

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

Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.

Tatiane Roquete Amparo

OURO PRETO, 2016

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

Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.

Tatiane Roquete Amparo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira

OURO PRETO, 2016

A526a Amparo, Tatiane Roquete.
Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de
Protium spruceanum (Benth.) Engler. [manuscrito] / Tatiane Roquete
Amparo. - 2016.
151f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Plantas medicinais. 2. Produtos de ação antimicrobiana. I. Souza, Gustavo
Henrique Bianco de. II. Teixeira, Luiz Fernando Medeiros. III. Universidade
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 633.88



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia


LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 109ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Tatiane Roquete Amparo**, com a defesa da dissertação intitulada: “Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 19 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão
UFOP



Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP

“Os que confiam no Senhor serão como o monte de Sião que não se abala.”

Sl 125, 1

“Os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.”

Is 40, 31

AGRADECIMENTOS

“Sozinha, jamais alcançaria...”

Agradeço a Deus, razão de toda a minha vida, sem O qual nenhum passo dessa caminhada seria possível. Meu sustento, minha força, meu consolo e minha proteção. A Nossa Senhora pela proteção e intercessão.

Agradeço especialmente a meus pais Anete Luzia Freitas Roquete e Mauro José do Amparo, pelo constante e incondicional amor, dedicação, apoio e por primarem pela minha educação com grandes sacrifícios. Aos meus irmãos Lucas Roquete Amparo e Maura Roquete Amparo, pelo exemplo, amor, incentivo e amizade constante e sincera. Ao meu namorado e anjo Wanderson Gonçalves, pelo carinho, companherismo e apoio em todos os momentos. Com vocês tudo se torna mais fácil e sempre estivemos unidos de coração.

A toda minha família pelas orações e apoio.

Ao meu orientador Gustavo Henrique Bianco, por todos os ensinamentos, pelo incentivo, pelo exemplo e pela amizade. Pela orientação durante quase 7 anos, sempre repleto de muita educação, obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Ao co-orientador desse trabalho, amigo Luiz Fernando Medeiros, pelos ensinamentos, pelo suporte e pela colaboração, possibilitando a realização dos ensaios biológicos desse trabalho.

À Nildes (Ivanildes Rodrigues), amiga e mestre, com a qual iniciei na pesquisa científica e muito me ensinou, ajudou e guiou. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, pelas dicas, pelas conversas, pelos conselhos e por sempre estar disposta a me ajudar.

A todos do Laboratório de Fitotecnologia, pelo aprendizado e agradável convívio. Agradeço em especial a Janaína Brandão, pela ajuda nos experimentos e pela amizade, idéias e momentos compartilhados. A Regislainy Gomes, Simone Carneiro, Fernanda Barçante, Fernanda Sena, Tamires

Cunha, Karen Carvalho, Lucas Andrade, Luana Christian e Pedro Amorim pelos bons momentos de conversa, partilhas e gargalhadas. A Amanda Ribeiro e Rafaela Zaniti, pela colaboração com os experimentos.

A Geraldo Célio Brandão, pela disponibilidade constante e pelo auxílio com as análises de CLUE/DAD/EM. À Adriana Akemi pelas análises de CG/EM. À Vivete Appolinário pela coleta do material vegetal. A Mauro Lúcio de Oliveira pelas análises *in silico*. A Sidney Vieira pelos ensinamentos, prontidão e amizade.

Aos amigos do GOU e rep. Grande Família, pelas orações, amizade, momentos de distração e cuidado. Vocês me ajudaram a crescer e perseverar na fé, são minha família aqui em Ouro Preto, sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao CIPHARMA pela oportunidade e formação. A CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho:
MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE ESTRUTURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Atividade antimicrobiana de plantas.....	1
1.2. Análises fitoquímicas.....	3
1.3. Análises <i>in silico</i>	7
1.4. Família Burseraceae.....	8
1.5. Gênero <i>Protium</i>	9
1.6. Espécie <i>Protium spruceanum</i>	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta e identificação dos materiais vegetais.....	13
3.2. Obtenção dos extratos etanólicos brutos.....	13
3.3. Fracionamento dos EEBs.....	13
3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	14
3.4.1. Triagem por difusão em ágar.....	15
3.4.2. Avaliação da metodologia utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	16
3.4.3. Determinação da CIM dos extratos e frações.....	17

3.4.4. Determinação da porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA), atividade antimicrobiana total (AAT) e índice de susceptibilidade microbiana (ISM).....	18
3.4.5. Análise do efeito sinérgico entre as frações.....	19
3.5. Análises fitoquímicas.....	20
3.5.1. Prospecção fitoquímica.....	20
3.5.2. Teor de compostos fenólicos totais.....	21
3.5.3. Teor de flavonóides totais.....	22
3.5.4. Teor de taninos totais.....	23
3.5.4.1. Método vanilina/HCl.....	23
3.5.4.2. Método de adsorção por gelatina.....	24
3.5.5. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	24
3.5.6. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE/DAD/EM).....	25
3.6. Atividade antimicrobiana de α - e β -amirinas.....	26
3.7. Avaliação <i>in silico</i> da atividade antimicrobiana dos constituintes.....	27
3.8. Análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Obtenção dos extratos etanólicos brutos.....	29
4.2. Fracionamento dos EEBs.....	29
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	30
4.3.1. Triagem por difusão em ágar.....	30
4.3.2. Avaliação da metodologia utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	34
4.3.3. Determinação da CIM dos extratos e frações.....	36
4.3.4. Análise do efeito sinérgico entre as frações.....	46
4.4. Análises fitoquímicas.....	49

4.4.1. Prospecção fitoquímica.....	49
4.4.2. Teor de compostos fenólicos totais.....	51
4.4.3. Teor de flavonoides totais.....	54
4.4.4. Teor de taninos totais.....	57
4.4.5. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	62
4.4.6. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arrosos de diodos e espectrometria de massas (CLUE/DAD/EM).....	75
4.5. Atividade antimicrobiana de α - e β -amirinas.....	99
4.6. Avaliação <i>in silico</i> da atividade antimicrobiana dos constituintes.....	100
5. CONCLUSÃO.....	112
6. REFERÊNCIAS.....	114

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
%AA	Porcentagem de atividade antimicrobiana
%AAT	Porcentagem da soma de AAT
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros
AAT	Atividade antimicrobiana total
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CG	Cromatografia gasosa
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia de alta eficiência
CLC	Cromatografia líquida clássica
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EQ	Equivalentes de quercetina
ER	Equivalentes de rutina
eV	Eletrovolts

g	Gramma
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
Hex	Hexano
HMeOH	Hidrometanólica
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
ISM	Índice de susceptibilidade microbiana
m/z	Razão massa/carga
MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
n	Número de amostras
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	<i>National committee for clinical laboratory standards</i>
NIST	<i>National institute of standards and technology</i>
nm	Nanômetros
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina/ polietilenoglicol 4000
Nº	Número
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gray-Lussac
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso por volume
Pa	Probabilidades do composto ser ativo
PASS	<i>Prediction activity spectra of substances</i>
Pi	Probabilidades do composto ser inativo
RMN	Ressonância magnética nuclear
r_s	Coefficiente de correlação de Spearman
S1 – S18	Frações obtidas no fracionamento da fração AcOEt de galhos
Σ	Soma

UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta – visível

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplos de estruturas químicas de metabólitos secundários de plantas. Terpenos: monoterpenos (1- sabineno), diterpenos (2- labdano), triterpenos (3- amirina) e sesquiterpenos (4- helenalina); Compostos fenólicos: flavonoides (5- quercetina), cumarinas (6- varfarina), lignanas (7- pinoresinol) e taninos (8- procianidina); Alcalóides (9- morfina).....4
- Figura 2:** Constituintes antibacterianos de *Dacryodes edulis*: galato de etila (A), quercitrina (B)5
- Figura 3:** Compostos bioativos de *Ceratonia siriaca*: miricetina-glicosídeo e miricetina-ramnosídeo (A); 1,6-Di-Galoil-glicose (B); ácido siríngico (C).....6
- Figura 4:** Flavonoides responsável pela atividade antimicrobiana de *Commiphora pedunculata*: campeferol (A) e diidrocampeferol (B).....8
- Figura 5:** Monoterpenos do óleo essencial de *Protium neglectum*: piperitenona (A), timol (B), durenol (C).....10
- Figura 6:** Fotos de flores, frutos, folhas e caule de *Protium spruceanum*.....11
- Figura 7:** Componentes majoritários do óleo essencial de *Protium spruceanum*: sabineno (A) e β - cariofileno (B).....11
- Figura 8:** Esquema do processo de obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEB) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....14
- Figura 9:** Frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) obtidas por partição líquido/líquido dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....30
- Figura 10:** Reação de catequina com vanilina no método vanilina/HCl para determinação de taninos totais (HAGERMAN, 2002).....61
- Figura 11:** Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *P. spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....62

- Figura 12:** Constituintes voláteis majoritários do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): A- ácido hexadecanóico, metil éster (13,65%), B- 9,12,15-ácido octadecatrienoico, metil éster (12,89%) e C- vitamina E (7,31%).....64
- Figura 13:** Cromatograma da fração hexânica (Hex) de folhas de *P. spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....65
- Figura 14:** Constituintes voláteis majoritários da fração hexânica (Hex) de folhas de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): A- β -amirina (24,45%) e B- α -amirina (24,10%).....66
- Figura 15:** Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *P. spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....66
- Figura 16:** Constituinte volátil majoritário da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): ácido hexanedioico, bis(2-etilhexil) éster (53,46%).....67
- Figura 17:** Cromatograma da fração Hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....68
- Figura 18:** Constituinte volátil majoritário da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): ácido benzoico, metil éster (46,99%).....69
- Figura 19:** Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....69
- Figura 20:** Cromatograma da fração hexânica (Hex) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....71

Figura 21:	Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	73
Figura 22:	Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	74
Figura 23:	Constituinte volátil majoritário da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): 4-propil-fenol (7,47%).....	75
Figura 24:	Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de <i>Protium spruceanum</i> obtido pela análise em CLUE/DAD/EM, extraído em 254 nm.....	76
Figura 25:	Espectro de ultravioleta (UV) do pico em 2.77 min da fração AcOEt de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido através de CLUE/DAD.....	77
Figura 26:	Espectros de massas do pico em 2,77 min da fração AcOEt de folhas de <i>Protium spruceanum</i> obtido através de CLUE/EM: A- Modo negativo e B- Modo positivo.....	78
Figura 27:	Espectro de massas do sinal <i>m/z</i> 477 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo.....	79
Figura 28:	Fragmentação proposta dos íons de quercetina-3-O-glucuronídeo (MARTUCCI <i>et al.</i> , 2014; RUSTAN <i>et al.</i> , 2001).....	80
Figura 29:	Espectro de ultravioleta (UV) do pico em 3.07 min da fração AcOEt de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido através de CLUE/DADEM-EM.....	81
Figura 30:	Espectro de massas do pico em 3.07 min da fração AcOEt de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido através de CLUE/EM: A- Modo negativo e B- Modo positivo.....	82
Figura 31:	Espectro de massas do sinal <i>m/z</i> 447 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo.....	83
Figura 32:	Fragmentação proposta dos íons de quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo).....	84
Figura 33:	Espectro de ultravioleta (UV) do pico em 3.41 min da fração AcOEt de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido através de CLUE/DADEM-EM.....	85

Figura 34:	Espectro de massas do pico em 3.41 min da fração AcOEt de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido através de CLUE/EM: A- Modo negativo e B- Modo positivo.....	86
Figura 35:	Espectro de massas do sinal <i>m/z</i> 431 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo.....	87
Figura 36:	Fragmentação proposta dos íons de campeferol-3-O-ramnosídeo.....	88
Figura 37:	Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de folhas de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM.....	89
Figura 38:	Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM.....	90
Figura 39:	Espectro no UV do pico em 1.89 min da fração AcOEt de galhos de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM.....	91
Figura 40:	Espectro de massas do pico em 1.89 min da fração AcOEt de galhos de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM: A- Modo negativo e B- Modo positivo.....	92
Figura 41:	Espectro de massas do sinal <i>m/z</i> 577 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo.....	93
Figura 42:	Fragmentação proposta para íons de procianidina do tipo B	94
Figura 43:	Espectro de massas do pico em 2.01 min da fração AcOEt de galhos de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM: A- Modo negativo e B- Modo positivo.....	95
Figura 44:	Espectro de massas do sinal <i>m/z</i> 289 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo.....	96
Figura 45:	Fragmentação proposta para íons de catequina.....	97
Figura 46:	Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>P. spruceanum</i> obtido por CLUE/DAD/EM.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Interações de acordo com os valores de ICIF.....	19
Tabela 2:	Condições de CG/EM utilizadas para análise dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações de <i>Protium spruceanum</i>	25
Tabela 3:	Condições de CLUE/DAD/EM utilizadas para análise dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações de <i>Protium spruceanum</i>	26
Tabela 4:	Medidas dos halos de inibição (mm)* obtidos pelo método de difusão em poço utilizado na análise do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de <i>Protium spruceanum</i> na concentração de 80 mg/mL.....	31
Tabela 5:	Medidas dos halos de inibição (mm)* obtidos pelo método de difusão em poço utilizado na análise do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> na concentração de 80 mg/mL.....	32
Tabela 6:	Resultados da viabilidade microbiana utilizando a metodologia de microdiluição adaptada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações de <i>Protium spruceanum</i>	35
Tabela 7:	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos brutos (EEB) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	37
Tabela 8:	Classificação da atividade antimicrobiana de produtos vegetais pelos resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo Holetz <i>et al.</i> , 2002; Silveira <i>et al.</i> , 2012, Jeong <i>et al.</i> , 2009 e Giner <i>et al.</i> , 2012.....	38
Tabela 9:	Porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	40

Tabela 10:	Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) de folhas e galhos de <i>P. spruceanum</i>	40
Tabela 11:	Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas de <i>Protium spruceanum</i>	42
Tabela 12:	Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de galhos de <i>Protium spruceanum</i>	45
Tabela 13:	Interação da atividade antimicrobiana entre as frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de <i>Protium spruceanum</i>	47
Tabela 14:	Interação da atividade antimicrobiana entre as frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>Protium spruceanum</i>	48
Tabela 15:	Classes de metabólitos presentes nos extratos etanólicos brutos (EEBs), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	50
Tabela 16:	Teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	51
Tabela 17:	Resultados de correlação de Spearman entre teor de compostos fenólicos totais e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	53
Tabela 18:	Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	54
Tabela 19:	Resultados de correlação de Spearman entre teor de flavonoides e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	56

Tabela 20:	Teor de taninos totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	57
Tabela 21:	Resultados de correlação de Spearman entre teor de taninos e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	60
Tabela 22:	Constituintes voláteis do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	63
Tabela 23:	Constituintes voláteis da fração hexânica (Hex) de folhas de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	65
Tabela 24:	Constituintes voláteis da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	67
Tabela 25:	Constituintes voláteis da fração hidrometanólica (HMeOH) de folhas de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	68
Tabela 26:	Constituintes voláteis do extrato etanólico bruto (EEB) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	70
Tabela 27:	Constituintes voláteis da fração hexânica (Hex) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	72
Tabela 28:	Constituintes voláteis da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de <i>Protium spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	73
Tabela 29:	Compostos voláteis da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de <i>P. spruceanum</i> identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	74

Tabela 30:	Resultados de atividade antimicrobiana de α - e β -amirina e variáveis dos estudos encontrados na literatura e do presente estudo.....	100
Tabela 31:	Previsões <i>in silico</i> dos potenciais efeitos biológicos, utilizando a ferramenta PASSonline*, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	102
Tabela 32:	Previsões <i>in silico</i> dos potenciais mecanismos antimicrobianos (1-5), utilizando a ferramenta PASSonline*, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	105
Tabela 33:	Previsões <i>in silico</i> dos potenciais mecanismos antimicrobianos (6-11), utilizando a ferramenta PASSonline*, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de <i>Protium spruceanum</i>	108

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Atividade antimicrobiana total (AAT) para extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....41
- Gráfico 2:** Atividade antimicrobiana total (AAT) do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum*.....43
- Gráfico 3:** Atividade antimicrobiana total (AAT) do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum*.....44
- Gráfico 4:** Teor de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....52
- Gráfico 5:** Teor de flavonoides totais em equivalentes de quercetina (EQ) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....55
- Gráfico 6:** Teor de flavonoides totais em equivalentes de rutina (ER) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.....55
- Gráfico 7:** Teor de taninos totais em equivalentes de catequina (EC) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*, determinado pelo método vanilina/HCl.....58
- Gráfico 8:** Teor de taninos totais em equivalentes de ácido tânico (EAT) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*, determinado pelo método adsorção por gelatina.....58

LISTA DE ESTRUTURAS

1-	Exemplo de estrutura de monoterpenos (sabineno).....	4
2-	Exemplo de estrutura de diterpenos (labdano).....	4
3-	Exemplo de estrutura de triterpenos (amirina).....	4
4-	Exemplo de estrutura de sesquiterpenos (helenalina).....	4
5-	Exemplo de estrutura de flavonoides (quercetina).....	4
6-	Exemplo de estrutura de cumarinas (varfarina).....	4
7-	Exemplo de estrutura de lignanas (pinoresinol).....	4
8-	Exemplo de estrutura de taninos (procianidina).....	4
9-	Exemplo de estrutura de alcalóides (morfina).....	4
10-	Galato de etila.....	5
11-	Quercitrina.....	5
12-	Miricetina-glicosídeo e miricetina-ramnosídeo.....	6
13-	1,6-Di-galoil-glicose.....	6
14-	Ácido siríngico.....	6
15-	Campeferol.....	8
16-	Diidrocampeferol.....	8
17-	Piperitenona.....	10
18-	Timol.....	10
19-	Durenol.....	10
20-	Sabineno.....	11
21-	β -cariofileno.....	11
22-	Palmitato de metila.....	64
23-	Linolenato de metila.....	64
24-	Vitamina E.....	64
25-	β -amirina.....	66
26-	α -amirina.....	66
27-	Adipato de bis(2-etil-hexila).....	67
28-	Benzoato de metila.....	69
29-	4-propil-fenol.....	75

RESUMO

Devido ao crescimento de patógenos resistentes aos fármacos atuais, a pesquisa por novos antimicrobianos tem sido incentivada, principalmente através das plantas medicinais. A espécie vegetal *Protium spruceanum* (Benth.) Engler, conhecida como breu, é utilizada popularmente como anti-inflamatório e expectorante, porém, há necessidade de expandir estudos sobre essa espécie. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram a avaliação da atividade antimicrobiana e o estudo fitoquímico dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações de folhas e galhos de *P. spruceanum*. Através dos métodos de difusão em poço e microdiluição, observou-se a atividade antimicrobiana dos EEBs contra 20 micro-organismos. O EEB de folhas apresentou maior atividade antimicrobiana total (AAT) que o EEB de galhos. As frações mais ativas foram as acetatoetilênicas e hidrometanólicas que apresentam ação sinérgica entre si. Através do estudo fitoquímico, observou-se que a AAT dos EEBs e frações pode ser correlacionada majoritariamente ao teor de taninos totais, porém, propõe-se uma ação sinérgica com outros compostos, como flavonóides. Os constituintes voláteis majoritários foram identificados utilizando CG/EM, dentre eles ácidos graxos, fenólicos e terpenoides, como amirinas. A avaliação da mistura de α - e β -amirina mostrou que esta não apresenta forte atividade antimicrobiana e também não está relacionada ao sinergismo entre as frações. Através de CLUE/DAD/EM-EM também foi possível identificar flavonoides glicosilados (quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e campeferol-3-O-ramnosídeo) e taninos (catequina e procianidina). Os resultados *in silico* gerados pela ferramenta PASSonline indicaram potencial efeito antibacteriano principalmente para os constituintes majoritários das frações AcOEt e HMeOH. Também foram indicados como principais mecanismos de ação: aumento da permeabilidade da membrana celular, inibição da biossíntese da parede bacteriana (enzimas peptidoglicano glicosiltransferase e CDP-glicerol glicerofosfotransferase) e inibição do metabolismo (enzimas 2-deidropantoato 2-redutase e piruvato cinase). Esses mecanismos de ação são diferentes dos antibióticos recentes e são considerados alvos para novos fármacos.

Palavras-chave: *Protium spruceanum*, atividade antimicrobiana, PASSonline.

ABSTRACT

Due to the growing of resistant pathogens to the actual drugs, the research for new antibiotics has been encouraged, mainly through the medicinal plants. The vegetal specie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler, known as *almécega-de-casca-lisa* or *breu*, is used by the population like anti-inflammatory and expectorant, however, it is necessary to expand studies about this specie. Therefore, the aims of this work were the evaluation of antimicrobial activity and the phytochemical study of the crude ethanolic extracts (EEBs) and fractions of leaves and branches of *P. spruceanum*. Using the well diffusion and microdilution methods, it was observed the antimicrobial activity of the EEBs against 20 micro-organisms. The EEB of leaves showed greater total antimicrobial activity (AAT) than the EEB of branches. The fractions more active were AcOEt and HMeOH that have synergic action with each other. Through the phytochemical studies, it was observed that the AAT of extracts and fractions can be mainly correlated to tannin concentration, but it was proposed a synergism with others compounds. The majority volatile constituents were identified using CG/EM, including fatty acids, phenolics and terpenoids, as amyryl. The evaluation of α - and β -amyryl showed weak antimicrobial activity and these compounds are not correlated to synergism between the fractions. The Through CLUE/DAD/EM-EM also was identified 3 flavonoids (quercetin-3-O-rhamnoside, quercetin-3-O-glucuronide and kaempferol-3-O-rhamnoside) and 2 tannins (catechin and procyanidin). The *in silico* results, obtained by PASSonline tool, showed potential antibacterial effect mainly to the majority constituents of AcOEt and HMeOH fractions. It also was indicated the possible main action mechanisms: increase of the membrane permeability, inhibition of wall bacterial biosynthesis (enzymes peptidoglycan glycosyltransferase and CDP-glycerol glycerophosphotransferase) and inhibition of metabolism (enzymes 2-dehydropanoate 2-reductase and pyruvate kinase). These action mechanisms are different of the actual antibiotic and are considered target to new drugs.

Keywords: *Protium spruceanum*, antimicrobial activity, PASSonline.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Atividade antimicrobiana de plantas

As plantas de uso medicinal, utilizadas há milhares de anos pela população, são uma importante fonte de novos fármacos, devido à sua ampla diversidade química. Aproximadamente 121 dos compostos ativos utilizados na terapêutica são de origem vegetal, representando 25% dos medicamentos prescritos no mundo. Dentre os 252 medicamentos considerados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente provenientes de plantas, além de um número significativo de fármacos sintéticos derivados de precursores naturais (RATES, 2001).

Um dos fatores que estimulam a pesquisa de novos medicamentos através das plantas é o aumento de micro-organismos patogênicos resistentes aos fármacos atualmente utilizados. Tal fato causa preocupação, pois dificulta o tratamento de doenças infecciosas, resultando em elevada morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2007).

Os problemas causados pelo aumento de micro-organismos resistentes estão sendo relatados por numerosas publicações. Porém, o número de novos antimicrobianos que entram no mercado tem mostrado um declínio ao longo das últimas décadas (MOELLERING JR, 2011).

75% dos compostos antimicrobianos aprovados nas últimas três décadas são de origem natural e visando a descoberta de novos fármacos destacam-se as plantas de uso medicinal (TOMÁS-MENOR, et al., 2015).

Outra vantagem da fitoterapia é o sinergismo entre os componentes bioativos. A diversidade estrutural dos compostos contribui para a diferença de mecanismos de ação, e isso pode ser uma estratégia para alcançar máxima resposta farmacológica. A ação sinérgica é bastante relevante para a terapia antimicrobiana, podendo reduzir a resistência dos micro-organismos (TOMÁS-MENOR, et al., 2015).

Vários estudos têm determinado a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados, como alcaloides, flavonoides,

sesquiterpenos, lactonas, diterpenos, triterpenos, dentre outros (RIOS & RECIO, 2005).

Os compostos das plantas de uso medicinal possuem potenciais mecanismos de ação antimicrobiana como: inibição da síntese da parede celular ou de proteínas e interferência com metabolismos intermediários de síntese de DNA (RADULOVIC *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana de produtos naturais pode ser avaliada através de diversos métodos como difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Devido às variações relacionadas a essa determinação, como por exemplo, técnica aplicada, micro-organismos e cepas utilizadas, origem da planta, época de coleta e preparação dos extratos, não existe padronização de um método para a avaliação da atividade de extratos vegetais (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), é responsável pela padronização dos testes de avaliação antimicrobiana desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais. Os extratos, assim como os óleos vegetais, possuem propriedades químicas, como solubilidade, que não possibilitam que a metodologia proposta pelo NCCLS seja seguida integralmente, exigindo modificações (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

A triagem da atividade antimicrobiana de plantas de uso medicinal é geralmente realizada através do método de difusão em ágar, que é simples e de baixo custo. Porém, estudos comparativos entre metodologias para determinação da CIM indicaram que esse método que pode gerar resultados falsos negativos, devido a fatores que interferem na difusão dos compostos no meio de cultura. Dessa forma, permite apenas uma triagem da atividade de produtos naturais, direcionando a análises para determinação da CIM (SCORZONI *et al.*, 2007; KLANČNIK *et al.*, 2010).

O método mais indicado para determinação da CIM é a microdiluição em meio de cultura líquido. Essa técnica possui maior sensibilidade, reprodutibilidade, requer pequena quantidade de amostra e pode ser usada para um grande número de amostras (OSTROSKY *et al.*, 2008; SCORZONI *et al.*, 2007; KLANČNIK *et al.*, 2010).

Apesar das diversas pesquisas que já foram realizadas envolvendo atividade antimicrobiana de plantas de uso medicinal ainda são necessários mais estudos incluindo toxicidade, mecanismos de ação, efeitos *in vivo*, interações com antibióticos padrões, padronização das técnicas de extração e avaliação da atividade, dentre outros (RIOS & RECIO, 2005).

Além disso, existem várias espécies que ainda não foram estudadas. No Brasil, por exemplo, das mais de 350.000 espécies já identificadas, apenas 100.000 já tiveram comprovação científica de sua atividade terapêutica. Também se deve ressaltar a importância dos estudos sobre a atividade antimicrobiana em um país de grande biodiversidade como o Brasil, já que tais pesquisas podem ser utilizadas para o primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica (OSTROSKY et al., 2008; REZENDE & COCCO, 2002).

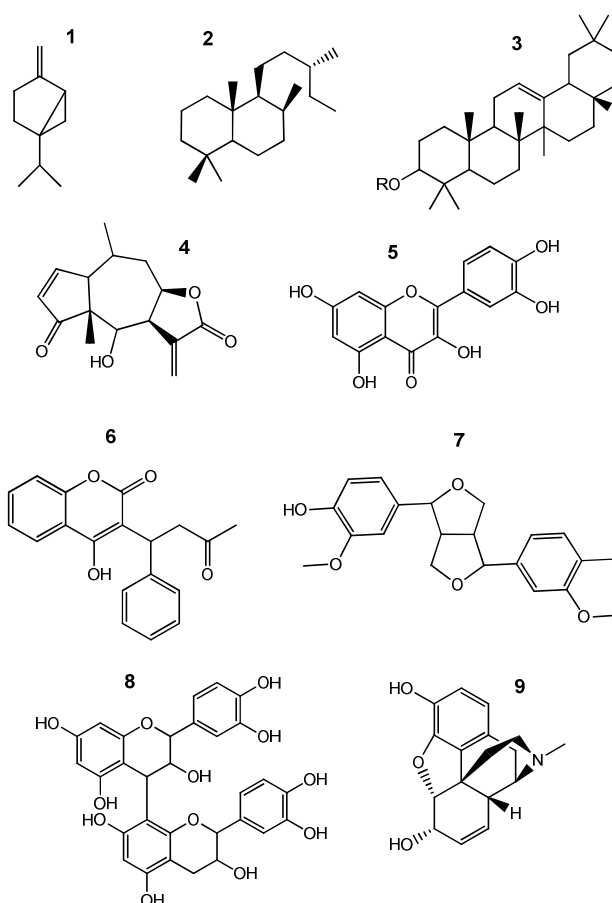
1.2. Análises fitoquímicas

A pesquisa com plantas de uso medicinal para descoberta de novos medicamentos envolve integração de várias áreas como etnobotânica, isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (MACIEL et al., 2002). Dessa forma, as análises fitoquímicas representam parte importante da pesquisa com plantas de uso medicinal, visando caracterizar os constituintes ativos.

A atividade terapêutica das plantas pode ser atribuída aos metabólitos secundários, que são substâncias produzidas pelo metabolismo vegetal que não estão envolvidas na manutenção fundamental e no desenvolvimento das plantas, mas são responsáveis pela sobrevivência e competição no ambiente (DIXON, 2001).

As principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários derivam do metabolismo primário do carbono e estes podem ser classificados em três classes: terpenos, compostos fenólicos (flavonoides, cumarinas, lignanas e taninos) e alcaloides (Figura 1). Essas classes representam compostos de ampla diversidade estrutural, muitos dos quais provaram possuir atividade antimicrobiana (WINK, 2003, GARCÍA & CARRIL, 2009; RADULOVIC *et al.*, 2013).

Figura 1: Exemplos de estruturas químicas de metabólitos secundários de plantas. Terpenos: monoterpenos (1- sabineno), diterpenos (2- labdano), triterpenos (3- amirina) e sesquiterpenos (4- helenalina); Compostos fenólicos: flavonoides (5- quercetina), cumarinas (6- varfarina), lignanas (7- pinoresinol) e taninos (8- procianidina); Alcalóides (9- morfina)

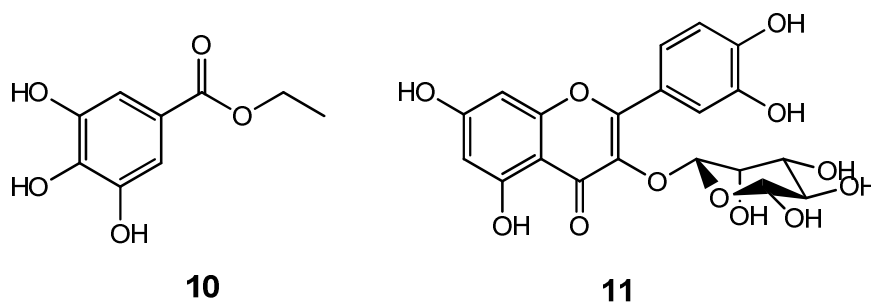


O desenvolvimento de técnicas de cromatografia e espectroscopia possibilitou o avanço dos estudos de produtos naturais, possibilitando o isolamento e identificação de metabólitos secundários (JUNIOR *et al.*, 2005).

As técnicas mais utilizadas para isolamento e identificação envolvem: técnicas cromatográficas como cromatografia líquida clássica (CLC) com sílica gel, cromatografia de exclusão molecular (CEM), cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG); e técnicas espectroscópicas como ultravioleta (UV) e espectrométricas como a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) (SULEIMAN, 2015; BANDEIRA et al., 2002; QUEIROZ & HOSTETTMANN, 2006).

Os componentes ativos de *Dacryodes edulis*, uma espécie da família Burseraceae que possui atividade antimicrobiana, foram isolados utilizando métodos cromatográficos como CLC e CEM e foram identificados através de UV e RMN. Para isolamento dos componentes ativos foi realizado um fracionamento bio guiado do extrato, através da qual as frações de maior atividade antimicrobiana foram refractionadas até a obtenção das substâncias ativas isoladas. A atividade antimicrobiana dessa espécie pôde então ser relacionada à presença dos compostos fenólicos: galato de etila e quercitrina (Figura 2) (AJIBESIN et al., 2011).

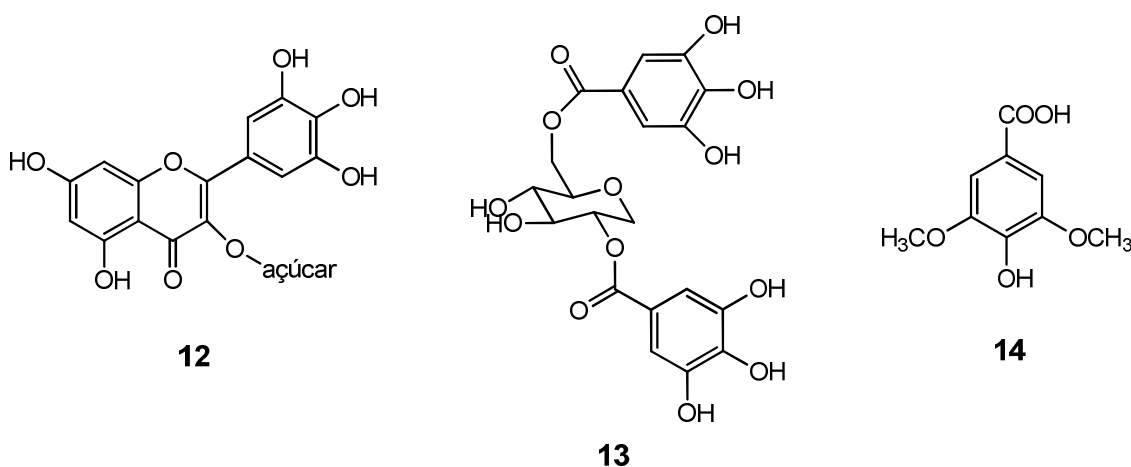
Figura 2: Constituintes antibacterianos de *Dacryodes edulis*: galato de etila (10), quercitrina (11)



Além do isolamento, compostos bioativos são identificados utilizando técnicas hífenadas ou acopladas, como CLAE/UV, CLAE/EM, CLAE/RMN e CG/EM. As análises fitoquímicas com essas técnicas contribuem para detectar compostos e economizar tempo, evitando o isolamento de compostos já conhecidos e facilitando a procura de novos fármacos (QUEIROZ & HOSTETTMANN, 2006).

A técnica acoplada CLAE/EM foi utilizada para identificação dos compostos bioativos de folhas de *Ceratonia siriqua*, da família Leguminosiae. O extrato em acetato de etila, com atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, possui alto teor de compostos fenólicos, sendo os constituintes majoritários: miricetina-glicosídeo, miricetina-ramnosídeo, 1,6-Di-galoil-glicose e ácido siríngico (Figura 3) (HSOUNA et al., 2015).

Figura 3: Compostos bioativos de *Ceratonia siriqua*: miricetina-glicosídeo e miricetina-ramnosídeo (12); 1,6-Di-galoil-glicose (13); ácido siríngico (14)



As determinações quantitativas também são importantes para as análises fitoquímicas. Tais determinações incluem métodos como CLAE/EM, CG/EM e espectrofotometria (KHODDAMI, et al.; 2013).

As análises de quantificação de metabólitos secundários contribuem para o direcionamento da pesquisa de compostos bioativos em extratos e frações, possibilitando correlacionar a atividade biológica com o teor dos constituintes (SILVÁN et al., 2013; SINGH et al., 2013; SILVA et al., 2012; SIMLAI & ROY et al., 2012; THITILERTDECHA et al., 2008).

