



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CIPHARMA



FERNANDA COELHO SILVA

**Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e potencial antioxidante das
folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler (Salicaceae)**

Ouro Preto

2015

FERNANDA COELHO SILVA

**Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e potencial antioxidante das
folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler (Salicaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Ouro Preto
2015



S586e Silva, Fernanda Coelho.
Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e potencial antioxidante das
folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler (Salicaceae) [manuscrito] /
Fernanda Coelho Silva. - 2015.
63f.: il.: grafs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. CIPHARMA. .
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Salgueiro (Botânica). 2. Produtos de ação antimicrobiana. I. Souza,
Gustavo Henrique Bianco de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.
Título.

CDU: 615.3



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 102ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Fernanda Coelho Silva**, com a defesa da dissertação intitulada: “**Estudo Fitoquímico, antimicrobiano e anti oxidante de Folhas de Abatia americana(Gardner) Eichler (Salicaceae)**”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 11 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório
(UNIFESP)

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
(DEFAR/UFOP)

Dedico esse trabalho à vó Dorica (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pela oportunidade, sem ele nada disso teria sido possível.

À mestre Janaína Seibert pela amizade, paciência, pelo conhecimento compartilhado comigo e tantas outras coisas. Muito obrigada, Pracinha!

Às mestrandas Tatiane Roquete e Regislayne Gomes por toda a ajuda, todo o companheirismo e paciência. Tati e Régis, agradeço muito a vocês!

À Dra. Ivanildes Vasconcelos pelo incentivo e ajuda que foram de extrema importância no início da minha caminhada pela pós-graduação.

Ao pessoal do laboratório de “Fitotecnologia”, Júlia, Ana Cláudia, Tamires, Luana, Lucas, Nilton, Juliana e Simone pelas ajudas e diversões.

Aos técnicos Adão, Leonardo, Patrícia e Nonoti por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

À profa. Dra. Adriana Okuma, do CEFET-BH, pela ajuda na utilização e nas análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. À mestre Marina Costa e ao laboratório de química da UFMG pela utilização do aparelho de ressonância nuclear magnética.

Aos professores, Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, Dr. Geraldo Célio Brandão, Dr. José Márcio Barichello, Dra. Angélica Alves Lima e em especial ao prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho, nosso querido Bibó!

Agradeço também a ajuda dos professores da UFG, Dra. Rosângela Maria Rodrigues, Dra. Nadya da Silva Castro e em especial ao Dr. Frederico Augusto Guimarães Guilherme.

Agradeço à República Pandora e suas moradoras por terem me recebido tão bem, em especial à Debs! Sentirei saudades!

Agradeço aos novos colegas do LANAGRO/PA pela compreensão.

Finalmente agradeço à Vida, aos meus pais, minhas irmãs Gabi e Carol (Lúcius!) e à vó Lilita!

Muito obrigada.

*Não se pode ensinar nada a um homem;
apenas ajudá-lo a encontrar as
respostas dentro de si mesmo.*
(Galileu Galilei)

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *ABATIA AMERICANA* (GARDNER) EICHLER
(SALICACEAE)**

A espécie *Abatia americana*, pertencente à família Salicaceae, é considerada endêmica no sudeste do Brasil, porém sem registros de seu uso na medicina popular. Essa família vegetal é mundialmente conhecida por suas propriedades medicinais, tendo destaque as espécies *Casearia sylvestris* e *Salix alba*. Este estudo teve como objetivo caracterizar metabólitos secundários majoritários das folhas de *A. americana*, avaliar o extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações frente à atividade antimicrobiana e seu potencial antioxidante. Para o isolamento e identificação foram utilizadas técnicas cromatográficas clássicas e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana foi avaliada em ensaio *in vitro* pelo método de difusão em ágar (bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e levedura). A avaliação do potencial antioxidante foi realizada pela técnica de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Num primeiro momento obteve-se o EEB por extração em ultrassom das folhas secas e trituradas (193,49g), resultando em 23,66g de EEB (16,99% de rendimento). As frações hidro alcoólica (FEtOH), acetatoetilênica (FAcOEt) e n-hexânica (FHex) também foram obtidas por extração em ultrassom partindo-se de 173,85 g de folhas secas e trituradas, resultando em 26,37g (15,1%), 5,98g (3,44%) e 1,89g (1,08%), respectivamente. Na FEtOH foram identificados dois heterosídeos de flavonoides, lucenina 2 e lucenina 1 ou lucenina 3 ou 5. A avaliação antimicrobiana qualitativa mostrou que o EEB e a FEtOH apresentaram as melhores atividades antimicrobianas contra as espécies *P. rettgeri*, *S. flexneri* e *L. monocytogene*, quando comparados aos outros extratos testados neste estudo, no entanto não apresentaram atividade contra as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa*. A FAcOEt apresentou atividade contra todas as espécies de microrganismos, com exceção da *E. coli*. Entretanto para as espécies *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* a atividade antimicrobiana foi observada a partir da concentração de 200mg/mL. Já a FHex apresentou atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em todas as concentrações testadas. A avaliação antimicrobiana quantitativa demonstrou que o EEB possui atividade na concentração de 3,12mg/mL contra *S. aureus* e 6,25mg/mL contra *C. albicans*. A FEtOH apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 3,12mg/mL contra *S. aureus* e de 6,25mg/mL contra *L. monocytogene*. A FAcOEt apresentou atividade na concentração de 6,25mg/mL contra *S. aureus* e a FHex na concentração de 1,56mg/mL contra *S. aureus*. O ensaio antioxidante teve resultados promissores, uma vez que o EEB (CE₅₀ 12,63µg/mL) e a FEtOH (CE₅₀ 18,52µg/mL) apresentaram valores de CE₅₀ baixos comparando-se ao ácido gálico (CE₅₀ 50µg/mL), utilizado como controle positivo. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que a espécie vegetal *A. americana* possui um potencial antimicrobiano e antioxidante ainda não explorados no meio científico.

Palavras chave: Salicaceae, lucenina, luteolina, heterosídeo de flavonoide, *Abatia americana*.

**PHYTOCHEMISTRY STUDY, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AND OXIDANT
POTENTIAL OF *ABATIA AMERICANA* (GARDNER) EICHLER (SALICACEAE)
LEAVES**

The specie *Abatia americana*, belongs the Salicaceae family, is considered endemic of southeast of Brazil, however without records about its medicine popular use. This family is know in the world for its medicinal properties, having highlight the species *Casearia sylvestris* and *Salix alba*. This study aimed to characterize majority secondary metabolites of leaves of *A. americana*, to evaluate the ethanolic extract crude (EEB) and its fractions front of antimicrobial activity and its antioxidant potential. To identify were used chromatographic techniques classic to minimize the complexity of the sample and liquid chromatography of ultra efficiency coupled to mass spectrometry. The antimicrobial activities were evaluated *in vitro* assay for the diffusion of agar method (Gram-negative bacteria, Gram-positive and yeast). The evaluate of antioxidant properties were realized through of the radical sequestration 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl technique. In the first moment obtained the EEB to ultrasound extraction from dry leaves and crushed (193,49g), resulting in 23,66g of EEB (16,99% of yield). The hydroalcoholic fractions (FEtOH), acetate ethylenic (FACOEt) and *n*-hexanic (FHex) were also obtained for ultrasound extraction from of 173,85g the dry leaves and crushed, resulting in 26,37g (15,1%), 5,98g (3,44%) e 1,89g (1,08%), respectively. In FEtOH were identified two heterosideos flavonoid. The antimicrobial qualitative evaluation showed that EEB and FEtOH submitted the better antimicrobial activities against *P. rettgeri*, *S. flexneri* e *L. monocytogene* species, when comparative with others tested extracts in this study, however its doesn't submitted activities against *E. coli* and *P. aeruginosa* species. The FACOEt submitted activities against all the microorganisms' species, except the *E. coli*. Though for the *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* species the antimicrobial activities were note from the 200mg/mL concentration. The FHex submitted activities against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* in all the tested concentration. The quantitative antimicrobial evaluate showed that EEB has activity the concentration of 3,12mg/mL against *S. aureus* and 6,25mg/mL against *C. albicans*. The FEtOH showed antimicrobial activity in concentration of 3,12mg/mL against *S. aureus* and 6,25mg/mL against *L. monocytogene*. The FACOEt showed activity in concentration of 6,25mg/mL against *S. aureus* and the FHex in concentration of 1,56mg/mL against *S. aureus*. The antioxidant assay showed promising results, since the EEB (CE₅₀ 12,63µg/mL) and the FEtOH (CE₅₀ 18,52µg/mL) submitted values of CE₅₀ very low comparing the garlic acid (CE₅₀ 50µg/mL), used for positive control. The results obtained in this study suggest that the specie *A. americana* has an antimicrobial and antioxidant has not still exploited in scientific areas.

Key words: Salicaceae, lucenin, luteolin, heterosideo of flavonoid, *Abatia americana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho das folhas, inflorescência e demais constituintes de <i>Abatia americana</i> (MARTIUS C., EICHLER A.G., URBAN I., 1871)	15
Figura 2: Estruturas das substâncias vimblastina (A), vincristina (B) e paclitaxel (C) (BRANDÃO et al., 2010).....	17
Figura 3: Países das Américas que apresentam cepas resistentes de <i>S. flexneri</i>	20
Figura 4: Esquema de obtenção do EEB.....	25
Figura 5: Esquema de obtenção das frações FHex, FAcOEt e FEtOH.....	26
Figura 6: Esquema de obtenção das frações FHex2, FAcOEt2 e FEtOH2.....	28
Figura 7: Esquema da placa de Petri para o teste antimicrobiano qualitativo. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo e as diferentes concentrações de 100, 200 e 300mg/mL dos extratos testados em triplicata.....	31
Figura 8: Reação química entre o radical DPPH e um composto antioxidante (R).....	33
Figura 9: Flavonas identificadas por UPLC-DAD-EM.....	36
Figura 10: Espectro de massas da flavona A.....	37
Figura 11: Esquema de fragmentação da molécula de flavona A.....	38
Figura 12: Espectro de UV da flavona A.....	39
Figura 13: Estrutura química das possíveis formas da lucenina proposta para a flavona A.....	40
Figura 14: Espectro de massas da flavona B.....	41
Figura 15: Esquema de fragmentação da molécula de flavona B.....	42
Figura 16: Espectro de UV da flavona B.....	43
Figura 17: Estrutura química da lucenina 2 proposta para a flavona B.....	44
Figura 18: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações do EEB.....	45
Figura 19: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FHex.....	45
Figura 20: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FAcOEt.....	46
Figura 21: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FEtOH	46

Figura 22: porcentagem da capacidade antioxidante do EEB, FHex, FAcOEt e FEtOH em diferentes concentrações.....	51
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das massas e rendimentos obtidos do EEB e frações (primeira etapa).....	34
Tabela 2: Relação das massas e rendimentos obtidos das frações (segunda etapa).....	35
Tabela 3: Concentrações do EEB e frações em mg/mL na avaliação antimicrobiana quantitativa.....	47

Lista de abreviaturas e siglas

AcOEt: acetato de etila

ATCC: *American Type Culture Collection*

CHCl₃: clorofórmio

CN: controle negativo

CP: controle positivo

CS₅₀: concentração mínima necessária para inibir 50% do radical DPPH

DAD: detector *diode array*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EEB: extrato etanólico bruto

EM: espectrometria de massa

ESI: “eletrospray”

ESI-MS/MS: “eletrospray” acoplado a espectrometria de massas/ massa sequencial

EtOH: etanol

FAcOEt: fração acetato de etila

FAcOEt2: fração acetato de etila 2

FEtOH: fração etanólica

FEtOH2: fração etanólica 2

FHex: fração n-hexânica

FHex2: fração n-hexânica 2

n-Hex: *n*-hexano

MeOH: metanol

m/z: razão carga/massa

OMS: Organização Mundial da Saúde

UFC: unidade formadora de colônia

UPLC-DAD-EM: cromatografia líquida de ultra performance equipada com detector de arranjo de diodos acoplada a espectrômetro de massas.

US: ultrassom

UV: ultravioleta

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
Introdução	14
Objetivos	16
Revisão de literatura.....	17
<i>Uso das plantas como matéria prima para novos fármacos.....</i>	<i>17</i>
<i>Microrganismos e a resistência aos antibióticos.....</i>	<i>18</i>
Microrganismos de interesse para o presente estudo	18
<i>Uso de plantas como compostos antioxidantes</i>	<i>21</i>
Espécies reativas de oxigênio.....	21
<i>Uso de técnicas cromatográficas.....</i>	<i>22</i>
Materiais e Métodos.....	24
<i>Material botânico.....</i>	<i>24</i>
Preparação do material vegetal.....	24
Análise fitoquímica	24
Obtenção do EEB por ultrassom	24
Obtenção das frações por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade (primeira etapa).....	25
Obtenção das frações por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade (segunda etapa).....	26
<i>Atividade antimicrobiana.....</i>	<i>30</i>
Análise qualitativa.....	30
Análise quantitativa.....	31
Resultados e discussão	34
<i>Obtenção dos extratos.....</i>	<i>34</i>
<i>Obtenção do EEB e frações (primeira etapa) por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade.....</i>	<i>34</i>
Obtenção das frações (segunda etapa) por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade	34
<i>Atividade antimicrobiana qualitativa.....</i>	<i>45</i>
<i>Atividade antimicrobiana quantitativa.....</i>	<i>47</i>

Potencial antioxidante	51
Conclusões	53
Referências bibliográficas	54

Introdução

A relação dos seres humanos com as plantas existe desde o momento em que o ser humano iniciou o uso dos vegetais para satisfazer suas necessidades de sobrevivência, seja como alimento, para produzir calor, como ornamento ou para promover sua saúde (LEVY; AGUIRRE, 1999). As plantas têm sido desde então largamente utilizadas em diversas áreas do conhecimento em especial na terapêutica. Isso é possível devido ao metabolismo secundário das plantas que envolvem várias rotas biossintéticas capazes de produzir diferentes classes de compostos bioativos como flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenoides, entre outros (BRESOLIN; CECHINEL, 2003).

A área de engenharia de alimentos tem apresentado grande interesse em compostos naturais bioativos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas para aumentar o tempo de vida útil dos alimentos nas prateleiras. O benefício de se utilizar compostos naturais é que eles substituem conservantes químicos danosos à saúde humana utilizados na produção de diversos alimentos industrializados (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

Na terapêutica, Kinghorn (2001) relatou que cerca de 120 substâncias isoladas de plantas eram utilizadas na produção de inúmeros medicamentos. A riqueza de estruturas químicas sintetizadas pelas plantas constitui importante alternativa para a introdução de fármacos inovadores nessa área e pesquisas sobre espécies vegetais pouco conhecidas são importante, pois podem agregar novos compostos nas formulações farmacêuticas (BRESOLIN; CECHINEL, 2003).

