI, X.N.; ZHAO, Y.; YANG, L.B.; CHEN, G.Q.; SUN, H.D. Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*. *Phytochemistry* 70: 1462-1466. 2009.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, 1ed. London: Churchill Livingstone. 2004.

HUESO-FALCÓN, I.; GIRÓN, N.; VELASCO, P.; AMARO-LUIS, J.M.; RAVELO, A.G.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; ESTEVEZ-BRAUN, A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of *ent*-kaurane derivatives. *Bioorg. Med Chem* 18: 1724-1735. 2010.

JORGE, S.S.A.; MORAIS, R.G. *Etnobotânica de Plantas Medicinais*. In: COELHO, M.F.B; JÚNIOR, P.C.; DOMBRESKI, J.L.D. (Org.). Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. Cuiabá. MT, p.89-98, 2003.

KAMUHABWA, A.; NSHIMO, C.; DE WITTE, P. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 70:143-149. 2000.

KONÉ, W.M.; ATINDEHOU, K.K.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. TRAORÉ, D. DOSSO, M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 93: 43-49. 2004.

LEE, I.; SHAMON, L.; CHAI, H.; CHAGWEDERA, T.E.; BESTERMAN, J.M.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Cell-

cycle specific cytotoxicity mediated by rearranged ent-Kaurene diterpenoids isolated from *Parinari curatellifolia*. *Chem-Biol Interact* 99: 193-204. 1996.

LIN, L.; GAO, Q.; CUI, C.; ZHAO, H.; FU, L.; CHEN, L.; YANG, B.; LUO, W.; ZHAO, M. Isolation and identification of ent-kaurane-type diterpenoids from *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara leaf and their inhibitory activities against HepG-2, MCF-7, and HL-60 cell lines. *Food Chem* 131:1009-1014. 2012.

LÓPEZ, C.A.A. *Considerações gerais sobre plantas medicinais*. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, v.1, n.1, p.19-27,2006.

LORENZI, H. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas* / Harri Lorenzi, Francisco José de Abreu Matos; computação gráfica Henrique Martins Lauriano. – 2°. Ed. – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

MAGASSOUBA, F.B.; DIALLO, A.; KOUYATÉ, M.; MARA, F.; MARA, O.; BANGOURA, O.; CAMARA, A.; TRAORÉ, S.; DIALLO, A.K.; ZAORO, M.; LAMAH, K.; DIALLO, S.; CAMARA, G.; TRAORÉ, S.; KÉITA, A.; CAMARA, M.K.; BARRY, R.; KÉITA, S.; OULARÉ, K.; BARRY, M.S.; DONZO, M.; CAMARA, K.; TOTÉ, K.; VANDEN BERGHE, D.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BALDÉ, A.M. Corrigendum to "Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine". *J Ethnopharmacol* 114:44-53. 2010.

MEDINA, M.A. et al. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biochemical applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 38, p. 23-59, 2003.

MENDEZ, J.; BILIA, A.R.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. *Pharm Acta Helv* 70:223-226. 1995.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. *Microbiologia Médica*, 2 ed. Manole: São Paulo, 1999.

MIRANDA, M.M.F.S.; GONÇALVES, J.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; SILVA, F.P.; PINTO, L.; SILVA, M.H.; EJZEMBERG, R.; GRANJA, L.F.Z.; WIGG, M.D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). *Phytomedicine* 9:641-645. 2002.

MOHAGHEGHZADEH, A.; FARIDI, P.; SHAMS-ARDAKANI, M.; GHASEMI, Y. Medicinal smokes. *J Ethnopharmacol* 108: 161-184. 2006.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem* 92: 349-355. 2005.

MOREIRA, F.P.M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v.26, n.3, p.309-311, 2003.

NAKAGAWA, J.; FELTRAN, J.C.; OLIVEIRA, R.L. Maturação de sementes de azevém-anual (*Lolium multiflorum* Lam.). *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 21, n. 1, p. 174-182, 1999.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* v. 31, n. 2, p. 247–256, 2000.

NDIAYE, M.; DIATTA, W.; SY, A.N.; DIÈYE, A.M.; FAYE, B.; BASSÈNE, E. Antidiabetic properties of aqueous barks extract of *Parinari excelsa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 79:267-270. 2008.

NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NUNES, X.P.; MAIA, G.L.A.; ALMEIDA, JR.G.S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16, p. 642-644, 2006.

OSTRAFF, M.; ANITONI, K.; NICHOLSON, A.; BOOTH, G.M. Traditional Tongan cures for morning sickness and their mutagenic: toxicological evaluations. *J Ethnopharmacol* 71: 201-209.

PAULO, S.A.; BALASSIANO, I.T.; SILVA, N.H.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C.; CABRAL, M.C.; CARVALHO, M.G.C. *Chrysobalanus icaco* L. Extract for antiangiogenic potential observation. *Internat J Mol Med* 5:667-669. 2000.

PARRA, A. L.; SILVA, Y. R.; GUERRA, G. I.; IGLESIAS, B. L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v.8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEREIRA, R.C.A. *Revisão taxonômica do gênero Ichthyothere Mart. (Heleiantheae – Asteraceae)*. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2001. 223 p.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56: 237-243, 2001.

PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.J.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Revista Química Nova*, vol.28, nº.3, São Paulo, mai./jun. – 2005.

PITTIER, H. *Manual de Plantas Medicinales Usadas en Venezuela*. Fundación Eugenio Mendoza; Caracas, Venezuela; 620 pp. 1978.

PLANETA ORGÂNICO. *Conhecendo os alimentos funcionais e os seus segredos: os fitoquímicos*. Disponível em <http://www.planetaorganico.com.br/saudnut8.htm>. Acesso em 08 de maio de 2014.

PRANCE, G.T. *Flora do Estado de Goiás*. Goiânia: Ed. da Universidade Federal de Goiás. 1988.

PRESTA, G.A.; PEREIRA, N.A. Atividade do abagerú (*Crysobalanus icaco* Lin, Crysobalanaceae) em modelos experimentais para o estudo de plantas hipoglicemiantes. *Rev Bras Farm* 68:91-101. 1987.

RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control Release.*, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RAUHA, J.P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonóides and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

RIBEIRO, C.M. *Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais da Amazônia* - Belém. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

ROSA, S.G.T.; FERREIRA, A.G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. *Acta Botanica Brasílica*, v.15, n.2, p.147-54, 2001.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciências & Saúde Coletiva*, v, 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

SALISBURY, R. "[Review of] Narrative of an expedition to explore the River Zaire, usually called the Congo, in South Africa, in 1816, under the direction of Captain J. H. Tuckey, R. N". *Month Rev* 86:113-129, 292-305. 1818.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* v. 35, p. 275-280, 2004.

SASSE, A. *E-Câncer–informações para uma vida melhor*. Disponível em: <http://www.andre.sasse.com/index.htm>. Acesso em 10 de junho de 2014.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3 ed. Guanabara Koogan:

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev. Bras. Farm.* 90 (2): 124-128, 2009.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quím Nova* 1998; 21(5):557-9.

SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.; HENRIQUES, M.G. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie* 2003; 58:582-6.

SSEGAWA, P.; KASENENE, J.M. Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. *J Ethnopharmacol* 113:521-540. 2007.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. *Áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do Bioma caatinga*. In: Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária. P. 47-52, 2002.

TASKOVAA, R., MITOVA, M.; MIKHOVA, B.; DUDDECK, H. *Bioactive Phenolics from Carthamus ianatus* L. *Z. Naturforsch.* Vol. 58c, pág. 704-707, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

TOLEDO, C.L.; KBITZKI, K.; PRANCE, G.H. *Flora de Venezuela* vol IV. Caracas: Ediciones Fundacion Educacion Ambiental p 332-406. 1982.

TOLEDO, A.C.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

UYS, A.C.U.; MALAN, S.F.; VAN DYCK, S.; VAN ZYL, R.L. Antimalarial compounds from *Parinari capensis*. *Bioorg Medic Chem Lett* 12:2167. 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A. Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

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

WERAWATTANACHAI, N.; KAEWAMATAWONG, R. Chemical constituents from *Parinari anamense*. *Biochem Syst Ecol* 38:836-838. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Tradicional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva: WHO, 2002. 65p.

YAKANDAWALA, D.; MORTON, C.M.; PRANCE, G.T. Phylogenetic Relationships of the Chrysobalanaceae inferred from chloroplast, nuclear, and morphological data. *Ann Missouri Bot Gard* 97: 259-281. 2010.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos. 2001.