A correlação entre atividade antimicrobiana e teor de compostos fenólicos foi observada entre extratos e frações de cascas e sementes de *Nephelium lappaceum*. Foram realizadas a determinação do teor de compostos fenólicos totais, através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, e a determinação da CIM, para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os autores concluíram que a atividade antibacteriana da espécie pode ser atribuída aos compostos fenólicos, já que somente as frações com

alto teor desses compostos apresentaram atividade (THITILERTDECHA et al., 2008).

Outras análises fitoquímicas também contribuem para a pesquisa de metabólitos secundários bioativos. Um exemplo é a prospecção fitoquímica, para identificação das classes de metabólitos presentes. Essas análises qualitativas são realizadas através de técnicas como CCD e reações químicas em tubos de ensaio, utilizando diferentes reagentes (RODRIGUES et al., 2009).

Testes fitoquímicos qualitativos utilizando CCD foram utilizados para identificar as classes de constituintes da fração antimicrobiana de *Solanum indicum*. A fração em acetato de etila foi obtida por partição do extrato etanólico dos frutos. Foi identificada a presença de flavonoides, saponinas, glicosídeos e carotenoides, que podem estar relacionados à atividade dessa fração (KOUADIO et al.; 2014).

1.3. Análises *in silico*

O *screening* virtual (*in silico*) também tem sido utilizado nas pesquisas com plantas de uso medicinal. As análises *in silico* direcionam os testes biológicos, facilitando e reduzindo os custos do processo de descoberta de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2014).

Uma das ferramentas *in silico* que tem sido utilizada para prever efeitos farmacológicos de metabólitos secundários é o programa “*Prediction of Activity Spectra for Substances*” (PASS). O PASS possibilita prever vários efeitos farmacológicos, mecanismos de ação e efeitos tóxicos específicos com base na estrutura da substância com 95% de acurácia e isso pode ser validado por testes *in vitro* e *in vivo* (GOEL et al., 2011).

PASS *online* também possibilita previsões simultâneas de várias atividades biológicas baseadas em comparações da estrutura química com compostos biologicamente ativos. No banco de dados são incluídos fármacos, candidatos a fármacos, compostos em processos de registro, substâncias tóxicas, fitocompotentes, dentre outros, totalizando mais de 260.000 descritores. Os resultados das análises são fornecidos como as probabilidades do composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) (www.pharmaexpert.ru/passonline).

1.4. Família Burseraceae

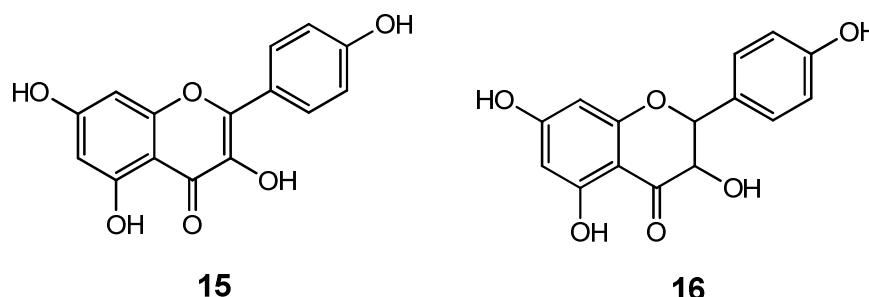
A família Burseraceae possui cerca de 750 espécies de árvores e arbustos distribuídas em 19 gêneros, sendo os principais: *Protium*, *Commiphora*, *Bursera* e *Canarium*. As espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, representando até 10-14% das árvores presentes em florestas úmidas. Na floresta Amazônica são encontradas mais de 100 espécies dessa família, que é considerada um excelente modelo para estudos sobre conservação, evolução e biogeografia da floresta, devido à alta diversidade, importância ecológica e diversidade de habitat ocupados (DALY et al., 2012).

Atividades terapêuticas de diversas espécies da família Burseraceae já foram estudadas, como por exemplo: atividade anti-inflamatória de folhas de *Bursera simaruba* (CARRETERO et al., 2008); atividades hepatoprotetora e antioxidante de cascas de *Commiphora berryi* (SHANKAR et al., 2008) e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Boswellia* spp (CAMARDA et al., 2007).

A composição química das espécies da família Burseraceae caracteriza-se pela presença de terpenos, flavonoides, cumarinas, lignanas e taninos (SIANI et al., 2012; RAJAGOPAL, 2014; SULEIMAN, 2015).

Commiphora pedunculata, utilizada na medicina tradicional para tratamento de doenças infecciosas, é uma das espécies da família Burseraceae que possui atividade antimicrobiana. Tal atividade dos extratos metanólicos de cascas dessa espécie foi atribuída à presença dos flavonoides: campeferol e diidrocampferol (Figura 4) (TAJUDDEEN et al., 2014).

Figura 4: Flavonoides responsáveis pela atividade antimicrobiana de *Commiphora pedunculata*: campeferol (15) e diidrocampferol (16)



1.5. Gênero *Protium*

Protium é o principal gênero da família Burseraceae com 150 espécies que representam a maior diversidade encontrada no hemisfério sul. No Brasil, essas espécies são encontradas em todo território, principalmente na floresta Amazônica e equivalem a 80% da família Burseraceae (MARQUES et al., 2010).

As espécies do gênero *Protium* são capazes de produzir oleoresinas como resultado de injúrias, como picadas de insetos e quebras nos galhos. Essas oleoresinas são conhecidas como “breus” e são utilizadas na medicina tradicional e na fabricação de vernizes (OTUKI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2013).

Na medicina tradicional, diferentes partes das plantas do gênero *Protium* são utilizadas como antissépticos, tônicos estimulantes, analgésicos, contraceptivos, laxativos, hemostáticos, antirreumáticos e para tratamento de gonorreia, doenças estomacais e pulmonares, dentre outras (RÜDIGER et al., 2007).

A maior parte dos estudos envolvendo fitoquímica e farmacologia de espécies *Protium* é sobre óleos essenciais de suas partes aéreas. Na constituição química desses óleos predominam terpenos (monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (RÜDIGER et al., 2007).

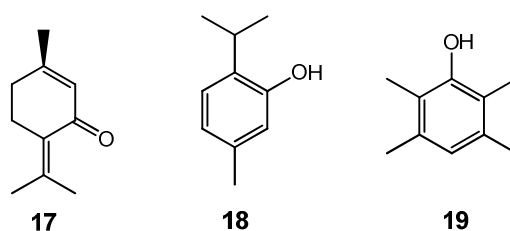
Protium heptaphyllum, uma das espécies mais estudadas do gênero, é encontrada na região Amazônica e possui seiva conhecida como almácea. Essa espécie é utilizada na medicina tradicional e também na perfumaria e como verniz. As atividades anti-inflamatória, gastroprotetora e antitumoral de seu óleo essencial e de sua resina foram comprovadas por estudos farmacológicos e a composição química dessa espécie é caracterizada pela presença de terpenos, como amirinas (SIANI, et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004).

A atividade antimicrobiana de *Protium heptaphyllum* também já foi identificada. O extrato etanólico bruto de cascas dessa espécie apresentou atividade antimicrobiana para os fungos *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. As frações em

hexano, acetato de etila e metanol desse extrato também apresentaram atividade antimicrobiana (VIOLANTE et al., 2012).

A espécie *Protium neglectum*, encontrada na Venezuela e utilizada na medicinal tradicional para tratamento doenças inflamatórias e respiratórias, também possui atividade antibacteriana. O óleo essencial extraído da resina dessa espécie apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos: piperitenona (25,4%), timol (17,5%) e durenol (15,6%) (Figura 5). A atividade antimicrobiana desse óleo foi determinada para bactérias Gram positivas como *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, porém demonstrou-se inativo para bactérias Gram negativas (SUÁREZ et al., 2007).

Figura 5: Monoterpenos do óleo essencial de *Protium neglectum*: piperitenona (17), timol (18), durenol (19).



1.6. Espécie *Protium spruceanum*

A espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler, encontrada em florestas úmidas Atlânticas e Amazônicas e também em matas ciliares do cerrado, é conhecida como almácega-de-casca-lisa ou breu. Na medicina tradicional, é utilizada como anti-inflamatório de tratamento tópico e expectorante (VIEIRA et al., 2010). Estudos botânicos a descrevem como uma espécie arbórea semidecídua com flores dispostas em inflorescência e frutos na forma de baga subglobosa (Figura 6) (VIEIRA, 2005).

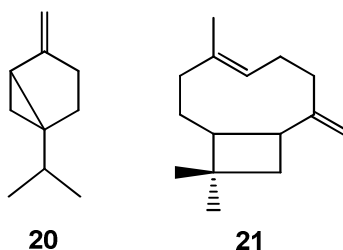
As atividades anti-inflamatória e analgésica do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas da espécie e suas frações já foram demonstradas e estão relacionadas à presença da mistura triterpênica de α - e β - amirinas. Além disso, verificou-se que o EEB possui baixa toxicidade aguda (RODRIGUES et al., 2013).

Figura 6: Fotos de flores, frutos, folhas e caule de *Protium spruceanum*

Fonte: <http://ecologia.ib.usp.br>

Os componentes voláteis majoritários do óleo essencial de folhas, resina e ramos de *P. spruceanum* são o sabineno, seguido do β -cariofileno (Figura 7). Essa composição dos óleos essenciais sofre influências sazonais, apresentando variações em diferentes estações do ano. Nas plantas da espécie da região Amazônica, o maior teor de *sabineno no óleo essencial foi encontrado durante o clima chuvoso* (MACHADO et al., 2003).

Figura 7: Componentes majoritários do óleo essencial de *Protium spruceanum*: sabineno (20) e β -cariofileno (21)



Ainda são encontrados poucos registros na literatura sobre fitoquímica da espécie *P. spruceanum* e inexistem dados sobre sua atividade antimicrobiana.

Dessa forma, no presente trabalho, foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de folhas e galhos de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. frente a diferentes espécies microbianas e análises fitoquímicas visando identificar metabólitos secundários que possam estar relacionados com as propriedades terapêuticas dessa espécie, direcionando estudos posteriores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e frações de folhas e de galhos de *Protium spruceanum*, bem como realizar análises fitoquímicas.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar os materiais vegetais e obter os extratos etanólicos brutos (EEBs);
- Fracionar os EEBs;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e suas frações.
- Determinar qualitativamente as classes de metabólitos presentes nos extratos e frações;
- Determinar os teores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos totais dos extratos e frações;
- Caracterizar a constituição química dos extratos e frações utilizando técnicas de cromatografia e espectrometria (CG/EM e CLUE/DAD/EM);
- Analisar *in silico* o potencial para efeitos e mecanismos antimicrobianos dos compostos identificados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação dos materiais vegetais

Os materiais vegetais utilizados, folhas e galhos da espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler., foram coletados em propriedade particular na região de Lavras-MG (entre coordenadas 21°17'33, 6"S e 44°59'15, 1"N, 21°18'11, 9"S e 44°59'18, 8"N). A espécie foi identificada por pesquisadores da Universidade Federal de Lavras e uma exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal de Lavras (Nº 16399 HESAL).

Após a coleta, os materiais foram submetidos a processo de secagem em estufa de ar circulante (Nova Etica[®], Brasil), 40 °C (estabilização). Após secagem, os materiais foram triturados, até o estado de pó fino, em moinho de facas (MR Manesco[®], Brasil).

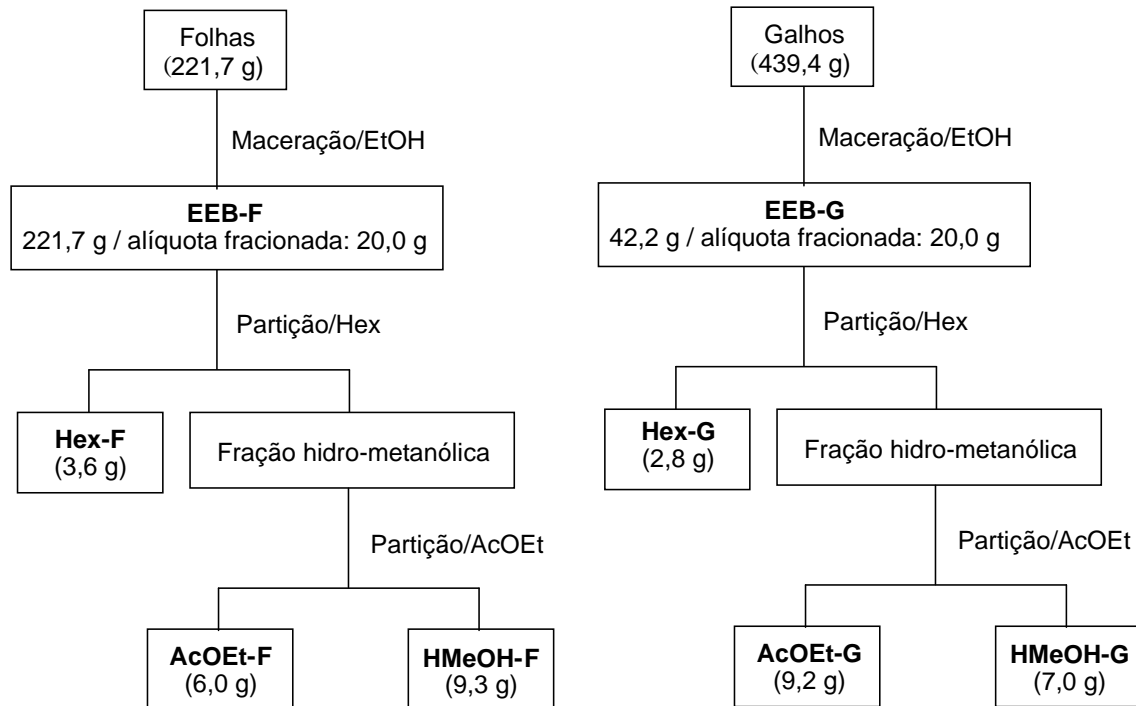
3.2. Obtenção dos extratos etanólicos brutos

Os materiais vegetais triturados (folhas ou galhos de *P. spruceanum*) foram submetidos à extração por maceração exaustiva com etanol comercial 92,8°GL (Topázio[®], Brasil), à temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel de filtro e o solvente completamente removido utilizando-se rotaevaporador (Fisatom[®], Brasil) à pressão reduzida e sob temperatura de 40 °C. Esse processo foi repetido até o esgotamento, quase que total, do material vegetal, obtendo-se os EEBs que foram submetidos à secagem em estufa 30-40 °C (Fanem[®], Brasil).

3.3. Fracionamento dos EEBs

Os EEBs (20,0 g) foram resuspendidos em 300 mL de MeOH:H₂O (1:1) e submetidos a partições líquido-líquido sucessivas em funil de separação utilizando hexano e acetato de etila (3 x 100 mL) (Química moderna[®], Brasil). Dessa forma foram obtidas as frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) (Figura 8).

Figura 8: Esquema do processo de obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEB) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*



3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

A triagem de atividade antimicrobiana dos EEBs e frações foi realizada pelo método de difusão em ágar e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo.

Foram utilizados 20 micro-organismos de coleções padrões da *American type culture collection* (ATCC) e isolados de amostras clínicas, sendo:

- Bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MARSA (isolado clínico), *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Listeria monocytogenes* (isolado clínico);
- Bactérias Gram negativas: *Enterococcus faecalis* ATCC 15325, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella flexneri* ATCC 12022,

Escherichia coli ATCC 25922, *Escherichia coli* EPEC (isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Providencia rettgeri* ATCC 29944, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182;
- Fungo leveduriforme: *Candida albicans* ATCC 14408.

3.4.1. Triagem por difusão em ágar

A triagem de atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o método de difusão em poço, descrita por Okunji e colaboradores, com modificações (OKUNJI et al., 1990).

Para isso, os EEBs e as frações foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec[®], Brasil), na concentração de 80 mg/mL. Como controle positivo, foi utilizado tetraciclina (100 µg/mL) para as bactérias, exceto para *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *P. rettgeri* para as quais utilizou-se moxifloxacina (100 µg/mL). Para a espécie leveduriforme, foi utilizado como controle positivo cetoconazol (100 µg/mL). Como controle negativo, para todas as espécies, foi utilizado DMSO.

Para o preparo do inóculo, as bactérias foram repicadas em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (Predimol[®]) e a levedura foi repicada em Ágar Saboraud (Predimol[®]). Após incubação a 37 °C por 24 horas, para bactérias, ou 48 horas, para a levedura, os inóculos foram preparados em salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter suspensões de turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL).

Placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton ou ágar Saboraud foram perfuradas, obtendo-se orifícios de 6 mm de diâmetro. Posteriormente, as placas foram inoculadas com as suspensões microbianas, por semeadura de superfície, com auxílio de *swab*. Em seguida, 50 µL das soluções dos EEBs, frações, controle positivo e controle negativo foram aplicadas nos orifícios das placas e estas foram incubadas por 24/48 horas em estufa a 37 ± 2 °C.

Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo[®], Brasil).

Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em média do halo de inibição (mm) \pm desvio padrão.

3.4.2. Avaliação da metodologia utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Devido à ausência de padronização de testes de atividade antimicrobiana para produtos naturais e à dificuldade de solubilização das amostras em meio de cultura líquido, foi realizada uma avaliação da viabilidade microbiana na metodologia utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações.

A metodologia utilizada foi a microdiluição em caldo, conforme orientações do CLSI com modificações (CLSI, 2012).

Para preparo do inóculo, os micro-organismos cultivados em ágar por 24 ou 48 horas, foram suspensos em salina (NaCl 0,9%), de modo a se obter turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). Essas suspensões foram diluídas 1:50 em caldo Mueller Hinton (Himedia[®]) (para as bactérias) ou caldo Saboraud (Himedia[®]) (para a levedura), obtendo-se uma suspensão a 2×10^6 UFC/mL, para que a concentração final de micro-organismo no teste fosse 5×10^5 UFC/mL.

Para avaliação da viabilidade microbiana, foram colocados 50 µL de MeOH e 75 µL de caldo Mueller Hinton ou Saboraud, em placas de 96 poços, esterilizadas. Como controle de crescimento, foram colocados somente 75 µL de meio de cultura.

No controle positivo, foram adicionados 50 µL de caldo e 25 µL de tetraciclina (para bactérias) ou cetoconazol (para a levedura), ambos a 400 µg/mL. Como controle do meio de cultura, foram adicionados somente 100 µL de caldo.

As placas foram colocadas em dessecador, com bomba de vácuo ligada, por 1 hora, para evaporação do MeOH. Em seguida, as placas foram expostas a luz UV, em cabine de segurança biológica, por 15 min, para esterilização.

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

Terminado o período de incubação, foram adicionados 30 µL de CTT (Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio - Neon[®]) a 0,25 mg/mL. As placas foram

então incubadas em estufa a 37 °C por 3 horas e foi realizada a leitura de absorbância em leitor de ELISA (Molecular Devices®) a 650 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata e a viabilidade microbiana foi avaliada pelo cálculo da porcentagem (%) de crescimento microbiano do teste em relação ao controle de crescimento. Os resultados foram expressos em % de crescimento microbiano \pm desvio padrão.

3.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações

A concentração inibitória mínima (CIM) dos EEBs e frações foi determinada utilizando a metodologia descrita no item 3.4.2 (pág. 16).

Para isso, as amostras foram resuspendidas em MeOH, para concentração de 160 mg/mL.

Em placas de 96 poços, foram adicionados 50 μ L de MeOH a partir do segundo poço. Em seguida, 100 μ L de solução de amostra foram adicionados no primeiro poço e foram realizadas diluições seriadas 1:2, retirando 50 μ L do primeiro poço e transferindo para o seguinte. Dessa forma, as amostras foram testadas em 12 concentrações: 80 a 0,039 mg/mL.

Após realização das diluições, 75 μ L de caldo Mueller Hinton ou Sabouraud foram adicionados em cada poço.

Para o controle de crescimento, foram colocados somente 75 μ L de meio de cultura. No controle positivo, foram adicionados 50 μ L de caldo e 25 μ L de tetraciclina ou moxifloxacina (para bactérias), ou cetoconazol (para a levedura), a 400 μ g/mL. No controle negativo, foram adicionados 50 μ L de metanol e 75 μ L de caldo. Como controle do meio de cultura, foram adicionados somente 100 μ L de caldo.

As placas foram colocadas em dessecador por 1 hora. Depois, as mesmas foram esterilizadas, foram adicionados 25 μ L de inóculo em cada orifício (exceto para o controle do meio de cultura) e foram incubadas em estufa a 37 °C por 24/48 horas.

Devido à coloração e precipitação dos extratos, não foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA. No entanto, foi adicionado o CTT e

cada poço sem coloração visível foi repicado, com auxílio de alça bacteriológica, para placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton ou Saboraud.

As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por 24/48 horas e foi considerada como CIM, a menor concentração em que não houve crescimento microbiano.

3.4.4. Determinação da porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA), atividade antimicrobiana total (AAT) e índice de susceptibilidade microbiana (ISM)

Visando analisar os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e frações, procedeu-se a determinação da porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA), atividade antimicrobiana total (AAT) e índice de susceptibilidade microbiana (ISM). Esses parâmetros foram determinados segundo as equações de 1 a 3 (Eq 1, Eq 2 e Eq 3), segundo Eloff, 2004 e Mahlke et al., 2009.

$$\%AA = \frac{100 \times n^{\circ} \text{ de micro-organismos susceptíveis à amostra}}{n^{\circ} \text{ total de micro-organismos testados}} \quad (\text{Eq 1})$$

$$AAT = \frac{\text{massa da amostra em mg}^*}{\text{CIM (mg/mL)}} \quad (\text{Eq 2})$$

$$ISM = \frac{100 \times n^{\circ} \text{ de amostras ativas contra o micro-organismo}}{n^{\circ} \text{ de amostras testadas}} \quad (\text{Eq 3})$$

3.4.5. Análise do efeito sinérgico entre as frações

Para a avaliação do efeito sinérgico, uma mistura das frações AcOEt e HMeOH em igual proporção, foi solubilizada em MeOH para uma concentração de 160 mg/mL.

Após preparo das amostras, foi determinada a CIM como descrito no item 3.4.3 (pág. 17).

Utilizando os resultados da CIM das misturas e das frações isoladas, foram calculados a concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), segundo GOTO et al., 1999.

A concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foram calculados utilizando as equações (Eq 4 e Eq 5):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{(\text{AcOEt})} + \text{CIF}_{(\text{HMeOH})} \quad (\text{Eq 4})$$

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM}_{\text{AcOEt na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{AcOEt}})} + \frac{(\text{CIM}_{\text{HMeOH na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{HMeOH}})} \quad (\text{Eq 5})$$

Os resultados foram interpretados de acordo com a tabela 1:

Tabela 1: Interações de acordo com os valores de ICIF (GOTO et al., 1999)

Tipo de interação	ICIF
Sinergismo	ICIF ≤ 0,5
Aditividade	0,5 < ICIF ≤ 1
Sem interação	1 < ICIF ≤ 2
Antagonismo	ICIF > 2

ICIF: Índice de concentração Inibitória Mínima

3.5. Análises fitoquímicas

Para realização das análises fitoquímicas foram utilizadas técnicas de cromatografia e espectrometria.

As análises envolvendo cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas cromatográficas com sílica 60G com indicador de fluorescência UV-vis a 254 nm (Vetec[®], Brasil), sendo a espessura 0,25 mm. Como fase móvel, foram utilizadas diferentes misturas de solventes e as placas foram reveladas com reagentes específicos para cada objetivo.

As análises por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas (EM) foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Biologia Farmacêutica, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob coordenação da Prof. Dra. Alaíde Braga de Oliveira.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte (CEFET-MG), sob coordenação da Prof. Dra. Adriana Akemi Okuma.

As leituras de absorvância das determinações de teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais foram realizadas em leitor de ELISA (Molecular Devices[®]), no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Ouro Preto, CIPHARMA-UFOP.

3.5.1. Prospecção fitoquímica

A análise qualitativa dos metabólitos secundários presentes nos EEBs e frações foi realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) (RODRIGUES et al., 2009). As classes de compostos pesquisados foram alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, taninos, terpenoides e ácidos graxos.

Quatro placas cromatográficas foram eluídas com mistura de solvente polar ácido (acetato de etila: ácido fórmico: água 88:6:6). Uma placa foi eluída

com mistura de solvente polar básico (tolueno: acetato de etila: dietilamina 70:20:10) e uma com eluente apolar (tolueno: acetato de etila 93:7).

Foram, então, utilizados os seguintes reagentes, aplicados às placas por pulverização:

- Reativo de Dragendorff, aplicado sobre a cromatoplaça eluída no sistema polar básico para a detecção de alcaloides (coloração amarronzada).

- Hidróxido de potássio 5%, aplicado sobre cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) sobre luz UV 386 nm.

- NP/PEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol), aplicado sobre a cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de flavonoides (amarelo) sobre luz UV 386 nm.

- Cloreto férrico 1%, aplicado sobre a cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de taninos (coloração azul escuro instável).

- Vanilina sulfúrica ácida, aplicada sobre cromatoplaça eluída no sistema polar ácido para a detecção de terpenoides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul).

3.5.2. Teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Bonoli e colaboradores, com modificações (BONOLI et al., 2004).

Foram preparadas soluções estoque dos EEBs e frações Hex, AcOEt e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas de 80 µL dessas soluções foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e foram adicionados 60 µL de água destilada e 10 µL de reagente Folin-Ciocalteu (Cromoline[®], Brasil). Em seguida a placa foi agitada por 1 min e foram adicionados 40 µL de carbonato de sódio (Vetec[®], Brasil) a 15% p/v. Após agitação por 30 segundos, foram adicionados 10 µL de água destilada para que a concentração final fosse 2,0 mg/mL.

Para construção da curva de calibração, foi feita uma solução estoque de ácido gálico (Vetec[®], Brasil) a 1 mg/mL em etanol 95%. Alíquotas dessa

solução foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 10 a 350 µg/mL, com volume ajustado com água destilada. Os mesmos procedimentos das amostras foram realizados.

Após incubação por 2 horas, a leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 650 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados obtidos para o padrão (ácido gálico), foi construída uma curva de calibração e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado pela interpolação dos resultados das amostras com a equação obtida. Os resultados foram expressos em EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de amostra.

3.5.3. Teor de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl_3), segundo Chang e colaboradores, com modificações (CHANG et al., 2002).

Foram preparadas soluções estoque dos EEBs e frações AcOEt e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas de 100 µL dessas soluções foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e foram adicionados 40 µL de etanol 95%, 4 µL de AlCl_3 (Synth[®], Brasil) a 10% p/v e 4 µL de acetato de potássio (Hannover[®]) a 1 mol/L. O volume foi ajustado com 52 µL de água destilada para que a concentração final fosse 2,5 mg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado, sem adição de AlCl_3 , para os brancos.

Para construção da curva de calibração, foram feitas soluções estoque de rutina e quercetina a 0,2 mg/mL. Alíquotas dessas soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 2 a 45 µg/mL, com volume ajustado com etanol. Os mesmos procedimentos das amostras foram realizados.

Após incubação por 40 min, foi realizada a leitura das aborbâncias em leitor de ELISA a 405 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados obtidos para os padrões (quercetina e rutina), foram construídas curvas de calibração e o teor de flavonoides totais foi determinado pela interpolação dos resultados das amostras com as equações obtidas. Os

resultados foram expressos em EQ (equivalentes de quercetina) e ER (equivalentes de rutina) por grama de amostra.

3.5.4. Teor de taninos totais

3.5.4.1. Método vanilina/ácido clorídrico

A determinação do teor de taninos totais pelo método com vanilina/ácido clorídrico foi realizada de acordo com o descrito por Perez e colaboradores, com modificações (PEREZ et al., 1999).

Foram preparadas soluções estoque dos EEBs e frações AcOEt e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas de 40 µL dessas soluções foram transferidas para poços de uma placa de 96 poços e foram adicionados 200 µL de solução de vanilina ácida (mistura recém-preparada de vanilina 4% em metanol e ácido clorídrico 8% em metanol, 1:1). A concentração final foi de 0,83 mg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado, sem adição de vanilina, para os brancos.

Para construção da curva de calibração, foi feita uma solução estoque de catequina a 270 µg/mL em metanol. Alíquotas dessa solução foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 2 a 45 µg/mL, com volume ajustado com etanol. Os mesmos procedimentos das amostras foram realizados.

Após incubação por 20 min, foi realizada a leitura das aborbâncias em leitor de ELISA a 490 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados obtidos para o padrão (catequina), foram construídas curvas de calibração e o teor de taninos totais foi determinado pela interpolação dos resultados das amostras com a equação obtida. Os resultados foram expressos em EC (equivalentes de catequina) por grama de amostra.

3.5.4.2. Método de adsorção por gelatina

A determinação do teor de taninos totais pelo método por adsorção por gelatina baseia-se na propriedade dos taninos formarem complexos com proteínas e consiste em duas etapas: **A**- quantificação de fenólicos totais; **B**- quantificação de fenólicos totais após adsorção de taninos por gelatina (VALDES et al., 2000).

Foram preparadas soluções estoque dos EEBs e frações AcOEt e HMeOH em etanol 95%, na concentração de 5 mg/mL. Para construção da curva de calibração, foi feita uma solução estoque de ácido tânico a 10 mg/mL em água. Alíquotas dessa solução foram transferidas para uma placa de 96 poços de modo a se obter concentrações finais de 10 a 500 µg/mL, com volume ajustado com água.

Na etapa **A** o teor de fenólicos totais foi determinado nas SE pelo método de Folin-Ciocalteu (BONOLI et al., 2004), conforme descrito no item 3.5.2 (pág. 21).

Na etapa **B** 2,5 mL de SE foram adicionados a uma solução de 5 mL de gelatina a 5%. Foram adicionados 5 mL de solução saturada de NaCl acidificada (HCl 1%) e 0,5 g de caulim. A mistura foi agitada por 30 min e filtrada. O teor de fenólicos totais foi determinado nos filtrados.

O teor de taninos totais foi calculado subtraindo do valor de fenólicos da etapa **A** o valor obtido pela etapa **B**. Os resultados foram expressos em EAT (equivalente de ácido tânico) por grama de amostra.

3.5.5. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

As amostras (EEBs e frações Hex, AcOEt e HMeOH) foram solubilizadas em Hex, AcOEt ou MeOH, de acordo com a solubilidade de cada uma. Em seguida foram analisadas utilizando cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, GC-MSD 5975, Agilent®, com as condições de análise apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de CG/EM utilizadas para análise dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações de *Protium spruceanum*

Equipamento	GC-MSD 5975, Agilent®
Coluna cromatográfica	Coluna capilar HP-5MS 5% Fenil Metil Silox (30 m X 250 µm X 0,25 µm)
Gás de arraste; Vazão	Hélio; 1,4 mL/min
Modo de injeção	Splitless
Volume injetado	1 µL
Temperatura do injetor	290 °C
Temperatura da coluna	100 °C por 1 min, 5 °C/min até 200 °C, 10 °C/min até 290 °C, 290 °C por 10 min
Temperatura do detector	290 °C
Impacto eletrônico	70 eV
Tempo de corrida	40 min

Os compostos detectados foram identificados utilizando o software MSD *Chemstation*® acoplado com a biblioteca de espectros de massa NIST/2.0 (National Institute of Standards and Technology - Standard Reference Database).

3.5.6. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE/DAD/EM)

Para as análises em CLUE/DAD/EM, escala analítica, os EEBs e as frações AcOEt e HMeOH foram solubilizadas em MeOH e filtradas em PVDF 0,22 µm.

As análises foram realizadas em equipamento UPLC ACQUITY, Waters®, nas condições cromatográficas apresentadas na Tabela 3., coluna CSH 130 C-18 (partículas 1,7 µm; 50 X 10 mm), fase móvel água 0,1% ácido

metanólico e acetonitrila (ACN) 0,1% ácido fórmico, eluição linear 5 - 95% de ACN em 10 min e isocrática 95% ACN por 1 min, tempo total de análise 11 minutos, os cromatogramas foram extraídos nos comprimentos de onda 220 nm e 400 nm, vazão de 0,3 mL/min.

Tabela 3: Condições de CLUE/DAD/EM utilizadas para análise dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações de *Protium spruceanum*

Equipamento	UPLC ACQUITY, Waters
Coluna cromatográfica	CSH 130 C18 (partículas 1,7 µm; 50 X 10 mm)
Fase móvel	H ₂ O 0,1% ácido fórmico; Acetonitrila (ACN) 0,1% ácido fórmico
Eluição	Linear 5-95% de ACN em 10 min, isocrática 95% de ACN por 1 min
Volume injetado	4 µL
Forno da coluna	40 °C
Fluxo	0,3 mL/min
Detecção UV	220-400 nm
Electrospray ionization	Voltagem: capilar (3,5 keV); cone (60 eV)

3.6. Atividade antimicrobiana de α - e β -amirina

A concentração inibitória mínima (CIM) da mistura de α - e β -amirina, foi determinada segundo a metodologia descrita no item 3.4.3. (pág. 17). A mistura utilizada foi isolada de folhas de *P. spruceanum* por Rodrigues e colaboradores (RODRIGUES et al., 2013). Os testes foram realizados utilizando *S. saprophyticus* e *E. aerogenes* e as concentrações de amirinas variaram entre 2 e 0,016 mg/mL.

Após adição de TTC, também foi realizada a leitura das absorbâncias em leitor de ELISA a 650 nm, assim como na avaliação da metodologia (item 3.4.2. pág. 16). Foi calculada a % de inibição de crescimento microbiano em relação ao controle.

Também foi feita uma avaliação da relação de α - e β -amirina com o efeito sinérgico entre as frações AcOEt e HMeOH. Para isso, foram adicionados 25% da mistura triterpênica à fração HMeOH de folhas e a CIM foi também determinada segundo a metodologia descrita no item 3.4.3. (pág. 17).

3.7. Avaliação *in silico* da atividade antimicrobiana dos constituintes

Os compostos identificados por meio das análises fitoquímicas (CG/EM e CLUE/DAD/EM), nos EEBs e frações, obtidos de folhas e galhos de *P. spruceanum*, foram analisados *in silico* utilizando PASS *online* (*Prediction Activity Spectra of Substances*). Essas análises foram realizadas pelo Dr. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira (Lanagro, MG).

Os resultados das análises por PASS *online* são fornecidos como probabilidades do composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) (www.pharmaexpert.ru/passonline).

Visando avaliar o potencial para atividade antimicrobiana dos constituintes de *P. spruceanum* identificados, foram analisados os resultados de Pa e Pi para os efeitos biológicos: antibacteriano (1), antifúngico (2), anti-infeccioso (3), antimicobacteriano (4), inibição da biossíntese da parede bacteriana (5), inibição da síntese de DNA (6), inibição da síntese proteica (7) e potencializador da permeabilidade da membrana (8).

Também foram analisados os resultados relacionados aos seguintes mecanismos de ação: inibição da DNA girase (1), inibição da DNA topoisomerase IV (2), inibição da subunidade ribossomal 30S (3), inibição da subunidade ribossomal 50S (4), inibição de RNA polimerase dependente de DNA (5), inibição de NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase (6); inibição de piruvato cinase (7); inibição de peptidoglicano glicosiltransferase (8); inibição da 2-Deidropantoato 2-redutase (9); inibição de CDP-glicerol glicerofosfotransferase (10); inibição de micotiol-S-conjugado amidase (11).