A família Salicaceae é uma alternativa promissora já que possui diversas espécies que apresentam metabólitos bioativos variados e são utilizadas para diferentes propósitos terapêuticos. *Casearia sylvestris* Sw., nativa do Brasil, tem sido amplamente estudada e alguns efeitos terapêuticos tem sido demonstrado, tais como, anti-inflamatórios, antioxidante (ALBANO et al., 2013), citotóxicos (PRIETO et al., 2012; PRIETO et al., 2013), antídoto contra veneno de serpente (CAVALCANTE et al., 2007) e analgésico (DE MATTOS et al., 2007). Collins e colaboradores (1990) demonstraram a ação antitumoral das cascas de *Casearia multinervosa* C.T.White & Sleumer, uma espécie nativa da Austrália.

Abatia americana (Gardner) Eichler, da extinta família Flacourtiaceae (APG III, 2009), atualmente está inserida na família Salicaceae (Figura 1). A espécie é endêmica da

região sudeste do Brasil e ocorre nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (FORZZA et al., 2010). No entanto, os estudos fitoquímicos realizados com a mesma até o presente estudo, não demonstraram seu uso terapêutico nem sua ação antimicrobiana.



Figura 1: Desenho das folhas, inflorescência e demais constituintes de *Abatia americana* (MARTIUS C., EICHLER A.G., URBAN I., 1871)

Objetivos

O objetivo geral desse estudo foi realizar uma investigação fitoquímica das folhas de *Abatia americana*, a atividade antimicrobiana e o potencial antioxidante do extrato etanólico bruto e frações. Os objetivos específicos foram:

- obter os extratos das folhas, utilizando solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, acetato de etila e etanol) de modo sequencial, bem como o extrato etanólico bruto (EEB);
- caracterizar substâncias majoritárias por técnicas de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector *diode array* e espectrometria de massas.
- avaliar qualitativa e quantitativamente a atividade antimicrobiana do EEB e suas frações;
- avaliar o potencial antioxidante.

Revisão de literatura

Uso das plantas como matéria prima para novos fármacos

A origem da medicina ocorreu concomitantemente ao uso de plantas e produtos de origem animal. Antropólogos datam esse fato na época da pré-história, mais precisamente da idade da pedra lascada. Dioscórides, considerado o fundador da farmacognosia, deixou como legado cinco livros que descrevem o uso de 600 plantas para fins terapêuticos, há séculos antes de Cristo (DIAS, 2005).

O uso das plantas como fonte de substâncias farmacológicas é devido à presença de diversos metabólitos secundários, muitos deles ainda desconhecidos, produzidos pelas mesmas. Modificados quimicamente em laboratório, tiveram a sua propriedade terapêutica potencializada como foi o caso das substâncias vimblastina e vincristina isolados da espécie *Catharanthus roseus*, dos derivados da substância paclitaxel da espécie *Taxus brevifolia* (Figura 2), entre outros (KINGHORN, 2001; DEL ROSÁRIO et al., 2012.).

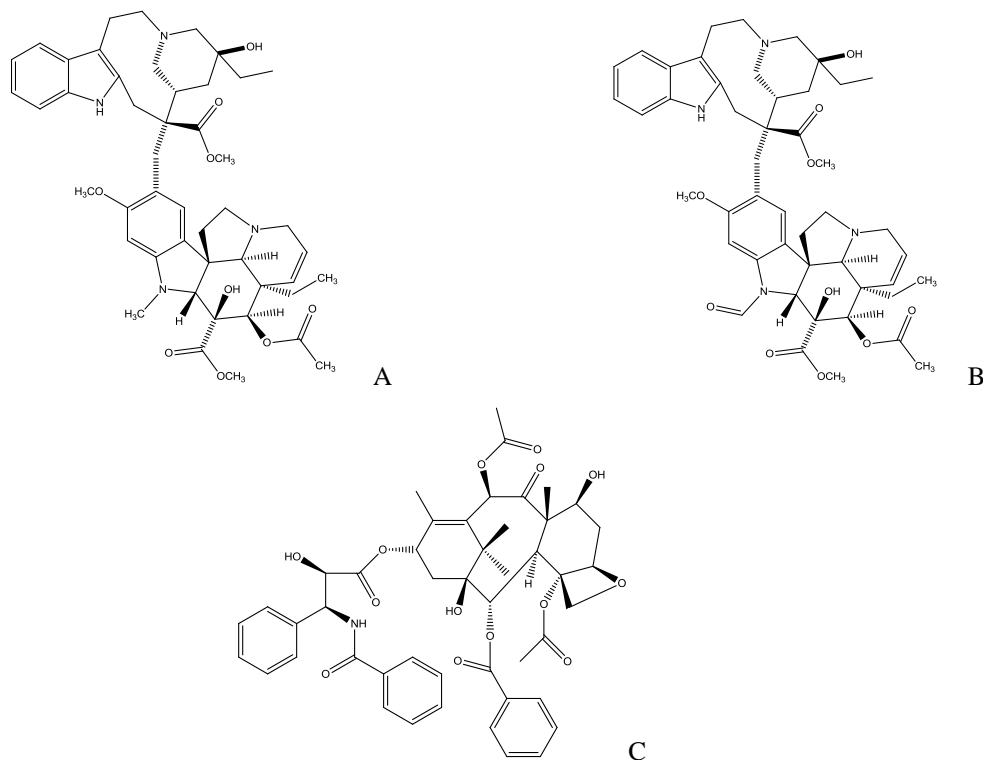


Figura 2: Estrutura química da vimblastina (A), vincristina (B) e paclitaxel (C).

Apesar da inúmera quantidade de medicamentos atualmente disponíveis no mercado, grande parte da população não possui condições financeiras para adquiri-los. Com isso, o uso das plantas como alternativa para o tratamento de diversas enfermidades continua sendo muito utilizado (BIAVATTI et al., 2007; VEIGA-JÚNIOR, 2008). Além disso, com o uso indiscriminado de determinados medicamentos, diversos micro-organismos criaram resistência a diferentes fármacos e esse fato impulsiona cada vez mais estudos detalhados e aplicados de substâncias originadas de produtos naturais (KINGHORN, 2001).

Microrganismos e a resistência aos antibióticos

O uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos trouxe como consequência o surgimento de diversas cepas de bactérias, fungos, vírus e parasitas resistentes a diversos medicamentos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em seu relatório de 2014 denominado *Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance*, mais de 74% dos países apresentam cepas de micro-organismos resistentes aos antibióticos utilizados. A ocorrência de uma epidemia, ou mesmo uma pandemia, de uma dessas cepas resistentes pode dizimar parte da população mundial, como foi o caso da peste bubônica no final do século 14, gripe espanhola no início do século 20 (SASSO; CHIMARA; MONTEIRO, 2004) e recentemente, no ano de 2014, o surto do “vírus ebola” no continente africano foi considerado pela OMS (2014) como sendo o maior da história recente.

Microrganismos de interesse para o presente estudo

Microrganismos apresentam relevância clínica, uma vez que podem causar a morte de crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas (CORDEIRO, A. L. A. O et al, 2015). Alguns desses exemplos, tais como bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogene*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Providencia rettgeri* e a levedura *Candida albicans* são detalhados a seguir.

Escherichia coli é uma bactéria bacilar do tipo Gram-negativa, anaeróbia facultativa, que existe normalmente no trato intestinal de animais de sangue quente sem causar danos. No entanto, algumas cepas (cerca de 10%) são patogênicas aos humanos e causam infecções gastrointestinais como diarreia, colites hemorrágicas e síndrome da uremia hemolítica. Causam infecções extra intestinais como infecções do trato urinário e meningite neonatal (SANTOS et al., 2009; EL-RAMI et al., 2012; YANG; WANG, 2014). De acordo com relatório da OMS (2014), a espécie *E. coli* apresenta altas taxas de resistência contra a terceira

geração do medicamento cefalosporina e fluoroquinonas, fármacos utilizados como referência para o tratamento de infecções causadas por esse microrganismo.

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria bacilar do tipo Gram-negativa, anaeróbica facultativa que causa desde infecções do trato urinário até pneumonia acometendo normalmente pacientes hospitalizados (AH; KIM; LEE, 2014). Essa espécie apresenta resistência aos medicamentos do tipo carbapenems em mais de 54% dos países do mundo (OMS, 2014). No Brasil, em 2010 ocorreu um surto de uma cepa resistente denominada KPC ou superbactéria (ALVES; BEHAR, 2013).

Staphylococcus aureus é uma bactéria do tipo coco Gram positiva, normalmente encontrada na epiderme e nas mucosas nasais de pessoas saudáveis. Algumas cepas resistentes causam desde infecções simples como acne ou furúnculos até infecções graves como meningite, endocardite, pneumonia e septicemia, levando muitas vezes o paciente a óbito (SANTOS et al., 2007). Segundo a OMS (2014), o número de cepas resistentes à meticilina, apresentou altas taxas de crescimentos em diversos países. O medicamento utilizado contra cepas resistentes, fármacos de segunda-linha, apresentam altos custos além de provocarem diversos efeitos colaterais.

Candida albicans é uma espécie de levedura diploide que coloniza naturalmente mucosa oral, vaginal e o trato digestório. No entanto, causam oportunamente infecções como candidíase e caso esses micro-organismos atinjam a corrente sanguínea, provocam candidaemia e com isso o desenvolvimento de candidíase em diversas partes do organismo de pacientes imunodeprimidos (MAVOR; THEWES; HUBE, 2005; GUEDOUARI et al., 2014). Segundo dados da OMS (2014), não se têm registros precisos sobre a resistência dessa levedura aos fármacos utilizados em seu tratamento. No entanto, encontrou-se na Dinamarca uma taxa de 33% de resistência ao medicamento fluconazol.

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, causador de uma doença denominada listeriose. Listeriose é definida como uma infecção alimentar que pode ser fatal em pessoas imunodeprimidas, idosos, grávidas e crianças, desencadeando quadros de septicemia e meningite (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007; DREVETS; BRONZE, 2008). Apesar dessa bactéria apresentar sensibilidade a diversos agentes antimicrobianos, já foi confirmada sua resistência à fluoroquinolonas e cefalosporina especialmente as de terceira e quarta gerações (GÓMES et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio, causador de infecções nosocomiais em pacientes hospitalizados (FIGUEIREDO-MENDES et al., 2005). Os antimicrobianos do tipo carbapenems são os mais utilizados na clínica contra infecções multirresistentes de espécies Gram-negativas (RUPP; FEY, 2003). No entanto, já se constatou resistência crescente dessa espécie contra os carbapenems deixando como alternativa a utilização de fármacos considerados inadequados devido aos seus efeitos colaterais, como é o caso das polimixinas e que muitas vezes não estão disponíveis para venda no Brasil (NEVES, 2010; NEVES et al., 2011).

Shigella flexneri é uma bactéria bacilar Gram-negativa causadora da doença denominada shigelose ou disenteria bacilar. Essa doença acomete cerca de 164 milhões de pessoas, principalmente crianças com idade inferior a cinco anos, levando à morte aproximadamente um milhão de pessoas por ano (KOTLOFF et al., 1999; PORE; CHAKRABARTI, 2013). Segundo dados da OMS (2014), existem cepas resistentes de *S. flexneri* ao medicamento fluoroquinolona em quase 30% dos países do mundo. O país que apresenta a maior taxa de cepas resistentes nas Américas é o Canadá com 20% (Figura 3).



Figura 3: Países das Américas que apresentam cepas resistentes de *S. flexneri*.

Providencia rettgeri, um bacilo Gram-negativo é normalmente encontrado no trato intestinal de pessoas saudáveis, em solos e na água (GOENAGA et al., 2001). Essa espécie é conhecida por causar infecções no trato urinário e septicemia em pacientes imunodeprimidos. No entanto, estudos recentes tem relacionado a *P. rettgeri* à infecções oculares como, conjuntivite, dacriocistite, queratite e endoftalmite, além de verificar a sua resistência aos fármacos β -lactâmicos (RUSSO, 2001; KOREISHI; SCHECHTER; KARP, 2006).

A resistência dos microrganismos acima citados, aos antibióticos utilizados ameaça a saúde pública global e gera grande impacto na economia mundial. A questão da resistência a antibióticos em escala global, enfatiza a necessidade de novos estudos visando a produção de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que a última classe de fármacos antibacterianos descoberta ocorreu durante a década de 80 (OMS, 2014).

Dessa forma, faz-se necessário o estudo de novas matérias primas, entre elas espécies vegetais com finalidade antimicrobiana, uma vez que as plantas produzem diversos metabólicos secundários que auxiliam na sua sobrevivência e na defesa contra diversos tipos de microrganismos.

Uso de plantas como compostos antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são por definição átomos ou moléculas reativas do oxigênio, altamente instáveis pelo fato de apresentarem em sua última camada eletrônica um número ímpar de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Atualmente, os radicais livres são mal vistos em diversas áreas. Uma delas é a engenharia de alimentos, devido ao fato dessas substâncias provocarem degradação precoce de diversos alimentos, principalmente os que contem ácidos graxos em sua composição (ORDÓÑEZ et al., 2005). Outra área é a cosmética/estética pelo fato desses compostos acelerarem o processo de envelhecimento celular caracterizado por alterações proteicas, perda de elasticidade, ineficiência na capacidade de realizar trocas aquosas e regeneração tecidual e conseqüentemente o envelhecimento cutâneo (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

A produção de radicais livres em sistemas biológicos é essencial para a manutenção da vida, uma vez que são eles os responsáveis por importantes reações bioquímicas (entre elas a produção de ATP por intermédio da cadeia transportadora de elétron nas mitocôndrias), pela fertilização do óvulo, pela atuação direta no combate de infecções, além de atuarem na ativação de determinados genes (SHAMI; MOREIRA, 2004).

Quando ocorre produção excessiva de radicais livres, ou os mecanismos antioxidantes presentes tornam-se ineficientes em um sistema biológico, ocorre o estresse oxidativo. Muitos autores relatam que o estresse oxidativo tem participação em diversas patologias, tais como a síndrome metabólica, neoplasias, doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose, diabetes, e outras (MAYNE, 2003; CRUZAT et al., 2007; VINCENT; INNES; VINCENT, 2007; BARBOSA et al., 2010)

A busca por compostos antioxidantes tem sido cada vez mais frequente na área científica e por se tratar de um tema multidisciplinar, esses compostos vem atraindo um número cada vez maior de pesquisadores em diferentes áreas (SELLÉS, 2011).