ZIELIŃSKA, M. et. al. The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochimica Apolonica*. Vol. 48 N°. 1/2001, 183–189.

ZUQUE, A.L.F.; WATANABE, E.S.; FERREIRA, A.M.T.; ARRUDA, A.L.A.; RESENDE, U.M.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). *Rev Bras Farmacogn* 14:129-136. 2004.

*Apêndices*

---

## APÊNDICE A

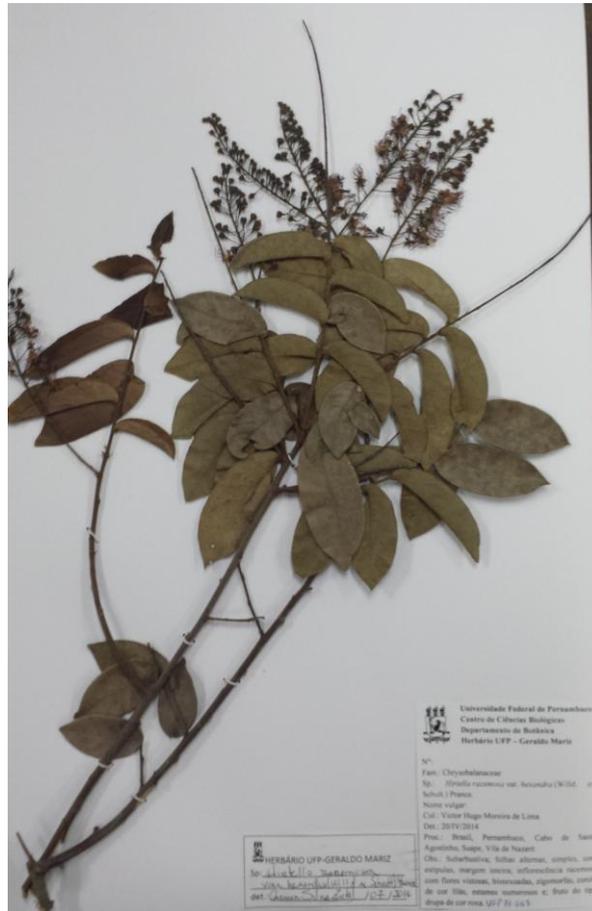


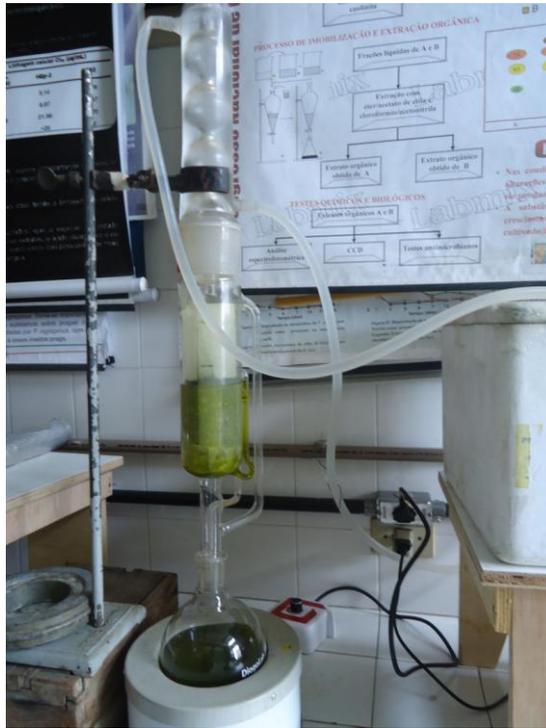
Figura 1 - Exsicata do material botânico depositada no herbário Geraldo Mariz.

## APÊNDICE B



Figura 2 - Rendimentos dos extratos brutos.