Os resultados das análises dos constituintes dos EEBs e frações de *P. spruceanum* foram expressos pela diferença (Pa-Pi) e foram classificados como: Pa-Pi < 0,2: Baixo potencial; 0,2 ≤ Pa-Pi < 0,5: Moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: Alto potencial.

3.8. Análises estatísticas

Os resultados de absorvância da avaliação da metodologia para determinação da CIM foram avaliados através de teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para avaliação da correlação entre os teores dos compostos e a atividade antimicrobiana, foram calculados os coeficientes de correlação de Spearman (r_s). A correlação foi classificada segundo Mukaka 2012, como:

- $0,0 \leq r_s < 0,5$: fraca;
- $0,5 \leq r_s < 0,7$: moderada;
- $0,7 \leq r_s \leq 1,0$: forte.

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5). As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos extratos etanólicos brutos

O extrato etanólico bruto de folhas (EEB-F) foi obtido a partir de 221,66 g do material vegetal pulverizado. Ao final do processo de maceração exaustiva e concentração do extrato, foram obtidos 37,54 g de EEB, totalizando um rendimento de 16,93%.

No processo de obtenção do extrato etanólico bruto de galhos (EEB-G), o rendimento foi de 9,60%, com obtenção de 42,21 g de extrato a partir de 439,36 g de droga vegetal pulverizada.

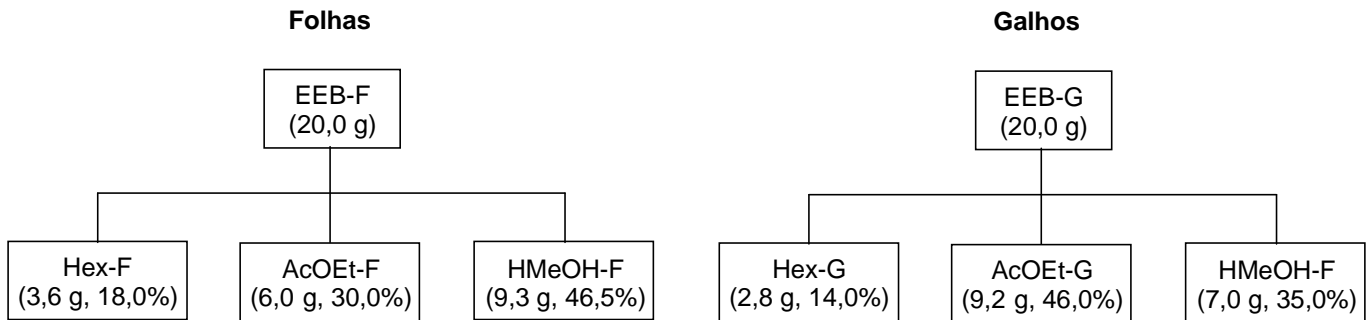
O menor rendimento de extratos de galhos em relação a extratos de folhas, também foi relatado para outras espécies, como, por exemplo, *Tecoma stans*. O extrato metanólico de folhas dessa espécie rendimento 1,4 vezes maior que o extrato de galhos (SALEM et al., 2013).

A diferença de rendimento entre os extratos é atribuída à diferença da disponibilidade de componentes extraíveis, resultantes da variedade da composição química entre partes de uma planta (SULTANA et al., 2009).

4.2. Fracionamento dos EEBs

A partir do fracionamento através de partição, foram obtidas três frações para cada EEB, com rendimentos representados na Figura 9 (pág. 30).

Figura 9: Frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) obtidas por partição líquido/líquido dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*



Para o EEB de folhas (EEB-F), o maior rendimento foi obtido para a fração HMeOH (46,5%), enquanto para o EEB de galhos (EEB-G) foi para a fração AcOEt (46%).

4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.3.1. Triagem por difusão em ágar

Os resultados da medida dos halos de inibição, observados pelo método de difusão em poço, estão representados nas Tabelas 4 e 5 (pág. 31 e 32).

Tabela 4: Medidas dos halos de inibição (mm)* obtidos pelo método de difusão em poço utilizado na análise do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum* na concentração de 80 mg/mL

Micro-organismo	EEB-F	Hex-F	AcOEt-F	HMeOH-F	Controle positivo**
<i>S. aureus</i>	18,52±0,06	-	17,98±0,50	18,57±1,01	39,04±1,74
<i>S. aureus</i> MARSA	18,89±0,18	-	16,37±1,85	19,38±0,31	40,08±0,07
<i>S. saprophyticus</i>	21,56±1,59	10,14±0,05	13,34±0,44	15,14±2,72	36,0±1,23
<i>L. monocytogenes</i>	10,16±2,17	-	11,00±2,95	11,71±1,26	36,96±2,35
<i>E. faecalis</i>	13,88±0,95	-	11,21±2,10	12,76±1,80	25,47±1,32
<i>E. faecium</i>	10,54±1,59	-	11,22±0,92	12,05±1,73	25,79±2,12
<i>E. aerogenes</i>	11,01±0,11	-	10,09±1,08	-	20,02±0,91
<i>P. mirabilis</i>	13,78±1,32	-	10,43±2,72	10,85±1,32	32,05±2,27
<i>S. typhimurium</i>	10,12±0,06	-	10,54±1,41	10,73±1,13	25,51±1,74
<i>S. sonnei</i>	13,95±2,89	-	10,14±1,03	10,31±1,34	29,46±0,79
<i>S. flexneri</i>	11,05±0,97	-	13,48±1,84	11,53±1,05	22,37±1,41
<i>E. coli</i>	10,17±136	-	-	10,30±0,49	24,50±0,74
<i>E. coli</i> EPEC	10,52±0,95	-	-	10,54±2,04	27,54±1,89
<i>S. pyogenes</i>	24,22±1,46	-	13,78±0,18	13,91±2,29	41,50±2,70
<i>P. aeruginosa</i>	17,81±0,74	-	10,40±0,06	10,94±1,38	26,08±0,65
<i>P. rettgeri</i>	15,64±2,21	-	10,32±1,51	10,06±1,02	25,48±2,86
<i>K. pneumoniae</i>	11,81±1,40	-	10,23±2,80	10,69±2,31	28,15±0,67
<i>K. oxytoca</i>	11,41±0,98	-	10,12±2,31	10,75±2,14	26,52±2,74
<i>S. enteritidis</i>	11,11±0,52	-	10,07±1,07	10,57±0,20	27,68±1,23
<i>C. albicans</i>	10,16±1,25	-	-	-	50,00±0,07

*Medidas expressas em média aritmética (mm) ± desvio padrão, incluindo o diâmetro do poço (6 mm); **Tetraciclina, moxifloxacina ou cetoconazol (100 µg/mL); - : ausência de halo de inibição

Tabela 5: Medidas dos halos de inibição (mm)* obtidos pelo método de difusão em poço utilizado na análise do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum* na concentração de 80 mg/mL

Micro-organismo	EEB-G	Hex-G	AcOEt-G	HMeOH-G	Controle positivo**
<i>S. aureus</i>	21,03±0,97	-	17,64±2,33	16,89±1,74	39,04±1,74
<i>S. aureus</i> MARSA	21,65±1,32	-	17,52±1,23	15,85±2,98	40,08±0,07
<i>S. saprophyticus</i>	24,07±1,41	10,25±0,76	16,08±1,29	14,13±1,91	36,0±1,23
<i>L. monocytogenes</i>	11,79±1,30	11,23±2,50	11,99±2,57	11,43±1,22	36,96±2,35
<i>E. faecalis</i>	17,36±1,53	-	11,65±1,02	12,06±0,04	25,47±1,32
<i>E. faecium</i>	10,59±0,76	-	13,18±2,53	11,77±0,41	25,79±2,12
<i>E. aerogenes</i>	13,53±1,48	-	10,31±1,30	7,04±1,56	20,02±0,91
<i>P. mirabilis</i>	13,67±1,98	-	-	13,58±0,08	32,05±2,27
<i>S. typhimurium</i>	10,67±0,53	-	-	10,38±0,20	25,51±1,74
<i>S. sonnei</i>	10,78±0,34	-	11,06±1,23	11,66±1,03	29,46±0,79
<i>S. flexneri</i>	11,01±1,86	-	12,22±1,04	8,02±0,50	22,37±1,41
<i>E. coli</i>	10,08±0,06	-	11,51±0,52	10,15±2,37	24,50±0,74
<i>E. coli</i> EPEC	11,15±2,35	-	11,94±1,51	11,03±1,30	27,54±1,89
<i>S. pyogenes</i>	14,53±2,16	-	12,94±0,72	13,69±1,14	41,50±2,70
<i>P. aeruginosa</i>	12,32±0,97	-	10,18±2,91	10,51±0,98	26,08±0,65
<i>P. rettgeri</i>	14,45±0,18	10,90±2,11	10,93±1,42	12,61±2,31	25,48±2,86
<i>K. pneumoniae</i>	10,41±0,93	-	10,05±1,34	-	28,15±0,67
<i>K. oxytoca</i>	11,02±1,56	-	10,29±1,44	-	26,52±2,74
<i>S. enteritidis</i>	13,50±0,79	-	10,41±1,32	10,16±2,06	27,68±1,23
<i>C. albicans</i>	10,09±2,35	-	-	-	50,00±0,07

*Medidas expressas em média aritmética (mm) ± desvio padrão, incluindo o diâmetro do poço (6 mm); **Tetraciclina, moxifloxacina ou cetoconazol (100 µg/mL); - : ausência de halo de inibição

Para o controle negativo (DMSO), observou-se ausência de halo de inibição para todos os micro-organismos, demonstrando que o solvente utilizado para o preparo das soluções dos EEBs e frações não possui atividade antimicrobiana. Portanto, o solvente não interferiu nos resultados obtidos.

O DMSO é comumente utilizado para preparo de soluções de extratos vegetais no teste de difusão em poço. A ampla utilização deve-se às suas propriedades, que permitem a solubilização de extratos e à ausência de atividade antimicrobiana (VALGAS et al., 2007; AYRES et al., 2008; ARAÚJO, 2011).

Para os resultados dos EEBs e frações, considerou-se como atividade antimicrobiana os halos de inibição iguais ou superiores a 10 mm (LIMA-FILHO et al., 2002). Sendo assim, os EEBs de folhas e de galhos possuem propriedade inibitória do crescimento de todos os 20 micro-organismos testados.

Os antimicrobianos estão associados a um espectro particular de atividade que abrange um número de diferentes espécies que são sensíveis ao fármaco. Os de amplo espectro são aqueles ativos contra muitas espécies enquanto os de baixo espectro são ativos contra poucas (KESTER, 2008). Portanto, os EEBs de folhas e de galhos de *P. spruceanum* são considerados antimicrobianos de amplo espectro, já que apresentaram atividade contra todas as 20 espécies testadas.

Em relação às frações, a fração hexânica de folhas (Hex-F) apresentou atividade contra *S. saprophyticus* e a fração hexânica de galhos (Hex-G) possui atividade contra *S. saprophyticus*, *L. monocitogenes* e *P. rettgeri*. No entanto, as frações AcOEt e HMeOH dos dois extratos apresentaram atividade contra a maioria das bactérias.

Esse resultado indica que a atividade antimicrobiana dos EEBs de folhas e galhos de *P. spruceanum* está mais relacionada com metabólitos de maior polaridade, presentes principalmente nas frações AcOEt e HMeOH.

A atividade antimicrobiana de outras espécies do gênero *Protium* já foi relatada, como *P. heptaphyllum* e *P. neglectum* (SUÁREZ et al., 2007; VIOLANTE et al., 2012). Porém, ainda não existem na literatura publicações sobre atividade antimicrobiana de *P. spruceanum*.

O micro-organismo mais susceptível aos EEBs e frações de *P. spruceanum* foi *S. saprophyticus*, que apresentou índice de susceptibilidade antimicrobiana (ISM) de 100%, seguido por *L. monocytogenes* e *P. rettgeri* (ISM: 87,5%). O mais resistente foi *C. albicans* (ISM: 25%), para a qual somente os EEBs tiveram atividade, seguido por *E. aerogenes* (ISM: 50%), para a qual somente os EEBs e frações AcOEt foram ativos. *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *E. coli*, *E. coli* EPEC, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* apresentaram ISM: 62,5% e *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *S. sonnei*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. aureus* MARSA apresentaram ISM: 75%.

As medidas dos halos de inibição apresentaram diferenças numéricas entre EEBs e frações para diferentes micro-organismos. Apesar disso, é preciso destacar que esses dados não devem ser simplesmente comparados, devido às características das substâncias que interferem na difusão pelo ágar (NASCIMENTO et al., 2007).

A difusão é definida como o processo pelo qual moléculas se misturam, como resultado da sua energia cinética, das áreas de altas concentrações para as de mais baixas. Esse processo depende de diversos fatores tais como número, tamanho e forma das partículas, que contribuem para que substâncias possuam taxas de difusão diferentes uma das outras e conseqüentemente resulte em distintos halos de inibição (VALGAS et al., 2007).

Diferentes extratos e frações vegetais possuem composição distinta e complexa, com substâncias com propriedades físico-químicas diversas, o que dificulta a simples comparação dos diâmetros dos halos de inibição entre as amostras e com o controle positivo.

Dessa forma, visando melhor avaliação da atividade antimicrobiana dos EEBs e frações de *P. spruceanum* foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

4.3.2. Avaliação da metodologia utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Devido à diferente composição dos EEBs e frações e à baixa solubilidade no meio de cultura líquido buscou-se avaliar uma adaptação da

metodologia para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição, proposta pelo CLSI com modificações (CLSI, 2012).

Após a leitura das absorvâncias, foi calculada a porcentagem de crescimento microbiano do teste em relação ao controle de crescimento. Os resultados, expressos em % de crescimento microbiano \pm desvio padrão, estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da viabilidade microbiana utilizando a metodologia de microdiluição adaptada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e frações de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	Crescimento microbiano*
<i>S. aureus</i>	96,51 \pm 7,26
<i>S. aureus</i> MARSA	91,67 \pm 19,13
<i>S. saprophyticus</i>	90,67 \pm 18,25
<i>S. enteritidis</i>	96,02 \pm 1,69
<i>E. faecalis</i>	96,73 \pm 0,52
<i>E. faecium</i>	96,07 \pm 2,63
<i>E. aerogenes</i>	109,67 \pm 11,67
<i>S. typhimurium</i>	94,22 \pm 5,97
<i>S. flexneri</i>	97,61 \pm 16,00
<i>E. coli</i>	91,70 \pm 6,38
<i>E. coli</i> EPEC	90,29 \pm 11,02
<i>P. rettgeri</i>	88,01 \pm 1,29
<i>K. pneumoniae</i>	105,56 \pm 6,10
<i>K. oxytoca</i>	86,38 \pm 5,79
<i>L. monocytogenes</i>	102,31 \pm 4,79
<i>S. pyogenes</i>	97,59 \pm 0,04
<i>P. aeruginosa</i>	106,99 \pm 8,26
<i>P. mirabilis</i>	100,36 \pm 0,31
<i>S. sonnei</i>	103,41 \pm 8,00
<i>C. albicans</i>	91,31 \pm 26,04

*porcentagem (%) de crescimento microbiano do teste em relação ao controle de crescimento. Resultados, expressos em % de crescimento microbiano \pm desvio padrão

Através da análise estatística das medidas de absorvância, utilizando o teste de Mann-Whitney, verificou-se que não houve diferença significativa entre o crescimento microbiano do teste, comparado com o controle de crescimento. Portanto, a metodologia avaliada, que favorece uma melhor dispersão das amostras no meio de cultura, mostrou-se ser útil para a determinação da CIM, já que não interfere na viabilidade dos micro-organismos.

4.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações

A concentração inibitória mínima (CIM) dos EEBs e das frações, que resultaram em halo de inibição maior ou igual a 10 mm, foi determinada utilizando a metodologia avaliada (item 4.3.2, pág. 34). Os resultados são apresentados na Tabela 7 (pág. 37).

Tabela 7: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos brutos (EEB) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceaum*

Micro-organismo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL)							
	Folhas				Galhos			
	EEB	Hex	AcOEt	HMeOH	EEB	Hex	AcOEt	HMeOH
<i>S. aureus</i>	5	-	2,5	0,312	2,5	-	1,25	1,25
<i>S. aureus</i> MARSA	5	-	2,5	0,625	5	-	0,312	1,25
<i>S. saprophyticus</i>	5	40	0,625	0,625	5	20	0,312	0,312
<i>L. monocytogenes</i>	40	-	40	40	40	80	5	20
<i>E. faecalis</i>	10	-	2,5	2,5	5	-	1,25	1,25
<i>E. faecium</i>	40	-	80	80	40	-	40	80
<i>E. aerogenes</i>	20	-	80	-	20	-	40	-
<i>P. mirabilis</i>	80	-	80	80	40	-	80	80
<i>S. typhimurium</i>	80	-	80	80	40	-	-	80
<i>S. sonnei</i>	20	-	80	20	80	-	20	20
<i>S. flexneri</i>	20	-	80	20	20	-	10	-
<i>E. coli</i>	5	-	-	80	20	-	20	80
<i>E. coli</i> EPEC	5	-	-	80	10	-	20	80
<i>S. pyogenes</i>	80	-	80	10	80	-	20	80
<i>P. aeruginosa</i>	10	-	20	20	10	-	10	20
<i>P. rettgeri</i>	20	-	40	20	20	40	10	20
<i>K. pneumoniae</i>	40	-	80	10	40	-	10	-
<i>K. oxytoca</i>	40	-	80	20	40	-	5	-
<i>S. enteritidis</i>	10	-	1,25	5	10	-	1,25	1,25
<i>C. albicans</i>	80	-	-	-	40	-	-	-

*- : CIM não determinada devido a halo de inibição menor que 10 mm na avaliação por difusão em poço.

Para classificação dos resultados da CIM de produtos naturais, existem divergências entre autores. Algumas classificações estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Classificação da atividade antimicrobiana de produtos vegetais pelos resultados da concentração inibitória mínima (CIM) segundo Holetz et al., 2002; Silveira et al., 2012, Jeong et al., 2009 e Giner et al., 2012

CIM (mg/mL)				
Atividade	Holetz et al., 2002	Silveira et al., 2012	Jeong et al., 2009	Giner et al., 2012
Forte	CIM < 0,1	CIM ≤ 1,25	CIM ≤ 0,156	CIM ≤ 3,2
Moderada	0,1 ≤ CIM ≤ 0,5	1,25 < CIM ≤ 10	0,156 < CIM ≤ 1,25	3,2 < CIM < 6,4
Fraca	0,5 < CIM ≤ 1,0	CIM > 10	CIM > 1,25	CIM ≥ 6,4
Inativa	CIM > 1,0	-	-	-

- : sem classificação.

Diante dessas divergências, foram adotadas as classificações de Jeong et al., 2009 e Giner et al., 2012., por se tratar de dados relativos a extratos vegetais e não óleos essenciais, aproximando mais dos objetos do presente estudo.

Sendo assim, segundo Jeong et al., 2009, os EEBs de folhas e galhos de *P. spruceanum* são considerados fracos agentes antimicrobianos para todos os micro-organismos testados. A fração AcOEt de folhas apresenta moderada atividade contra *S. saprophyticus* e *S. enteritidis* e a fração HMeOH das folhas apresenta moderada atividade contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA e *S. saprophyticus* (CIM: 0,312 - 1,25 mg/mL).

Em relação às frações dos galhos, segundo Jeong et al., 2009, as frações AcOEt e HMeOH possuem moderada atividade contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. enteritidis* (CIM: 0,312 - 1,25 mg/mL).

No entanto, seguindo a classificação de Giner et al., 2012, os EEBs e frações são classificados como agentes antimicrobianos de atividade forte a fraca.

Assim, no presente trabalho, o EEB de folhas foi considerado um moderado agente antimicrobiano para *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *E. coli* EPEC e *P. aeruginosa*. Já as frações AcOEt e HMeOH das folhas apresentam forte atividade contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. enteritidis*.

A atividade antimicrobiana do EEB dos galhos foi considerada como forte para *S. aureus* e moderada para *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus* e *E. faecalis*. A fração AcOEt dos galhos possui forte atividade contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. enteritidis* e moderada contra *L. monocytogenes* e *K. oxytoca*. A fração HMeOH-G apresenta forte atividade contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. enteritidis*.

Com objetivo de analisar comparativamente os resultados entre EEBs e frações, utilizou-se os dados de porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA) e atividade antimicrobiana total (AAT).

Nos resultados de atividade antimicrobiana total (AAT) considera-se a quantidade de compostos ativos extraídos por grama de material vegetal seco, permitindo a comparação da atividade entre diferentes plantas ou partes vegetais. Além disso, para as frações, a AAT considera a massa de fração obtida de uma quantidade de extrato particionado, indicando qual fração é majoritariamente responsável pela atividade biológica e também se existe sinergismo entre as frações (ELOFF, 2004).

Os resultados da porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA) estão listados na Tabela 9 (pág. 40). Comparando os resultados entre os EEBs, observou-se que os extratos de folhas e casca/caule foram ativos contra todos os 20 micro-organismos testados (%AA: 100).

Porém, com base nos resultados da atividade antimicrobiana total (AAT) (Tabela 10 e Gráfico 1; pág. 40 e 41), concluiu-se que o EEB de folhas possui maior AAT que o EEB de galhos para 75% dos micro-organismos testados. Dessa forma, considerou-se que as folhas de *P. spruceanum* possuem maior potencial antimicrobiano que os galhos (maior quantidade de compostos ativos extraídos com etanol).

Tabela 9: Porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Amostra		% AA
Folhas	EEB	100
	Hex	5
	AcOEt	85
	HMeOH	90
Galhos	EEB	100
	Hex	15
	AcOEt	85
	HMeOH	75

Tabela 10: Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) de folhas e galhos de *P. spruceanum*

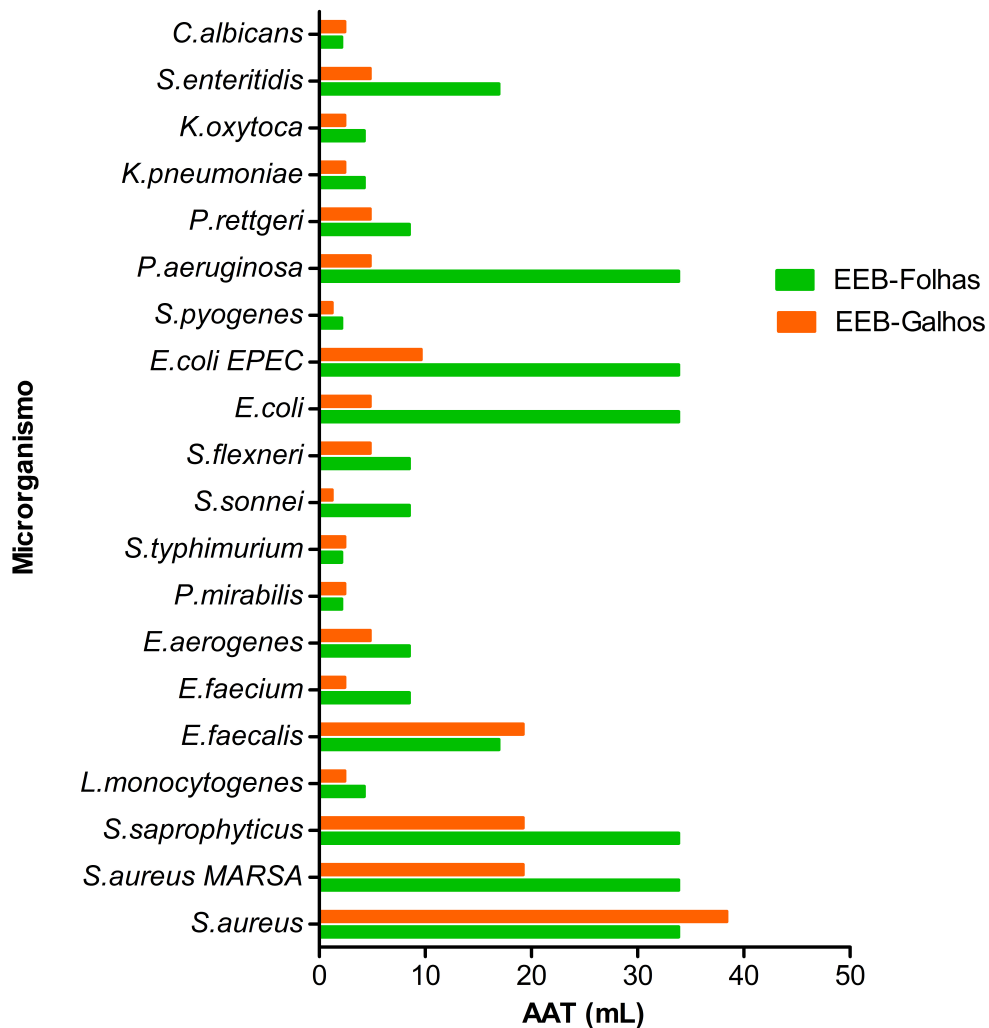
	EEB-Folhas		EEB-Galhos	
	CIM ¹	AAT ²	CIM ¹	AAT ³
<i>S. aureus</i>	5	33,86	2,5	38,40
<i>S. aureus</i> MARSA	5	33,86	5	19,20
<i>S. saprophyticus</i>	5	33,86	5	19,20
<i>L. monocytogenes</i>	40	4,23	40	2,40
<i>E. faecalis</i>	10	16,93	5	19,20
<i>E. faecium</i>	20	8,47	40	2,40
<i>E. aerogenes</i>	20	8,47	20	4,80
<i>P. mirabilis</i>	80	2,12	40	2,40
<i>S. typhimurium</i>	80	2,12	40	2,40
<i>S. sonnei</i>	20	8,47	80	1,20
<i>S. flexneri</i>	20	8,47	20	4,80
<i>E. coli</i>	5	33,86	20	4,80
<i>E. coli</i> EPEC	5	33,86	10	9,60
<i>S. pyogenes</i>	80	2,12	80	1,20
<i>P. aeruginosa</i>	5	33,86	20	4,80
<i>P. rettgeri</i>	20	8,47	20	4,80
<i>K. pneumoniae</i>	40	4,23	40	2,40
<i>K. oxytoca</i>	40	4,23	40	2,40
<i>S. enteritidis</i>	10	16,93	20	4,80
<i>C. albicans</i>	80	2,12	40	2,40

1- CIM: mg/mL;

2- AAT considerando 169,3 mg de EEB extraído de 1 g de folhas secas;

3- AAT considerando 96,0 mg de EEB extraído de 1 g de galhos secos.

Gráfico 1: Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*



Em relação às frações do EEB de folhas, as maiores porcentagens de atividade antimicrobiana (%AA) foram obtidas para as frações hidrometanólica (HMeOH) (%AA: 90) e acetato de etila (AcOEt) (%AA: 85). A fração hexânica foi ativa contra 5% dos micro-organismos testados (Tabela 9, pág. 40).

Os resultados da atividade antimicrobiana total (AAT) e porcentagem da soma de AAT (% AAT) das frações ativas estão apresentados na Tabela 11 (pág. 42). Para melhor visualização da relação da AAT entre as frações e EEB, os resultados relacionados a alguns micro-organismos estão apresentados no Gráfico 2 (pág. 43).

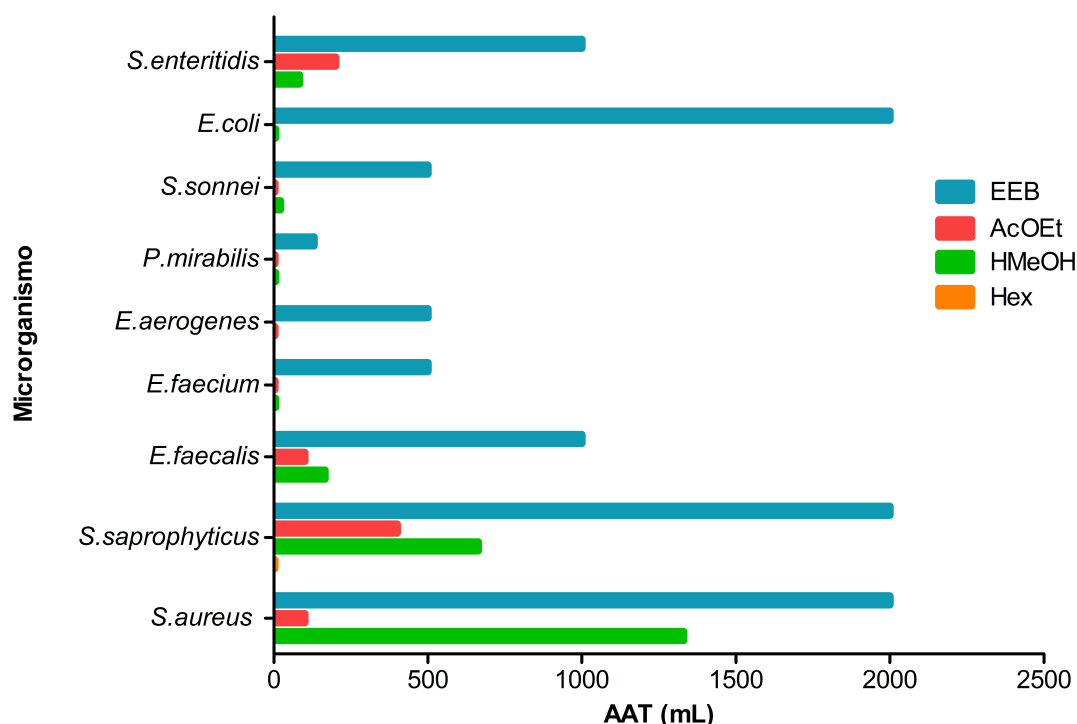
Analisando esses resultados, observou-se que a fração HMeOH, com maior %AA, também representa a maior % AAT das frações ativas, para quase todos os micro-organismos testados, exceto para *E. aerogenes* e *S. enteritidis*, para os quais a fração AcOEt possui maior porcentual.

Tabela 11: Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	EEB		Hex			AcOEt			HMeOH			Σ AAT ⁷
	CIM ¹	AAT ²	CIM ¹	AAT ⁴	% AAT ³	CIM ¹	AAT ⁵	% AAT ³	CIM ¹	AAT ⁶	% AAT ³	
<i>S. aureus</i>	5	2000	-	-	-	2,5	100	6,99	0,312	1330,13	93,01	1430,13
<i>S. aureus</i> MARSA	5	2000	-	-	-	2,5	100	13,09	0,625	664,0	86,91	764,0
<i>S. saprophyticus</i>	5	2000	40	3,25	0,30	0,625	400	37,48	0,625	664,0	62,22	1067,25
<i>L. monocytogenes</i>	40	250	-	-	-	40	6,25	37,59	40	10,38	62,41	16,63
<i>E. faecalis</i>	10	1000	-	-	-	2,5	100	37,59	2,5	166,0	62,41	266,0
<i>E. faecium</i>	20	500	-	-	-	80	3,13	37,59	80	5,19	62,41	8,31
<i>E. aerogenes</i>	20	500	-	-	-	80	3,13	100,0	-	-	-	3,13
<i>P. mirabilis</i>	80	125	-	-	-	80	3,13	37,59	80	5,19	62,41	8,31
<i>S. typhimurium</i>	80	125	-	-	-	80	3,13	37,59	80	5,19	62,41	8,31
<i>S. sonnei</i>	20	500	-	-	-	80	3,13	13,09	20	20,75	86,91	23,88
<i>S. flexneri</i>	20	500	-	-	-	80	3,13	13,09	20	20,75	86,91	23,88
<i>E. coli</i>	5	2000	-	-	-	-	-	-	80	5,19	100,0	5,19
<i>E. coli</i> EPEC	5	2000	-	-	-	-	-	-	80	5,19	100,0	5,19
<i>S. pyogenes</i>	80	125	-	-	-	80	3,13	7,0	10	41,5	93,0	44,63
<i>P. aeruginosa</i>	5	2000	-	-	-	20	12,5	37,59	20	20,75	62,41	33,25
<i>P. rettgeri</i>	20	500	-	-	-	40	6,25	23,15	20	20,75	76,85	27,0
<i>K. pneumoniae</i>	40	250	-	-	-	80	3,13	7,0	10	41,5	93,0	44,63
<i>K. oxytoca</i>	40	250	-	-	-	80	3,13	13,09	20	20,75	86,91	23,88
<i>S. enteritidis</i>	10	1000	-	-	-	1,25	200	70,67	5	83,0	29,33	283,0
<i>C. albicans</i>	80	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1- CIM: mg/mL; 2- AAT considerando 10000 mg de EEB particionado; 3- % AAT: Porcentagem da AAT da fração em relação ao total das AATs das frações; 4- AAT considerando 130 mg de fração obtida na partição; 5- AAT considerando 250 mg de fração; 6- AAT considerando 415 mg de fração; 7- Soma das AATs das frações ativas.

Gráfico 2: Atividade antimicrobiana total (AAT) do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum*.



Dessa forma, conclui-se que os compostos de maior polaridade, presentes na fração HMeOH, são responsáveis pela maior parte da atividade antimicrobiana do EEB de folhas de *P. spruceanum* (maior %A e AAT).

Através da comparação entre a AAT do EEB particionado e a soma das AAT das frações ativas (Σ AAT), observou-se que, para todos os microrganismos testados, a AAT do EEB é menor que Σ AAT. Esse resultado indica possibilidade de sinergismo entre as frações (ELOFF, 2004).

Em relação às frações do EEB dos galhos, as maiores porcentagens de atividade antimicrobiana (%AA) também foram obtidas para as frações de maior polaridade: acetato de etila (AcOEt) (%AA: 85) e hidrometanólica (HMeOH) (%AA: 75). A fração hexânica (Hex) foi ativa contra 15% dos microrganismos testados (Tabela 9, pág. 40).

A fração Hex dos galhos apresenta maior porcentagem de atividade antimicrobiana que a fração Hex de folhas (%AA: 5%).

Os resultados da atividade antimicrobiana Total (AAT) e porcentagem da soma de AAT (% AAT) das frações ativas estão apresentados na Tabela 12

(pág. 45). De maneira similar ao que foi explanado para as frações do EEB de folhas, os resultados da AAT para alguns micro-organismos estão apresentados no Gráfico 3 (pág. 44).

Analisando esses resultados, observou-se que a fração AcOEt, além de possuir maior %AA, também representa a maior %AAT das frações ativas, para quase todos os micro-organismos testados, exceto para *S. typhimurium*, para o qual a fração HMeOH possui maior porcentual.

Os compostos majoritariamente presentes na fração AcOEt são responsáveis pela maior parte da atividade antimicrobiana do EEB de galhos de *P. spruceanum* (maior %A e AAT).

Assim como para as frações de folhas, observou-se que, para a maioria dos micro-organismos testados, a AAT do EEB é menor que Σ AAT das frações ativas, exceto para *S. saprophyticus*, indicando a possibilidade de sinergismo também entre essas frações (ELOFF, 2004).