As plantas, por serem organismos sésseis são vulneráveis às diversas alterações ambientais que ocorrem ao seu redor. Por este fato elas tiveram que se adaptar e desenvolver mecanismos naturais de defesa, entre eles o de defesa antioxidante. Sabe-se que as plantas possuem duas formas de defesa contra os radicais livres, os sistemas enzimáticos que incluem as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e os não enzimáticos que incluem a produção de compostos fenólicos, vitaminas e minerais (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; BARBOSA et al., 2010; ROSSI; COSTA, 2012).

De posse dessas informações, a busca por compostos antioxidantes em plantas apresenta-se de forma promissora. São encontrados na literatura diversos estudos que relacionaram a propriedade antioxidante a diferentes extratos vegetais e na maioria dos casos os resultados apresentados foram satisfatórios. Seguindo esse raciocínio, espera-se encontrar na espécie *A. americana* resultados positivos para seu potencial antioxidante.

Uso de técnicas cromatográficas

A utilização das técnicas cromatográficas tem seus primeiros registros datados no ano de 77 DC, pelo militar romano naturalista Caio Plínio Segundo (PACHECO et al., 2015).

Nesse momento da história, Plínio Segundo descreveu um método cromatográfico para verificar a autenticidade de um fármaco utilizado para finalidades antifúngicas, um sal de nome *Verdigris*. O método utilizado era a aplicação do sal em folhas de papiro embebidas em um extrato vegetal; se o sal fosse puro o papiro tornava-se negro. Caso contrário, o *Verdigris* estaria adulterado com pó de mármore verde utilizado na época para aumentar o rendimento do sal (<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/>).

A fim de melhorar a eficácia da separação por cromatografia, muitos estudos foram realizados ao longo dos últimos séculos. No século XIX, o médico Jöns Jacob Berzelius descreveu o fenômeno da desmineralização da água salgada através de filtração em areia (PACHECO et al, 2015), que seriam os primórdios da cromatografia em coluna de sílica gel. Em 1903, início do século XX, o botânico Mikhail Semenovich Tswett, apresentou um estudo sobre a aplicação do fenômeno de adsorção em análises bioquímicas e em 1906 ele publicou dois artigos que descreviam o uso da cromatografia e sua aplicação ao estudo da química da clorofila (BEREZKIN, 1989).

Com a melhoria das técnicas cromatográficas ao longo dos séculos muitas áreas das ciências foram beneficiadas, como é o caso do uso da cromatografia líquida de alta eficiência em análises ambientais, clínicas, toxicológicas, de medicina forense, entre diversas outras áreas (MALDANER, 2012). As técnicas mais sofisticadas deste século XXI utilizam aparelhos de cromatografias acoplados a detectores de massas que são conectados diretamente a bancos de dados pré-existentes. Dessa maneira tem-se grande facilidade em comparar a substância testada com outras substâncias químicas similares presentes nesses bancos de dados. Essa tecnologia auxilia na rapidez e na precisão da identificação molecular cujas substâncias podem se tornar objetos de estudo das áreas de nanotecnologia e biologia molecular.

Materiais e Métodos

Material botânico

Folhas de *Abatia americana* foram coletadas no período de florada (abril de 2012, abril de 2013 e maio de 2014) no município de Ouro Preto, identificadas pelo Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa e depositadas no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o número OUPR 26604.

Preparação do material vegetal

As folhas foram mantidas em temperatura ambiente por sete dias para secagem inicial. Após esse período de tempo, foi utilizada estufa de ar circulante a 40°C para o término da secagem do material (aproximadamente 12h). Em seguida, as folhas foram trituradas em moinho de facas para a obtenção do material pulverizado (332,69g).

Análise fitoquímica

A obtenção do extrato bruto e frações se deu em dois momentos. Inicialmente a obtenção do EEB por ultrassom e posteriormente por extrações sequenciais em ultrassom, com solventes em ordem crescente de polaridade, que serão explicadas detalhadamente a seguir.

Obtenção do EEB por ultrassom

Nesta etapa, 139,20g de planta pulverizada (coletada em abril de 2013) foram submetidos à extração com aproximadamente 500mL de álcool etílico P.A. (Cinética[®]), em aparelho de ultrassom (UltraCleaner 1600 - Unique[®]) por 30min. Após esse tempo o material foi filtrado e a solução concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (Vaccum

Controller V-850) à temperatura de 50°C. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes até a obtenção do EEB (Figura 4).

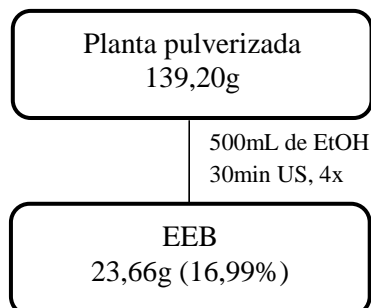


Figura 4: Esquema de obtenção do extrato etanólico bruto de *A. americana* por ultrassom.

Obtenção das frações por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade (primeira etapa)

Nesta etapa, 193,49g de planta pulverizada (coletada em abril de 2013) foram submetidos à extração com aproximadamente 500mL de *n*-hexano P.A. (Isifar[®]), em aparelho de ultrassom por 30min. Após esse tempo o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida à temperatura de 50°C. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes até obtenção da FHex.

Após obtenção da FHex foi adicionado à torta aproximadamente 500mL de acetato de etila P.A. (Impex[®]) e todos os procedimentos utilizados para a extração da FHex foram repetidos obtendo-se assim a FAcOEt.

Após obtenção da FAcOEt foi adicionado à torta aproximadamente 500mL de álcool etílico P.A. (Cinética[®]) e todos os procedimentos utilizados para a extração da FHex foram repetidos obtendo-se assim a FEtOH. Todos os procedimentos realizados para a obtenção da FHex, FAcOEt e FEtOH estão apresentados a seguir (Figura 5).

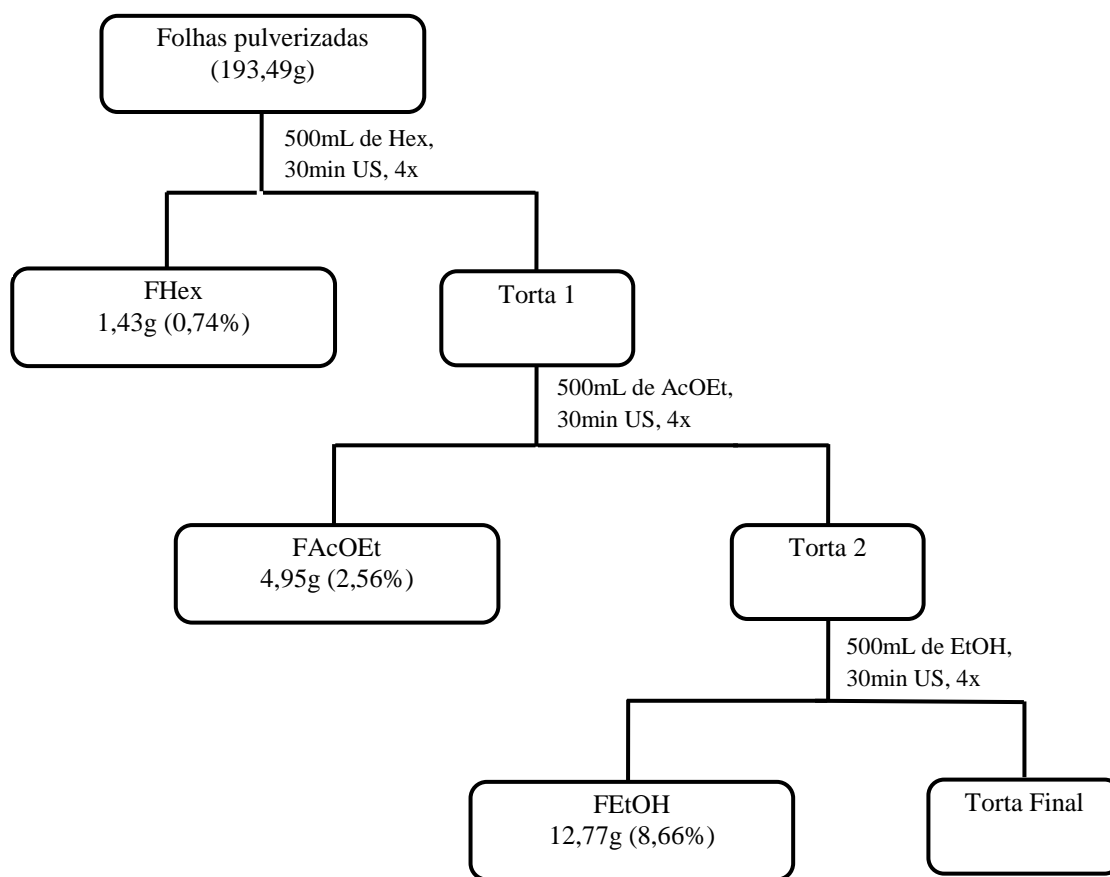


Figura 5: Esquema de obtenção das frações FHex, FAcOEt e FEtOH.

Ao final da obtenção dos extratos, os solventes foram recuperados sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura 50°C e utilizou-se dessecador de vidro com sílica azul, resultando nas amostras secas do EEB, FHex, FAcOEt e FEtOH.

Obtenção das frações por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade (segunda etapa)

Essa segunda etapa foi realizada com 173,85g de planta pulverizada (coletada em maio de 2014), submetidos à extração com aproximadamente 500mL de *n*-hexano P.A., em aparelho de ultrassom por 30min. Após esse tempo o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à temperatura de 50°C. Posteriormente foi adicionado à torta 500mL de *n*-hexano P.A. e com a ajuda de um bastão de vidro fez-se uma homogeneização da torta juntamente ao solvente. Somente após esse procedimento a torta foi

submetida à extração por meio de ultrassom por 1h. Passado esse tempo, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C. Novamente adicionou-se à torta cerca de 500mL de *n*-hexano P.A., fez-se nova homogeneização e esta foi então levada ao aparelho de ultrassom por mais 30min, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C. Posteriormente adicionou-se à torta cerca de 500mL de *n*-hexano P.A., fez-se nova homogeneização e esta foi levada ao aparelho de ultrassom por mais 30min, esse material foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C. Por último, foi novamente adicionado à torta aproximadamente 500mL de *n*-hexano P.A., fez-se nova homogeneização e esta foi submetida à extração em aparelho de ultrassom por mais 30min. O material foi então filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C.

Totalizaram-se assim cinco extrações com aproximadamente 2,5L de *n*-hexano. Após essas cinco extrações, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à temperatura de 50°C e então se adicionou cerca de 500mL de *n*-hexano P.A. à torta que foi deixada sob maceração por um período mínimo de 16h.

Após o período de maceração, a torta foi então homogeneizada com o bastão de vidro e submetida à extração por meio de ultrassom 30min. Passado esse tempo o material foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 50°C tendo como resultado a FHex2. As etapas referentes à obtenção da FHex2 estão representadas na Figura 6.

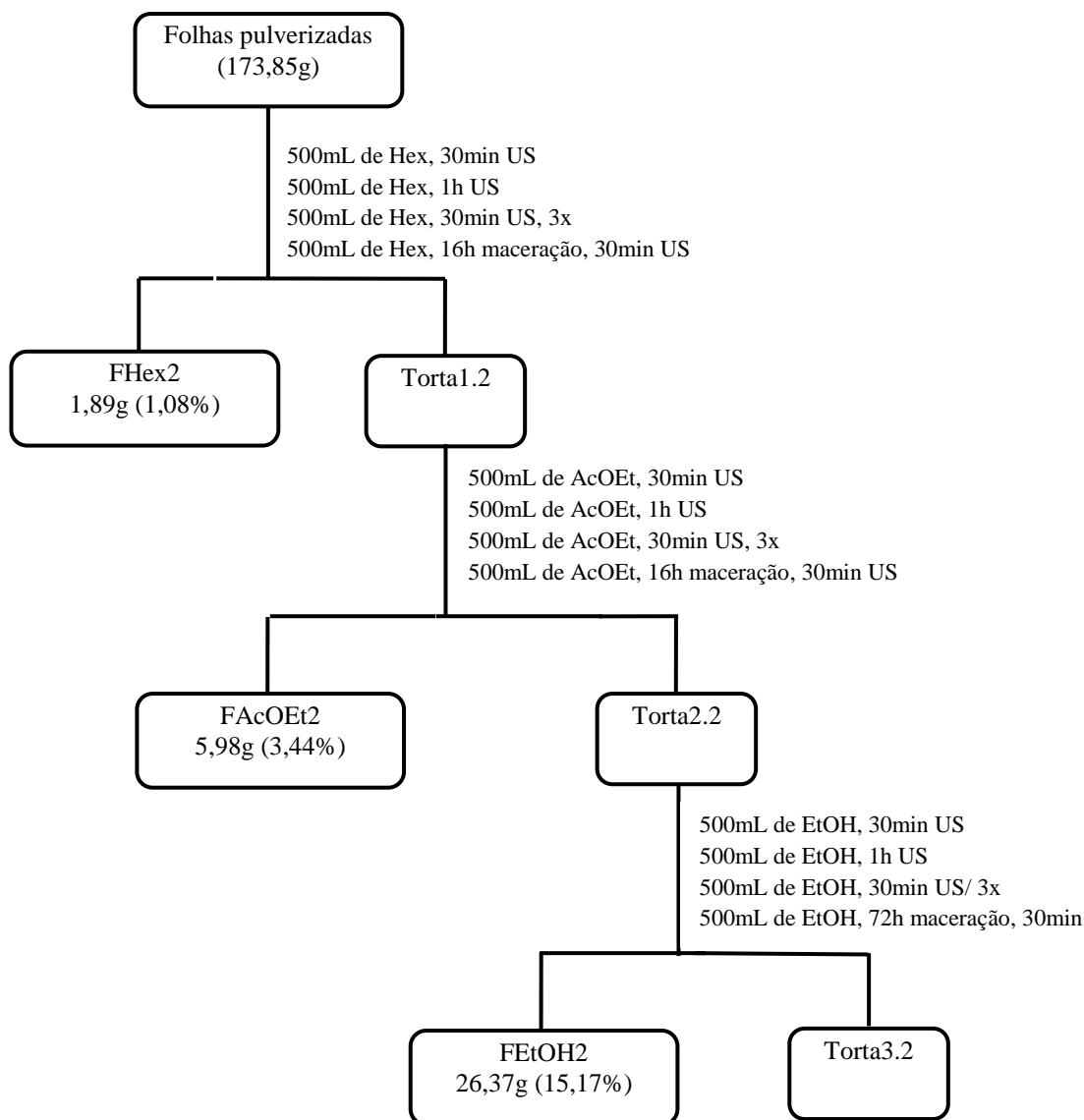


Figura 6: Esquema de obtenção das frações FHex2, FAcOEt2 e FEtOH2.