## APÊNDICE C



**Figura 3** - Extração com aparelho de Soxhlet.

## APÊNDICE D



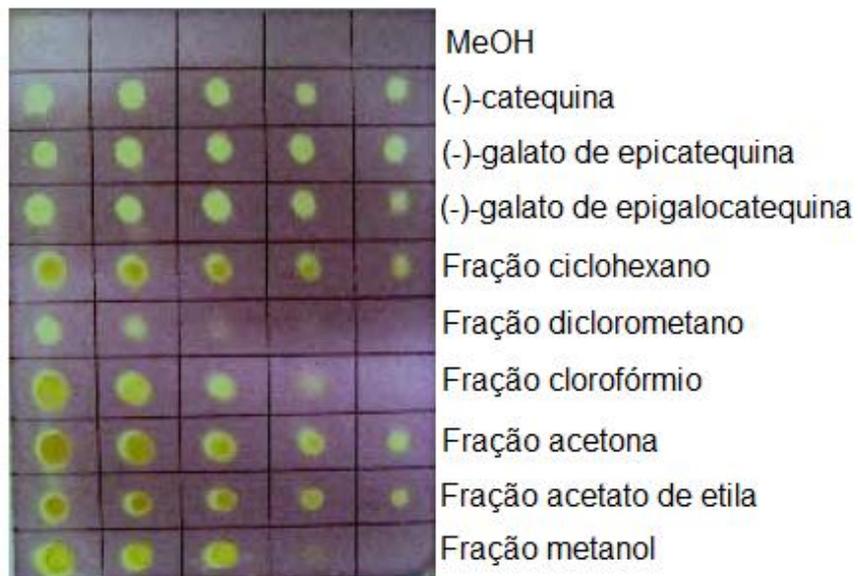
**Figura 4** - Concentração do extrato com rotaevaporador.

## APÊNDICE E



**Figura 5** - Detecção de alcalóides nos extratos foliares de *H. racemosa*.

## APÊNDICE F



**Figura 6** - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos foliares de *H. racemosa*.

## APÊNDICE G



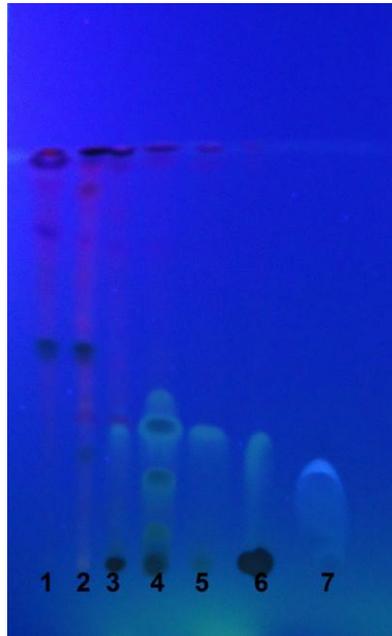
**Figura 7** - Revelador dragendorff sendo borrifado na cromatoplaca.

## APÊNDICE H



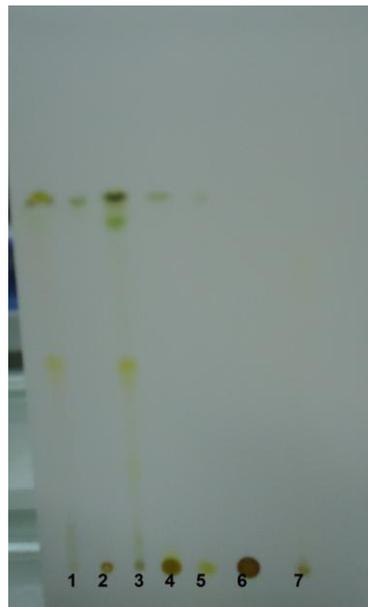
**Figura 8** - Avaliação da presença de alcalóides após aplicação de dragendorff. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] pilocarpina (padrão).

## APÊNDICE I



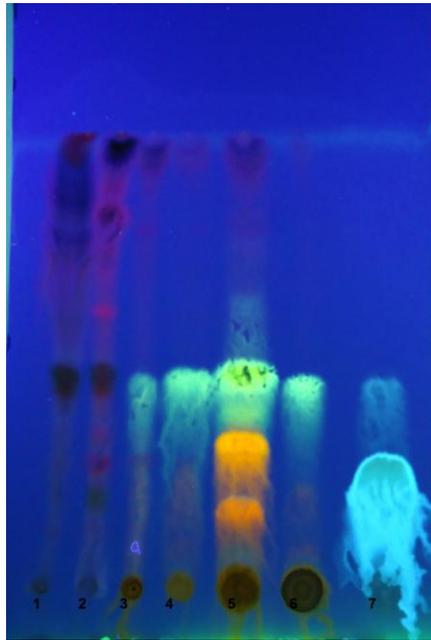
**Figura 9** - Avaliação da presença de cumarinas. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] (umbeliferona) padrão.