Gráfico 3: Atividade antimicrobiana total (AAT) do extrato etanólico bruto (EEB) e frações hexânica (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum*.

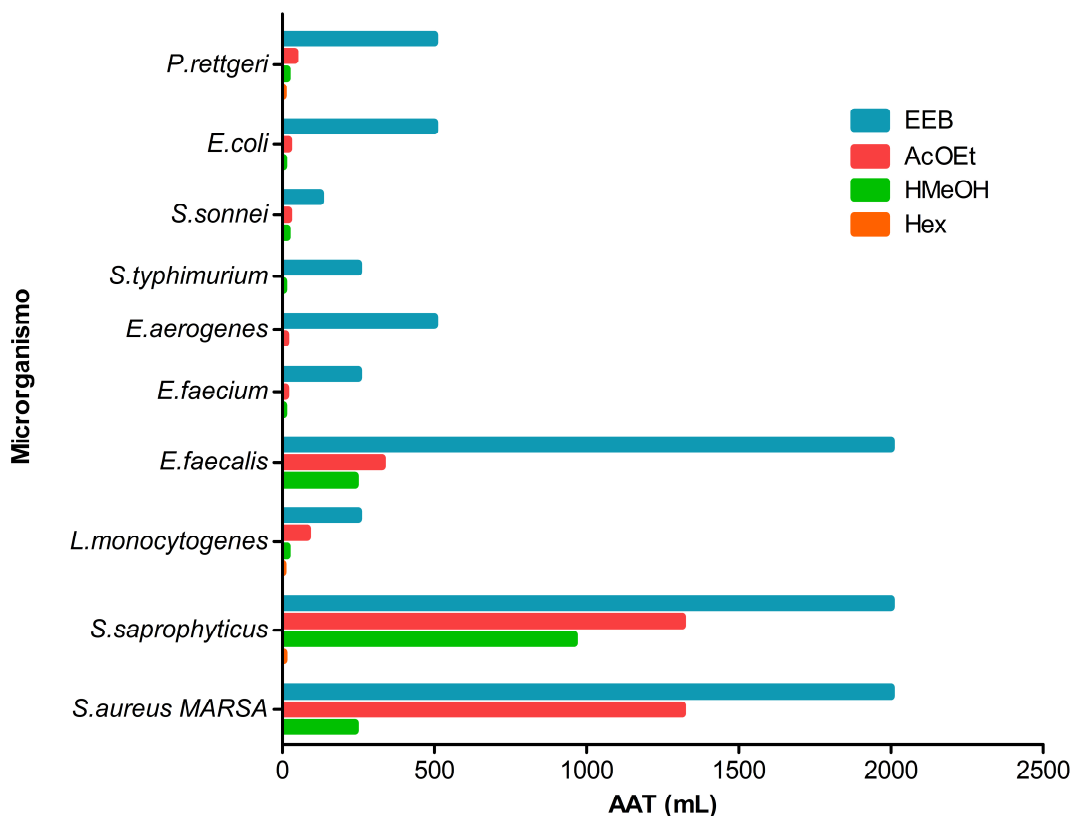


Tabela 12: Atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	EEB		Hex			AcOEt			HMeOH			Σ AAT ⁷
	CIM ¹	AAT ²	CIM ¹	AAT ⁴	% AAT ³	CIM ¹	AAT ⁵	% AAT ³	CIM ¹	AAT ⁶	% AAT ³	
<i>S. aureus</i>	2,5	4000	-	-	-	1,25	328,0	57,79	1,25	239,6	42,21	567,6
<i>S. aureus</i> MARSA	5	2000	-	-	-	0,312	1314,0	84,58	1,25	239,6	15,42	1553,6
<i>S. saprophyticus</i>	5	2000	20	4,4	-	0,312	1314,0	57,67	0,312	959,94	42,13	2278,34
<i>L. monocytogenes</i>	40	250	80	1,1	-	5	82,0	84,56	20	14,98	15,44	96,98
<i>E. faecalis</i>	5	2000	-	-	-	1,25	328,0	57,79	1,25	239,6	42,21	567,6
<i>E. faecium</i>	40	250	-	-	-	40	10,25	73,25	80	3,74	26,75	13,99
<i>E. aerogenes</i>	20	500	-	-	-	40	10,25	100,0	-	-	-	10,25
<i>P. mirabilis</i>	40	250	-	-	-	80	5,13	57,79	80	3,74	42,21	8,87
<i>S. typhimurium</i>	40	250	-	-	-	-	-	-	80	3,74	100,0	3,74
<i>S. sonnei</i>	80	125	-	-	-	20	20,5	57,79	20	14,98	42,21	35,48
<i>S. flexneri</i>	20	500	-	-	-	10	41,0	100,0	-	-	-	41,0
<i>E. coli</i>	20	500	-	-	-	20	20,5	84,56	80	3,74	15,44	24,24
<i>E. coli</i> EPEC	10	1000	-	-	-	20	20,5	84,56	80	3,74	15,44	24,24
<i>S. pyogenes</i>	80	125	-	-	-	20	20,5	84,56	80	3,74	15,44	24,24
<i>P. aeruginosa</i>	20	500	-	-	-	10	41,0	73,25	20	14,98	26,75	55,98
<i>P. rettgeri</i>	20	500	40	2,2	3,93	10	41,0	73,25	20	14,98	26,75	55,98
<i>K. pneumoniae</i>	40	250	-	-	-	10	41,0	100,0	-	-	-	41,0
<i>K. oxytoca</i>	40	250	-	-	-	5	82,0	100,0	-	-	-	82,0
<i>S. enteritidis</i>	20	500	-	-	-	1,25	328,0	57,79	1,25	239,6	42,21	567,6
<i>C. albicans</i>	40	250	-	-	-	-	-	-	--	-	-	-

1- CIM: mg/mL; 2- AAT considerando 10000 mg de EEB particionado; 3- % AAT: Porcentagem da AAT da fração em relação ao total das AATs das frações; 4- AAT considerando 88 mg de fração obtida na partição; 5- AAT considerando 410 mg de fração; 6- AAT considerando 299,5 mg de fração; 7- Soma das AATs das frações ativas.

Visando analisar esse possível efeito sinérgico entre as frações AcOEt e HMeOH, determinou-se a CIM de suas combinações para classificar a interação entre elas.

4.3.4. Análise do efeito sinérgico entre as frações

O sinergismo entre as frações ativas, observado por meio dos resultados da AAT, foi confirmado pelos resultados obtidos pela determinação da CIM das combinações das frações AcOEt e HMeOH. Após os cálculos de concentração inibitória fracionada (CIF) e índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), o efeito da interação entre as frações foi classificado como sinergismo, aditividade, sem interação ou antagonismo, segundo GOTO et al., 1999.

Por meio dos resultados dessa classificação aplicada às frações de folhas de *P. spruceanum* (Tabela 13, pág 47) constatou-se a ausência de interação entre as frações AcOEt e HMeOH contra *S. aureus*. Contra *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *E. faecalis* e *S. enteritidis*, a combinação das frações induz um efeito aditivo. Para os demais micro-organismos, existe sinergismo entre as frações.

Considerando a classificação de Giner et al., 2012, contra os micro-organismos em que os resultados mostraram sinergismo, as frações que isoladas tinham atividade fraca, após combinação passaram a ter atividade de forte a moderada.

Em relação a alguns micro-organismos, contra os quais uma das frações não possuía atividade nem na maior concentração (80 mg/mL), a combinação das frações possui atividade moderada. Como por exemplo, contra *C. albicans*, as frações isoladas não possuem atividade, mas devido ao sinergismo, a combinação das frações AcOEt e HMeOH possui atividade fraca.

Em relação às frações de galhos (Tabela 14, pág. 48), não existe interação das frações para *E. faecalis* e efeito aditivo para *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus* e *S. enteritidis*. Para os demais micro-organismos, os resultados indicaram sinergismo.

Da mesma forma que para as frações de folhas, a combinação das frações AcOEt e HMeOH apresentam melhor atividade que as frações isoladas, passando de atividade fraca a moderada a atividade moderada a forte.

Tabela 13: Interação da atividade antimicrobiana entre as frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum*.

Micro-organismo	Amostra	CIM (mg/mL)		CIF	ICIF	Interação
		Sozinho	Combinado			
<i>S. aureus</i>	AcOEt	2,5	0,312	0,125	1,125	Sem interação
	HMeOH	0,312	0,312	1,000		
<i>S. aureus</i> MARSA	AcOEt	2,5	0,312	0,125	0,624	Aditividade
	HMeOH	0,625	0,312	0,499		
<i>S. saprophyticus</i>	AcOEt	0,625	0,312	0,499	0,624	Aditividade
	HMeOH	2,5	0,312	0,125		
<i>L. monocytogenes</i>	AcOEt	40	0,625	0,016	0,031	Sinergismo
	HMeOH	40	0,625	0,016		
<i>E. faecalis</i>	AcOEt	2,5	1,25	0,500	0,531	Aditividade
	HMeOH	40	1,25	0,031		
<i>E. faecium</i>	AcOEt	80	2,5	0,031	0,063	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>E. aerogenes</i>	AcOEt	80	2,5	0,031	0,031	Sinergismo
	HMeOH	-	2,5	-		
<i>P. mirabilis</i>	AcOEt	80	0,625	0,008	0,016	Sinergismo
	HMeOH	80	0,625	0,008		
<i>S. typhimurium</i>	AcOEt	80	0,625	0,008	0,016	Sinergismo
	HMeOH	80	0,625	0,008		
<i>S. sonnei</i>	AcOEt	80	2,5	0,031	0,156	Sinergismo
	HMeOH	20	2,5	0,125		
<i>S. flexneri</i>	AcOEt	80	0,625	0,008	0,039	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>E. coli</i>	AcOEt	-	2,5	-	0,031	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>E. coli</i> EPEC	AcOEt	-	2,5	-	0,031	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>S. pyogenes</i>	AcOEt	80	2,5	0,031	0,281	Sinergismo
	HMeOH	10	2,5	0,250		
<i>P. aeruginosa</i>	AcOEt	40	1,25	0,031	0,047	Sinergismo
	HMeOH	80	1,25	0,016		
<i>P. rettgeri</i>	AcOEt	40	0,625	0,016	0,047	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>K. pneumoniae</i>	AcOEt	80	1,25	0,016	0,141	Sinergismo
	HMeOH	10	1,25	0,125		
<i>K. oxytoca</i>	AcOEt	80	0,625	0,008	0,039	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>S. enteritidis</i>	AcOEt	1,25	0,625	0,500	0,625	Aditividade
	HMeOH	5	0,625	0,125		
<i>C. albicans</i>	AcOEt	-	5	-		Sinergismo
	HMeOH	-	5	-		

Tabela 14: Interação da atividade antimicrobiana entre as frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	Amostra	CIM (mg/mL)		CIF	ICIF	Interação
		Sozinho	Combinado			
<i>S. aureus</i>	AcOEt	1,25	0,625	0,5	1	Aditividade
	HMeOH	1,25	0,625	0,5		
<i>S. aureus</i> MARSA	AcOEt	0,312	0,156	0,5	0,625	Aditividade
	HMeOH	1,25	0,156	0,125		
<i>S. saprophyticus</i>	AcOEt	0,312	0,156	0,5	1	Aditividade
	HMeOH	0,312	0,156	0,5		
<i>L. monocytogenes</i>	AcOEt	5	0,625	0,125	0,155	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>E. faecalis</i>	AcOEt	2,5	1,25	0,5	1,5	Sem interação
	HMeOH	1,25	1,25	1		
<i>E. faecium</i>	AcOEt	40	1,25	0,031	0,047	Sinergismo
	HMeOH	80	1,25	0,016		
<i>E. aerogenes</i>	AcOEt	40	2,5	0,062	0,062	Sinergismo
	HMeOH	-	2,5	-		
<i>P. mirabilis</i>	AcOEt	-	0,625	-	0,008	Sinergismo
	HMeOH	80	0,625	0,008		
<i>S. typhimurium</i>	AcOEt	-	0,625	-	0,008	Sinergismo
	HMeOH	80	0,625	0,008		
<i>S. sonnei</i>	AcOEt	20	2,5	0,125	0,25	Sinergismo
	HMeOH	20	2,5	0,125		
<i>S. flexneri</i>	AcOEt	10	0,625	0,062	0,062	Sinergismo
	HMeOH	-	0,625	-		
<i>E. coli</i>	AcOEt	20	2,5	0,125	0,155	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>E. coli</i> EPEC	AcOEt	20	2,5	0,125	0,155	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>S. pyogenes</i>	AcOEt	20	2,5	0,125	0,155	Sinergismo
	HMeOH	80	2,5	0,031		
<i>P. aeruginosa</i>	AcOEt	10	0,625	0,062	0,093	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>P. rettgeri</i>	AcOEt	10	0,625	0,062	0,093	Sinergismo
	HMeOH	20	0,625	0,031		
<i>K. pneumoniae</i>	AcOEt	10	2,5	0,025	0,025	Sinergismo
	HMeOH	-	2,5	-		
<i>K. oxytoca</i>	AcOEt	5	0,625	0,125	0,125	Sinergismo
	HMeOH	-	0,625	-		
<i>S. enteritidis</i>	AcOEt	1,25	0,625	0,5	1	Aditividade
	HMeOH	1,25	0,625	0,5		
<i>C. albicans</i>	AcOEt	-	20	-	-	Sinergismo
	HMeOH	-	20	-		

O sinergismo, observado entre componentes vegetais ou entre produtos naturais e antibióticos padrões, tem sido relatado e é considerado como uma estratégia contra micro-organismos resistentes. Os efeitos farmacológicos de extratos vegetais resultam da existência de diferentes classes de compostos com diversos mecanismos de ação. A interação entre compostos pode amplificar ou potencializar a ação farmacológica, apresentando vantagem sobre a monoterapia (TOMÁS-MENOR et al., 2015; NCUBE et al., 2012).

Com objetivo de identificar os compostos majoritariamente responsáveis pela atividade antimicrobiana de folhas e galhos de *P. spruceanum*, foram realizados estudos fitoquímicos dos extratos e frações.

4.4. Análises fitoquímicas

4.4.1. Prospecção fitoquímica

Através da prospecção fitoquímica, foi possível identificar nos EEBs de folhas e galhos de *P. spruceanum* a presença das classes de metabólitos secundários: cumarinas, flavonoides, taninos, terpenóides e ácidos graxos. Sendo que, terpenoides e ácidos graxos, compostos de menor polaridade, estão presentes nas frações hexânicas (Hex). Flavonoides e taninos, mais polares, foram encontrados nas frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) e cumarinas estão presentes nas frações acetato de etila (AcOEt). Dentre os metabólitos pesquisados, não foram observados resultados positivos para antraquinonas e alcalóides (Tabela 15, pág. 50).

Tabela 15: Classes de metabólitos detectadas nos extratos etanólicos brutos (EEBs), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

	Folhas				Galhos			
	EEB	Hex	AcOEt	HMeOH	EEB	Hex	AcOEt	HMeOH
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	-	+	-	+	-	+	-
Flavonoides	+	-	+	+	+	-	+	+
Taninos	+	-	+	+	+	-	+	+
Terpenóides	+	+	-	-	+	+	-	-
Ácidos graxos	+	+	-	-	+	+	-	-

(-): não detectado; (+): detectado

A análise da atividade antimicrobiana das frações obtidas por partição líquido-líquido direciona a descoberta das classes de metabólitos responsáveis pela atividade biológica (FILHO & YUNES, 1998).

As frações de média e alta polaridade (AcOEt e HMeOH) de folhas e galhos de *P. spruceanum* foram as de maior porcentagem de atividade antimicrobiana (%AA) e maior atividade antimicrobiana total (AAT), em relação à fração menos polar (Hex) (item 4.3.3, pág. 36).

Dessa forma, atribuiu-se a atividade antimicrobiana, dos EEBs de folhas e galhos dessa espécie, principalmente a compostos de maior polaridade, incluindo cumarinas, flavonoides e taninos detectados por meio da prospecção fitoquímica dessas frações.

Essas classes de metabólitos detectadas estão entre os maiores grupos que são responsáveis pela atividade antimicrobiana de plantas (GYAWALIA & IBRAHIM, 2014).

No entanto, deve-se destacar que é importante considerar outras classes que não foram pesquisadas nessa prospecção e são necessários mais estudos para definir os compostos ativos.

4.4.2. Teor de compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos foram determinados através da interpolação das medidas de absorvância das amostras com a curva de calibração de ácido gálico (Eq 6).

$$y = 0,0002x + 0,0652 \quad r^2: 0,9935 \quad (\text{Eq 6})$$

A partir dos resultados de teor de compostos fenólicos totais dos EEBs e frações de folhas e galhos de *P. spruceanum* (Tabela 16 e Gráfico 4, pág. 51 e 52), observou-se que o EEB de galhos possui maior teor de fenólicos que o EEB de folhas.

As variações na concentração de metabólitos secundários entre partes vegetais são frequentemente relatadas e ocorre devido às diferenças de metabolismo dos órgãos vegetais (GOBBO-NETO & LOPES, 2006; CHUNLONG et al., 2008; SALEM et al., 2013; IAMSAARD et al., 2014).

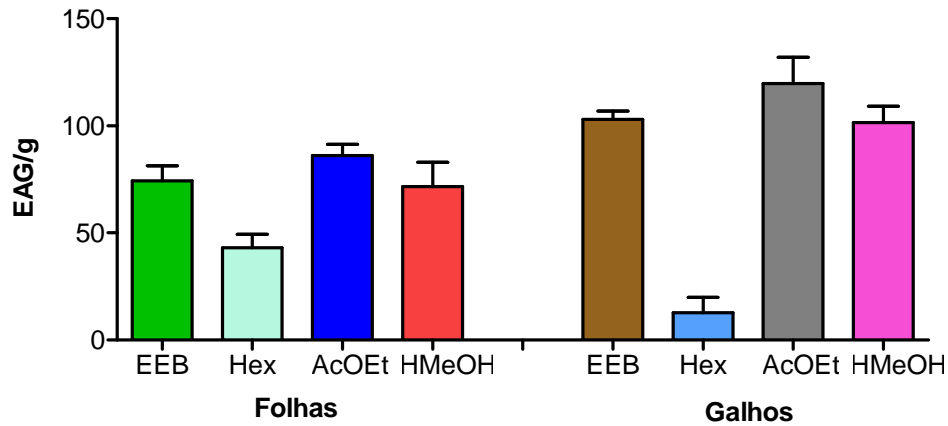
Compostos fenólicos, de ambos os extratos, concentraram-se nas frações AcOEt e HMeOH e as frações Hex são as de menor teor desses compostos. Esses resultados devem-se ao fato de que a maioria dos compostos fenólicos é de média a alta polaridade, como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (FILHO & YUNES, 1998).

Tabela 16: Teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Amostra		EAG/ g*
Folhas	EEB	74,31 ± 7,05
	Hex	43,11 ± 6,30
	AcOEt	86,18 ± 5,18
	HMeOH	71,74 ± 11,36
Galhos	EEB	103,06 ± 3,91
	Hex	12,81 ± 7,10
	AcOEt	119,79 ± 12,27
	HMeOH	101,57 ± 7,67

*equivalentes de ácido gálico por g de amostra - média ± desvio padrão. Método Folin-Ciocalteu.

Gráfico 4: Teor de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.



Compostos fenólicos, em geral, estão entre os principais metabólitos vegetais secundários que possuem atividade antimicrobiana. O teor desses compostos está relacionado com a atividade antimicrobiana de algumas espécies vegetais, como *Nephelium lappaceum* (THITILERTDECHA et al., 2008).

Através dos cálculos estatísticos de correlação de Spearman, entre o teor de compostos fenólicos totais e atividade antimicrobiana total (AAT), observou-se que existe correlação significativa ($p < 0,05$) relacionada a *E. faecalis* e *S. enteritidis* (Tabela 17, pág. 55). Mesmo com a falta de significância estatística, existe correlação forte ou moderada para 90% dos micro-organismos. Dessa forma, não se pode atribuir a atividade antimicrobiana de folhas e galhos de *P. spruceanum* majoritariamente aos compostos fenólicos em geral, porém esses compostos estão relacionados a essa atividade.

Tabela 17: Resultados de correlação de Spearman entre teor de compostos fenólicos totais e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações hexânicas (Hex), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	n ¹	r _s ²	Correlação ³	p ⁴
<i>S. aureus</i>	8	0,6	Moderada	0,15
<i>S. aureus</i> MARSA	8	0,6	Moderada	0,08
<i>S. saprophyticus</i>	8	0,7	Forte	0,06
<i>L. monocytogenes</i>	8	0,7	Forte	0,06
<i>E. faecalis</i>	8	0,7	Forte	0,04*
<i>E. faecium</i>	8	0,6	Moderada	0,11
<i>E. aerogenes</i>	8	0,6	Moderada	0,13
<i>P. mirabilis</i>	8	0,6	Moderada	0,10
<i>S. typhimurium</i>	8	0,3	Fraca	0,46
<i>S. sonnei</i>	8	0,5	Moderada	0,22
<i>S. flexneri</i>	8	0,5	Moderada	0,20
<i>E. coli</i>	8	0,5	Moderada	0,17
<i>E. coli</i> EPEC	8	0,5	Moderada	0,17
<i>S. pyogenes</i>	8	0,5	Moderada	0,17
<i>P. aeruginosa</i>	8	0,6	Moderada	0,11
<i>P. rettgeri</i>	8	0,6	Moderada	0,10
<i>K. pneumoniae</i>	8	0,5	Moderada	0,21
<i>K. oxytoca</i>	8	0,6	Moderada	0,15
<i>S. enteritidis</i>	8	0,7	Forte	0,04*
<i>C. albicans</i>	8	0,3	Fraca	0,46

1- n: número de amostras; 2- r_s: coeficiente de correlação de Spearman; 3- Classificação da correlação: 0,0 ≤ r_s < 0,5: fraca; 0,5 ≤ r_s < 0,7: moderada; 0,7 ≤ r_s ≤ 1,0: forte. 4- significância estatística: p<0,05*.

4.4.3. Teor de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados através da interpolação das medidas de absorvância das amostras com a curva de calibração de quercetina (Eq 7) e rutina (Eq 8).

$$\text{Quercetina: } y = 0,0299x + 0,0058 \quad r^2: 0,9997 \quad (\text{Eq 7})$$

$$\text{Rutina: } y = 0,0111x + 0,0212 \quad r^2: 0,9946 \quad (\text{Eq 8})$$

Os resultados de teor de flavonoides totais dos EEBs e frações AcOEt e HMeOH de folhas e galhos de *P. spruceanum* estão listados na Tabela 18 (pág. 54) e nos Gráficos 5 e 6 (pág. 55). Observa-se que o EEB de folhas possui maior teor de flavonoides que o EEB de galhos. Em ambos os extratos, os flavonoides concentraram-se mais na fração AcOEt.

Tabela 18: Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Amostra		mg de EQ/g*	ER/g**
Folhas	EEB	17,98 ± 2,64	47,87 ± 7,12
	AcOEt	19,03 ± 0,40	50,73 ± 1,08
	HMeOH	16,70 ± 0,94	44,43 ± 2,53
Galhos	EEB	2,49 ± 0,42	6,14 ± 1,15
	AcOEt	9,51 ± 0,61	25,06 ± 1,64
	HMeOH	2,38 ± 0,25	5,85 ± 0,66

*equivalentes de quercetina por g de amostra - média ± desvio padrão; **equivalentes de rutina por g de amostra - média ± desvio padrão. Método colorimétrico de cloreto de alumínio.

Gráfico 5: Teor de flavonoides totais em equivalentes de quercetina (EQ) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.

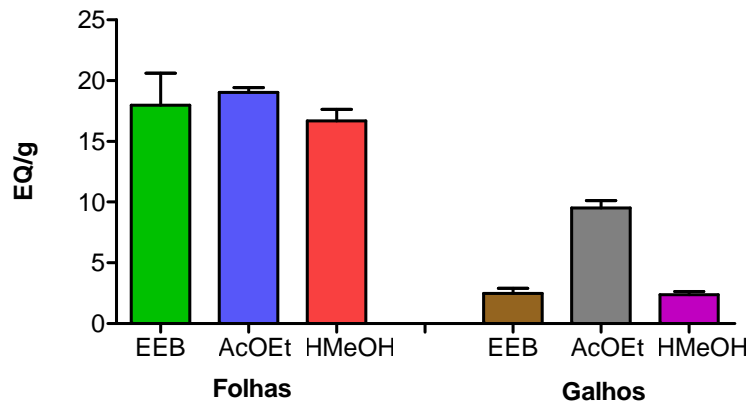
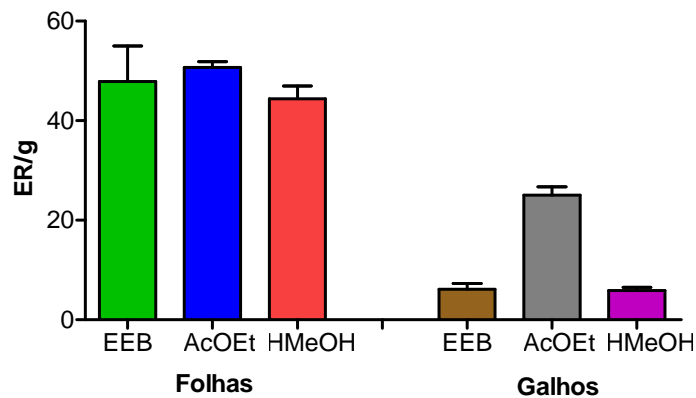


Gráfico 6: Teor de flavonoides totais em equivalentes de rutina (ER) por grama dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*.



A atividade antimicrobiana de diversos flavonoides, relatada na literatura, é atribuída a mecanismos de ação como: inibição da síntese de ácidos nucleicos, desestabilização da membrana citoplasmática e inibição do metabolismo energético (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Através dos cálculos estatísticos de correlação de Spearman, entre o teor de flavonoides totais e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos e frações, observa-se correlação moderada para 60% dos micro-organismos, porém não significativa ($p < 0,05$) (Tabela 19, pág. 56). Dessa forma, também não se atribuiu a atividade antimicrobiana de folhas e galhos de *P. spruceanum* majoritariamente a flavonoides.

Tabela 19: Resultados de correlação de Spearman entre teor de flavonoides e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	n ¹	r _s ²	Correlação ³	p ⁴
<i>S. aureus</i>	8	0,5	Moderada	0,22
<i>S. aureus</i> MARSA	8	0,5	Moderada	0,20
<i>S. saprophyticus</i>	8	0,4	Fraca	0,30
<i>L. monocytogenes</i>	8	0,4	Fraca	0,30
<i>E. faecalis</i>	8	0,4	Fraca	0,33
<i>E. faecium</i>	8	0,6	Forte	0,11
<i>E. aerogenes</i>	8	0,5	Moderada	0,20
<i>P. mirabilis</i>	8	0,5	Moderada	0,22
<i>S. typhimurium</i>	8	0,4	Fraca	0,27
<i>S. sonnei</i>	8	0,6	Moderada	0,15
<i>S. flexneri</i>	8	0,6	Moderada	0,11
<i>E. coli</i>	8	0,4	Fraca	0,33
<i>E. coli</i> EPEC	8	0,4	Fraca	0,33
<i>S. pyogenes</i>	8	0,5	Moderada	0,17
<i>P. aeruginosa</i>	8	0,5	Moderada	0,17
<i>P. rettgeri</i>	8	0,5	Moderada	0,20
<i>K. pneumoniae</i>	8	0,6	Moderada	0,13
<i>K. oxytoca</i>	8	0,6	Moderada	0,15
<i>S. enteritidis</i>	8	0,5	Moderada	0,20
<i>C. albicans</i>	8	0,2	Fraca	0,62

1- n: número de amostras; 2- r_s: coeficiente de correlação de Spearman; 3- Classificação da correlação: 0,0 ≤ r_s < 0,5: fraca; 0,5 ≤ r_s < 0,7: moderada; 0,7 ≤ r_s ≤ 1,0: forte. 4- significância estatística: p < 0,05.

4.4.4. Teor de taninos totais

Os teores de taninos totais determinados usando o método de vanilina/ácido clorídrico foram estabelecidos por meio da interpolação das medidas de absorvância das amostras com a curva de calibração da catequina (Eq 9).

$$y = 0,0023x - 0,0053 \quad r^2: 0,9938 \quad (\text{Eq 9})$$

Os resultados obtidos utilizando o método de adsorção por gelatina foram determinados através da interpolação com a curva de calibração do ácido tânico (Eq 10).

$$y = 0,0004x - 0,2726 \quad r^2: 0,9924 \quad (\text{Eq 10})$$

Os resultados de teor de taninos totais dos EEBs e frações de folhas e galhos de *P. spruceanum* estão representados na Tabela 20 (pág. 57) e nos Gráficos 7 e 8 (pág. 58). Observou-se que, nos resultados obtidos pelas duas metodologias, o EEB de galhos possui maior teor de taninos que o EEB de folhas.

Tabela 20: Teor de taninos totais dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Amostra		Método vanilina/HCl EC/g ¹	Método adsorção EAT/g ²
Folhas	EEB	133,88 ± 10,32	510,74 ± 21,05
	AcOEt	14,59 ± 2,30	561,74 ± 16,20
	HMeOH	156,19 ± 1,09	18,05 ± 4,66
Galhos	EEB	624,63 ± 20,09	709,66 ± 28,43
	AcOEt	527,77 ± 12,56	389,35 ± 26,58
	HMeOH	151,89 ± 0,80	140,81 ± 18,51

¹equivalentes de catequina por g de amostra - média ± desvio padrão, determinado pelo método de vanilina/ácido clorídrico; ²equivalentes de ácido tânico por g de amostra - média ± desvio padrão, determinado pelo método de adsorção por gelatina

Gráfico 7: Teor de taninos totais em equivalentes de catequina (EC) por grama dos extratos etanólicos Brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*, determinado pelo método vanilina/ácido clorídrico.

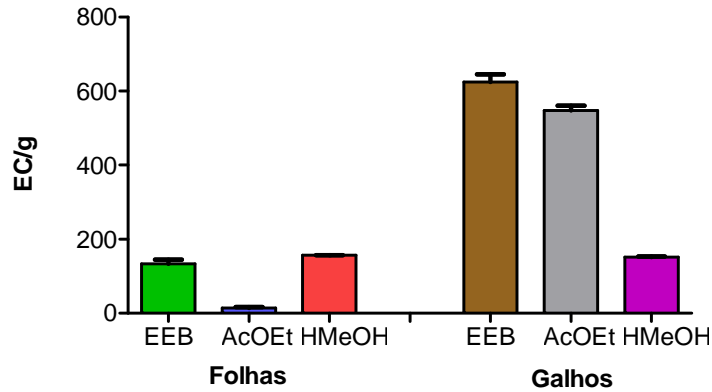
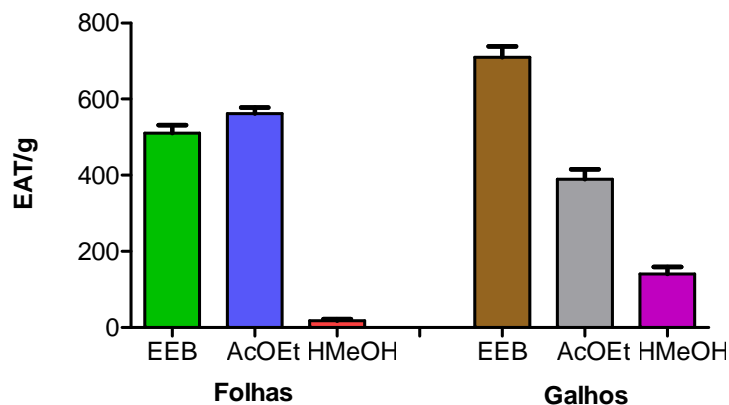


Gráfico 8: Teor de taninos totais em equivalentes de ácido tânico (EAT) por grama dos extratos etanólicos Brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*, determinado pelo método de adsorção por gelatina.



Através da metodologia de vanilina/HCl, os taninos presentes no EEB de folhas estavam mais concentrados na fração HMeOH, já no EEB de galhos a fração AcOEt possui maior teor. Para confirmar esse resultado foi realizada a metodologia de adsorção por gelatina que é mais específica para taninos. Por meio dos resultados verificou-se que nos dois extratos a maior concentração de taninos está na fração AcOEt, sugerindo que a maioria dos taninos de *P. spruceanum* tem baixa polaridade. O maior teor de taninos em extratos de menor polaridade já foi relatado para outras espécies.

Por exemplo, na extração consecutiva de folhas de *Galla chinensis* (Pemphigidae) com solventes de polaridade crescente, a maior quantidade de taninos (91,5% do total) foi obtida utilizando éter e acetato de etila. Teores menores (8,5%) foram encontrados nos extratos mais polares (etanol e água). Essa concentração de taninos foi atribuída à presença de taninos de baixa polaridade (TIAN et al., 2009).

O maior teor de taninos totais no extrato acetato de etila também foi encontrado na extração de cascas de *Uncaria gambir* (Rubiaceae). O extrato obtido com acetato de etila possui a maior porcentagem de taninos condensados (93,12%) em relação aos extratos metanólico (75,35%) e aquoso (66,96%) (KASSIM et al., 2011).

Taninos condensados oligoméricos de baixo peso molecular, como procianidinas tipo B, são solúveis em acetato de etila (KARCHESY & HEMINGWAY, 1986). A fração acetato de etila obtida por partição do extrato etanólico de folhas de *Combretum mucronatum* (Combretaceae) é rica em procianidinas B enquanto procianidinas de alto peso molecular (tipos C e D) foram identificadas na fração aquosa (KISSEIH et al., 2015).

Esses relatos de maior concentração de taninos em extratos acetato-etilênicos e presença de taninos de menor polaridade corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Através dos cálculos estatísticos de correlação de Spearman, entre o teor de taninos totais e atividade antimicrobiana total (AAT), observou-se que existe correlação forte positiva e significativa ($p < 0,05$) para 85% dos microorganismos testados, com os resultados obtidos pelo método vanilina/HCl. Já pelo método de adsorção por gelatina, observa-se correlação forte positiva para 75% e significativa apenas para 50% (Tabela 21, pág. 60).