Após a extração com *n*-hexano foi adicionado à torta cerca de 500mL de acetato de etila P.A. e todos os procedimentos realizados para a obtenção da FHex2 foram aqui repetidos, originando a FAcOEt2.

Após a extração com acetato de etila foi adicionado à torta cerca de 500mL de álcool etílico P.A. (Química Moderna[®]) e todos os procedimentos realizados para a obtenção da FHex2 foram também repetidos, originando a FEtOH2. As etapas referentes à obtenção da FAcOEt2 e FEtOH2 estão representadas na Figura 6.

Para a caracterização dos constituintes polares, alíquotas da fração FEtOH e FEtOH2 foram unidos, filtrados em filtros de seringa CHROMABOND[®] C18 em cuba à vácuo Manifold, Phenomenex[®] e enviados para análise em cromatografia líquida de ultra

performance acoplada a detector de varredura de diodos e espectrometria de massas (UPLC-DAD-EM).

Identificação das substâncias químicas

As análises das frações F_{EtOH} e F_{EtOH2} foram realizadas em cromatógrafo *Acquity Ultra-performance liquid chromatography* - UPLC (*Waters Corporation*) equipado com um detector *diode array* (DAD) acoplado a espectrômetro de massa *ion trap* equipado com ionização por eletrospray (ESI) sob as seguintes condições: modo de íons positivo e negativo, voltagem capilar de 3500V, temperatura capilar de 320°C, voltagem da fonte de 5kV, temperatura de vapor de 320°C, injetor 5mA e pressão de nitrogênio de 27psi. A corrida ocorreu em modo de varredura completa (100 a 2000u). Análises em ESI-MS/MS foram adicionadas ao UPLC utilizando o gás hélio como gás de arraste e a energia de arraste foi de 30eV. A separação cromatográfica foi realizada em coluna *Acquity UPLC™ BEH RP-18* (com partículas de 1,7µm, 50mm de comprimento e 2mm de diâmetro interno) (*Waters Corporation*). A fase móvel utilizada foi água a 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila a 0,1% de ácido fórmico (solvente B). O protocolo de eluição foi de 0 a 11min e gradiente linear de 5 a 95%. A taxa de vazão de arraste foi de 0,3mL/min e o volume de amostra injetada foi de 4,0µL. O espectro de UV foi registrado no comprimento de onda de 190 a 450nm.

A análise em espectrômetro de massa foi realizada em instrumento quadrupolo equipado com uma fonte de eletrospray em modo negativo. A voltagem do spray iônico foi de -4kV e a voltagem do orifício foi de -60V.

Atividade antimicrobiana

Análise qualitativa

Placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton para o cultivo de bactérias e ágar Sabouraud para o cultivo de levedura foram inoculadas com suspensões de microrganismos por meio da técnica de semeadura em superfície.

Os microrganismos utilizados foram bactérias de coleções padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC) e de isolado clínico, sendo eles *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13833) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022) do tipo Gram-negativa. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* (cepa selvagem) do tipo Gram-positivo e a levedura utilizada foi *Candida albicans* (ATCC 14408).

Pequena quantidade dos micro-organismos testados foram suspensos em tubos de ensaio contendo solução salina a 0,9g/100mL e em seguida homogeneizados em aparelho do tipo Vortex. Esse procedimento foi realizado para todas as espécies de microrganismos a serem testados com a finalidade de se obter suspensões finais com turvações correspondentes a 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Posteriormente, essas suspensões foram distribuídas uniformemente sobre toda a superfície do meio de cultura com o auxílio de um *swab* previamente esterilizado em autoclave.

Poços de 6mm de diâmetros foram succionados nas placas inoculadas com as suspensões, com o auxílio de uma base de pipeta de Pasteur cortada e acoplada à extremidade da mangueira de uma bomba à vácuo. O poço central recebeu 50µL de controle positivo (CP) (tetraciclina 200µg/mL, moxifloxacina 40µg/mL ou cetoconazol 60µg/mL, de acordo com os micro-organismos testados) (Figura 7). Foi adicionado 50µL do controle negativo (CN) (DMSO P.A. Synth[®]) em um poço feito por último conforme a disposição final dos poços já existentes.

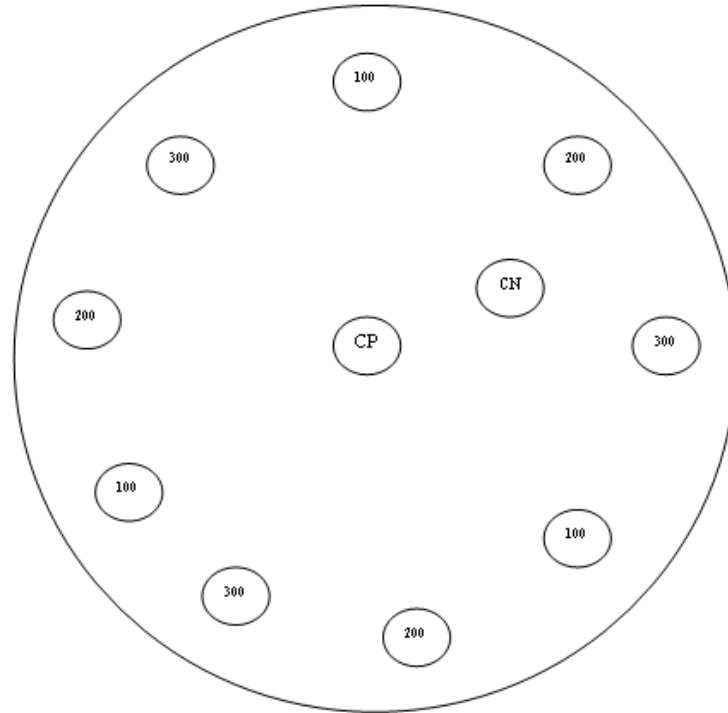


Figura 7: Esquema da placa de Petri para o teste antimicrobiano qualitativo. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo e as diferentes concentrações de 100, 200 e 300mg/mL dos extratos testados em triplicata.

O EEB e frações foram separados em frascos de penicilina em diferentes massas (100, 200 e 300mg) e em cada um dos foi adicionado 1mL de DMSO, resultando em três extratos com concentrações finais de 100, 200 e 300mg/mL. A cada poço foi adicionado 50,0 μ L dos extratos (em triplicata, na mesma placa) nas diferentes concentrações (Figura 6). Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h para bactérias e 48h para levedura em estufa (Biociclo[®]) a 37°C.

O tamanho do halo de inibição de crescimento foi determinado de acordo com diâmetro formado pela ausência de microrganismos ao redor do poço. Os microrganismos cujo EEB e frações apresentaram halos de inibição de 6mm foram considerados resistentes, maiores que 6mm e menores que 10mm foram considerados moderadamente sensíveis e maiores que 10mm foram considerados sensíveis.

Análise quantitativa

Placas de micro titulação foram impregnadas com EEB e frações de acordo com a técnica de micro diluição em caldo, preconizado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* com modificações (CLSI, 2002).

Preparação dos inóculos

Para preparo dos inóculos, placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Himedia®) para o cultivo das bactérias e ágar Sabouraud para o cultivo da levedura foram repicadas com os micro-organismos de interesse e incubadas em estufa a 37°C por 24h para bactérias e 48h para levedura. Após a incubação, esses micro-organismos foram suspensos em solução salina a 0,9mg/100mL com a finalidade de se obter suspensões correspondentes a 0,5 da escala McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Essas suspensões foram diluídas na proporção de 1:50 em caldo Mueller Hinton e/ou Sabouraud (de acordo com o microrganismo), obtendo-se uma suspensão de $2,0 \times 10^6$ UFC/mL e concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Preparação do EEB e frações

Em placas de 96 poços, foram adicionados 50µL de MeOH em todos os poços com exceção do primeiro que recebeu 100µL dos extratos vegetais (EEB e frações nas concentrações de 200mg/mL). A partir do primeiro poço foram realizadas diluições seriadas na proporção de 1:2, retirando alíquotas de 50µL do primeiro poço e transferindo para o seguinte, sendo a última alíquota descartada. Dessa forma foram verificadas oito concentrações com variações de 100 a 0,78mg/mL.

Preparação das placas

Após realização das diluições, 75µL de caldo Mueller Hinton e/ou Sabouraud foram adicionados em cada poço de acordo com os microrganismos de interesse.

No controle positivo foram adicionados 50µL de caldo e 25µL de tetraciclina ou moxifloxacina dependendo do tipo de bactérias e cetoconazol para a levedura, ambos com concentração de 400µg/mL. O controle utilizado para os meios de cultura foi 100µL do caldo.

As placas foram colocadas em dessecador acoplado à bomba de vácuo pelo período de 1h, para evaporação do solvente do EEB e frações. Em seguida, as placas foram expostas a luz UV, em cabine de segurança biológica durante 15min.

Após esse período, foram adicionados 25µL de inóculo em cada poço (exceto para o controle do meio de cultura). As placas foram lacradas e incubadas em estufa a 37°C por 24h, para bactérias e 48h para leveduras.

Potencial antioxidante

O potencial antioxidante do EEB e de suas frações foi determinado pelo método de DPPH. Este método consiste em uma reação de oxirredução na captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, o DPPH, por compostos antioxidantes presentes nas amostras a serem testadas. Nesse teste o DPPH, cuja coloração é violeta, é reduzido por um radical hidrogênio de um antioxidante presente nas amostras a serem testadas, tornando a solução amarela, o DPPH-H reduzido é estável. Abaixo segue reação (Figura 8).

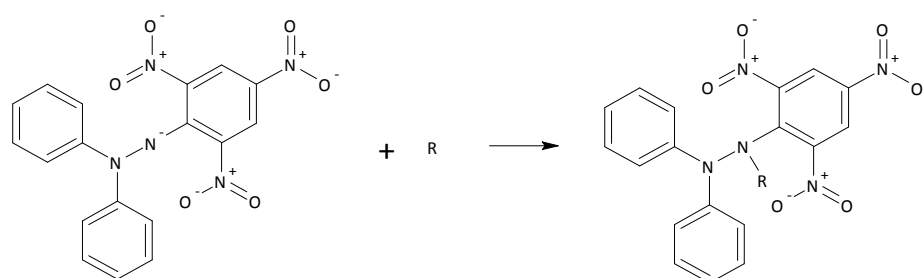


Figura 8: Reação química entre o radical DPPH e um composto antioxidante (R).

As amostras foram preparadas em tubos de ensaio de 5mL envoltos em papel alumínio para proteger da luz. Duas soluções estoques foram preparadas com os extratos e frações nas concentrações de 0,1mg/mL e 0,2mg/mL. A cada tubo de ensaio foi inicialmente adicionado diferentes alíquotas de etanol e posteriormente diferentes alíquotas das soluções estoques para obter concentrações finais de 1,0µg/mL até 150µg/mL.

Após a adição das alíquotas das soluções foram adicionados aos tubos 2,0mL da solução de DPPH. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após 30min foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517nm (RUFINO et al., 2007). Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico. A porcentagem do efeito antioxidante foi calculada conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{ AA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Onde, % AA corresponde ao percentual antioxidante; A_{DPPH} , à absorbância do DPPH a 517nm e A_{amostra} , à absorbância das amostras após 30min de incubação (BLOIS, 1958). Foi calculada a concentração mínima necessária dos extratos para inibir 50% do radical DPPH, a CS_{50} .

Resultados e discussão

Obtenção dos extratos

Obtenção do EEB e frações (primeira etapa) por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade

Nesta primeira etapa da extração em ultrassom, partindo-se de 139,20g da planta seca, obteve-se o EEB seco com massa de 23,66g com rendimento de 16,99%.

Na extração sequencial em ultrassom, partindo-se da planta seca (193,49g), a massa obtida da FHex foi de 1,43g com rendimento de 0,74%. Para a FAcOEt a massa obtida foi de 4,95g com rendimento de 2,56%. E para a FEtOH a massa obtida foi de 16,75g com rendimento de 8,66% (Tabela 1).

Tabela 1: relação das massas e rendimentos obtidos do EEB e frações (primeira etapa)

Planta seca (g)	Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
139,20	EEB	23,66	16,99
193,49	FHex	1,43	0,74
	FAcOEt	4,95	2,56
	FEtOH	16,75	8,66

Obtenção das frações (segunda etapa) por extrações sequenciais com solventes em ordem crescente de polaridade

Nesse segundo momento a extração foi realizada por ultrassom (com modificações/homogeneização), partindo-se de 173,85g de planta seca obteve-se na FHex2 uma massa de 1,89g com rendimento de 1,08%. Para a FAcOEt2 a massa obtida foi de 5,98g com rendimento de 3,44%. E para a FEtOH2 a massa obtida foi de 26,37g com rendimento de 15,17 (Tabela 2).

Tabela 2: relação das massas e rendimentos obtidos das frações (segunda etapa)

Planta seca (g)	Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
173,85	FHex2	1,89	1,08
	FAcOEt2	5,98	3,44
	FEtOH2	26,37	15,17

Quando modificada a maneira de extração, com a adição da homogeneização do material vegetal junto aos solventes, o rendimento da FHex2 foi 0,34% maior quando comparado à FHex. O rendimento da FAcOEt2 foi 0,88% maior que o rendimento da FAcOEt e para a FEtOH2, o rendimento foi 6,51% maior ao da FEtOH.

Com esses resultados verificou-se que os métodos e o tempo utilizado para a extração sequencial interferiram no rendimento das amostras. O estudo de Victório e colaboradores (2009) teve como objetivo utilizar técnicas simples, eficazes e rápidas para obtenção do extrato bruto hidro alcóolico das folhas de *Alpinia zerumbet*, uma espécie nativa da China e Japão. Para isso foram utilizados quatro tipos diferentes de extrações. As extrações foram: a) maceração com agitação a 100rpm, a 25°C, por três dias; b) por ultrassom, a 40 e 60°C, durante 45min; c) extração por micro-ondas, a 70°C, sendo 3 segundos ligados e 60 segundos desligados, repetidos por três vezes e d) agitação a 50 e 60°C por 1h. Essas extrações resultaram em rendimentos de 8,2%, 13,0%, 13,5% e 14,0% respectivamente. No entanto, sabe-se que a utilização de altas temperaturas em extratos vegetais degrada compostos presentes nesses extratos, entre eles os compostos fenólicos, e desencadeia reações químicas indesejáveis, como oxidação enzimática (BIESAGA; PYRZYNSKA, 2013).

No estudo de Schinor e Dias (2005), utilizaram-se as partes aéreas da planta *Moquinia kingii*, uma espécie de Asteraceae nativa da floresta Atlântica, da qual foram realizadas extrações exaustivas com CHCl₃ e EtOH à temperatura ambiente. Os rendimentos obtidos dessas extrações foram de 3,83% para o extrato clorofórmico e de 1,94% para o extrato etanólico. Esse rendimento foi inferior ao que se obteve no presente estudo, apesar dos pesquisadores utilizarem uma técnica exaustiva.