## APÊNDICE J



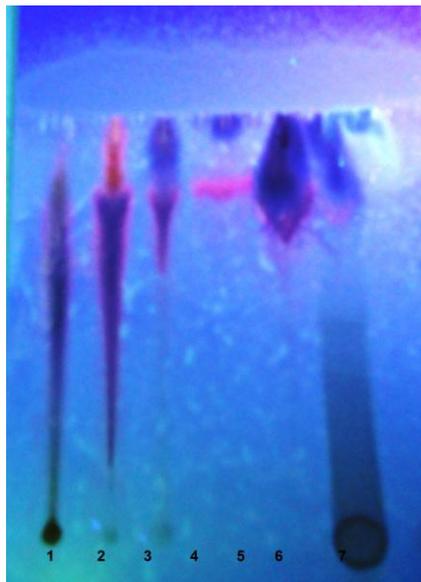
**Figura 10** - Avaliação da presença de saponinas. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] saponina (padrão).

## APÊNDICE K



**Figura 11** - Avaliação da presença de triterpenos. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7]  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol e ác. ursólico (padrão).

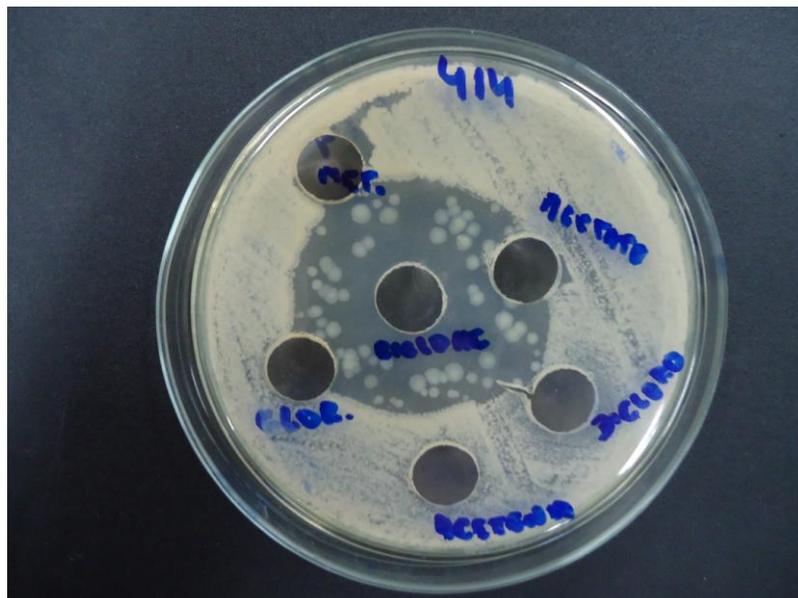
## APÊNDICE L



**Figura 12** - Avaliação da presença de flavonóides. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] (luteolina) padrão.

**APÊNDICE M**

**Figura 13** - Avaliação da presença de alcalóides. [1] diclorometano, [2] ciclohexano, [3] clorofórmio, [4] acetona, [5] acetato de etila, [6] metanol e [7] pilocarpina (padrão).

**APÊNDICE N**

**Figura 14** - Teste disco difusão frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

## APÊNDICE O



Figura 15 - Teste disco difusão frente à bactéria *Micrococcus luteus*.

## APÊNDICE P



Figura 16 - Teste disco difusão frente à bactéria *Streptococcus mutans*.