Tabela 21: Resultados de correlação de Spearman entre teor de taninos e atividade antimicrobiana total (AAT) dos extratos etanólicos brutos (EEBs) e frações acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólicas (HMeOH) de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Micro-organismo	Método vanilina/HCl				Método adsorção		
	n ¹	r _s ²	Correlação ³	p ⁴	r _s ²	Correlação ³	p ⁴
<i>S. aureus</i>	8	0,8	Forte	0,01*	0,7	Forte	0,07
<i>S. aureus</i> MARSA	8	0,8	Forte	0,02*	0,7	Forte	0,06
<i>S. saprophyticus</i>	8	0,8	Forte	0,03*	0,7	Forte	0,04*
<i>L. monocytogenes</i>	8	0,8	Forte	0,03*	0,7	Forte	0,04*
<i>E. faecalis</i>	8	0,8	Forte	0,01*	0,7	Forte	0,04*
<i>E. faecium</i>	8	0,7	Forte	0,04*	0,7	Forte	0,04*
<i>E. aerogenes</i>	8	0,5	Moderada	0,20	0,8	Forte	0,01*
<i>P. mirabilis</i>	8	0,8	Forte	0,01*	0,7	Forte	0,06
<i>S. typhimurium</i>	8	0,6	Moderada	0,15	0,6	Moderada	0,10
<i>S. sonnei</i>	8	0,7	Forte	0,04*	0,6	Moderada	0,10
<i>S. flexneri</i>	8	0,7	Forte	0,07	0,7	Forte	0,04*
<i>E. coli</i>	8	0,7	Forte	0,04*	0,6	Moderada	0,15
<i>E. coli</i> EPEC	8	0,7	Forte	0,04*	0,6	Moderada	0,15
<i>S. pyogenes</i>	8	0,8	Forte	0,03*	0,7	Forte	0,08
<i>P. aeruginosa</i>	8	0,8	Forte	0,04*	0,7	Forte	0,07
<i>P. rettgeri</i>	8	0,8	Forte	0,02*	0,7	Forte	0,06
<i>K. pneumoniae</i>	8	0,7	Forte	0,04*	0,7	Forte	0,04*
<i>K. oxytoca</i>	8	0,7	Forte	0,04*	0,8	Forte	0,04*
<i>S. enteritidis</i>	8	0,7	Forte	0,08	0,8	Forte	0,02*
<i>C. albicans</i>	8	0,4	Fraca	0,27	0,6	Moderada	0,08

1- n: número de amostras; 2- r_s: coeficiente de correlação de Spearman; 3- Classificação da correlação: 0,0 ≤ r_s < 0,5: fraca; 0,5 ≤ r_s < 0,7: moderada; 0,7 ≤ r_s ≤ 1,0: forte. 4- significância estatística: p < 0,05.

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações é maior quanto maior é seu teor de taninos totais, em relação à maioria dos micro-organismos. Dessa

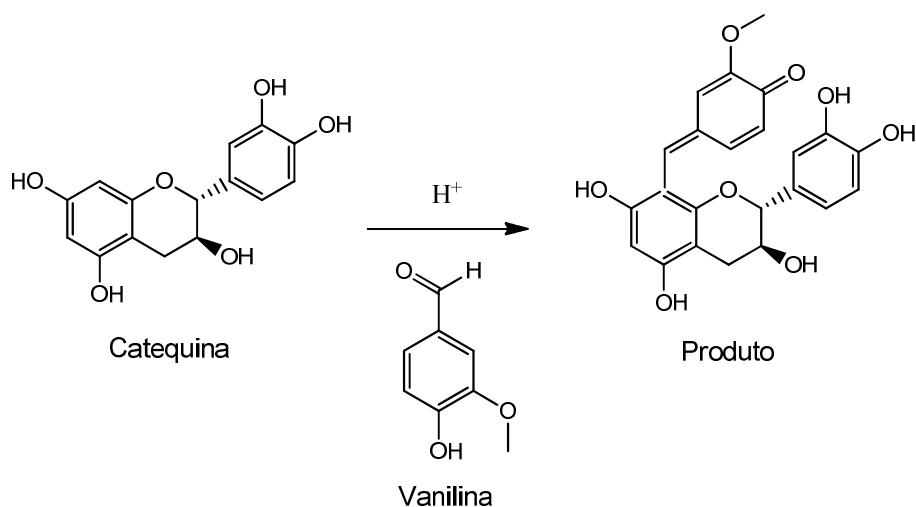
forma, atribuiu-se a atividade antimicrobiana de folhas e galhos de *P. spruceanum* majoritariamente aos taninos.

Os mecanismos de ação dos taninos condensados e hidrolisáveis são diversos, incluindo: desestabilização da membrana citoplasmática, inibição de enzimas e principalmente inibição do metabolismo por quelação com metais como zinco e ferro (DAGLIA, 2012).

É importante destacar que para os outros teores determinados (fenólicos e flavonoides) também foi observada uma correlação moderada positiva, apesar de não significativa. A atividade pode ser resultante de uma ação sinérgica entre esses metabólitos. Além disso, outras classes de metabólitos não pesquisadas e a não especificidade da metodologia utilizada também devem ser consideradas.

A diferença de significância entre os resultados das duas metodologias para determinação de taninos totais é atribuída à baixa especificidade do método vanilina/HCl. Esse método envolve a reação de um aldeído aromático (vanilina) com um anel aromático metasubstituído gerando um produto de coloração vermelha (Figura 10, pág. 61). Qualquer polifenólico apropriadamente substituído reage nesse teste, como flavonóides (HAGERMAN, 2002).

Figura 10: Reação de catequina com vanilina no método vanilina/HCl para determinação de taninos toatais (HAGERMAN, 2002).

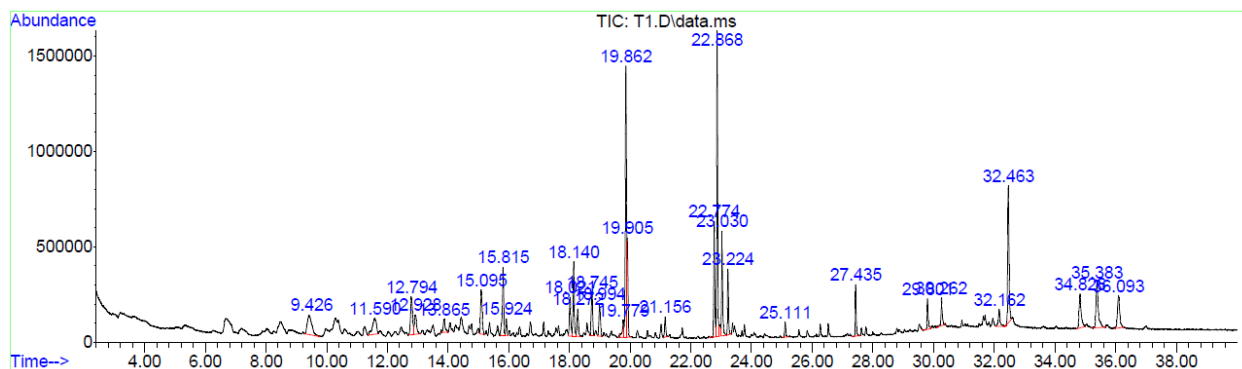


4.4.5. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Os constituintes voláteis dos extratos e frações de *P. spruceanum* foram analisados por CG/EM e identificados utilizando a biblioteca de espectros de massas NIST/2.0. Foram excluídos da discussão os picos associados a contaminantes, como ftalatos e compostos de sílica.

Através das análises por CG/EM foi possível identificar 16 constituintes voláteis do EEB de folhas de *P. spruceanum* (Figura 11 e Tabela 22, pág 62 e 63). Os constituintes majoritários foram o palmitato de metila (13,65%), linolenato de metila (12,89%) e a vitamina E (7,31%) (Figura 12, pág 64).

Figura 11: Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

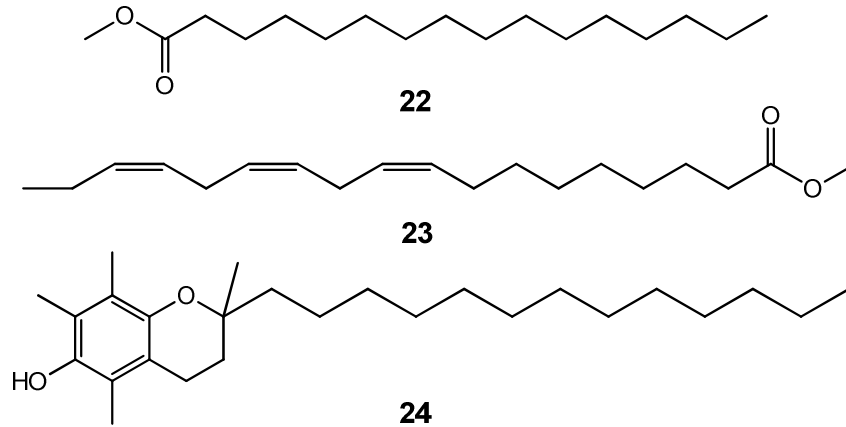


Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 22: Constituintes voláteis do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t_r (min)	Constituintes	%
1	9,424	Cariofileno	3,55
2	12,795	(-)-Spatulenol	3,10
3	15,813	3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila	4,02
4	18,269	5-Eicosene, (E)-	1,60
5	18,993	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2,03
6	19,862	Palmitato de metila (hexadecanoato de metila)	13,65
7	21,155	Palmitato de etila (hexadecanoato de etila)	1,02
8	22,772	Linoleato de metila (9,12-octadecadienoato de metila)	4,89
9	22,868	Linolenato de metila (9,12,15-octadecatrienoato de metila)	12,89
10	23,030	Fitol	4,67
11	23,227	Estearato de metila (octadecenoato de metila)	2,67
12	29,803	Esqualeno	1,35
13	32,462	Vitamina E	7,31
14	34,827	β-sitosterol	2,89
15	35,384	β-amirina	4,23
16	36,091	α-amirina	2,92

Figura 12: Constituintes voláteis majoritários do extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): **22**- palmitato de metila (13,65%), **23**- linolenato de metila (12,89%) e **24**- vitamina E (7,31%).

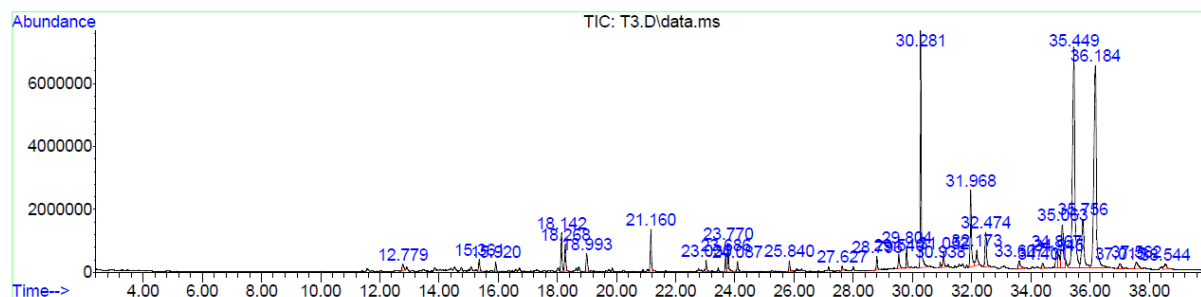


A maioria dos constituintes voláteis do EEB de folhas de *P. spruceanum* já foi identificada em outras espécies da família Burseraceae. Como por exemplo, o majoritário palmitato de metila, um éster do ácido palmítico que está presente nos óleos essenciais de frutos, folhas, sementes e cascas de *Protium confusum*. Esses óleos essenciais dessa espécie apresentam atividade antimicrobiana (SANTANA et al., 2009).

Na fração hexânica de folhas de *P. spruceanum* foram identificados 16 constituintes voláteis (Figura 13 e Tabela 23, pág. 65). Os constituintes majoritários foram β-amirina (24,45%) e α-amirina (24,10%) (Figura 14, pág. 66).

A mistura de β e α-amirinas já foi isolada da fração hexânica de folhas de *P. spruceanum* e são responsáveis por sua atividade anti-inflamatória (RODRIGUES et al., 2013).

Figura 13: Cromatograma da fração hexânica (Hex) de folhas de *P. spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

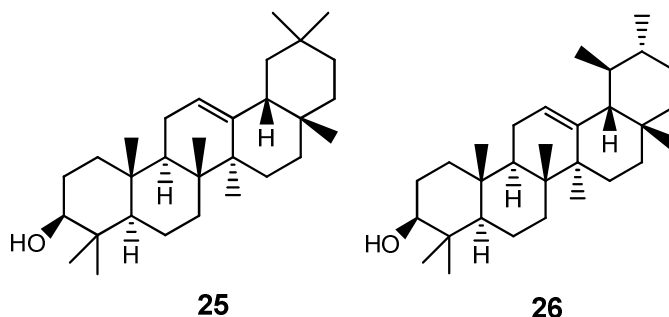


Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 23: Constituintes voláteis da fração hexânica (Hex) de folhas de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

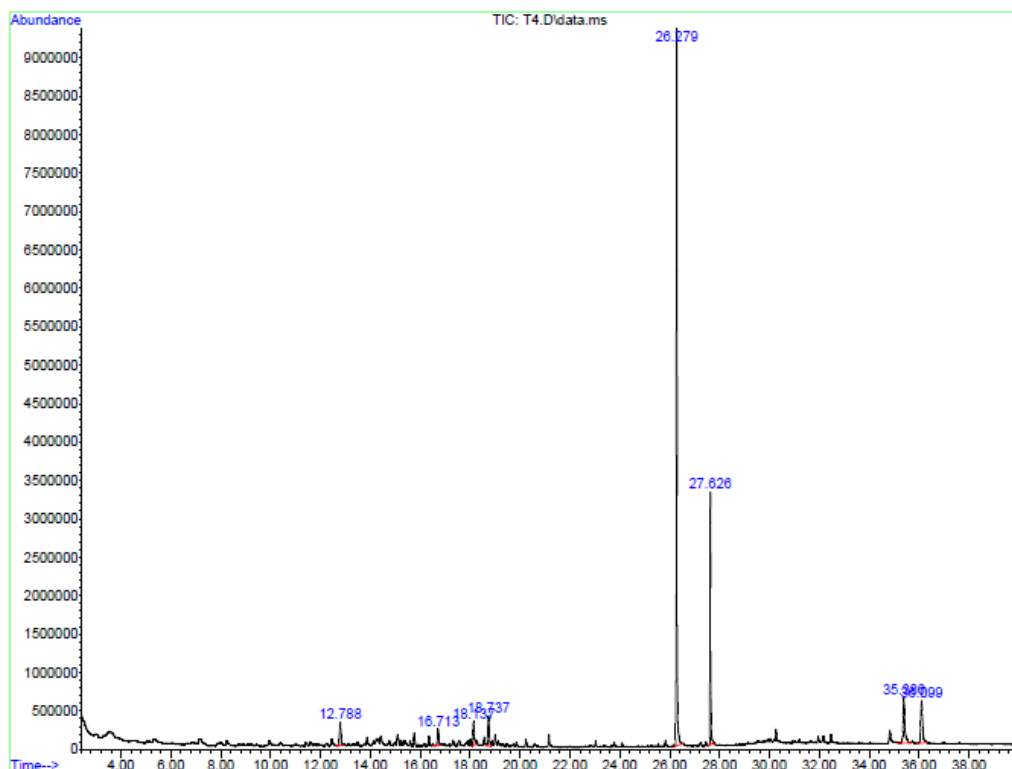
Nº	t _r (min)	Constituinte	%
1	12,777	(-)-Espatulenol	0,47
2	18,993	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	1,22
3	21,161	Palmitato de etila	2,21
4	23,030	Fitol	0,55
5	23,688	Linolenato de etila	0,71
6	23,772	Linoleato de etila	1,41
7	24,084	Estearato de etila	0,47
8	29,803	Esqualeno	0,95
9	32,174	Estigmastan-3,5-dieno	1,31
10	32,474	Vitamina E	2,56
11	34,869	γ-Sitosterol	1,45
12	34,947	Lanosterol	1,06
13	35,450	β-amirina	24,45
14	36,181	α-amirina	24,10
15	37,013	Estigmast-4-en-3-ona	0,53
16	38,546	Friedelan-3-ona	0,62

Figura 14: Constituintes voláteis majoritários da fração hexânica (Hex) de folhas de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): **25**- β -amirina (24,45%) e **26**- α -amirina (24,10%).



Na fração acetato de etila de folhas de *P. spruceanum* foram identificados somente quatro constituintes voláteis (Figura 15 e Tabela 24, pág 66 e 67). O constituinte majoritário foi o adipato de bis(2-etil-hexila) (53,46%) (Figura 16, pág. 67).

Figura 15: Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

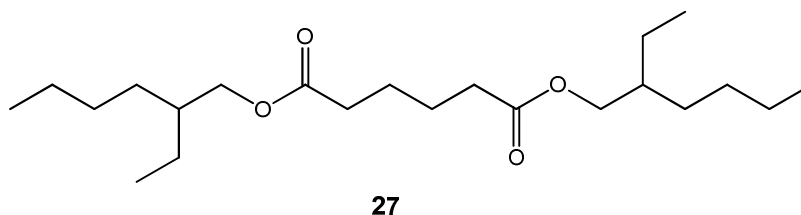


Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 24: Constituintes voláteis da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Constituintes	%
1	12,789	(-)- Espotulenol	3,33
2	26,281	Adipato de bis(2-etil-hexila) (hexanedioato de bis(2-etil-hexila))	53,46
3	35,384	β-amirina	8,24
4	36,097	α-amirina	7,93

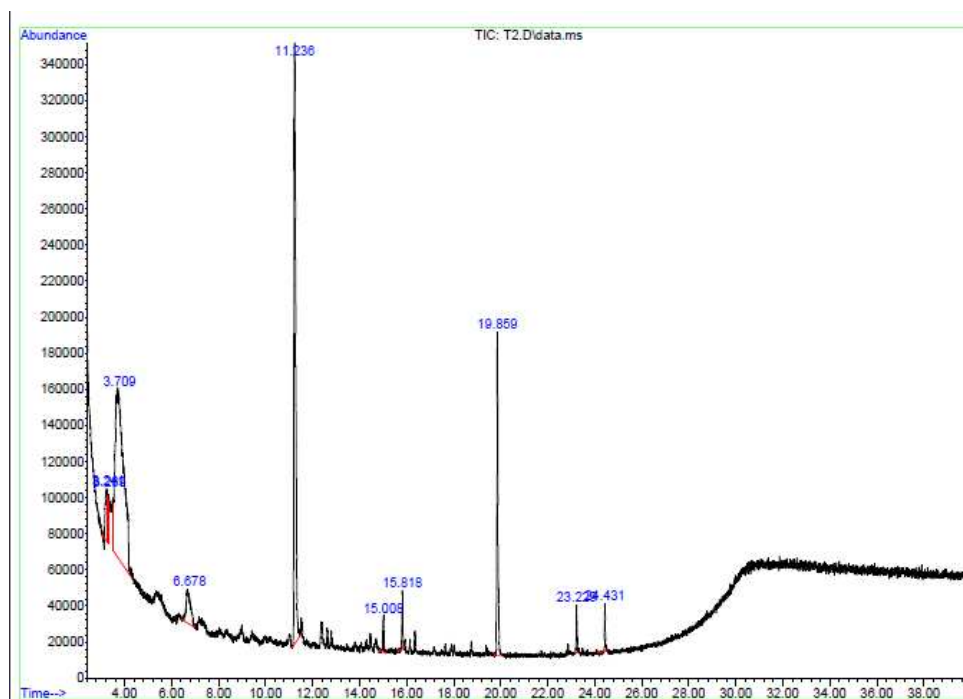
Figura 16: Constituinte volátil majoritário da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): **27**- adipato de bis(2-etil-hexila) (53,46%).



O adipato de bis(2-etil-hexila) éster ainda não foi relatado em espécies da família Burseraceae, mas já foi identificado em extratos de raízes de *Stellera chamaejasme*. Essa espécie é da família Thymelaeaceae e possui atividade antifúngica (BAI et al., 2012).

Na fração hidrometanólica de folhas de *P. spruceanum* foram identificados quatro constituintes voláteis (Figura 17 e Tabela 25, pág. 68). Os constituintes majoritários foram o benzoato de metila (46,99%) e o palmitato de metila (Figura 18, pág. 69). Este último também é um dos constituintes majoritários do EEB de folhas.

Figura 17: Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

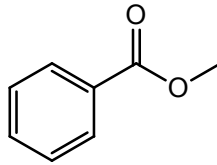


Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 25: Constituintes voláteis da fração hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Constituinte	%
1	3,710	Benzoato de metila	46,99
2	15,011	α-bisabolol	1,23
3	19,862	Palmitato de metila	10,80
4	23,227	Estearato de metila	1,17

Figura 18: Constituinte volátil majoritário da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): **28**- benzoato de metila (46,99%).

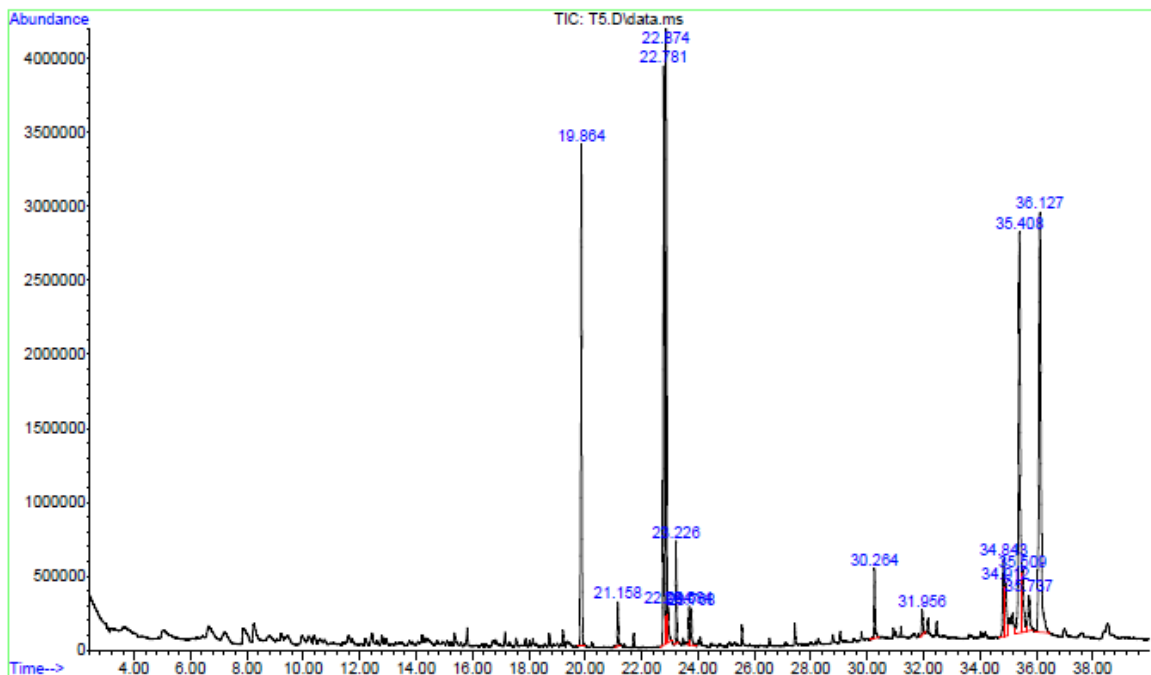


28

O ácido benzoico já foi identificado no óleo essencial de folhas de *Protium unifoliolatum* (ZOGHBI et al., 1993).

Para o EEB de galhos de *P. spruceanum*, através das análises por CG/EM, foi possível identificar oito constituintes voláteis (Figura 19 e Tabela 26, pág. 69 e 70). Os constituintes majoritários foram α -amirina (21,88%) e β -amirina (18,20%) (Figura 14, pág. 66).

Figura 19: Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)



Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

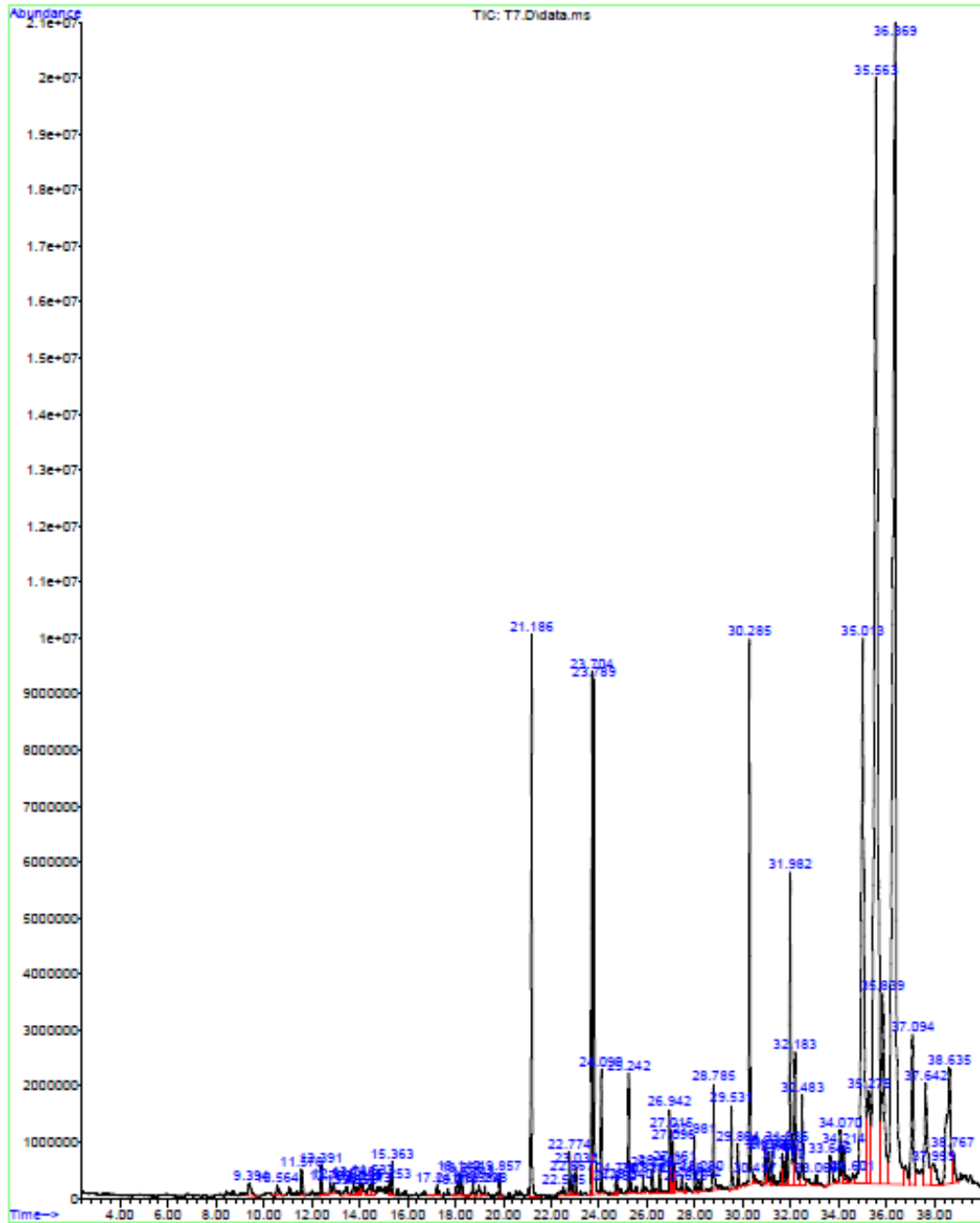
Tabela 26: Constituintes voláteis do extrato etanólico bruto (EEB) de galhos de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Constituintes	%
1	19,862	Palmitato de metila	13,70
2	21,161	Palmitato de etila	1,17
3	22,784	Linoleato de metila	13,34
4	22,874	Linolenato de metila	14,06
5	23,227	Estearato de metila	2,21
6	34,845	β-sitosterol	3,44
7	35,408	β-amirina	18,20
8	36,127	α-amirina	21,88

Todos esses compostos também foram identificados no EEB de folhas. Porém, o EEB de galhos possui como constituintes majoritários α- e β-amirina.

Na fração hexânica de galhos de *P. spruceanum* foram identificados 21 constituintes voláteis (Figura 20 e Tabela 27, pág. 71 e 72). Os constituintes majoritários também foram α-amirina (24,49%) e β-amirina (23,28%) (Figura 14, pág. 66).

Figura 20: Cromatograma da fração hexânica (Hex) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)



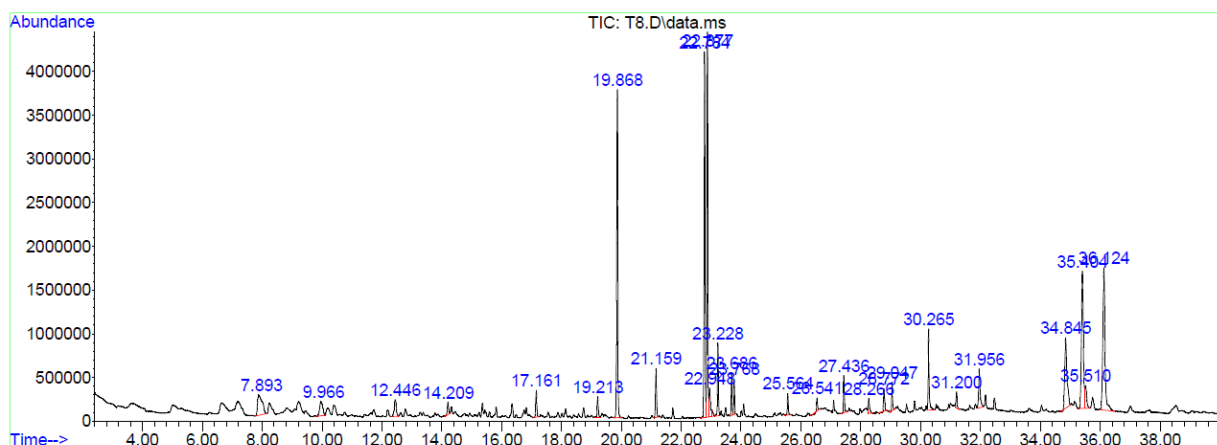
Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil sílox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 27: Constituintes voláteis da fração hexânica (Hex) de galhos de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Constituinte	%
1	9,393	Cariofileno	0,22
2	12,394	Nerolidol	0,25
3	12,783	(-)-espatulenol	0,09
4	21,185	Palmitato de etila	3,68
5	23,030	Fitol	0,16
6	23,706	Linoleato de etila	2,68
7	23,790	Linolenato de etila	3,01
8	24,090	Estearato de etila	0,61
9	29,803	Esqualeno	0,24
10	31,653	γ-tocoferol	0,32
11	31,983	Hentriacontano	2,57
12	32,180	Estigmastan-3,5-dieno	1,17
13	32,486	Vitamina E	0,86
14	33,647	Campesterol	0,43
15	34,073	Estigmasterol	0,53
16	35,013	β-sitosterol	9,42
17	35,564	β-amirina	23,28
18	36,366	α-amirina	24,49
19	37,091	Estigmast-4-en-3-ona	2,01
20	37,959	Lupeol	0,65
21	38,636	Friedelan-3-one	2,78

Na fração acetato de etila de galhos de *P. spruceanum* foram identificados nove constituintes voláteis (Figura 21 e Tabela 28, pág. 73). Os constituintes majoritários foram o linolenato de metila (14,33%), palmitato de metila (13,79%), linoleato de metila (13,50%) e α-amirina (11,91%) (Figura 12 e 14, pág. 64 e 66).

Figura 21: Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)



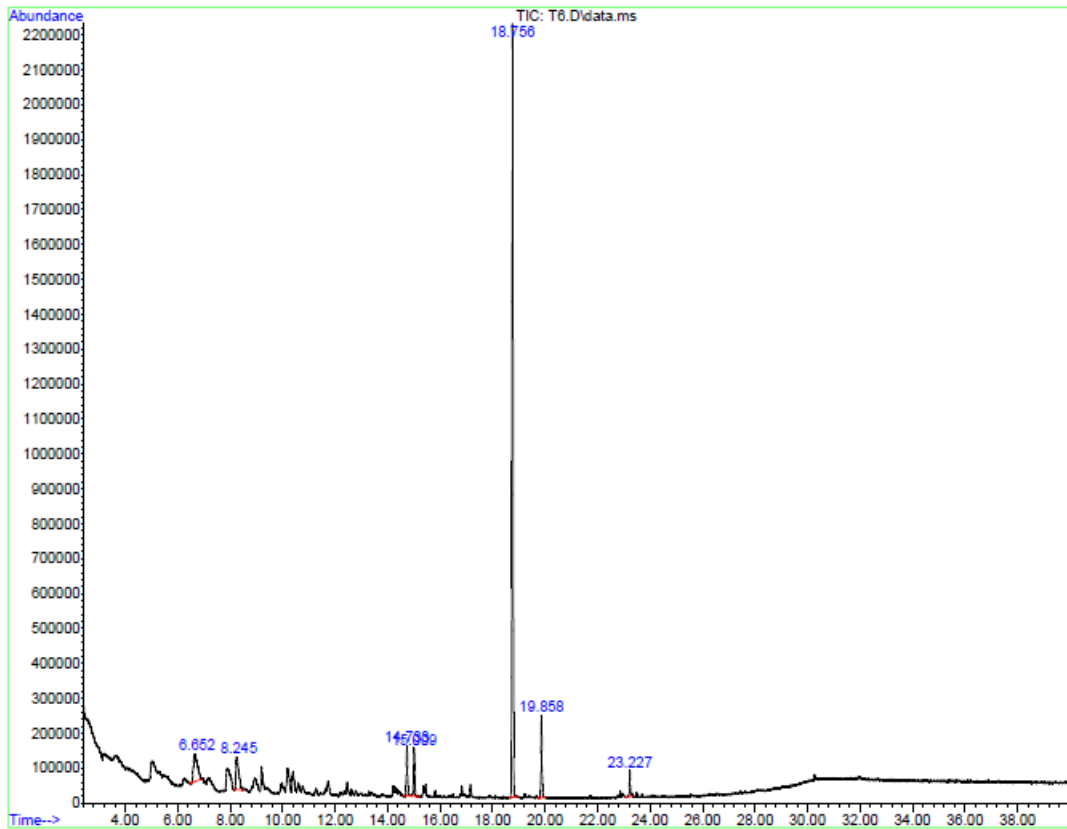
Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290°C.

Tabela 28: Constituintes voláteis da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de *Protium spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Constituente	%
1	13,79	Palmitato de metila	13,79
2	22,784	Linoleato de metila	13,50
3	22,880	Linolenato de metila	14,33
4	23,227	Estearato de metila	2,54
5	23,688	Linoleato de etila	1,38
6	23,766	Linolenato de etila	1,31
7	34,845	β-sitosterol	5,78
8	35,402	β-amirina	9,87
9	36,127	α-amirina	11,91

Na fração hidrometanólica de galhos de *P. spruceanum* foram identificados quatro constituintes voláteis (Figura 22 e Tabela 29, pág. 74). Os constituintes majoritários foram o 4-propil-fenol (7,47%) e o palmitato de metila (6,60%) (Figuras 12 e 23, pág. 64 e 75).

Figura 22: Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *Protium spruceanum* obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

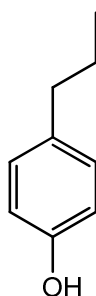


Condições de análise = Gás de arraste: hélio; Vazão: 1,4 mL/min; Coluna: HP-5MS 5% fenil metil silox; Temperatura da coluna: 100-290 °C.

Tabela 29: Compostos voláteis da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Nº	t _r (min)	Composto	%
1	8,244	4-propil-fenol	7,47
2	15,011	α-bisabolol	4,69
3	19,856	Palmitato de metila	6,60
4	23,227	Estearato de metila	1,89

Figura 23: Constituinte volátil majoritário da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *P. spruceanum* identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): **29:** 4-propil-fenol (7,47%).