O estudo de Liu e colaboradores (2013) foi realizado com caules da espécie *Homalium ceylanicum*, uma espécie de Salicaceae nativa da China. A técnica utilizada para a obtenção do extrato foi extração exaustiva por EtOH 80% por três vezes, sendo utilizados 100, 75 e 75L de solventes para cada extração. Após a extração fez-se uma partição líquido:líquido com

AcOEt:*n*-butanol, que resultou em um rendimento (para a fração *n*-butanol) de 1,2%. A fração acetato de etila não foi considerada no estudo.

Dessa maneira observou-se que as variáveis temperatura, tempo de exposição do material vegetal ao solvente, agitação e concentração dos solventes utilizados interferem nos rendimentos dos extratos vegetais. No presente estudo observou-se que ao aumentar o tempo de exposição do material vegetal junto ao solvente e fazer uso concomitante com agitação mecânica (homogeneização), realizados na segunda etapa da extração, os rendimentos obtidos foram maiores comparados aos rendimentos da primeira etapa de extração.

A avaliação do rendimento da extração é importante na área de farmacognosia devido ao fato de se utilizar grandes quantidades de plantas e em muitos casos a colheita é prejudicial para a população botânica. Tratando de espécies endêmicas, como é o caso da *Abatia americana*, o agravante dessas colheitas é levar à extinção da espécie em determinados locais.

Caracterização dos compostos

A caracterização dos constituintes da FEtOH e FEtOH2 submetidos à UPLC mostrou dois derivados de flavonoides em maior concentração. Duas flavonas *C*-heterosídicas de massa molecular com razão massa/carga (*m/z*) de 579,48 (A) e 609,85 (B), obtidos em modo negativo (Figura 9).

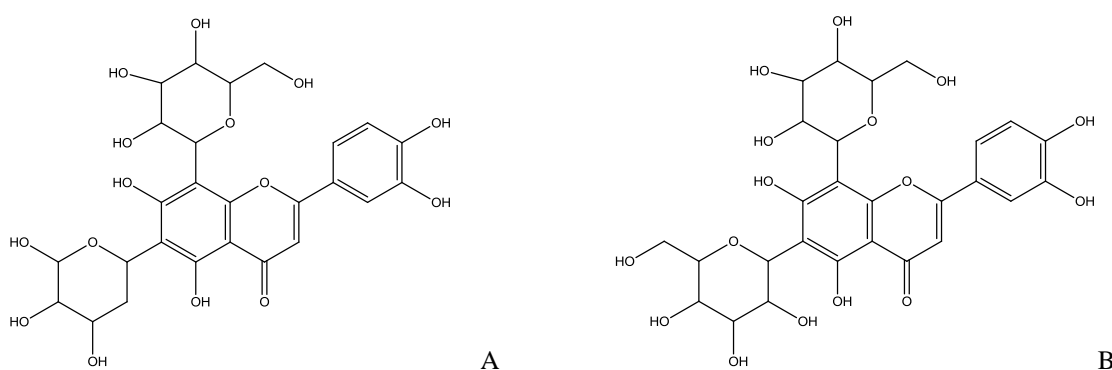


Figura 9: Estrutura química de lucenina 1 ou lucenina 3,5 (A) e lucenina 2 (B), identificadas por meio de UPLC-DAD-EM.

O espectro de UV da molécula A teve o tempo de retenção de 2,372 minutos (Figura 12).

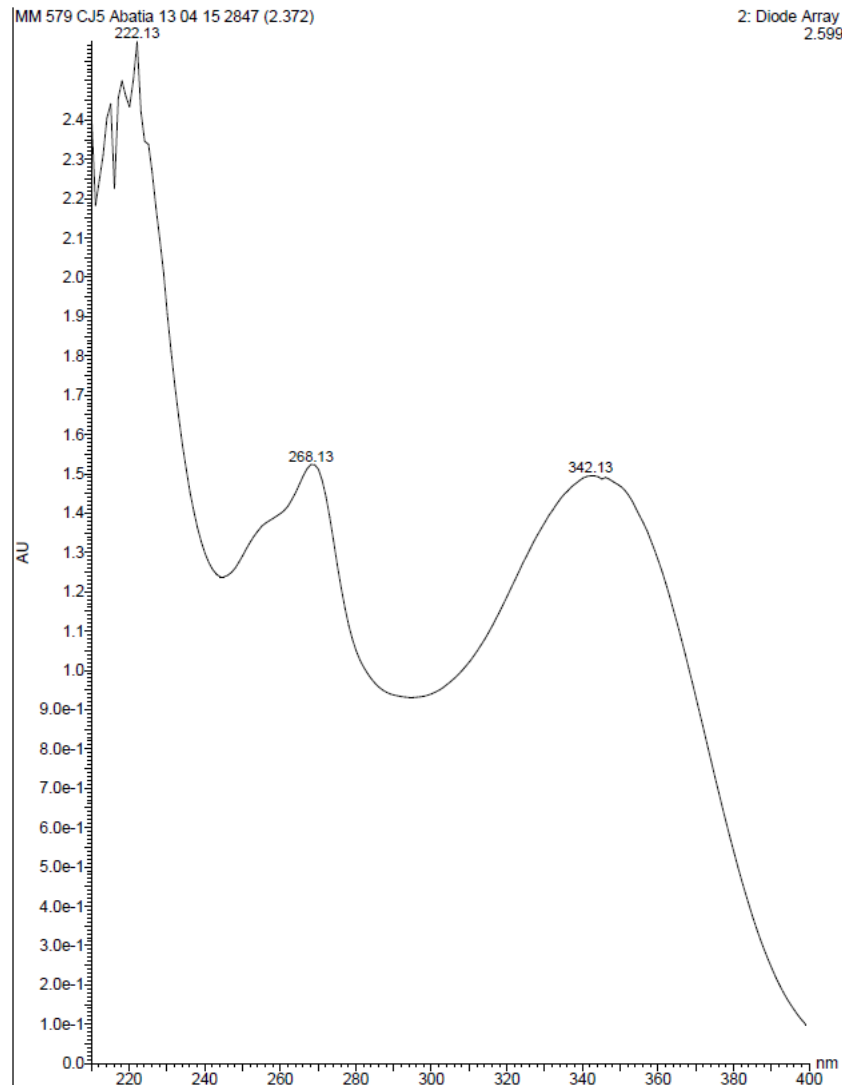


Figura 12: Espectro de UV da flavona A.

Espectro de ultravioleta de flavonoides apresentam em geral duas bandas de maior absorção na região de 240 a 400nm; banda I (304 a 350nm) e a banda II (240 a 280nm) (CHANG, 2005). O espectro acima da substância A apresenta a banda I em 342nm e a banda II em 268nm, que são característicos da sub classe das flavonas. Os dados do espectro de massas sugerem a genina ser a flavona luteolina. Assim a molécula C-heterosidica proposta é a lucenina 1, 3 ou 5, podendo os açúcares (glicose e ramnose) estarem ligados nas posições 6 e 8 ou trocados (Figura 13).

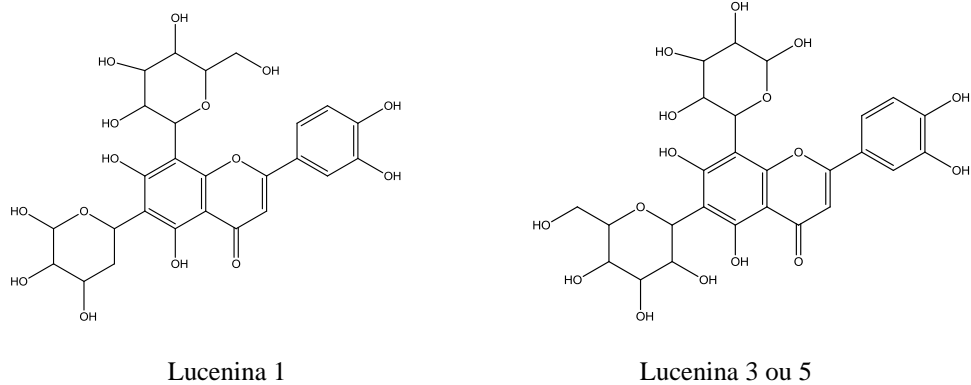


Figura 13: Estrutura química de lucenina 1 ou lucenina 3,5 (A), identificadas por meio de UPLC-DAD-EM

Caracterização da Flavona A

O espectro de massas da C-flavona A (Figura 10) apresentou os maiores picos de fragmentação de m/z 357, 429 e 327 com mais de 50% das fragmentações. O íon molecular com m/z 357 foi relacionado a flavonoide do tipo flavona com estrutura básica de 15 átomos de carbono (GOMES, 2010).

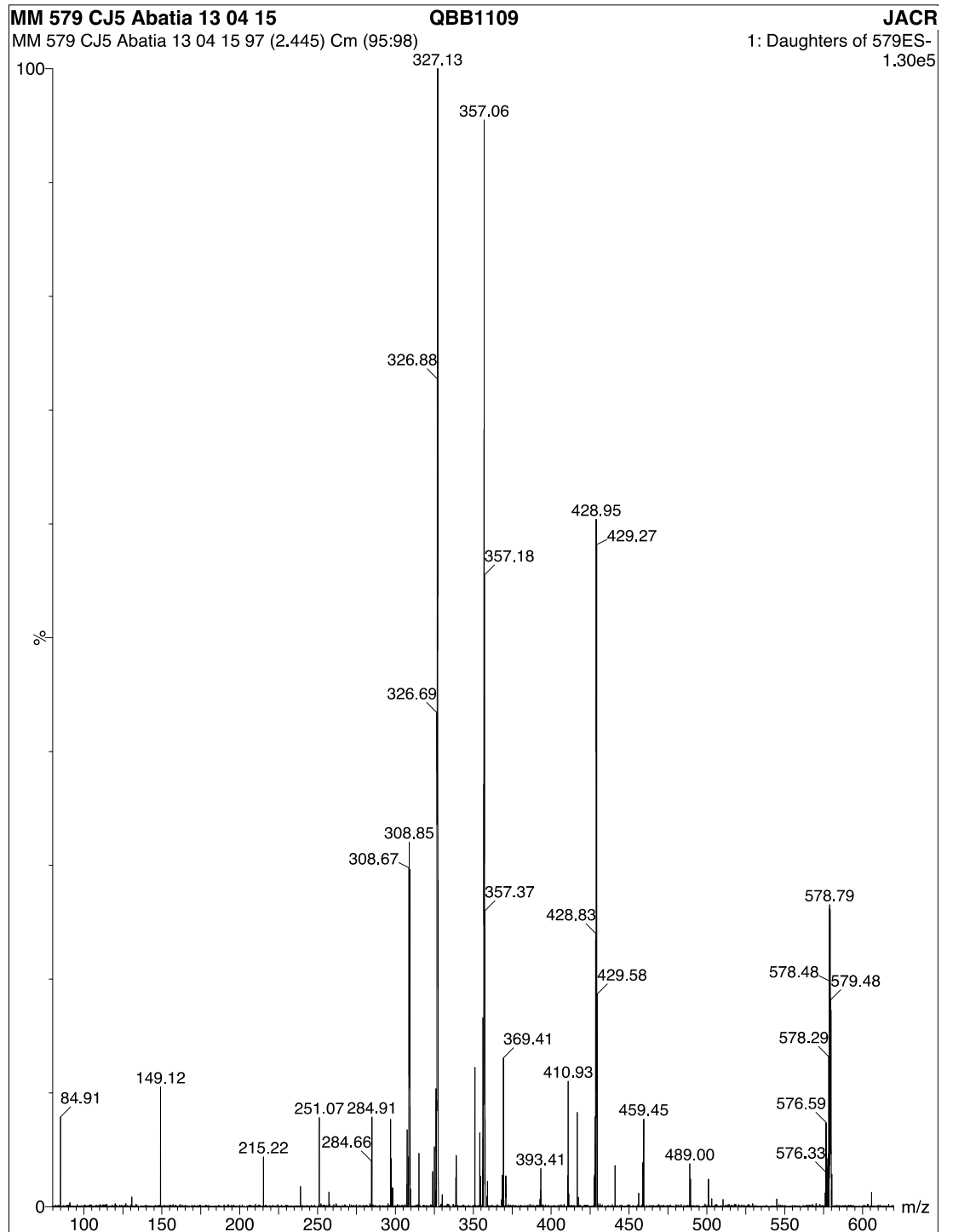


Figura 10: Espectro de massas da flavona A.

As respectivas fragmentações da EM da flavona A encontram-se a seguir (Figura 11).

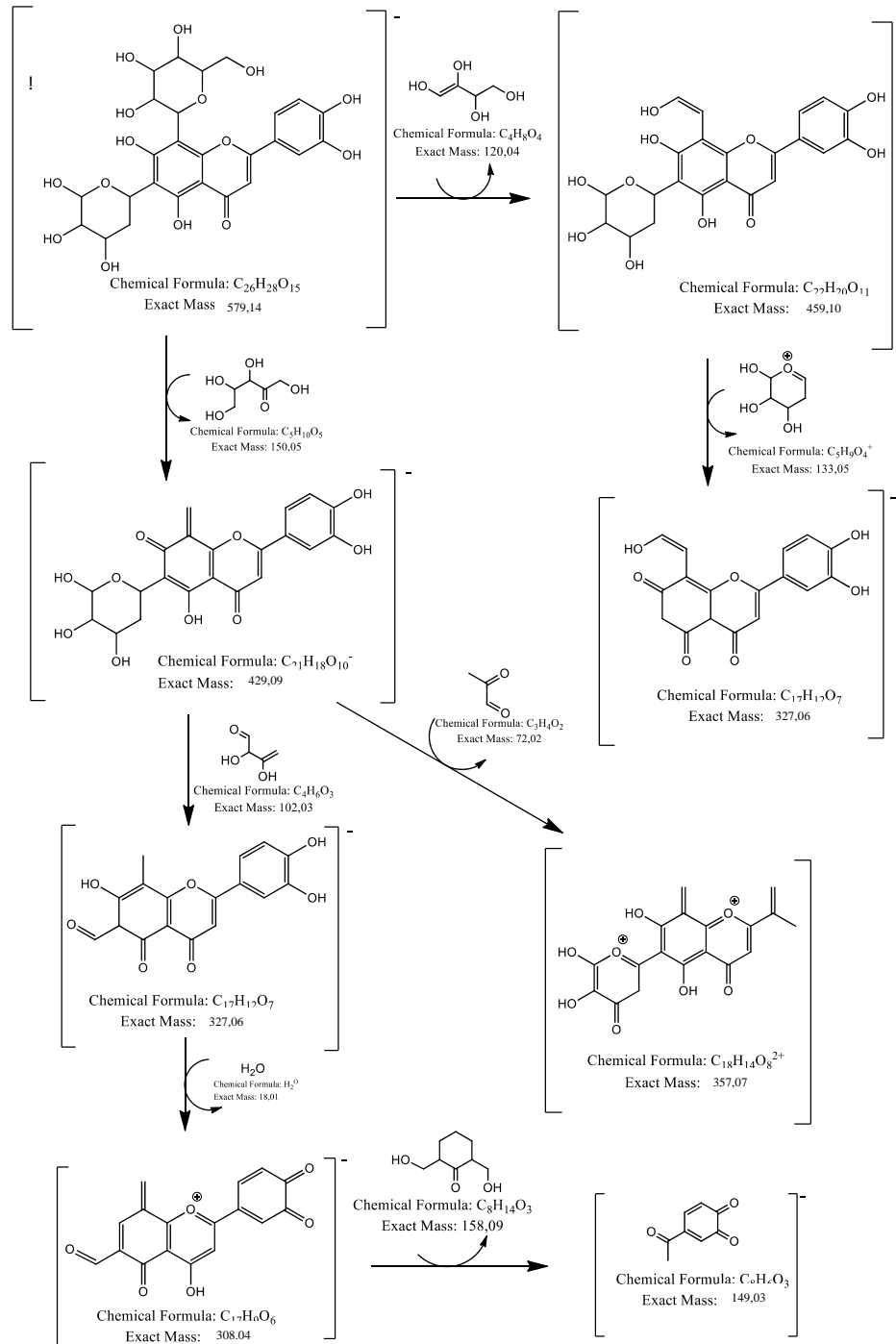


Figura 11: Esquema de fragmentação da molécula de flavona A.