## APÊNDICE Q

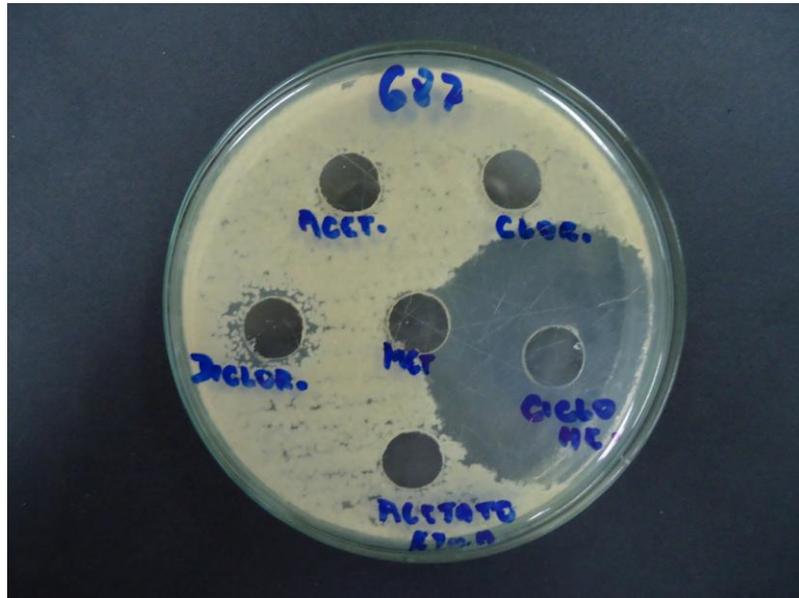
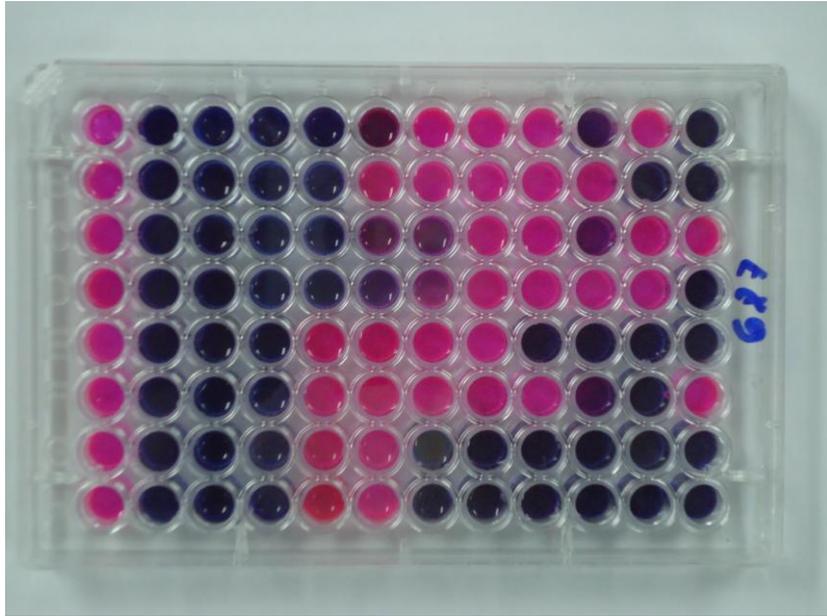


Figura 17 - Teste disco difusão frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