29

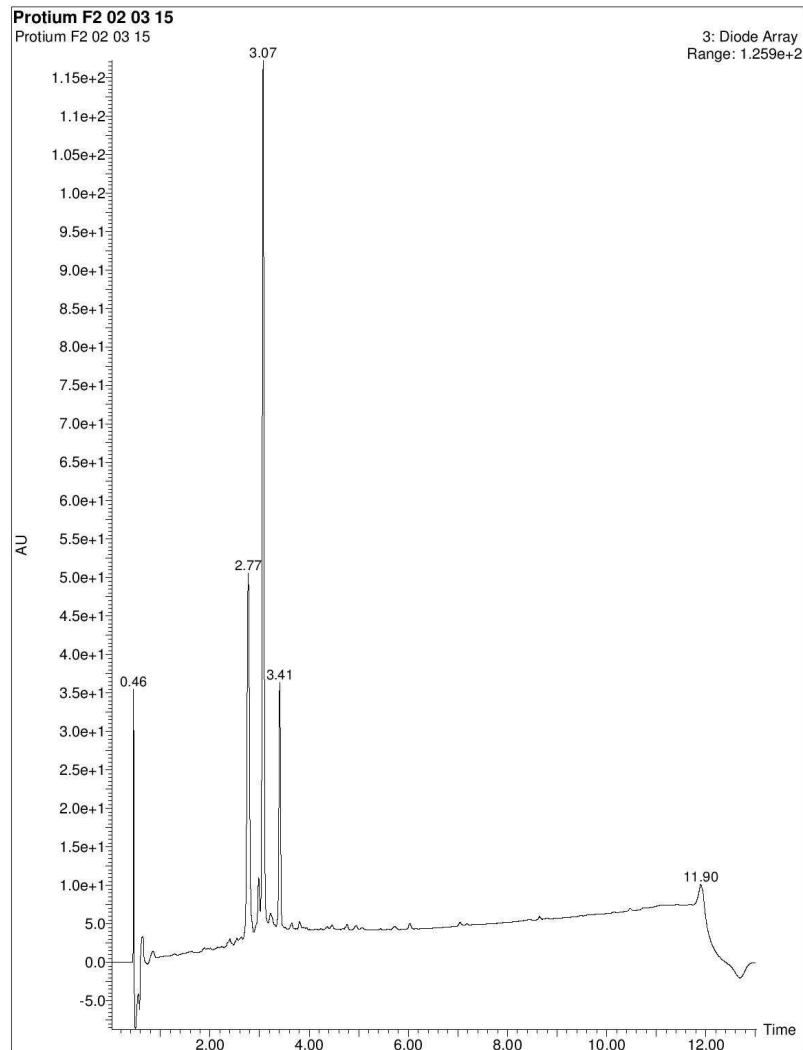
O 4-propil-fenol ainda não tinha sido relatado na família Burseraceae, mas já foi identificado em extratos de flores de *Cassia javanica*, uma espécie indiana com atividade antimicrobiana (BHUVANESWARI & GOBALAKRISHNAN, 2014).

4.4.6. Análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos e espectrometria de massas (CLUE/DAD/EM)

Visando identificar também os constituintes majoritários não voláteis presentes nas frações mais polares (AcOEt e HMeOH), efetuou-se as análises através de CLUE/DAD/EM.

No cromatograma da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* (Figura 24, pág. 76), extraído em 254 nm, observaram-se três picos majoritários.

Figura 24: Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de folhas de *Protium spruceanum* obtido pela análise em CLUE/DAD/EM, extraído em 254 nm.

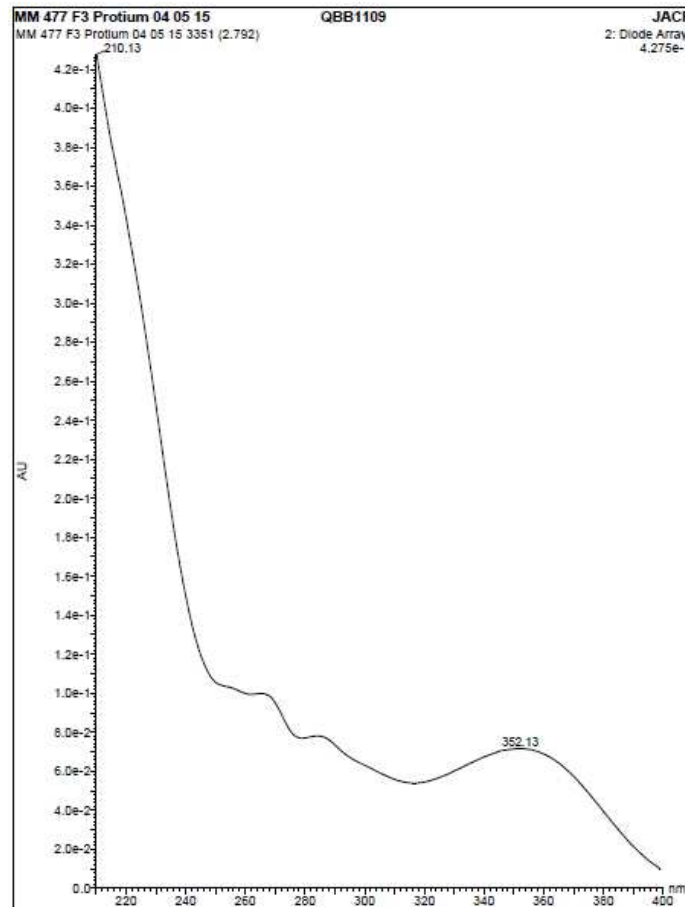


Condições de análise = fase móvel: Água e Acetonitrila, Coluna: CSH 130 C18, Fluxo: 0,3 mL/min.

Os picos em 2,77; 3,07 e 3,41 min foram selecionados e analisados em DAD e EM.

O espectro de ultravioleta do pico em 2,77 min (Figura 25, pág. 77) é característico de flavonoides. A banda I em 352 nm e a banda II em 268 nm indicaram a presença de um flavonol 3-OH substituído (TIBERTI et al., 2007).

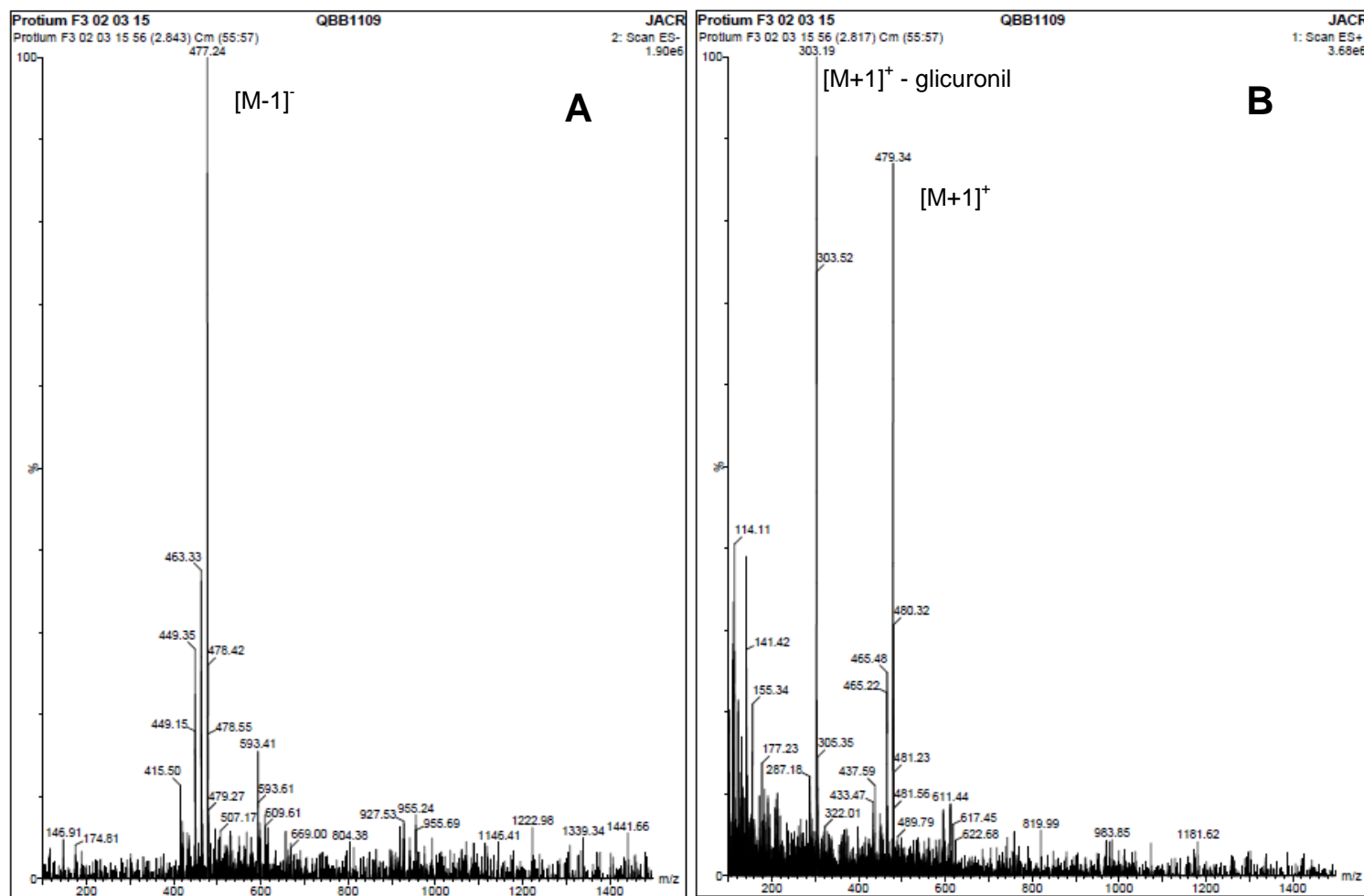
Figura 25: Espectro no ultravioleta (UV) do pico em 2,77 min da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* obtido através de CLUE/DADEM-EM



De acordo com o espectro de massas do pico em 2,77 min, no modo negativo (Figura 26 A, pág. 78), o sinal de m/z 477,24 foi atribuído ao íon molecular $[M-1]^-$. No modo positivo (Figura 26 B, pág. 78), o íon molecular $[M+1]^+$ foi relacionado ao sinal de m/z 479,34 e o sinal m/z 303,19 equivalente a perda da unidade de açúcar (glicuronil: 176 u). Esses resultados indicaram a presença de quercetina-3-O-glicuronídeo.

Figura 26: Espectros de massas do pico em 2,77 min da fração AcOEt de folhas de *Protium spruceanum* obtido através de CLUE/EM:

A- negativo e B- Modo positivo



Para confirmar a identificação, o sinal de m/z 477 foi selecionado e analisado utilizando espectrometria de massas sequenciais (CLUE/DAD/EM-EM) (Figura 27, pág. 79).

O padrão de fragmentação demonstrado serviu de base para confirmação da presença de quercetina-3-O-glicuronídeo, com base no encontrado na literatura (Figura 28, pág. 80) (MARTUCCI et al., 2014; RUSTAN et al., 2001).

Figura 27: Espectro de massas do sinal m/z 477 obtido através de CLUE/EM-EM
Modo negativo

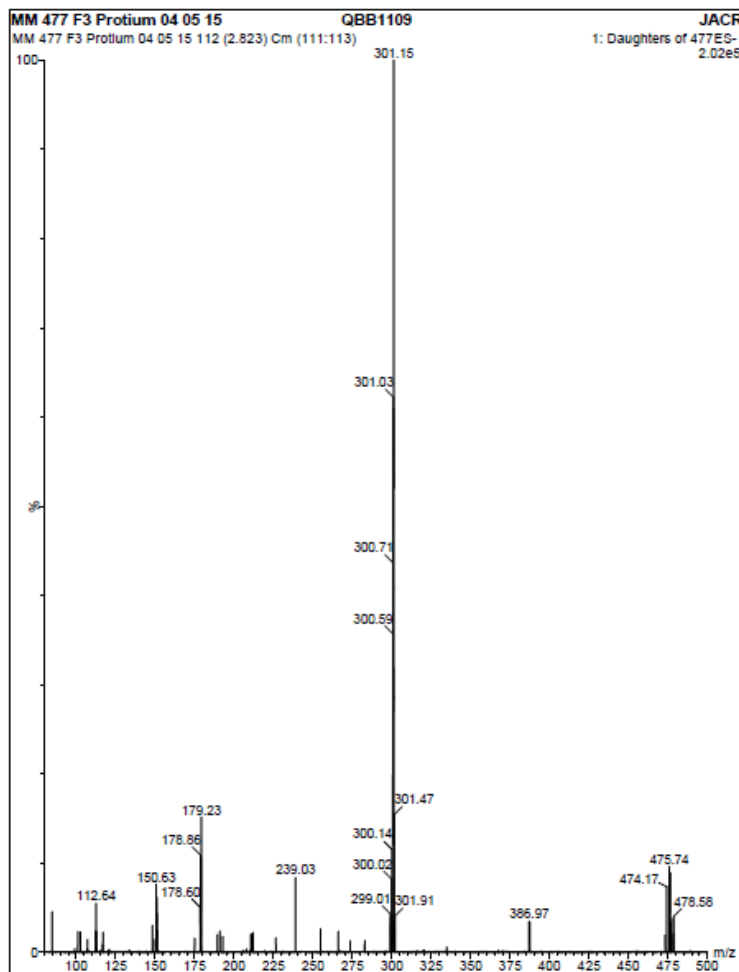
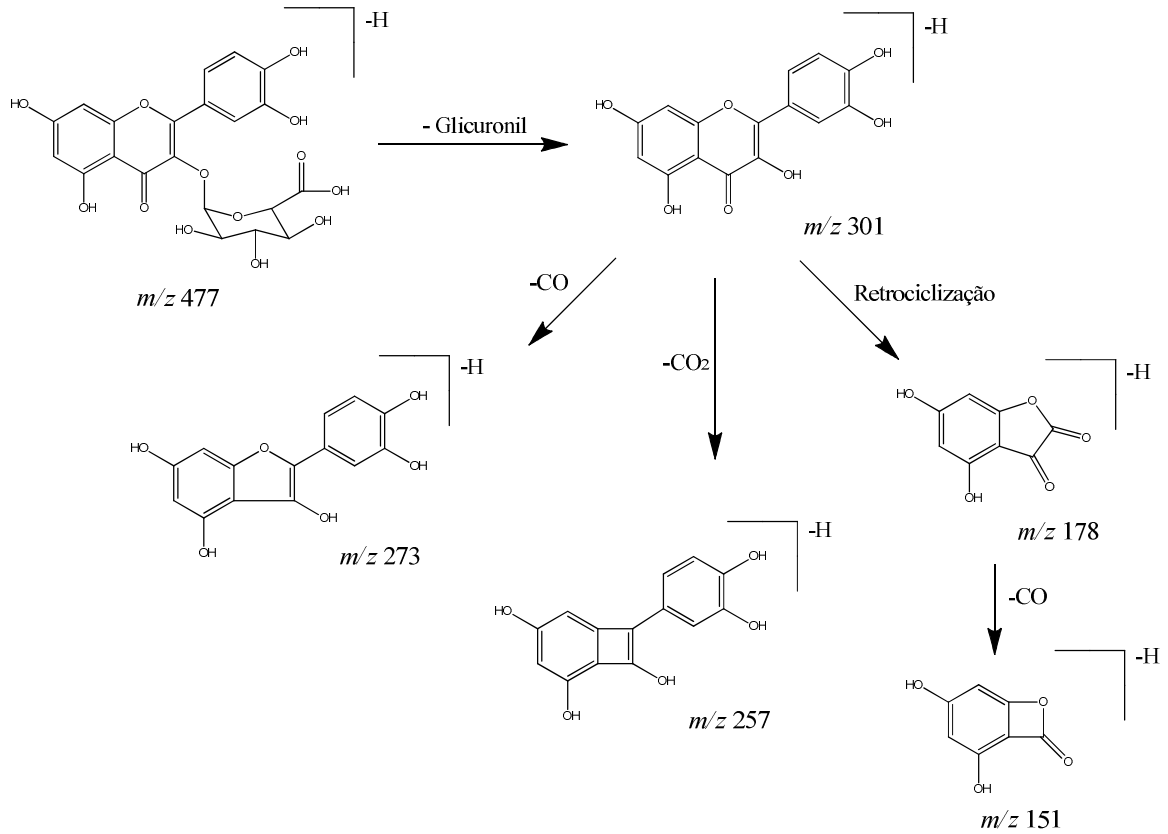
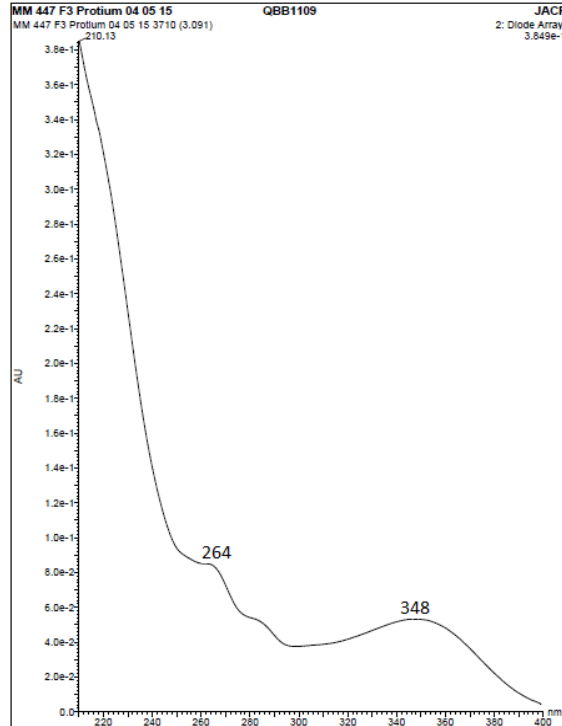


Figura 28: Fragmentação proposta para íons de quercetina-3-O-glicuronídeo.



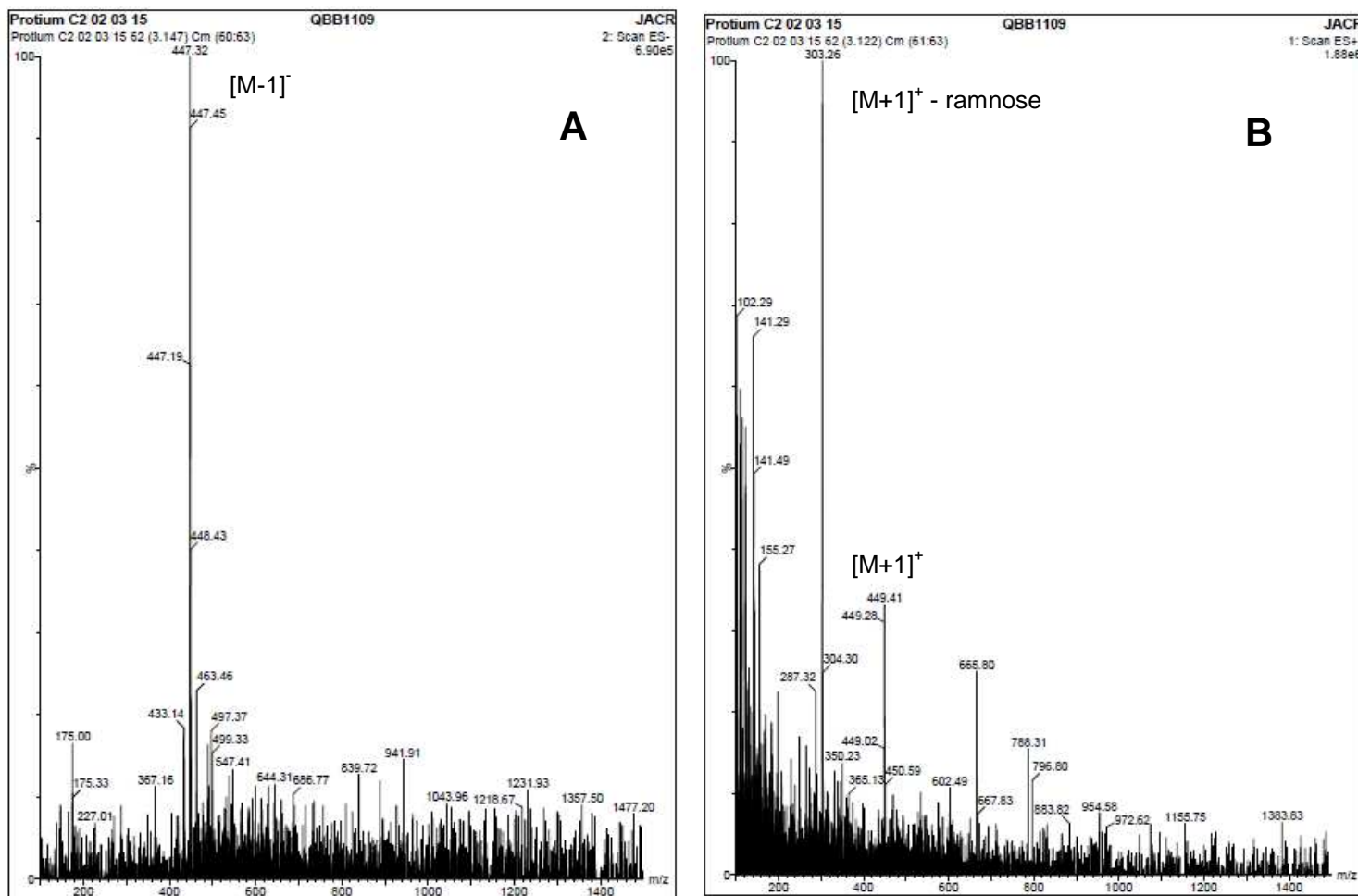
Nos resultados da análise do constituinte de $t_r = 3,07$ min, o espectro no ultravioleta (Figura 29, pág. 81) também foi característico de um flavonol 3-OH substituído: banda I em 348 nm e a banda II em 264 nm (TIBERTI et al., 2007).

Figura 29: Espectro no ultravioleta (UV) do pico em 3,07 min da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* obtido através de CLUE/DADEM-EM



De acordo com o espectro de massas do pico em 3,07 min, no modo negativo (Figura 30 A, pág. 82), o sinal de m/z 447,32 foi atribuído ao íon molecular $[M-1]^-$. No modo positivo (Figura 30 B, pág. 82), o íon molecular $[M+1]^+$ foi relacionado ao sinal de m/z 449,41 e o sinal m/z 303,26, equivalente a perda da unidade de açúcar (ramnose: 146 u). Esses resultados indicaram a presença de quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo).

Figura 30: Espectros de massas do pico em 3,07 min da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* obtido através de CLUE/EM: **A-** Modo negativo e **B-** Modo positivo



Para confirmar a identificação, o sinal de m/z 447 foi selecionado e analisado utilizando espectrometria de massas sequenciais (CLUE/DAD/EM-EM) (Figura 31, pág. 83).

Pelo padrão de fragmentação demonstrado, confirmou-se a presença de quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo), com base no encontrado na literatura (TIBERTI et al., 2007; RUSTAN et al., 2001) (Figura 32, pág. 84). Esse flavonoide já foi isolado do EEB de galhos de *P. spruceanum* (AMPARO et al., 2014).

Figura 31: Espectro de massas do sinal m/z 447 obtido através de CLUE/EM-EM
Modo negativo

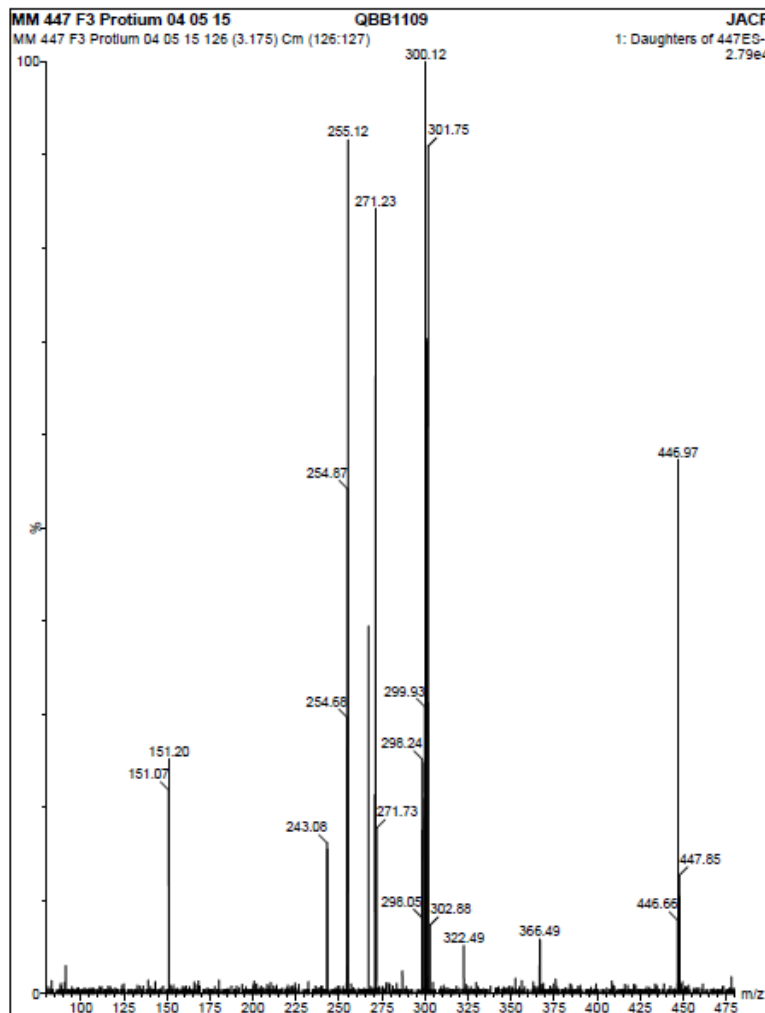
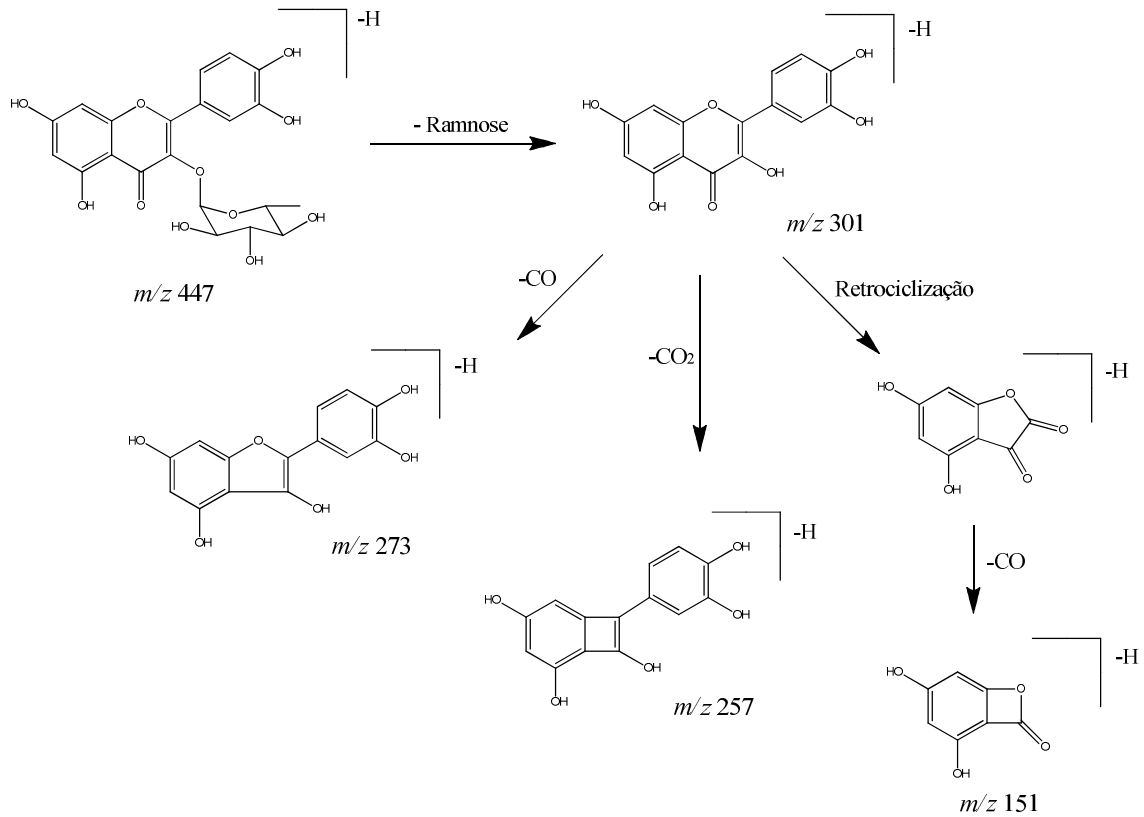
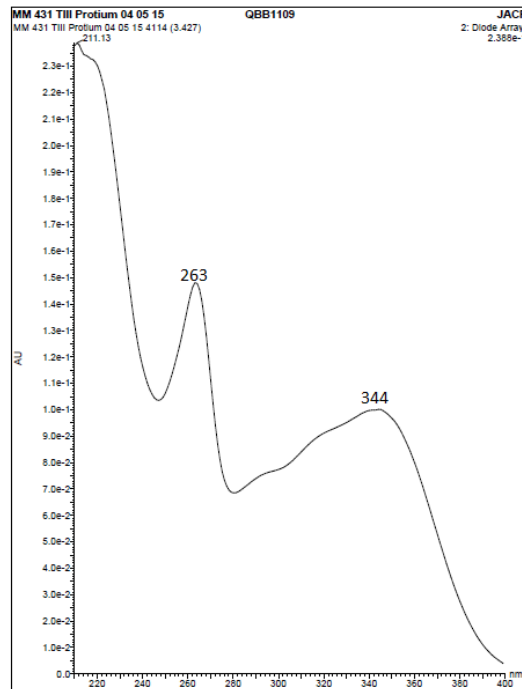


Figura 32: Fragmentação proposta para íons de quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo).



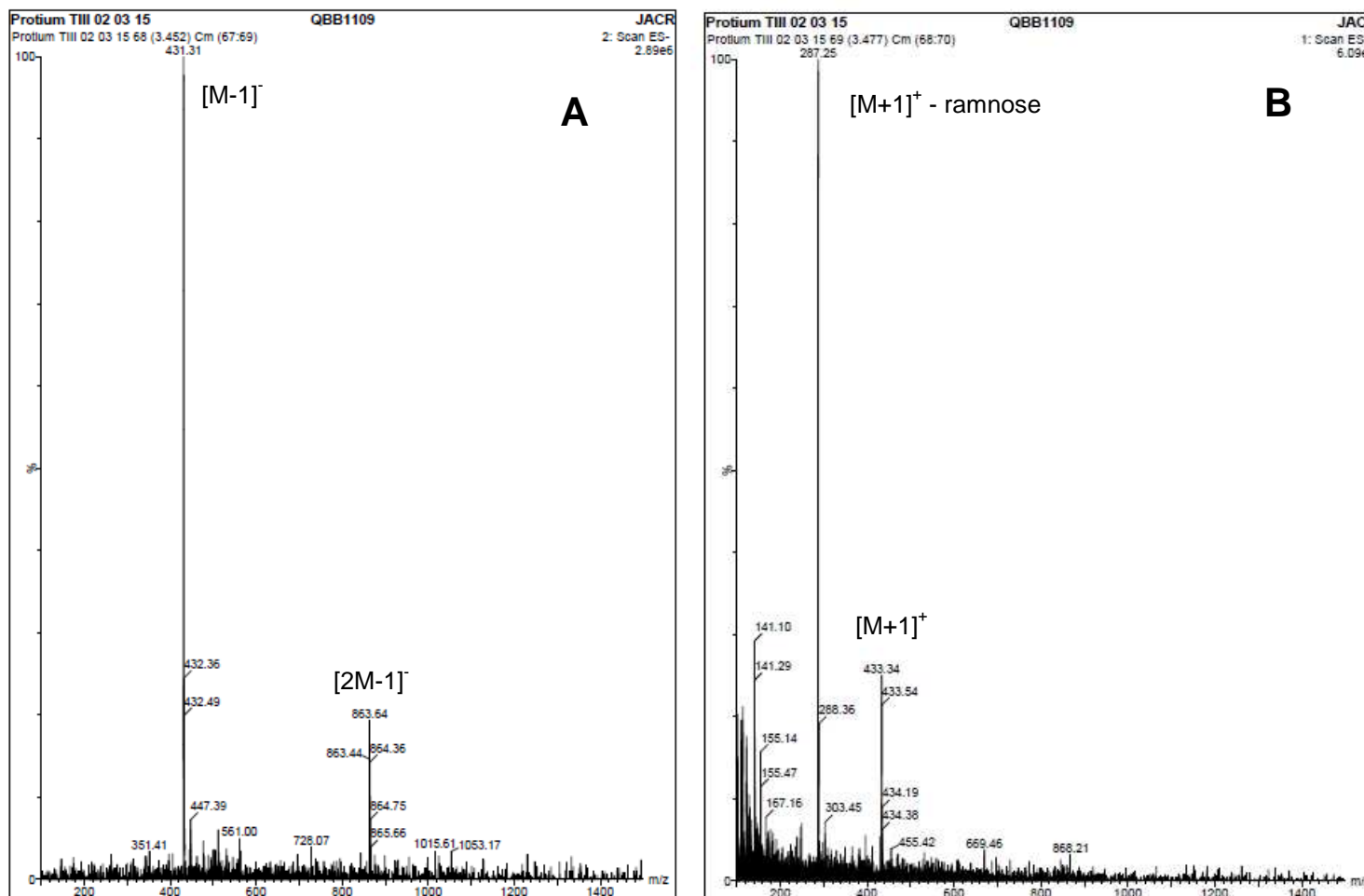
Nos resultados da análise do pico em 3,41 min, o espectro de ultravioleta (Figura 33, pág. 85) também é característico de um flavonol 3-OH substituído: banda I em 344 nm e a banda II em 263 nm (TIBERTI et al., 2007).

Figura 33: Espectro de ultravioleta (UV) do pico em 3,41 min da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* obtido através de CLUE/DADEM-EM



De acordo com o espectro de massas do pico em 3,41 min, no modo negativo (Figura 34 A, pág. 86), o sinal de m/z 431,31 foi atribuído ao íon molecular $[M-1]^-$. No modo positivo (Figura 34 B, pág. 86), o íon molecular $[M+1]^+$ foi relacionado ao sinal de m/z 433,34 e o sinal m/z 287,25 equivalente a perda da unidade de açúcar (ramnose: 146 u). Esses resultados indicaram a presença de campeferol-3-O-ramnosídeo.

Figura 34: Espectros de massas do pico em 3,41 min da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum* obtido através de CLUE/EM: **A-** Modo negativo e **B-** Modo positivo



Para confirmar a identificação, o sinal de m/z 431 foi selecionado e analisado utilizando espectrometria de massas sequenciais (CLUE/DAD/EM-EM) (Figura 35, pág. 87).

O padrão de fragmentação demonstrado confirmou a presença de campeferol-3-O-ramnosídeo, com base com o encontrado na literatura (MARCH & MIAO, 2004; RUSTAN et al., 2001) (Figura 36, pág. 88).