Caracterização da Flavona B

O espectro de UV da molécula de flavona B teve seu tempo de retenção de 2,333 minutos (Figura 16).

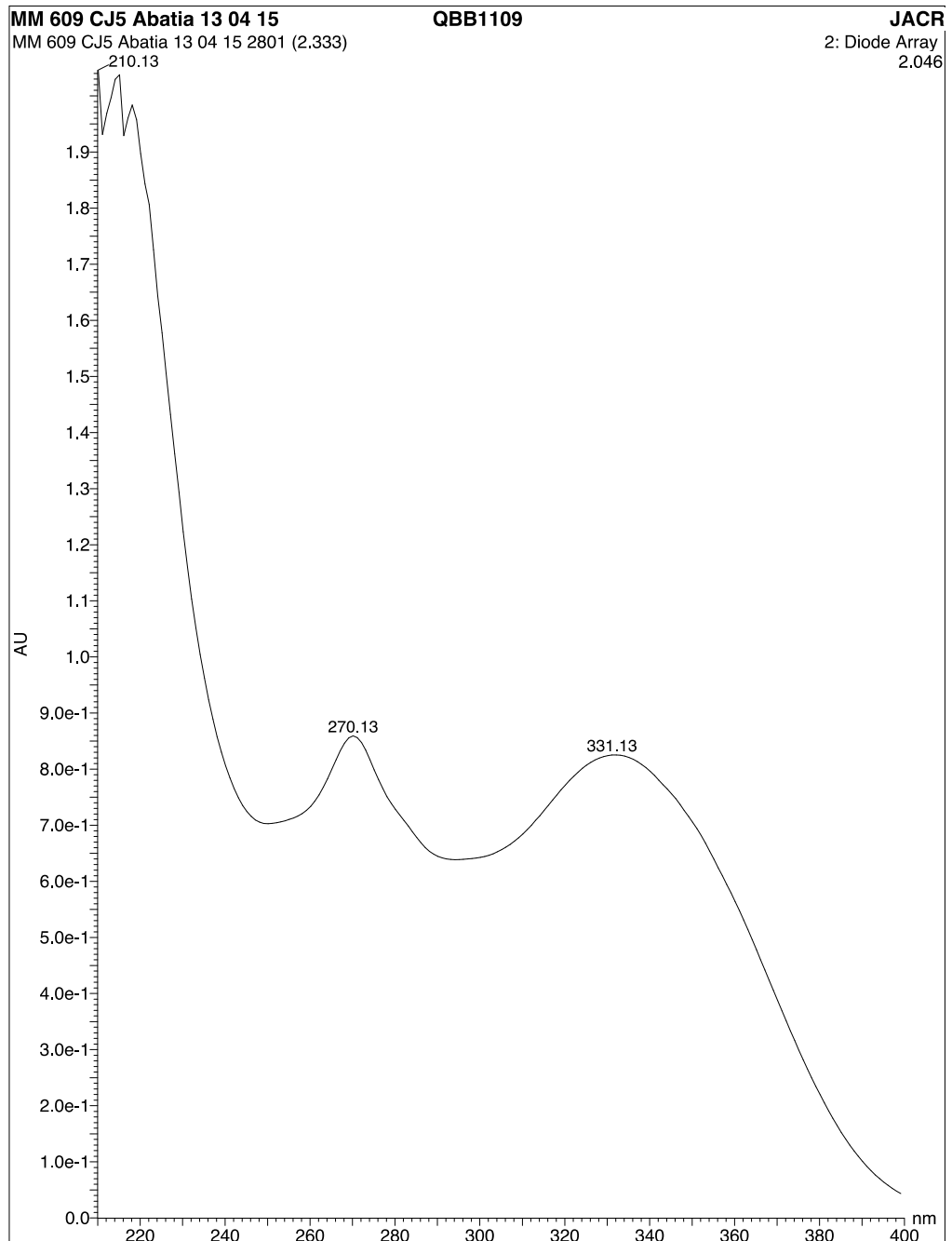


Figura 16: Espectro de UV da flavona B.

O espectro da substância B apresenta a banda I em 331nm e a banda II em 270nm, que são característicos da subclasse das flavonas. O conjunto de dados, principalmente os obtidos da espectrometria de massas sugere a genina ser a flavona luteolina. Assim a molécula C-heterosídica proposta é a lucenina 2, sendo a glicose o açúcar ligado nas posições 6 e 8 (Figura 9).

O espectro de massas da C-flavona B (Figura 14) apresentou os maiores picos de fragmentação de m/z 489, 447, 328 e 357. O íon molecular com m/z 357 foi relacionado à flavonoide do tipo flavona com estrutura básica de 15 átomos de carbono (GOMES, 2010).

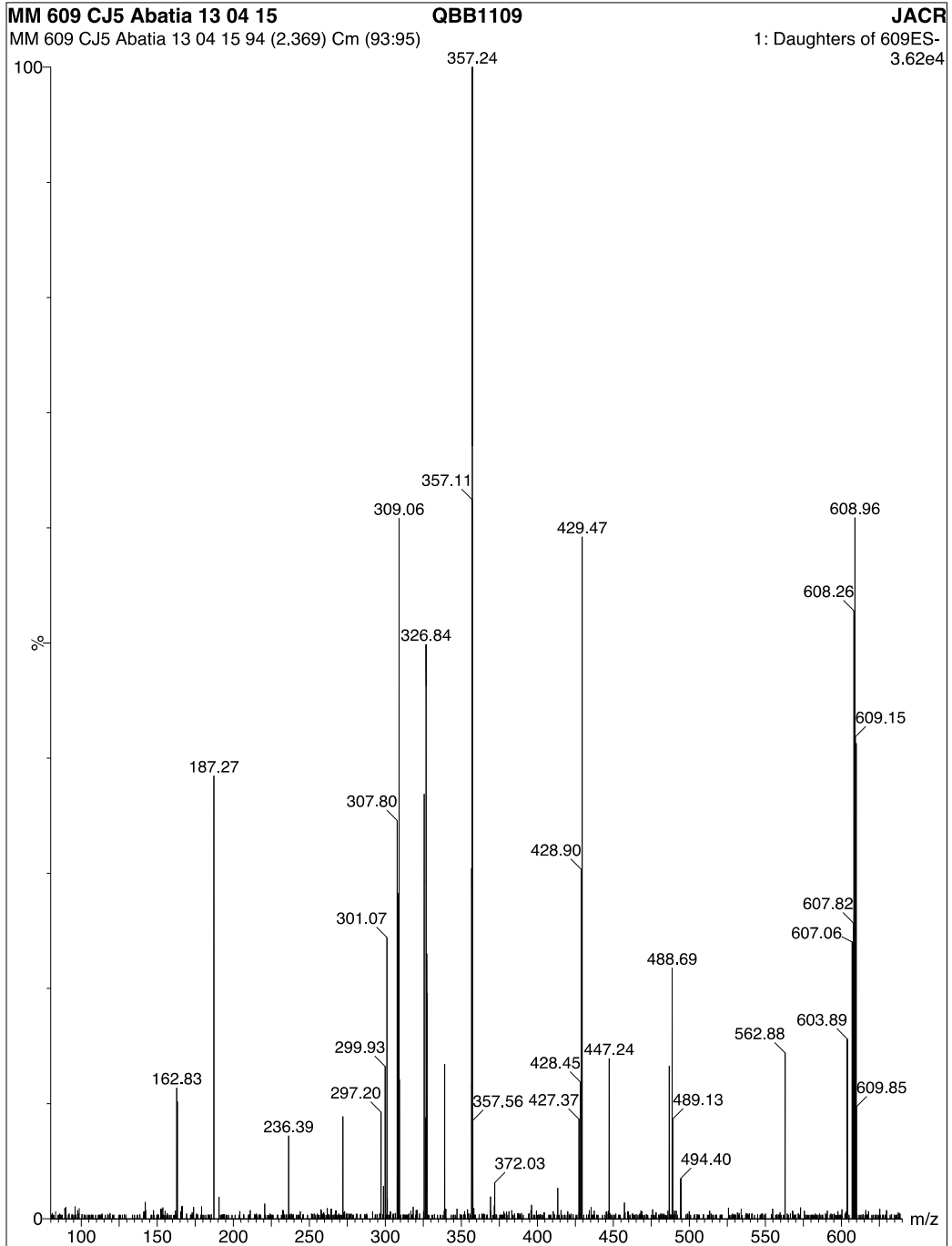


Figura 14: Espectro de massas da flavona B.

As respectivas fragmentações propostas para da EM da flavona B encontram-se a seguir (Figura 15).

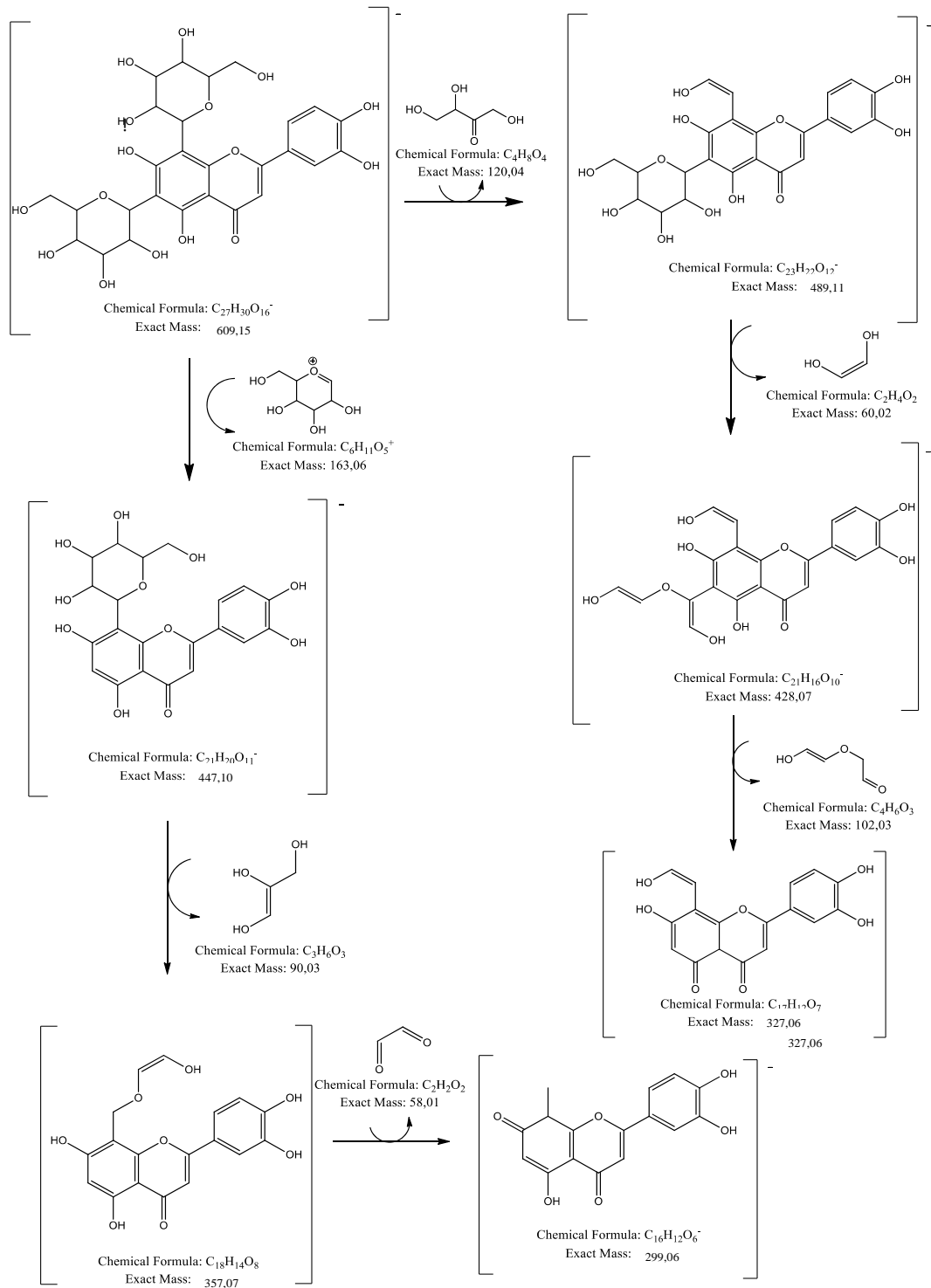


Figura 15: Esquema de fragmentação da molécula de flavona B.

Atividade antimicrobiana qualitativa

O EEB e as frações avaliadas nesse estudo apresentaram atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos submetidos aos ensaios.

O EEB apresentou atividade contra *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *L. monocytogene* e *C. albicans* em todas as concentrações testadas, no entanto as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram-se resistentes a essas concentrações (Gráfico 1).