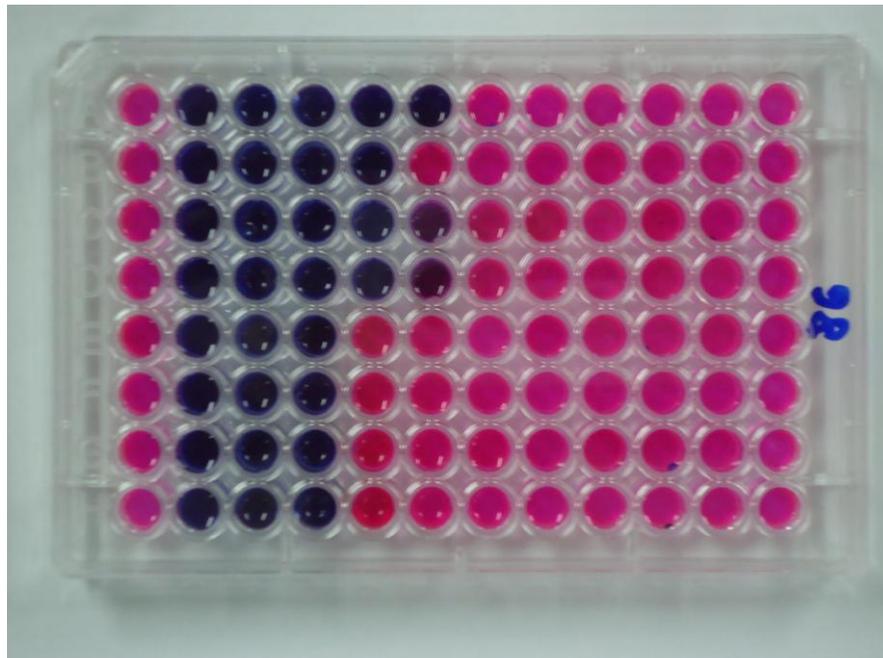
## APÊNDICE R



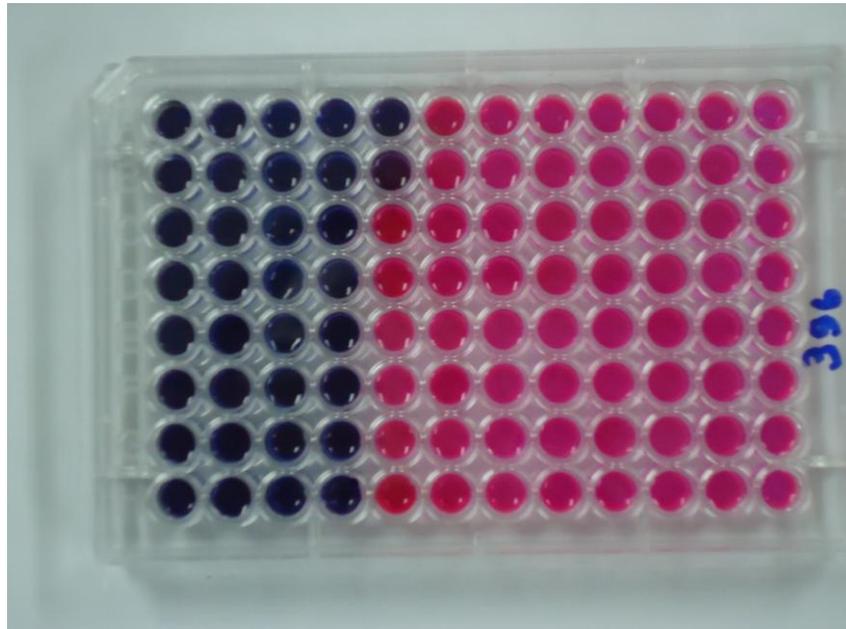
Figura 18 - Teste disco difusão frente à bactéria *Enterococcus faecalis*.

**APÊNDICE S**

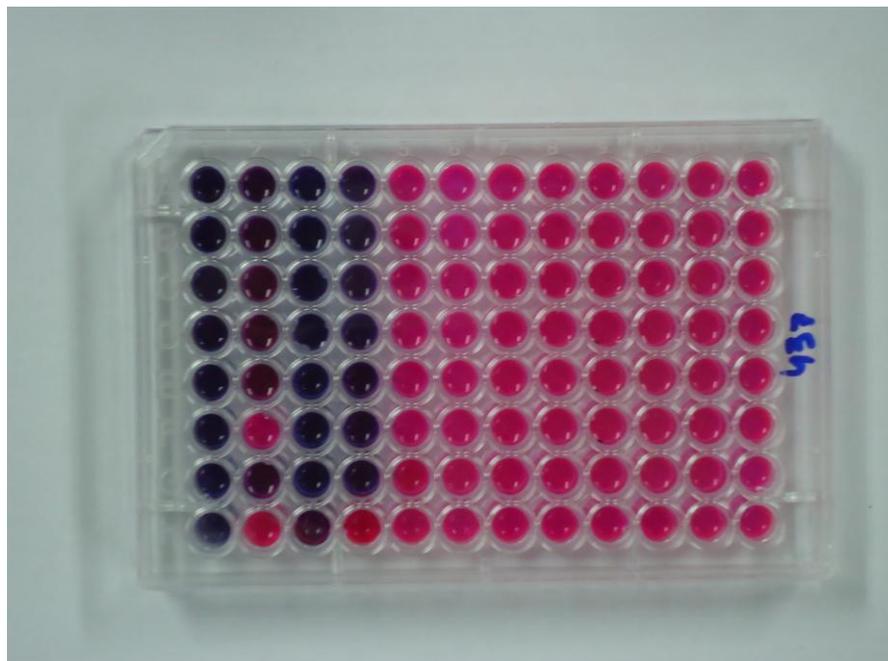
**Figura 19** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

**APÊNDICE T**

**Figura 20** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Micrococcus luteus*.

**APÊNDICE U**

**Figura 21** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Streptococcus mutans*.

**APÊNDICE V**

**Figura 22** - Teste de concentração mínima inibitória dos extratos frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis*.