Figura 35: Espectro de massas do sinal m/z 431 obtido através de CLUE/EM-EM
Modo negativo

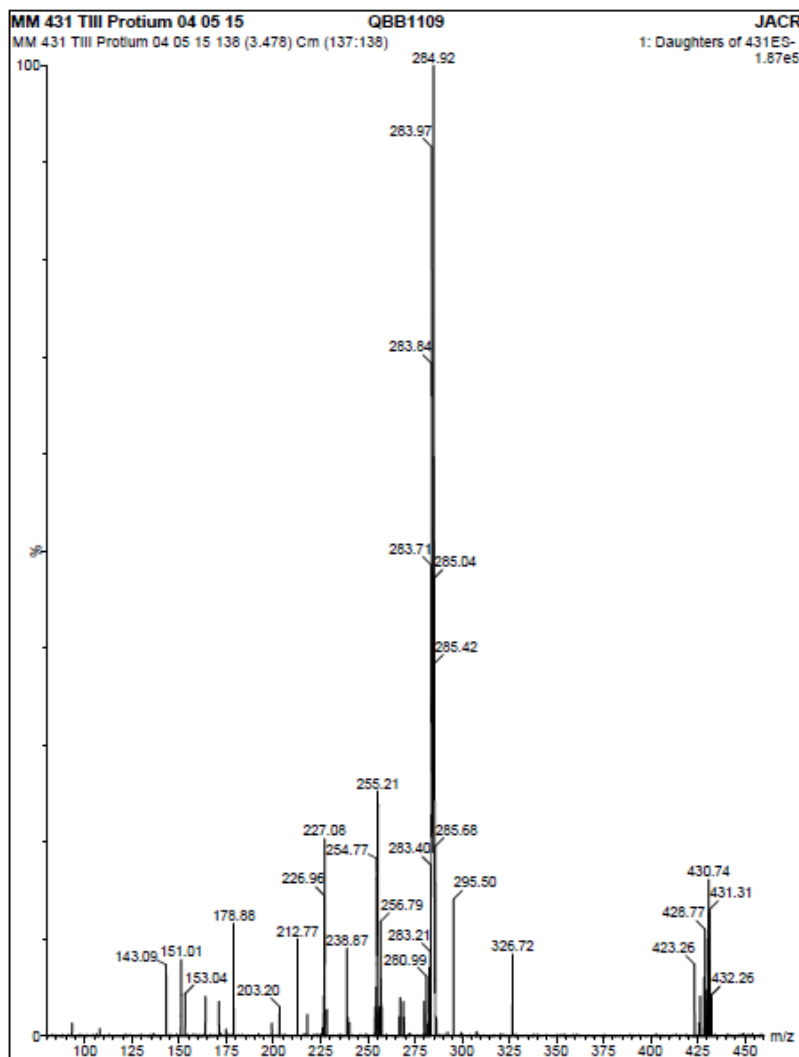
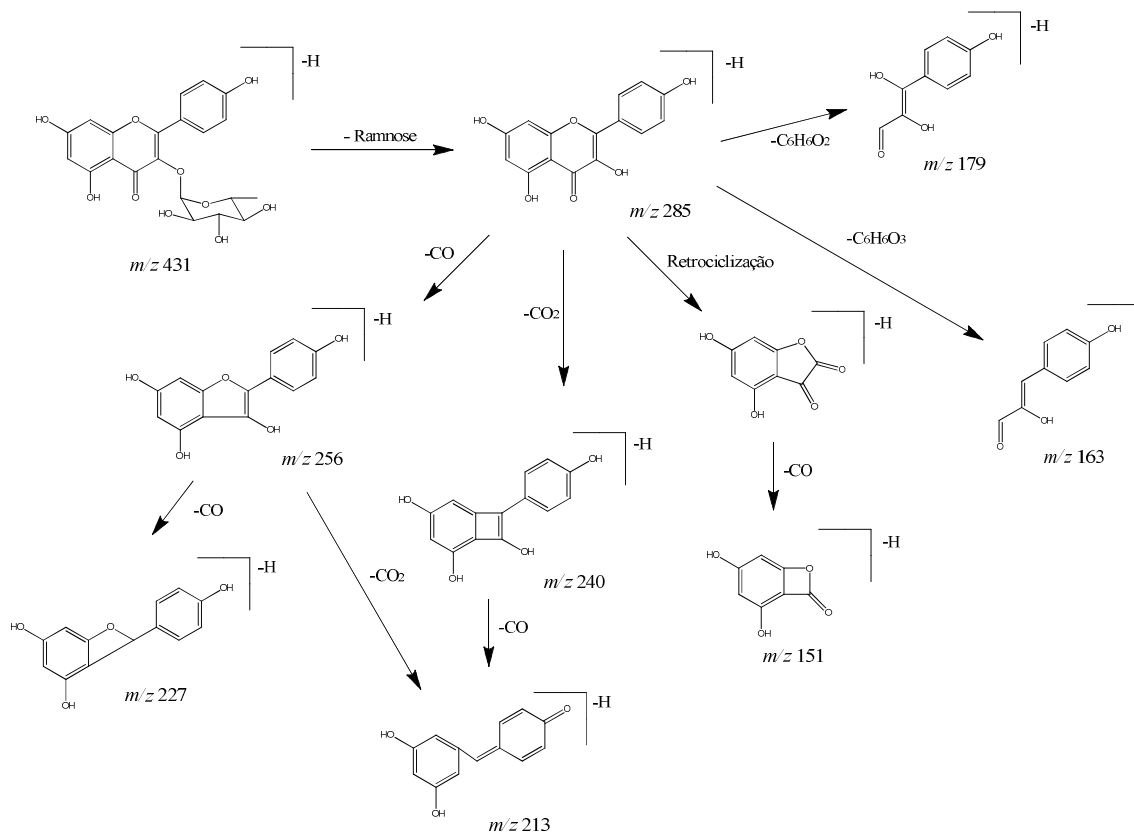
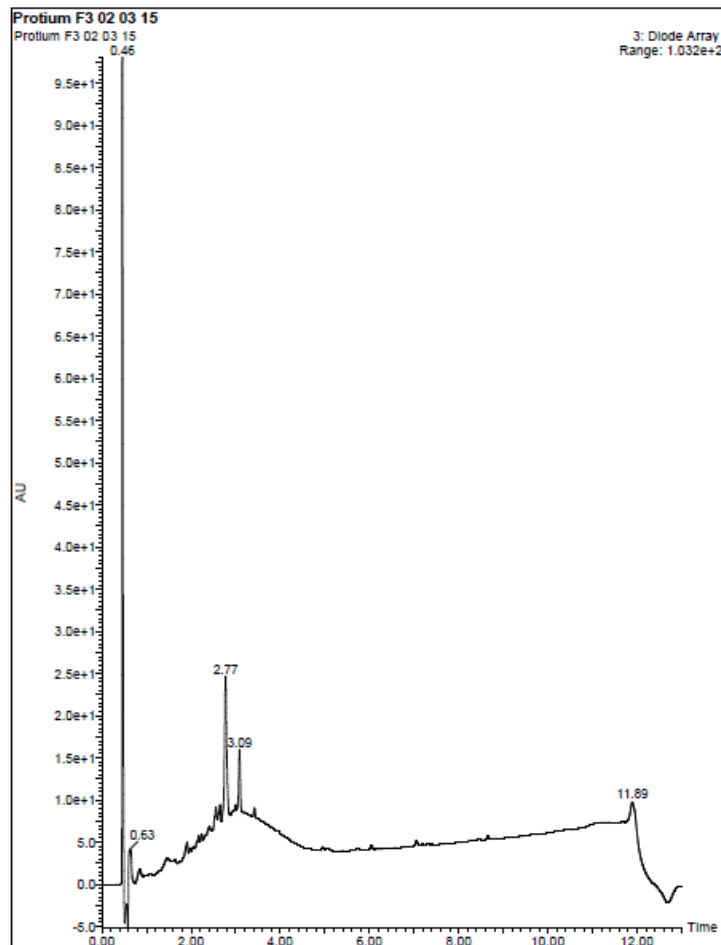


Figura 36: Fragmentação proposta para íons de campeferol-3-O-ramnosídeo.

Através das análises por CLUE/DAD/EM foi possível identificar três flavonoides majoritários da fração AcOEt de folhas de *P. spruceanum*: quercetina-3-O-glicuronídeo, quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) e campeferol-3-O-ramnosídeo.

Em relação à fração HMeOH de folhas, os resultados indicaram a presença de apenas dois compostos majoritários (Figura 37, pág. 89).

Figura 37: Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de folhas de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM



Condições de análise = fase móvel: Água e Acetonitrila, Coluna: CSH 130 C18, Fluxo: 0,3 mL/min.

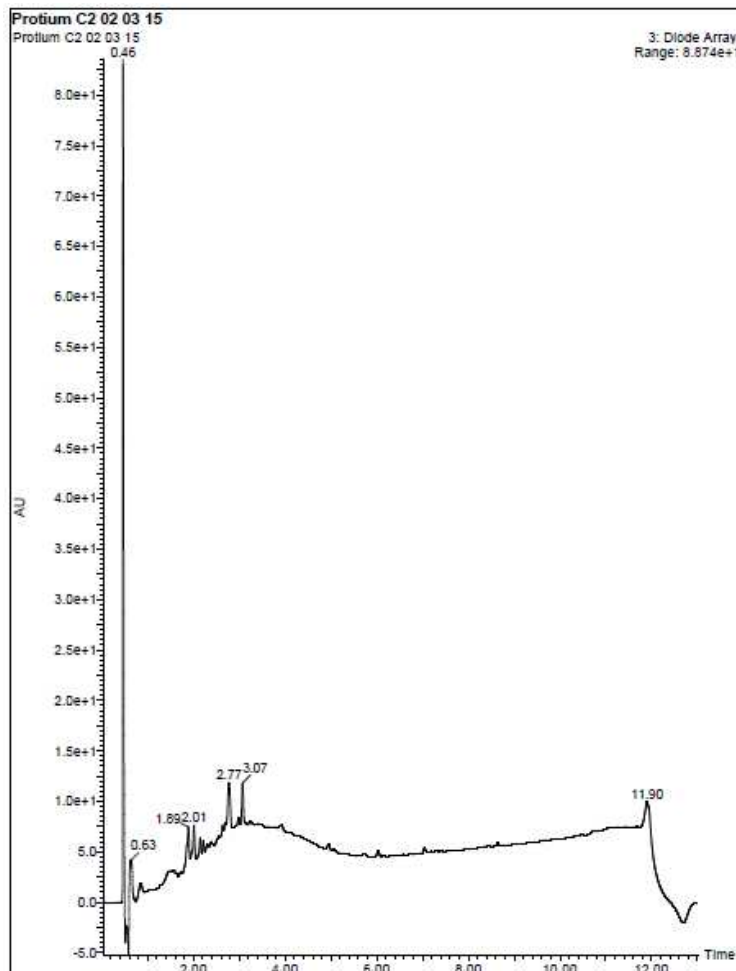
Os picos em 2,77 e 3,09 foram selecionados e analisados utilizando DAD e EM.

Os espectros no ultravioleta e massas do pico em 2,77 min, foram semelhantes aos espectros do mesmo tempo de retenção da fração AcOEt de folhas (Figuras 25 a 27, pág. 77 a 79). Assim, identificou-se a presença de quercetina-3-O-glicuronídeo.

Os espectros no UV e massas do pico em 3,09 min foram semelhantes ao pico em 3,07 min da fração AcOEt (Figuras 29 a 31, pág. 81 a 83), identificando a estrutura como quercitrina (quercetina-3-O-ramnosideo).

Em relação às análises de galhos, nas análises da fração AcOEt de *P. spruceanum* observou-se a presença de quatro picos majoritários (Figura 42, pág. 94).

Figura 38: Cromatograma da fração acetato de etila (AcOEt) de galhos de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM

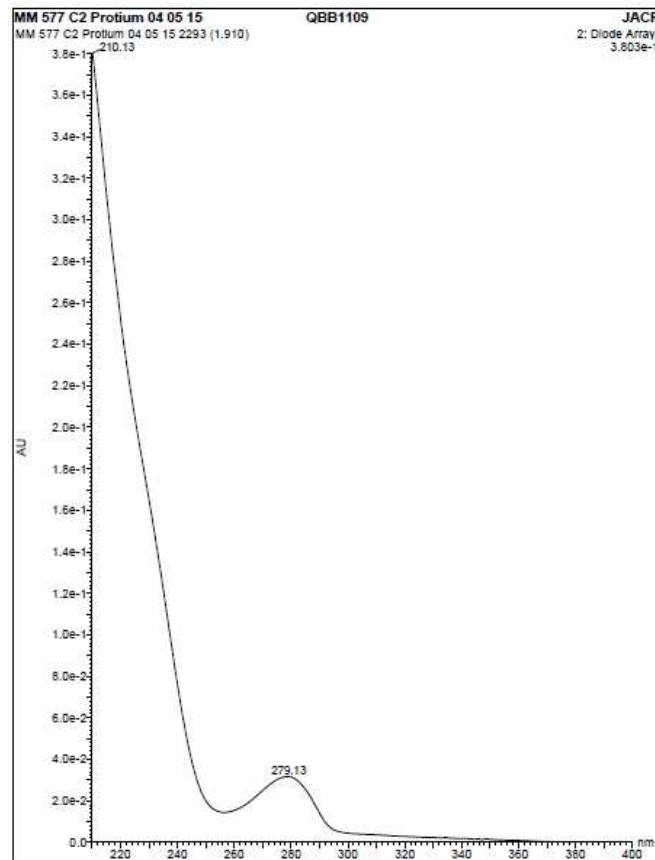


Condições de análise = fase móvel: Água e Acetonitrila, Coluna: CSH 130 C18, Fluxo: 0,3 mL/min.

Os picos em 1,89; 2,01; 2,77 e 3,07 min foram selecionados e analisados utilizando as técnicas de DAD e EM.

O espectro no UV do pico em 1,89 min apresentou somente uma banda em 279 nm (Figura 39, pág. 91).

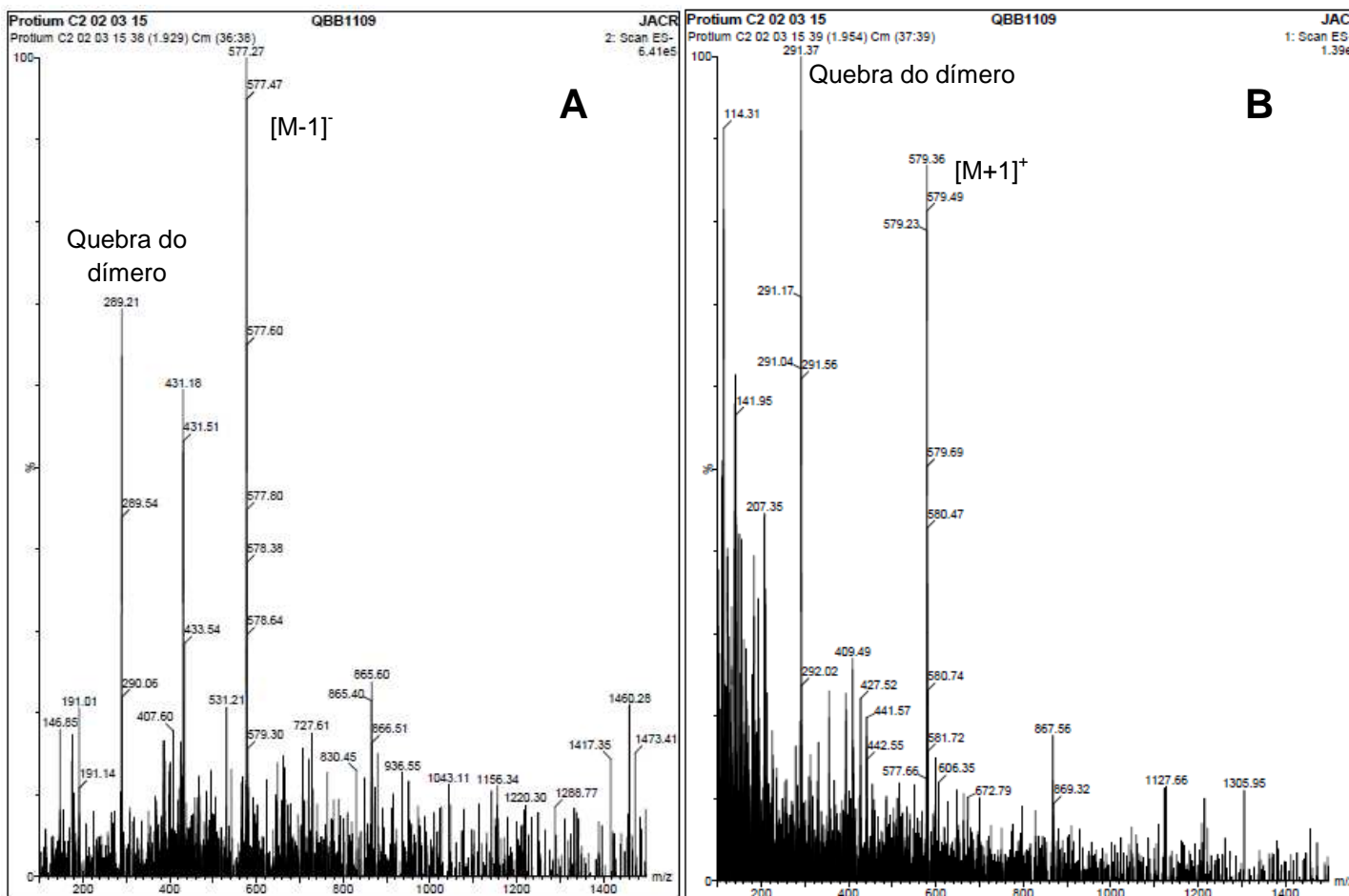
Figura 39: Espectro no UV do pico em 1,89 min da fração AcOEt de galhos de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM



Sendo a fração AcOEt de galhos rica em taninos (item 4.4.4, pág. 57) e diante dos resultados no UV e alto peso molecular do espectro de massas, indicou-se presença de um tanino condensado.

De acordo com o espectro de massas do pico em 1,89 min, no modo negativo (Figura 40 A, pág. 92), o sinal de m/z 577,27 foi atribuído ao íon molecular $[M-1]^-$ e o sinal m/z 289,21 atribuído à quebra do dímero. No modo positivo (Figura 40 B, pág. 92), o íon molecular $[M+1]^+$ foi relacionado ao sinal de m/z 579,36 e o sinal m/z 291,37 equivalente à quebra do dímero. Esses resultados indicaram a presença de um dímero de (epi)catequina (procianidina).

Figura 40: Espectros de massas do pico em 1,89 min da fração AcOEt de galhos de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM: **A-** Modo negativo e **B-** Modo positivo



Para confirmar a identificação, o sinal de m/z 577 foi selecionado e analisado utilizando espectrometria de massas sequenciais (CLUE/DAD/EM-EM) (Figura 41, pág. 93).

O padrão de fragmentação demonstrado confirmou a presença de procianidina do tipo B, com base na literatura (Figura 42, pág. 94) (CALLEMIEN & COLLIN, 2008).

Figura 41: Espectro de massas do sinal m/z 577 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo

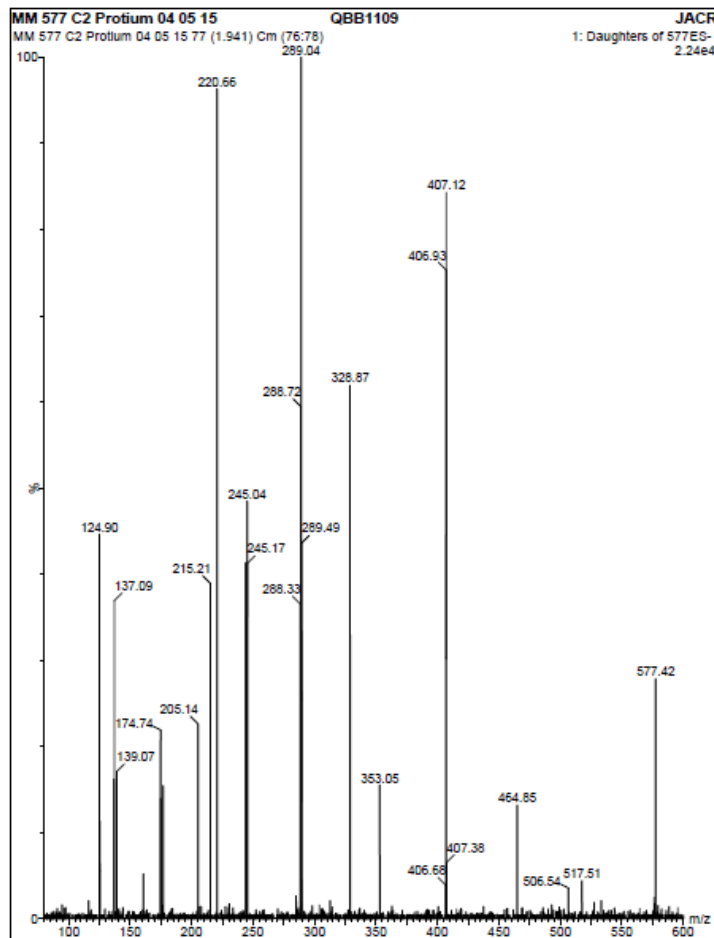
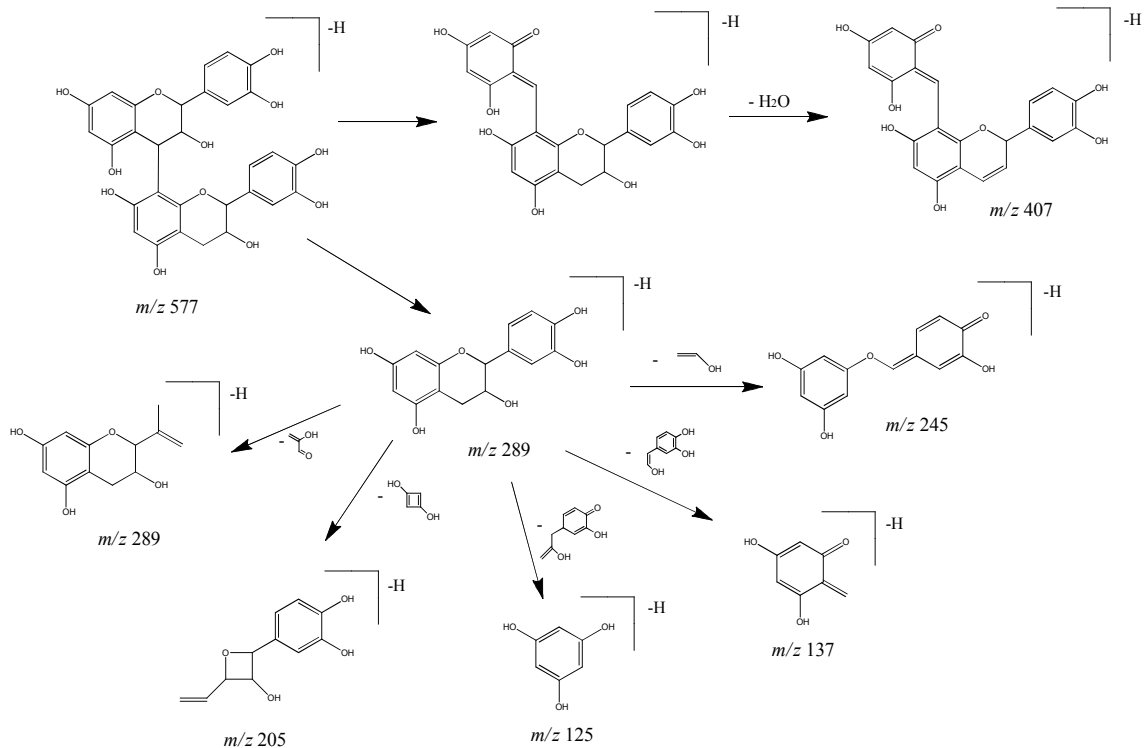


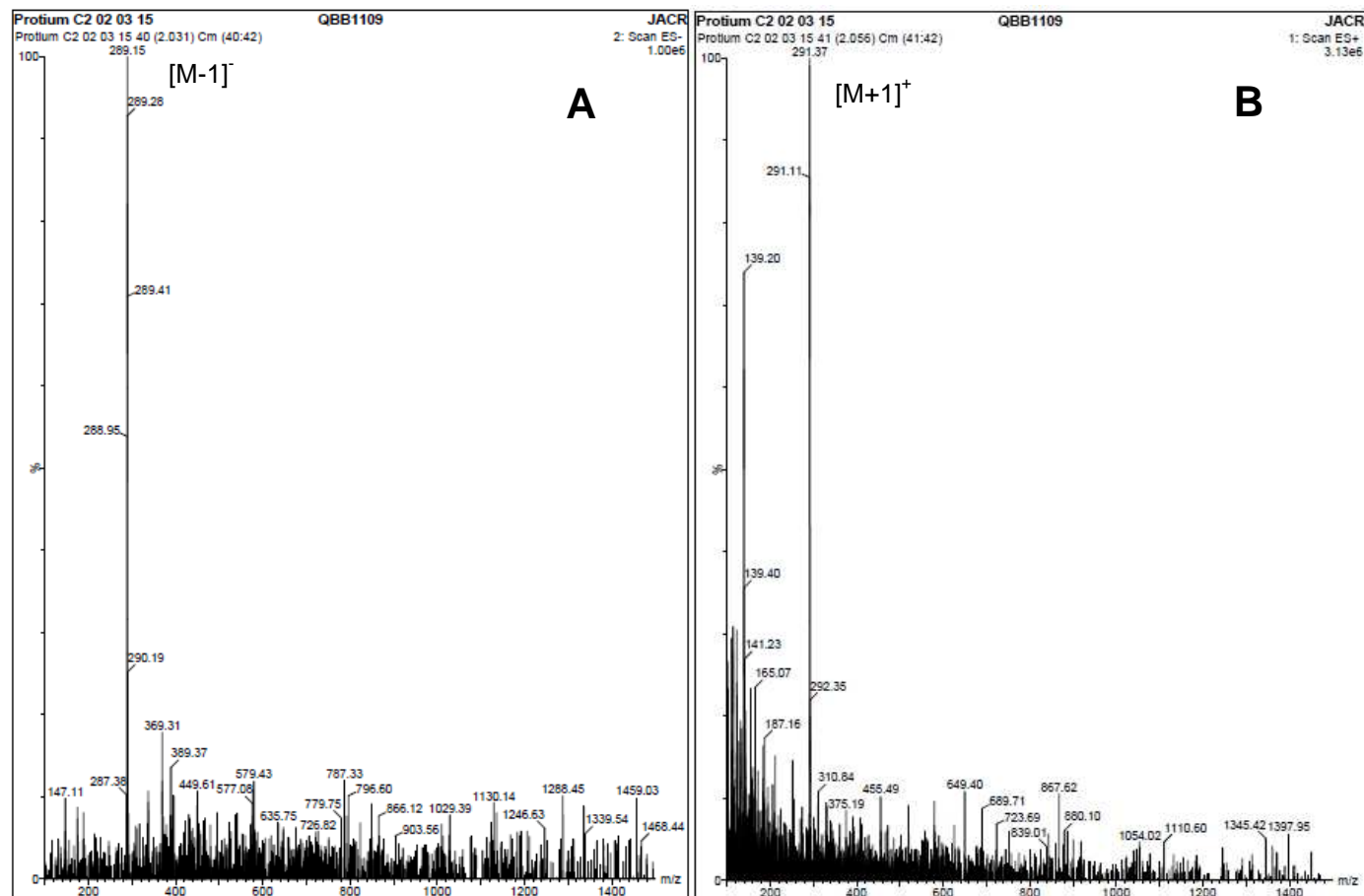
Figura 42: Fragmentação proposta para íons de procianidina tipo B.

O espectro no UV do pico em 2,01 min apresentou espectro no UV semelhante ao pico da procianidina tipo B: somente uma banda em 279 nm, indicando um tanino (Figura 39, pág. 91).

De acordo com o espectro de massas desse pico em 2,01 min, no modo negativo (Figura 43 A, pág. 95), o sinal de m/z 289,15 foi atribuído ao íon molecular $[M-1]^-$. No modo positivo (Figura 43 B, pág. 95), o íon molecular $[M+1]^+$ foi relacionado ao sinal de m/z 291,37. Esses resultados indicaram a presença de (epi)catequina.

Figura 43: Espectros de massas do pico em 2,01 min da fração AcOEt de galhos de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM:

A- Modo negativo e B- Modo positivo



Para confirmar a identificação, o sinal de m/z 289 foi selecionado e analisado utilizando espectrometria de massas sequenciais (CLUE/DAD/EM-EM) (Figura 44, pág. 96).

Por meio do padrão de fragmentação demonstrado foi possível confirmar a presença de catequina, baseado na literatura (Figura 45, pág. 97) (CALLEMIEN & COLLIN, 2008).

Figura 44: Espectro de massas do sinal m/z 289 obtido através de CLUE/EM-EM Modo negativo

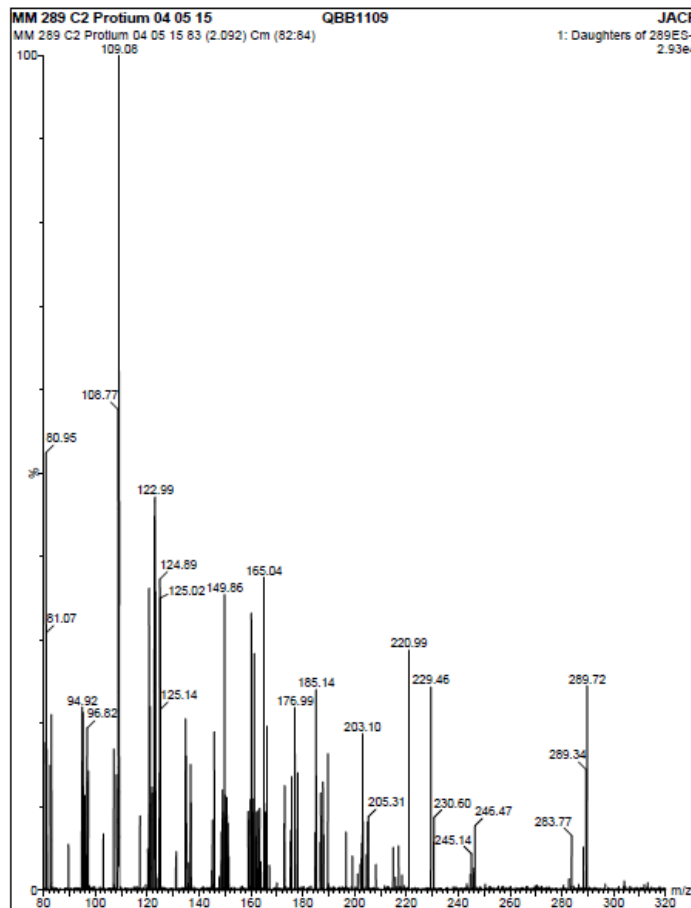
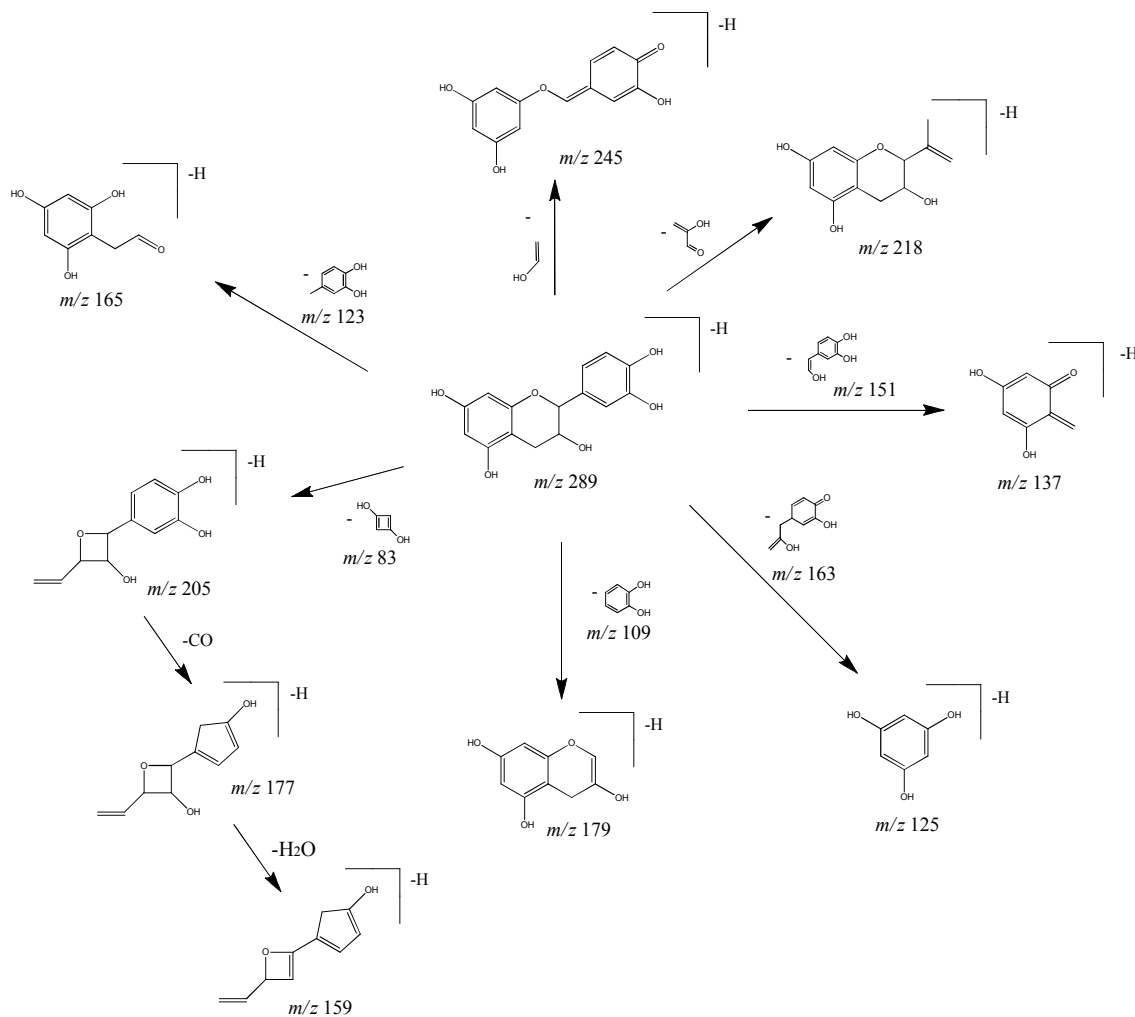


Figura 45: Fragmentação proposta para íons de catequina.