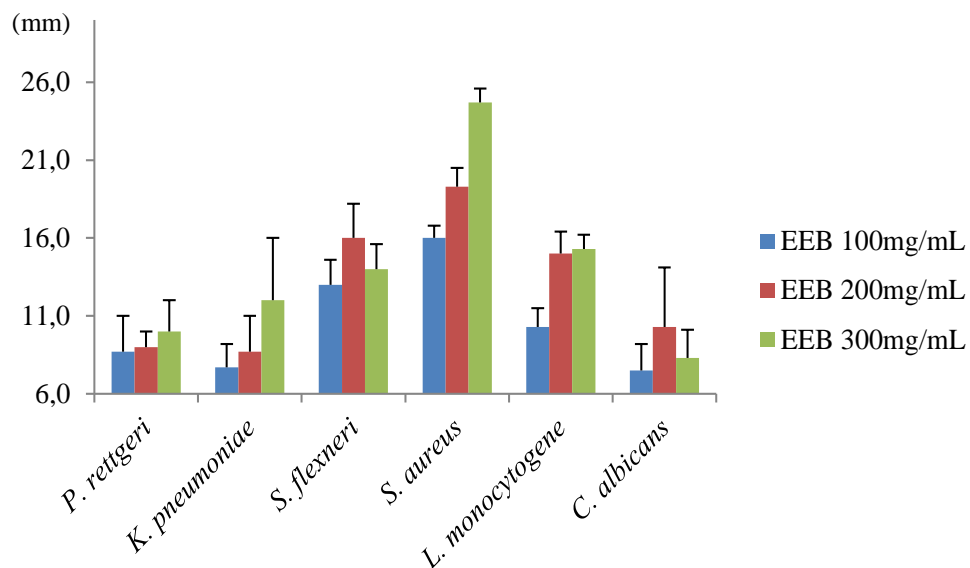


Figura 18: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações do EEB.

A FHex teve sua atividade testada contra os três micro-organismos testados: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gráfico 2). Não foi possível a realização do teste com os outros micro-organismos devido a pouca quantidade da FHex.

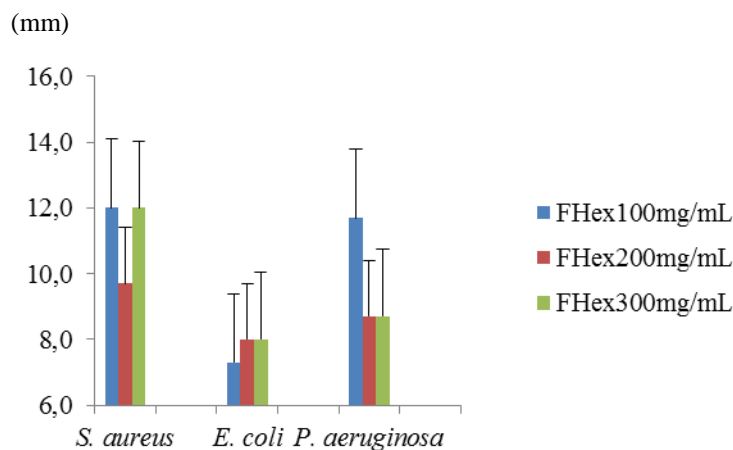


Figura 19: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FHex.

A fração FAcOEt apresentou atividade contra *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri* e *L. monocytogene* em todas as concentrações testadas. Para as espécies *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* a menor concentração ativa foi de 200mg/mL, a espécie *E. coli* apresentou-se resistente a todas as concentrações testadas (Gráfico 3).

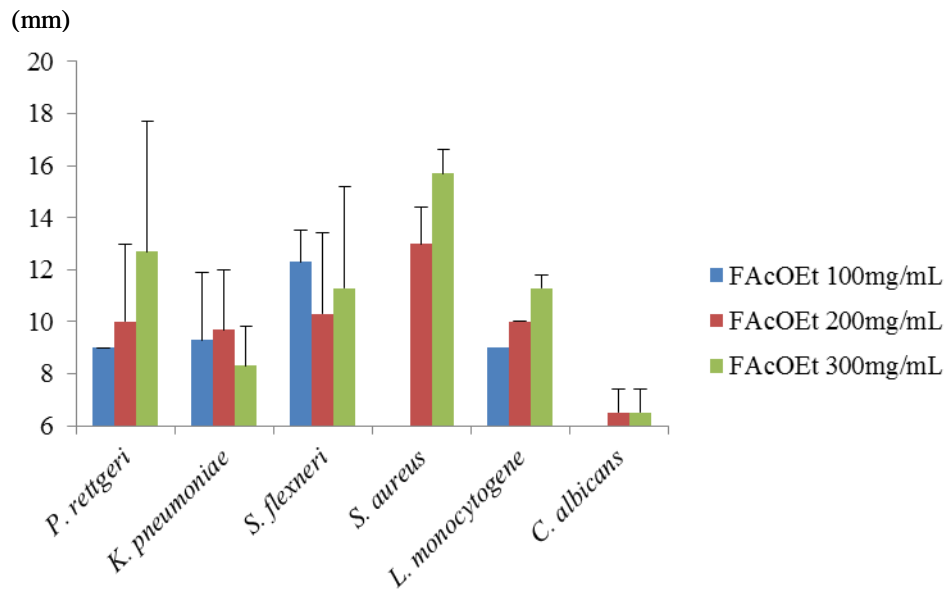


Figura 20: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FAcOEt.

A adição da fração FEtOH no meio apresentou efeito inibitório no crescimento de *P. rettgeri*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *L. monocytogene* e *C. albicans* em todas as concentrações testadas, no entanto as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram-se resistentes a todas elas (Gráfico 4).

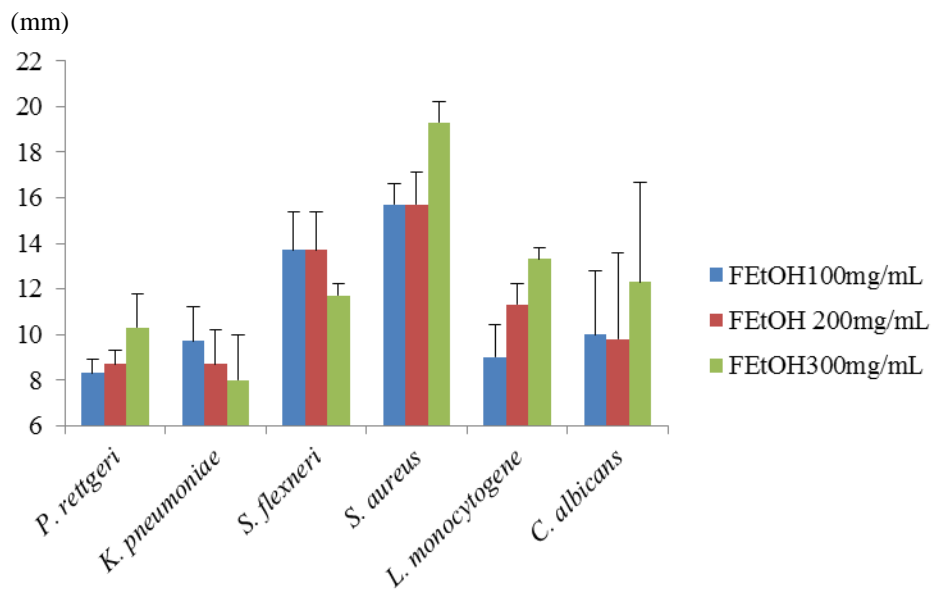


Figura 21: Média e desvio padrão dos halos de inibição de crescimento em relação às concentrações da FEtOH.

Atividade antimicrobiana quantitativa

A avaliação quantitativa demonstrou propriedade antimicrobiana do EEB a partir da concentração de 3,12mg/mL contra *S. aureus*, 6,25mg/mL contra *C. albicans*, 50mg/mL contra *P. rettgeri*, 100mg/mL contra *L. monocytogene* e em concentrações maiores de 100mg/mL contra as espécies *K. pneumoniae* e *S. flexneri*.

As concentrações da FHex que apresentaram inibição foram a partir de 1,56mg/mL contra a espécie *S. aureus* e maiores de 100mg/mL contra *P. aeruginosa*.

A atividade antimicrobiana da FAcOEt foi observada a partir das concentrações de 6,25mg/mL contra *S. aureus*, 25mg/mL contra *P. rettgeri* e *S. flexneri* e 100mg/mL contra *L. monocytogene* e *P. aeruginosa*.

A concentração mínima da FEtOH que apresentou taxas de inibições microbianas foi de 3,12mg/mL contra *S. aureus*, 6,25mg/mL contra *L. monocytogene*, 12,50mg/mL contra *P. rettgeri* e concentrações maiores de 100mg/mL contra *S. flexneri* e *C. albicans*.

Tabela 3: Concentrações do EEB e frações em mg/mL na avaliação antimicrobiana quantitativa.

Microrganismo	EEB	FHex	FACoEt	FEtOH
<i>S. aureus</i>	3,12	1,56	6,25	3,12
<i>P. rettgeri</i>	50,0	-	25	12,5
<i>K. pneumoniae</i>	100	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	100	-	25	100
<i>L. monocytogene</i>	100	-	100	6,25
<i>P. aeruginosa</i>	-	100	100	-
<i>C. albicans</i>	6,25	-	-	100

Os microrganismos foram classificados como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes. Os controles positivos utilizados neste estudo foram tetraciclina (200µg/mL) e moxifloxacina (40µg/mL) para bactérias e cetoconazol (60µg/mL) para levedura. Todos os controles utilizados apresentaram atividade, conforme o esperado, no entanto não houve comparação em relação aos halos de inibição do EEB e frações.

A espécie *K. pneumoniae* mostrou-se moderadamente sensível ao EEB nas concentrações de 100 e 200mg/mL, a todas as concentrações testadas da FACoEt e FEtOH; e sensível ao EEB na concentração de 300mg/mL.

A espécie *S. aureus* mostrou-se resistente à concentração de 100mg/mL da FACoEt, moderadamente à concentração de 200mg/mL da FHex e sensível a todas as outras concentrações de todos os extratos testados.

C. albicans mostrou-se resistente à concentração de 100mg/mL da FACoEt, moderadamente sensível às concentrações de 100mg/mL do EEB, 200 e 300mg/mL da FACoEt, e sensível a as concentrações de 200 e 300mg/mL do EEB e a todas às concentrações da FEtOH.

L. monocytogene mostrou-se moderadamente sensível às concentrações de 100mg/mL do EEB e FEtOH e sensível a todas as outras concentrações e extratos.

P. aeruginosa mostrou-se moderadamente sensível às concentrações 200mg/mL da FHex, 300mg/mL da FACoEt e FHex, sensível à concentração de 200mg/mL da FACoEt e 100mg/mL da FHex. Em relação aos outros extratos, frações e concentrações a espécie mostrou-se resistente.

S. flexneri mostrou-se sensível em todos os testes analisados, já a espécie *E. coli* mostrou-se moderadamente sensível apenas à FHex em todas suas concentrações.

P. rettgeri mostrou-se sensível às concentrações de 300mg/mL da FAcOEt e FEtOH, para os outros testes a espécie mostrou-se moderadamente sensível.

No estudo de Jamal (2002), com a espécie vegetal *A. americana*, foram realizados testes antimicrobianos contra *S. aureus* (ATCC 25285) e *E. coli* (ATCC 25922), utilizando a mesma escala McFarland do presente estudo ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As frações testadas foram: benzênica, hexânica, aceto nitrila/ clorofórmio e aquosa das folhas e benzênica, diclometânica e etanólica dos galhos, nas concentrações de 20, 10 e 5mg/mL. A metodologia utilizada foi difusão em disco e não foram observadas atividades antimicrobianas consideráveis em nenhuma das concentrações testadas.

Os resultados antimicrobianos apresentados por Jamal (2002) diferem dos apresentados no presente estudo. Dois fatores podem justificar tais divergências: a) a metodologia utilizada e b) a concentração dos extratos testados. A metodologia de difusão em disco é muito aplicada para testes com extratos vegetais de polaridade intermediária a baixa, como é o caso dos óleos vegetais, que apresentam maior dificuldade de difusão no ágar; por outro lado, substâncias mais polares ficam retidas no disco e não difundem de forma adequada para o meio de cultura (PELLISSARI, 2008).

Já as concentrações dos extratos utilizadas por Jamal (2002) foram inferiores às concentrações testadas no presente estudo (100, 200 e 300mg/mL), no entanto a concentração da cultura bacteriana utilizada sobre os meios de cultura foi a mesma em ambos os estudos. Além disso, pôde-se observar no presente estudo que algumas espécies de microrganismos, como o *S. aureus*, tiveram seus crescimentos inibidos a partir da concentração de 200mg/mL da FAcOEt.

O estudo de Silva e colaboradores (2007) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidro alcoólico das cascas de *Anacardium occidentale*, popularmente conhecido como caju, contra 30 espécies multirresistentes de *S. aureus*, obtidas a partir de pacientes internados no Hospital Universitário Lauro Wanderley/ UFPB. A metodologia utilizada foi difusão em poço (50µL dos extratos em poços de 6mm de diâmetro) e consideraram-se como ativos aqueles extratos que apresentaram halo de inibição igual ou superior a 10mm. As concentrações foram diluídas em álcool etílico 70% variando de 100 a 0,19mg/mL. O controle negativo utilizado foi álcool etílico 70%. O resultado obtido foi que todas as amostras de *S. aureus* testadas foram sensíveis aos extratos. Os pesquisadores relacionaram esses achados à

presença de taninos e outros compostos fenólicos presentes no cajueiro, assim como a presença de alcaloides.

O estudo de Antunes e colaboradores (2006) testou a atividade antimicrobiana do EEB das cascas e folhas de *Ocotea duckei*, uma espécie de Lauraceae nativa do Brasil, contra *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 76645). Além disso, foi avaliada a atividade do composto lapachol e seus derivados, isoladamente. A metodologia utilizada foi difusão em poço e foram utilizadas as mesmas referências do presente estudo. Pôde-se constatar que o lapachol e seus derivados apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas, no entanto contra *C. albicans* não foi observada essa mesma atividade.

No estudo realizado por Sobral e colaboradores (2009), foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana de xantonas e triterpenos. A metodologia utilizada foi micro diluição em caldo, segundo a metodologia de Bicalho e colaboradores (2003). Utilizou-se o extrato diclorometano de *Kielmeyera cuspidata*, nativa da América do Sul e com grande ocorrência no cerrado brasileiro, do qual foram isoladas cinco xantonas e a mistura de α e β amirina. Os autores concluíram que o extrato apresentou-se ativo contra todas as espécies Gram-positivas testadas, entre elas a espécie *S. aureus*, no entanto não foi verificada atividade contra bactérias Gram-negativas.

Compostos fenólicos apresentam propriedades antimicrobianas comprovadas, sendo uma delas a capacidade de atuar na parede celular dos micro-organismos alterando sua estrutura e com isso as funções biológicas essenciais à continuidade da vida (SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004). Jamal (2002) isolou compostos fenólicos de *A. americana*, como lapachol e flavonoides (rutina e isoquercetina); misturas de triterpenos α e β amirina e lupeol. O estudo de Candotti (2013) realizado com *A. americana* demonstrou através de marcha fitoquímica resultados positivos para flavonoides, cumarinas, terpenoides e taninos. Esses pesquisadores comprovaram que a espécie *A. americana* possui compostos com propriedades antimicrobianas e essa atividade foi comprovada no atual estudo.

Constatou-se no presente estudo que as frações avaliadas foram ativas (com destaque para o EEB e FEtOH), contra diferentes espécies de micro-organismos, podendo estes resultados mais promissores, estarem relacionados à presença de substâncias fenólicas em maior concentração.

Potencial antioxidante

Por meio do método de sequestro do radical DPPH, foram avaliadas as propriedades antioxidantes do EEB e frações. Observou-se que o EEB e a FEtOH apresentam um potencial antioxidante similar ao controle positivo, o ácido gálico, tendo o EEB um potencial antioxidante máximo de 94,25%, na concentração de 50 μ g/mL e a FEtOH, 95,45% em 100 μ g/mL (Gráfico 5). A porcentagem máxima de propriedade antioxidante da FHex foi de 81,82%, na concentração de 250 μ g/mL. A FAcOEt apresentou uma porcentagem máxima de 78,07%, na concentração de 300 μ g/mL.

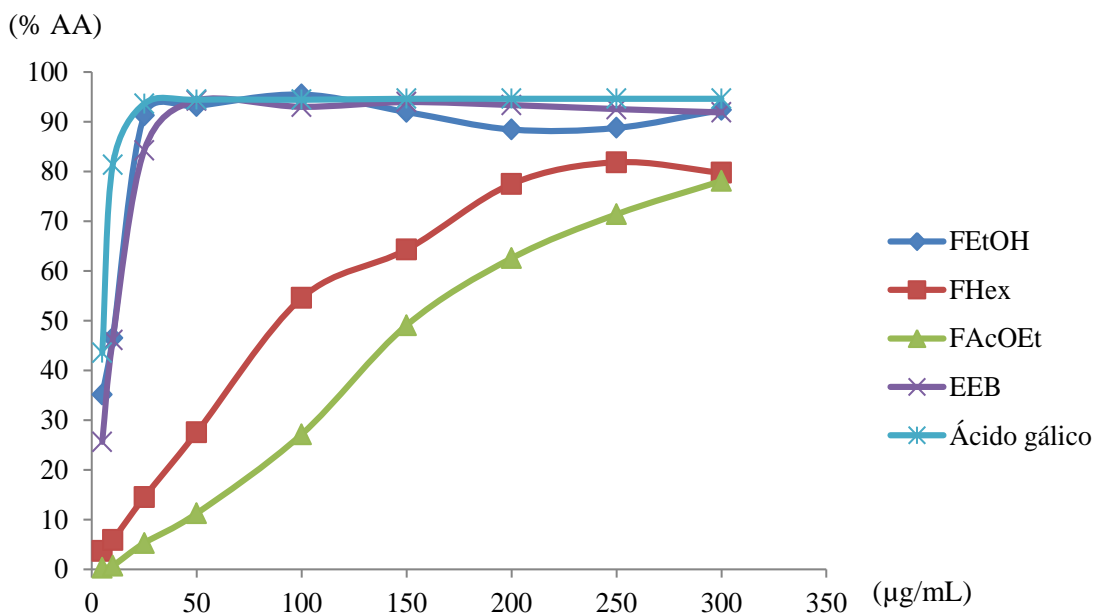


Gráfico 5: porcentagem da capacidade antioxidante do EEB, FHex, FAcOEt e FEtOH em diferentes concentrações.

Foi realizado o cálculo da CS_{50} , para quantificar a concentração necessária de cada extrato para sequestrar 50% do radical DPPH. Para o controle positivo, ácido gálico, foi calculada uma CS_{50} equivalente a 1,08 μ g/mL. Para o EEB foi encontrado um valor de CS_{50} equivalente a 12,63 μ g/mL; para a FHex, o valor de CS_{50} encontrado foi equivalente a 91,63 μ g/mL. Para a FAcOEt foi encontrado um valor de CS_{50} de 177,21 μ g/mL e para a FEtOH o valor de CS_{50} foi 18,52 μ g/mL.

Banskota e colaboradores (2003) encontraram um valor de CS_{50} de $18\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto hidro alcólico das cascas de *Taxus yunnanensis*, espécie nativa da China.

Os controles positivos utilizados foram o ácido ascórbico e o ácido caféico que apresentaram respectivamente CS_{50} de $12,6\mu\text{g/mL}$ e $25,5\mu\text{g/mL}$. O estudo de Lay e colaboradores (2014), realizado com os frutos de *Phaleria macrocarpa*, uma planta muito utilizada na Indonésia para diversos fins terapêuticos, apresentou resultados de CS_{50} de $8,15\mu\text{g/mL}$ para os extratos em acetato de etila e para o extrato bruto. O padrão utilizado foi o ácido gálico, no entanto este apresentou uma CS_{50} de $10,8\mu\text{g/mL}$, diferentemente do apresentado no presente estudo. Já no estudo de Wu e colaboradores (2008), foram feitas análises antioxidantes do extrato bruto metanólico e frações das flores de *Acacia confusa*, uma espécie de Fabaceae nativa do sudeste da Ásia, que resultaram em CS_{50} de $62,9\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto, $72,4\mu\text{g/mL}$ para a fração clorofórmica, $13,9\mu\text{g/mL}$ para a fração butanólica e $358,1\mu\text{g/mL}$ para a fração aquosa. O controle positivo utilizado nesses experimentos foi a quercetina que apresentou um CS_{50} de $2,9\mu\text{g/mL}$.

Com esses dados foi possível verificar que o EEB e a FEtOH foram os extratos que apresentaram a melhor capacidade antioxidante, comparado às FHex e FAcOEt. Entretanto, essas frações ainda foram capazes de reduzir o radical DPPH mesmo em baixas concentrações. Dessa forma, todas as amostras testadas apresentaram propriedades antioxidantes, o que sugere que a espécie *A. americana* apresenta compostos antioxidantes, entre eles, os compostos fenólicos.

Conclusões

A obtenção de extratos vegetais e suas frações é a parte principal de qualquer estudo farmacognóstico. A técnica de extração é considerada relativamente simples, no entanto nem sempre é dada grande importância. Observou-se nesse estudo que, ao se realizar agitação e, conseqüentemente homogeneização do meio, quando o material vegetal em contato com o solvente, o rendimento aumentou em média 51,83%, um valor relativamente alto tendo em vista a obtenção de melhores rendimentos e um aproveitamento máximo do material vegetal.

Como resultado da purificação da fração etanólica por técnicas de cromatografia líquida, foi possível caracterizar duas substâncias fenólicas C-heterosídicas com a genina sendo a luteolina. As moléculas em questão foram identificadas como lucenina 1, 3 ou 5 e lucenina 2.

A atividade antimicrobiana do EEB e frações foi avaliada com êxito em todas as concentrações nos diferentes extratos. Através da técnica da micro diluição em caldo foi possível verificar que a atividade antimicrobiana existe mesmo em baixas concentrações, como foi o caso da FHex que apresentou um CS_{50} de 1,56mg/mL.

O EEB e a FEtOH apresentaram potencial antioxidante semelhante ao controle positivo utilizado, o ácido gálico.

Os resultados obtidos demonstram que a espécie *Abatia americana* representa um potencial ainda não explorado no meio científico. Esse foi um estudo piloto sobre a espécie vegetal citada, e através dele espera-se que estudos mais aprofundados possam ser realizados com diferentes propósitos já que os resultados foram positivos em todos os testes avaliados.

Referências bibliográficas

AH, Y. M., KIM, A. J., LEE, J. Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 44, n. 1, p. 8-15, 2014.

ALBANO, M. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.

ALVES, A. P., BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v.57, n.3, p. 213-218, 2013.

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes . **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 24-29, 2006.

APG III (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 128-131, 2009.

BANSKOTA, A. H. et al. DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities of the constituents from the wood of *Taxus yunnanensis*. **Planta Médica**, v. 69, n. 6, p. 500-505, 2003.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010.

BEREZKIN, V. G. Biography of Tswett, Mikhail, Semenovich and Translation of Tswett preliminary communication on a new category of adsorption phenomena. **Chemical Reviews**, v. 89, p. 279, 1989.

BIAVATTI, M. W., MARENSI, V., LEITE, S. N, REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 640-653, 2007.

BICALHO, B. et al. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* ssp. (Clusiaceae) pollinating bees. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 746-751, 2003.

BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during diferente extraction methods. **Food Chemistry**, v. 136, p. 46-54, 2013.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, 1958.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRESOLIN, T. M. B., CECHINEL, F. V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. 136 p.

BURT, S. Essential oil: their antibacterial properties and potencial applications in food – a review. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CANDOTTI, J. **Estudo fitoquímico de *Abatia tomentosa* Mart. (Salicaceae)**. 2013. 29-32 f. Monografia (Farmácia) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

CAVALCANTE, W. L. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-7, 2007.

CHANG, R. Estudos químicos da própolis do estado de Minas Gerais. 2005. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte, 2005.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-A2, CLSI, Pennsylvania, 19087, v. 17, p. 1-29, 2002.

COLLINS, D. J. et al. Plants for medicines. **Journal of Farmaceutical Science**, v. 80, p.42-43, 1990.

CORDEIRO, A. L. A. O, et al. Equipment contamination in an intensive care unit. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.28, n.2, p. 160-165, 2015.

CRUZAT, V. F., ROGERO, M. M., BORGES, M. C., TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 5, 2007.

DE MATTOS, E. S. et al. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 1-6, 2007.

DEL ROSARIO, A. A., SÁNCHEZ, M. A., MACEIRAS, L. R., CAPDEVILA, E. F. Sarcoma de Kaposi parte II: tratamento. **Piel**, v. 27, n. 5, p. 243-252, 2012.

DIAS, J. P. S. **A Farmácia e a História: Uma introdução à História da Farmácia, da Farmacologia e da Terapêutica**. Monografia (Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2005.

DREVETS, D. A., BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology Medical and Microbiology**, v. 53, p. 151–165, 2008.

EL-RAMI, F. E., RAHAL, E. A., SLEIMAN, F. T., ABDELNOOR, A. M. Identification of virulence genes among antibacterial-resistant *Escherichia coli* isolated from poultry. **Advanced Studies in Biology**, v. 4, n. 8, p. 385-396, 2012.

FAI, A. E. C., STAMFORD, T. C. M., STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FIGUEIREDO-MENDES, C. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 7, p. 402-5, 2005.

FORZZA et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro, v. 2, 2010. 1600 p. Catalog.

GOENAGA, M. A., MORAN, J. M., CARRERA, J. A. et al. Bacteremia due to *Providencia rettgeri*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, p. 282–283, 2001.

GOMES, C. L. Estudo Químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae). 2010. 45-48 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de química orgânica e inorgânica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.

GÓMEZ, D. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, v. 42, p. 61-65, 2014.

GUEDOUARI, H. et al. Molecular basis of disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1855-1869, 2014.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology Journal**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HIRATA, L. L., SATO, M. E. O., SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.

JAMAL, C. M. **Estudo fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw. e de *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae). Análise de derivados fenólicos, por CLAE.** Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 135-48, 2001.

KOREISHI, A. F., SCHECHTER, B. A., KARP, C. L. Ocular infections caused by *Providencia rettgeri*. **Ophthalmology**, v. 113, n. 8, p. 1463-1466, 2006.

KOTLOFF K. L. et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, p. 651–666, 1999.

LAY, M. M., KARSANI, S. A., MOHAJER, S., MALEK, S. N. A. Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 152, 2014.

LEVY, T. S. I., AGUIRRE, R. J. R. Conceptuación etnobotánica (experiencia de un estudio en la Lacandona). **Revista de Geografía Agrícola**, v. 29, p. 83-115, 1999.

LIU, L. et al. Phenolic glycosides from the stems of *Homalium ceylanicum* (Gardner) Bentham (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 55–58, 2013.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MARTIUS, C., EICHLER, A. G., URBAN, I. Flora Brasiliensis 1. 1871

MAVOR, A. L., THEWES, S., HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida species*: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 863–874, 2005.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p.933-40, 2003.

NEVES, P. R., MAMIZUKA, E. M., LEVY, C. E., LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

_____. **Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance.** Geneva, 2014.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos.** Porto Alegre: Artmed, p. 33-49, 2005.

PACHECO, S. et al. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PELLISSARI, G. P., PIETRO, R. C. L. R., MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 70-74, 2008.

PORE, D., CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a: A promising subunit vaccine candidate. **Vaccine**, v. 31, n. 36, p. 3644–3650, 2013.

PRIETO, A. M. et al. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 153-9, 2013.

_____. Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n. 3, p. 368-72, 2012.

ROCOURT, J., BUCHRIESER, C. **The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenic position** E.T. Ryser, E.H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 3^a ed., CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007.

ROSSI, V. S., COSTA, M. F. Mecanismo antioxidante em plantas. In: 10^a Mostra Acadêmica da UNIMEP, 2012, Piracicaba, **Resumo**.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Comunicado técnico – metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 2007.

- RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.
- RUSSO, T. A. Diseases caused by Gram-negative enteric bacilli. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, v. 1., p. 953-959, 2001
- SANTOS, A. C. M. et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.
- SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SASSO, J. B., CHIMARA H. D. B., MONTEIRO, L. H. A. Epidemias e modelos epidemiológicos baseados em autômatos celulares: uma breve revisão. **Caderno de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica**, v. 4, n. 1, p. 71-80, 2004.
- SCHINOR, E. C., DIAS, D. A. Constituents of *Moquinia kingii*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.
- SCHNEIDER, C. D, OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n.10, p. 308-313, 2004.
- SELLÉS, A. J. N. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. **Revista Cubana de Salud Pública**, v. 37, p. 644-660, 2011.
- SHAMI, N. J. I. E., MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- SIKKEMA, J, DE BONT, J.A.M, POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**, v. 59, p. 201-222, 1995.
- SILVA, J. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, 2007.
- SOBRAL, I. S. et al. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, 2009.

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

VICTÓRIO, C. P., LAGE, C. L. S., KUSTER, R. M. Flavonoid extraction from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith leaves using different techniques and solvents. **Eclética Química**, v. 34, n. 1, p. 19-24, 2009.

VINCENT, H. K., INNES, K. E., VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.

WU, J. H., HUANG, C. Y., TUNG, Y. T., CHANG, S. T. Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confuse*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 328–332, 2008.

YANG, X., WANG, H. *Escherichia coli*, Pathogenic *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, p. 695–701, 2014.

Disponível em <<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/>>. Acesso em: 20/07/2015.