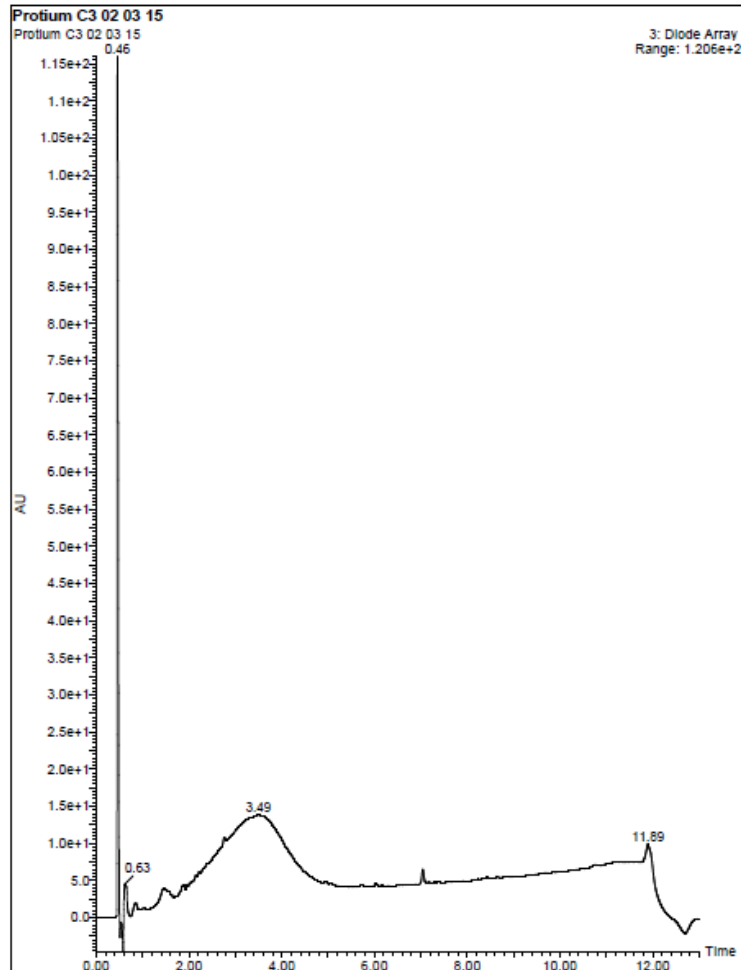
Os espectros no UV e massas do pico em 2,77 min da fração AcOEt de galhos, foram semelhantes aos espectros do constituinte de mesmo tempo de retenção das frações de folhas (Figuras 25 a 27, pág. 77 a 79). Dessa forma, foi identificada a presença de quercetina-3-O-glicuronídeo.

Os espectros no UV e massas do pico em 3,07 min da fração AcOEt de galhos, foram semelhantes aos espectros do constituinte de mesmo tempo de retenção da fração de folhas (Figuras 29 a 31, pág. 81 a 83). Assim, identificou-se a presença de quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo).

Com resultados das análises de CLUE/DAD/EM-EM da fração AcOEt de galhos de *P. spruceanum* foi identificada a presença dos taninos procianidina tipo B e catequina e dos flavonoides quercetina-3-O-glicuronídeo e quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo).

Para a fração HMeOH de galhos não foi possível uma boa separação, sob as condições utilizadas (Figura 46, pág. 98). Portanto, nenhuma substância foi identificada nesta fração.

Figura 46: Cromatograma da fração hidrometanólica (HMeOH) de galhos de *P. spruceanum* obtido por CLUE/DAD/EM



Condições de análise = fase móvel: Água e Acetonitrila, Coluna: CSH 130 C18, Fluxo: 0,3 mL/min.

4.5. Atividade antimicrobiana de α - e β -amirina

Através da avaliação da atividade da mistura de α - e β - amirinas para *S. saprophyticus* e *E. aerogenes* não foi possível determinar a CIM. A maior concentração testada (2,0 mg/mL) inibiu somente 36,0% do crescimento de *S. saprophyticus* e 20,8% de *E. aerogenes*. Dessa forma, esses triterpenos não foram considerados os principais compostos bioativos de *P. spruceanum*, mas podem estar contribuindo para a atividade.

Por meio das análises por CG/EM foi observado α - e β -amirina como componentes majoritários das frações Hex (Tabelas 23 e 27, pág. 65 e 72). Essas substâncias juntas representam 48,5% e 47,8% das frações das folhas e dos galhos, respectivamente. A baixa atividade antimicrobiana desses triterpenos corrobora com os resultados de fraca atividade dessas frações.

α - e β -amirina também estão presentes nas frações AcOEt (Tabelas 24 e 28, pág. 67 e 73), porém em menores porcentagens. Essas frações possuem efeito aditivo ou sinérgico com as frações HMeOH (Tabelas 13 e 14, pág. 47 e 48). Devido às porcentagens de atividade bacteriostática de α - e β -amirina observadas, foi realizada uma avaliação do efeito entre a mistura triterpênica e a fração HMeOH das folhas.

Com adição de 25% de mistura de α - e β -amirina na fração HMeOH não houve mudança na CIM (0,625 mg/mL) dessa fração para *S. saprophyticus*, para a qual as frações AcOEt e HMeOH mostraram efeito aditivo.

A fração HMeOH não foi ativa contra *E. aerogenes* mas possui efeito sinérgico com a fração AcOEt. Com a adição de α - e β - amirinas a fração HMeOH permaneceu sem atividade.

Com esses resultados conclui-se que α - e β -amirina não são os principais constituintes da fração AcOEt que estão relacionados ao efeito sinérgico.

Na literatura, existem relatos da atividade antimicrobiana de α - e β -amirina para diversas bactérias, porém, existem divergências em relação à CIM (Tabela 30, pág. 100). As diferenças entre esses estudos e o presente estudo podem ser devido às variações nas cepas utilizadas e na forma de solubilização das substâncias. Para fins de comparação entre os resultados é necessário realizar novos experimentos com padronização das variáveis.

Tabela 30: Resultados de atividade antimicrobiana de α - e β - amirinas e variáveis dos estudos encontrados na literatura e do presente estudo

Referência	Meio	Inóculo	Substância testada	Micro-organismos (CIM $\mu\text{g/mL}$)
Presente estudo	Mueller-Hinton/evaporação do solvente	5×10^5 UFC/mL	mistura de α - e β -amirinas	<i>S. saprophyticus</i> (> 2000) <i>E. aerogenes</i> (> 2000)
Kiplimo et al., 2011	Mueller-Hinton com DMSO 16%	$1,2 \times 10^7$ UFC/mL	mistura de α - e β -amirinas	<i>S. aureus</i> (250) <i>E. faecium</i> (250) <i>S. saprophyticus</i> (250) <i>E. coli</i> (120) <i>K. pneumoniae</i> (500) <i>P. aeruginosa</i> (1000)
Jiang-Ling et al., 2015	Mueller-Hinton com DMSO 5%	5×10^5 UFC/mL	α -amirina	<i>S. aureus</i> (> 100) <i>E. faecalis</i> (> 100) <i>E. coli</i> (> 100)
Chung et al., 2011	Mueller-Hinton com MeOH 50%	5×10^5 UFC/mL	α -amirina	<i>S. aureus</i> (64)
Martins et al., 2011	Mueller-Hinton	5×10^5 UFC/mL	β -amirina	<i>S. aureus</i> (> 200) <i>S. enteritidis</i> (> 200) <i>E. coli</i> (> 200) <i>E. faecalis</i> (> 200)
Rivero-Cruz et al., 2009	BHI com DMSO 2,5%	$2,5 \times 10^6$ UFC/mL	β -amirina	<i>S. aureus</i> (256) <i>E. coli</i> (1024) <i>K. pneumoniae</i> (1024) <i>P. aeruginosa</i> (1024)

4.6. Avaliação *in silico* da atividade antimicrobiana dos constituintes

Os resultados da correlação entre probabilidade de ser ativo (P_a) e inativo (P_i) das análises de dados gerados pela ferramenta PASSonline foram classificados como:

- $P_a - P_i < 0,2$: Baixo potencial
- $0,2 \leq P_a - P_i < 0,5$: Moderado potencial
- $P_a - P_i \geq 0,5$: Alto potencial

Foi possível realizar a identificação de oito potenciais efeitos biológicos relacionados com atividade antimicrobiana (Tabela 31, pág. 102).

A maioria dos componentes que foram identificados nos EEBs e frações de folhas e galhos de *P. spruceanum*, com exceção do estigmasterol, apresentaram potencial efeito antibacteriano ($P_a > P_i$) (1-Tabela 31, pág. 102). Os componentes considerados de alto potencial ($P_a - P_i \geq 0,5$) foram os flavonoides, identificados nas frações mais polares: campeferol-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e quercitrina ($P_a - P_i: 0,6$). Esses resultados corroboram com a maior atividade antibacteriana que as frações AcOEt e HMeOH apresentaram nos testes *in vitro*, em relação às frações hexânicas (item 4.3.3, pág. 36).

Quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) possui atividade relatada contra *Bacillus subtilis* (CIM: 0,13 mg/mL) e *C. albicans* (CIM: 0,25 mg/mL) (ADEROGBA et al., 2013). A atividade antimicrobiana de campeferol-3-O-ramnosídeo e quercetina-3-O-glicuronídeo ainda não foi publicada, sendo necessários estudos experimentais para confirmação do potencial indicado pelos resultados *in silico*.

A amirina apresentou baixo potencial *in silico* ($P_a - P_i: 0,1$) para atividade antibacteriana, corroborando com os resultados obtidos *in vitro* (item 4.5, pág. 99)

Em relação à atividade antifúngica (2), todos os compostos identificados apresentaram potencial ($P_a > P_i$). A maioria dos compostos de maior potencial ($P_a - P_i \geq 0,5$), também são constituintes das frações mais polares, como por exemplo: os flavonoides, a catequina, o sitosterol e o espatulenol.

Diversos compostos das frações hexânicas também apresentaram alto potencial antifúngico, como α -amirina ($P_a - P_i: 0,6$), constituinte majoritário dessas frações.

A atividade antifúngica de quercitrina (YANHUA et al., 2002), catequina (ALVES et al., 2014), amirina (JOHANN et al., 2007) e sitosterol (MBAMBO et al., 2012) já foi comprovada.

Tabela 31: Previsões *in silico* dos potenciais efeitos biológicos, utilizando a ferramenta PASSonline, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Constituinte	Potencial efeito biológico*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	0,4	0,6	0,4	0,3	-	0,2	0,2	0,5
4-propil-fenol	0,1	0,3	0,5	0,2	0,3	0,2	-	0,4
Adipato de bis(2-etil-hexila)	0,1	0,4	0,4	0,1	0,1	0,3	-	0,5
Benzoato de metila	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	-	0,4
Bisabolol	0,4	0,5	-	0,2	-	0,1	0,2	0,4
Campeferol-3-O-ramnosídeo	0,6	0,7	0,7	0,6	0,1	0,4	0,4	0,5
Campesterol	0,2	0,6	-	0,2	-	-	0,1	0,5
Cariofileno	0,4	0,6	-	0,1	-	0,2	0,3	0,3
Catequina	0,3	0,6	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,3
Espatuleno	0,4	0,5	-	-	-	0,1	0,3	0,2
Esqualeno	0,4	0,5	0,3	0,5	0,2	0,2	0,1	0,6
Estearato de metila	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,1	0,5
Estigmast-4-en-3-ona	0,1	0,4	-	0,1	-	-	-	0,3
Estigmasterol	-	0,5	-	-	-	-	0,1	0,4
Fitol	0,4	0,6	0,4	0,3	-	0,2	0,2	0,5
Friedelan-3-one	0,2	0,4	-	-	0,1	0,1	0,2	0,3
Linoleato de etila	0,2	0,5	0,5	0,4	0,1	0,3	-	0,5
Linoleato de metila	0,2	0,5	0,4	0,4	0,1	0,2	0,1	0,5
Linolenato de metila	0,3	0,5	0,3	0,4	0,1	0,3	-	0,5
Palmitato de metila	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,1	0,5
Procianidina	0,4	0,5	-	-	-	-	-	0,1
Quercetina-3-O-glicuronídeo	0,6	0,7	0,6	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4
Quercitrina	0,6	0,7	0,7	0,6	0,1	0,3	0,4	0,5
Sitosterol	0,2	0,6	0,2	0,3	-	-	0,1	0,5
Vitamina E	0,1	0,3	0,2	-	-	-	-	-
α - amirina	0,1	0,6	-	-	-	-	0,1	0,3

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$).

1- Antibacteriano; 2- Antifúngico; 3- Anti-infeccioso; 4- Anti-micobacteriano; 5- Inibição da biossíntese da parede bacteriana; 6- Inibição da síntese de DNA; 7- Inibição da síntese proteica; 8- Potencializador da permeabilidade da membrana.

Em geral, os resultados *in silico* de potencial antifúngico foram melhores que para potencial antibacteriano. Apesar disso, somente os EEBs e as combinações das frações AcOEt e HMeOH apresentaram atividade contra a levedura *C. albicans* nos testes *in vitro*.

A atividade contra a levedura pode ser resultante da ação sinérgica entre os constituintes, como indicado pelos resultados do efeito sinérgico entre as frações mais polares (AcOEt e HMeOH) (item 4.3.4, pág. 46). Além disso, também resalta-se a possibilidade de melhor atividade contra fungos filamentosos, que não foram testados.

Os resultados *in silico* para os efeitos anti-infeccioso (3-Tabela 31, pág. 102) e anti-micobacteriano (4-Tabela 31, pág. 102), confirmaram o maior potencial antimicrobiano dos flavonoides glicosilados.

Visando direcionar a discussão do potencial efeito antimicrobiano dos compostos, foram analisados também os resultados para os efeitos biológicos que são os principais alvos de ação dos antibióticos clássicos: Inibição da biossíntese da parede bacteriana (5); Inibição da síntese de DNA (6); Inibição da síntese proteica (7) (Tabela 31, pág. 102).

A inibição da biossíntese da parede bacteriana é o alvo de ação dos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, carbapenens e cefalosporinas (KOHANSKI et al., 2010). 46,15% dos compostos analisados apresentaram potencial para esse efeito biológico (5-Tabela 31, pág. 102). Dentre esses, 4-propil-fenol, ácido benzóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, catequina, esqualeno e quercetina-3-O-glicuronídeo foram atribuídos a moderado potencial ($0,2 \leq Pa-Pi < 0,5$). Os demais resultaram em baixo potencial ($Pa-Pi < 0,2$).

Os antibióticos da classe das quinolonas, como levofloxacino e ciprofloxacino, atuam inibindo a síntese de DNA (KOHANSKI et al., 2010). Para esse efeito biológico (6-Tabela 31, pág. 102), os resultados indicaram potencial ($Pa > Pi$) para 60% dos compostos identificados, com moderado potencial ($0,2 \leq Pa-Pi < 0,5$).

Outro alvo de ação dos antibióticos é a inibição da síntese proteica, como as tetraciclínas (KOHANSKI et al., 2010). Aproximadamente 60% dos compostos apresentaram de moderado a baixo potencial para esse efeito (7-Tabela 31, pág. 102).

Além desses efeitos biológicos, também foram analisados os resultados *in silico* como potencializador da permeabilidade da membrana (8-Tabela 31, pág. 102). A maioria dos compostos analisados, exceto vitamina E, possuem potencial para esse efeito ($P_a > P_i$).

O aumento da permeabilidade celular facilita o acesso a fármacos. Por exemplo, o sinergismo entre aminoglicosídeos e β -lactâmicos resulta da ação dos aminoglicosídeos sobre a membrana (KOHANSKI et al., 2010).

O aumento da permeabilidade da membrana por bisabolol (P_a : 0,4) já foi estudado. Esse sesquiterpenoide rompeu a membrana celular e demonstrou aumentar a sensibilidade bacteriana a eritromicina, vancomicina e gentamicina. A interação dos sesquiterpenoides com a membrana está relacionada à semelhança de sua estrutura com os lipídeos da bicamada (caráter lipofílico com terminais mais polares) (BREHM-STECHER & JOHNSON, 2003).

Com o objetivo de analisar também os mecanismos relacionados aos efeitos antimicrobianos, foram analisados os resultados como: inibidor da DNA girase (1), inibidor da DNA topoisomerase IV (2), inibidor da subunidade ribossomal 30S (3), inibidor da subunidade ribossomal 50S (4), inibidor de RNA polimerase dependente de DNA (5) (Tabela 32, pág. 105). Esses são os principais mecanismos de ação das classes dos antibióticos mais utilizados.

As enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV, alvos de ação das quinolonas, são fundamentais no processo de replicação do DNA bacteriano (KOHANSKI et al., 2010). Dos constituintes identificados, 19,2% mostraram potencial ($P_a > P_i$) para inibição da DNA girase: os flavonoides e a procianidina ($P_a - P_i < 0,2$) e a catequina ($0,2 \leq P_a - P_i < 0,5$) (1-Tabela 32, pág. 105). Em relação à inibição da DNA topoisomerase IV, nenhum dos constituintes resultou em potencial satisfatório ($P_a > P_i$) (2-Tabela 32, pág. 105).

Dessa forma, indica-se que a inibição dessas enzimas, não é o principal mecanismo de ação antimicrobiano dos constituintes EEBs e frações de *P. spruceanum*. Os resultados de potencial efeito de inibição da síntese de DNA (6-Tabela 31, pág. 102) podem ser resultantes da inibição de outras enzimas.

Tabela 32: Previsões *in silico* dos potenciais mecanismos antimicrobianos (1-7), utilizando a ferramenta PASSonline*, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Constituinte	Potencial mecanismo antimicrobiano*				
	1	2	3	4	5
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	-	-	-	-	-
4-propil-fenol	-	-	-	-	0,1
Adipato de bis(2-etil-hexila)	-	-	-	-	-
Benzoato de metila	-	-	-	-	0,1
Bisabolol	-	-	-	-	0,1
Campeferol-3-O-ramnosídeo	-	-	-	-	0,2
Campesterol	0,1	-	0,2	0,2	0,3
Cariofileno	-	-	-	-	-
Catequina	-	-	-	-	-
Espatuleno	0,2	-	0,1	-	0,2
Esqualeno	-	-	-	0,1	-
Estearato de metila	-	-	-	-	-
Estigmast-4-en-3-ona	-	-	-	-	0,1
Estigmasterol	-	-	-	-	-
Fitol	-	-	-	-	-
Friedelan-3-one	-	-	-	-	-
Linoleato de etila	-	-	-	-	0,1
Linoleato de metila	-	-	-	-	0,1
Linolenato de metila	-	-	-	-	0,1
Palmitato de metila	-	-	-	-	0,1
Procianidina	0,1	-	-	-	0,1
Quercetina-3-O-glicuronídeo	0,1	-	0,1	0,1	0,3
Quercitrina	0,1	-	0,2	0,1	0,3
Sitosterol	-	-	-	-	-
Vitamina E	-	-	-	-	-
α- amirina	-	-	-	-	-

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$).

1- inibidor da DNA girase; 2- inibidor da DNA topoisomerase IV; 3- inibidor da subunidade ribossomal 30S; 4- inibidor da subunidade ribossomal 50S; 5- inibidor da RNA polimerase dependente de DNA.

A inibição da síntese proteica através das subunidades ribossomais 30S e 50S está entre os principais mecanismos de ação. Inibidores da subunidade 50S incluem eritromicina e cloranfenicol e os inibidores de 30S incluem as tetraciclinas (KOHANSKI et al., 2010).

Dos constituintes identificados, quatro deles apresentaram potencial para inibição das subunidades ribossomais 30S (3-Tabela 32, pág. 105) e 50S (4-Tabela 32, pág. 105): campeferol-3-O-ramnosídeo (Pa-Pi: 0,2 para ambas), quercitrina (Pa-Pi: 0,2 e 0,1 respectivamente), quercetina-3-O-glicuronídeo (Pa-Pi: 0,1 para ambas), catequina (Pa-Pi: 0,1 para 30S) e espatulenol (Pa-Pi: 0,1 para 50S).

Sendo assim, sugere-se que a inibição das subunidades ribossomais, principal mecanismo de inibição da síntese proteica, não seja o principal alvo de ação dos constituintes de *P. spruceanum*.

Outro mecanismo de ação de inibição da síntese proteica analisado foi inibição da RNA polimerase dependente de DNA, alvo das rifamicinas (KOHANSKI et al., 2010). Dos compostos identificados, 53,8% possuem potencial de inibição dessa enzima (5-Tabela 32, pág. 105). Dentre esses, a maioria com baixo potencial (Pa-Pi < 0,2) e apenas 5 indicaram possuir moderado potencial: bisabolol (Pa-Pi: 0,2), campeferol-3-O-ramnosídeo (Pa-Pi: 0,3), catequina (Pa-Pi: 0,2), quercetina-3-O-glicuronídeo (Pa-Pi: 0,3) e quercitrina (Pa-Pi: 0,3).

Portanto, sugere-se que a inibição da RNA polimerase dependente de DNA também não seja o principal alvo de ação dos constituintes de *P. spruceanum*.

Diante dos resultados *in silico* de baixo potencial para os mecanismos de ação dos antibióticos clássicos, também foram analisados mecanismos considerados como alvos para novos antimicrobianos: inibidor de NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase (6); inibidor de piruvato cinase (7); inibidor de peptidoglicano glicosiltransferase (8); inibidor de 2-deidropantoato 2-redutase (9); inibidor de CDP-glicerol glicerofosfotransferase (10); inibidor de micotiol-S-conjugado amidase (11) (Tabela 33, pág. 108).

A enzima NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase é responsável pela transferência de ADP-ribose para grupos arginina de uma proteína alvo, modificando-a covalentemente. Apesar da ADP-ribosilação estar envolvida com

a toxicidade de importantes infecções bacterianas, poucos estudos sobre inibidores destas enzimas têm sido descritos. A utilização de inibidores dessa toxina seria útil para controlar os efeitos prejudiciais de infecções, mesmo que os agentes patogênicos alvos sejam resistentes aos antibióticos (MAURER et al., 2011).

Os resultados *in silico* indicaram alto potencial de inibição da NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase (6-Tabela 33, pág. 108) para: 4-propil-fenol (Pa-Pi: 0,6), benzoato de metila (Pa-Pi: 0,5), campeferol-3-O-ramnosídeo (Pa-Pi: 0,8), esqualeno (Pa-Pi: 0,6), quercetina-3-O-glicuronídeo (Pa-Pi: 0,6) e quercitrina (Pa-Pi: 0,7).

A piruvato cinase catalisa a etapa final da glicólise com conversão irreversível de fosfoenolpiruvato para piruvato. Essa enzima é essencial para a viabilidade de bactérias, como *S. aureus*, e por isso é considerada um novo alvo para fármacos (ZORAGHI et al., 2011).

Os flavonoides identificados (campeferol-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e quercitrina), apresentaram alto potencial como inibidores da piruvato cinase (7-Tabela 33, pág. 108) (Pa-Pi: 0,8).

A maioria dos fármacos que possuem como alvo a biossíntese da parede celular atuam inibindo a síntese de peptideoglicanos. Essas macromoléculas envolvem as bactérias, dando forma e proteção, e a inibição de sua síntese causa lise das células. A síntese envolve duas enzimas: glicosiltransferase e transpeptidase (DEROUAUX et al., 2013).

A glicosiltransferase sintetiza cadeias de glicano e a transpeptidase cataliza a ligação cruzada de duas cadeias de glicano com as cadeias laterais do peptídeo. Inibidores da transpeptidase já são utilizados na terapia, como os β -lactâmicos, já os inibidores da glicosiltransferase ainda estão sendo desenvolvidos (DEROUAUX et al., 2013).

Tabela 33: Previsões *in silico* dos potenciais mecanismos antimicrobianos (6-11), utilizando a ferramenta PASSonline*, dos componentes identificados nos extratos e frações de folhas e galhos de *Protium spruceanum*

Constituinte	Potencial mecanismo antimicrobiano*					
	6	7	8	9	10	11
3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	0,4	0,1	0,5	0,4	0,3	0,3
4-propil-fenol	0,6	0,1	0,5	0,8	0,5	0,3
Adipato de bis(2-etil-hexila)	0,1	0,1	0,6	0,4	-	0,1
Benzoato de metila	0,5	-	0,6	0,8	-	-
Bisabolol	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2
Campeferol-3-O-ramnosídeo	0,3	-	0,3	-	0,6	-
Campesterol	0,8	0,8	-	0,9	0,9	0,7
Cariofileno	-	-	0,8	-	-	-
Catequina	-	-	0,3	-	-	-
Espatuleno	0,4	0,1	0,3	0,8	0,3	0,2
Esqualeno	-	-	0,4	-	0,1	-
Estearato de metila	-	-	0,6	-	-	-
Estigmast-4-en-3-ona	0,6	-	0,5	0,5	0,8	-
Estigmasterol	-	-	0,7	-	-	-
Fitol	-	-	0,7	-	-	-
Friedelan-3-one	0,4	-	0,5	0,4	0,3	0,3
Linoleato de etila	0,1	-	-	0,4	-	0,1
Linoleato de metila	0,1	-	0,5	0,3	0,1	-
Linolenato de metila	0,1	-	0,5	0,3	0,1	-
Palmitato de metila	0,2	0,1	0,6	0,5	0,1	0,2
Procianidina	0,2	-	-	0,5	0,5	-
Quercetina-3-O-glicuronídeo	0,6	0,8	0,1	0,9	0,9	0,7
Quercitrina	0,7	0,8	-	0,9	0,9	0,7
Sitosterol	-	-	0,8	-	-	-
Vitamina E	-	-	-	-	0,5	-
α - amirina	-	-	0,6	-	-	-

*Valores da diferença Pa-Pi (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline>), - Não indicado ou insatisfatório ($Pa \leq Pi$).

6- inibidor de NAD⁺-arginina ADP-ribosiltransferase; 7- inibidor de piruvato cinase; 8- inibidor de peptidoglicano glicosiltransferase; 9- inibidor da 2-deidropantoato 2-redutase; 10- inibidor de CDP-glicerol glicerofosfotransferase; 11- inibidor de micotiol-S-conjugado amidase.

Dos constituintes identificados, 80,8% apresentaram potencial como inibidores da peptidoglicano glicosiltransferase, a maioria deles com alto potencial ($Pa-Pi \geq 0,5$) (8-Tabela 33, pág. 108). Dentre esses estão incluídos os compostos voláteis das frações AcOEt e HMeOH, de maior atividade antibacteriana *in vitro*: 4-propil-fenol ($Pa-Pi: 0,5$), benzoato de metila ($Pa-Pi: 0,6$), ácido 9,12,15-octatrienóico, metil éster ($Pa-Pi: 0,5$) e ácido hexanedioic, bis(2-etilhexil) éster ($Pa-Pi: 0,6$).

A amirina, que não apresentou potencial para nenhum outro mecanismo analisado, também resultou em alto potencial de inibição ($Pa-Pi: 0,6$) para a glicosiltransferase. Entretanto, os flavonoides, constituintes de maior potencial antibacteriano, não possuem potencial para inibição da glicosiltransferase.

Outro mecanismo relacionado à biossíntese da parede celular é a inibição da CDP-glicerol glicerofosfotransferase. Essa enzima cataliza a síntese de ácidos tecóicos componentes da parede celular. Devido à importância essencial desses ácidos para a viabilidade celular, a inibição de enzimas envolvidas em sua biossíntese pode ser alvo de novos antibióticos (FITZGERALD & FOSTER, 2000).

Alguns componentes das frações AcOEt e HMeOH apresentaram alto potencial de inibição da CDP-glicerol glicerofosfotransferase: flavonoides ($Pa-Pi: 0,9$), procianidina ($Pa-Pi: 0,5$), bisabolol ($Pa-Pi: 0,6$) e 4-propil-fenol ($Pa-Pi: 0,5$).

A 2-deidropantoato 2-redutase, também denominada cetopantoato redutase, é uma das enzimas responsáveis pela biossíntese de pantotenato (vitamina B5). Essa vitamina essencial é o precursor de CoA e sua via biossintética é limitada a bactérias e plantas. Portanto a inibição da 2-deidropantoato 2-redutase pode ser considerada um alvo para novos antimicrobianos (WEBB et al., 2004).

Os resultados *in silico* para inibição da 2-deidropantoato 2-redutase indicaram potencial de moderado a alto (10-Tabela 33, pág. 108). Os compostos majoritários das frações AcOEt e HMeOH apresentaram alto potencial: flavonoides ($Pa-Pi: 0,9$), 4-propil-fenol ($Pa-Pi: 0,8$), benzoato de metila ($Pa-Pi: 0,8$), ácido hexadecanóico, metil éster ($Pa-Pi: 0,5$), catequina ($Pa-Pi: 0,8$) e procianidina ($Pa-Pi: 0,5$).

Outro mecanismo analisado refere-se à enzima micotiol-S-conjugado amidase, envolvida no processo de reciclagem intracelular de micotiol em actinomicetos, incluindo micobactérias como *Mycobacterium tuberculosis*. Este composto atua como antioxidante mantendo o meio intracelular livre de agentes alquilantes e outras toxinas. A redução de micotiol têm mostrado aumentar a sensibilidade de *Mycobacterium sp.* aos fármacos, sendo um possível mecanismo para novos medicamentos anti-tuberculose (NICHOLAS et al, 2002).

Visando a redução de micotiol, a inibição da micotiol-S-conjugado amidase é um mecanismo de ação promissor, devido à sua exclusiva presença em actinomicetos e não homologia com outras enzimas eucarióticas conhecidas (NICHOLAS et al, 2002).

Os flavonoides identificados (campeferol-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e quercitrina), com potencial efeito antimicobacteriano (4-Tabela 31, pág. 102), apresentaram alto potencial de inibição dessa enzima (11-Tabela 33, pág. 108) (Pa-Pi:0,7). Aos outros constituintes também foi atribuído potencial de inibição da micotiol-S-conjugado amidase como: 4-propil-fenol (Pa-Pi: 0,3), ácido octadecanóico (Pa-Pi: 0,2), ácido hexadecanóico (Pa-Pi: 0,2), catequina (Pa-Pi: 0,2) e fitol (Pa-Pi: 0,3).

A atividade desses constituintes contra *Mycobacterium* ainda não foi estudada.

Através dos resultados *in silico* gerados pela ferramenta PASSonline, indica-se pontencial efeito antibacteriano principalmente para os constituintes majoritários das frações AcOEt e HMeOH: quercitrina; campeferol-3-O-ramnosídeo; quercetina-3-O-glicuronídeo; catequina; procianidina; 4-propil-fenol; benzoato de metila; ácido hexadecanóico metil éster; ácido hexanedióico bis(2-etilhexil) éster; ácido 9,12-octadienóico metil éster; ácido 9,12,15-octadecatrienóico metil éster e bisabolol. Essas frações apresentaram maior atividade antimicrobiana total (AAT) nos testes *in vitro* (item 4.3.3, pág. 36).

A atividade antimicrobiana de quercitrina (ADEROGBA et al., 2013); catequina (SAADAT et al.,2013; ALVES et al., 2014); procianidina (WANG et al., 2015); 4-propil-fenol (KIM et al., 2007); ácido 9,12,15-octadecatrienóico

metil éster (MATIKAINEN et al., 2015) e bisabolol (BREHM-STECHER & JOHNSON, 2003) já foi relatada na literatura.

Indica-se que os principais mecanismos de ação antimicrobiana das frações de *P. spruceanum* estão relacionados a um aumento da permeabilidade da membrana celular, inibição da síntese da parede bacteriana (enzimas peptidoglicano glicosiltransferase e CDP-glicerol glicerofosfotransferase) e inibição do metabolismo (enzimas 2-deidropantoato 2-redutase e piruvato cinase). Esses mecanismos de ação são diferentes dos antibióticos recentes e são considerados alvos para novos fármacos.

O potencial de constituintes identificados atuar sobre diferentes mecanismos de ação é uma possível explicação para o sinergismo entre as frações (item 4.3.4, pág. 46). A combinação de substâncias com diferentes alvos de ação, além de melhorar a atividade, retarda a evolução da resistência bacteriana. Isso acontece porque são necessárias várias mutações individuais para alcançar a resistência a fármacos com diferentes alvos celulares (BOLLENBACH, 2015).

Os resultados *in silico* indicando possíveis compostos bioativos e mecanismos de ação das frações de *P. spruceanum* abrem perspectivas para estudos *in vitro* e *in vivo* com as substâncias isoladas para confirmar os potenciais indicados.

5. CONCLUSÃO

Em relação aos extratos etanólicos brutos de folhas e galhos de *Protium spruceanum* foram identificadas propriedades antimicrobianas contra todas as 20 espécies testadas, sendo bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungo leveduriforme (*Candida albicans*). O EEB de folhas apresentou maior atividade antimicrobiana total (AAT) que o EEB de galhos.

As frações de maior atividade antimicrobiana foram as de maior polaridade (acetatoetilênicas e hidrometanólicas), que apresentaram efeito sinérgico entre si.

Com os resultados da prospecção fitoquímica, foi possível identificar a presença de ácidos graxos, terpenos, flavonoides, taninos e cumarinas.

A atividade antimicrobiana total dos extratos e frações foi atribuída majoritariamente ao teor de taninos totais. Sugere-se que existe uma ação sinérgica com flavonoides e outros compostos.

Através das análises em CG/EM foi possível identificar os constituintes voláteis majoritários dos EEBs e frações. Dentre eles, terpenóides, ácidos graxos e fenólicos.

Por meio de CLUE/DAD/EM-EM, foram identificados flavonoides glicosilados (quercetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e campeferol-3-O-ramnosídeo) e taninos (catequina e procianidina).

Com análises dos resultados *in silico*, gerados pela ferramenta PASSonline, atribuiu-se pontencial efeito antibacteriano principalmente para os constituintes majoritários das frações AcOEt e HMeOH: quercitrina; campeferol-3-O-ramnosídeo; quercetina-3-O-glicuronídeo; catequina; procianidina; 4-propilfenol; benzoato de metila; palmitato de metila; adipato de bis (2-etil-hexila); linoleato de metila; linolenato de metila e bisabolol.

Os resultados *in silico* também indicaram que os principais mecanismos de ação antimicrobiana das frações estejam relacionados a um aumento da permeabilidade da membrana celular, inibição da biossíntese da parede bacteriana (enzimas peptidoglicano glicosiltransferase e CDP-glicerol glicerofosfortransferase) e inibição do metabolismo (enzimas 2-deidropantoato

2-redutase e piruvato cinase). Esses mecanismos de ação são diferentes dos antibióticos recentes e são considerados alvos para novos fármacos.

Os resultados *in silico*, abrem perspectivas para o desenvolvimento de estudos experimentais com as substâncias isoladas para identificar os compostos bioativos e seus mecanismos de ação.

Os resultados fornecem suporte científico *in vitro* para a possibilidade de aplicação de folhas e galhos de *P. spruceanum* como agente antimicrobiano que contribua para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes.

6. REFERÊNCIAS

ADEROGBA, M.A.; NDHLALA, A.R.; RENGASAMY, K.R.R.; STADEN, J.V. Antimicrobial and Selected *In Vitro* Enzyme Inhibitory Effects of Leaf Extracts, Flavonols and Indole Alkaloids Isolated from *Croton menyharthii*. ***Molecules***, 18, 12633-44, 2013.

AJIBESIN, K.K.; ESSIEN, E.E.; ADESANYA, S.A. Antibacterial constituents of the leaves of *Dacryodes edulis*. ***African Journal of Pharmacy and Pharmacology***, 5(15), 1782-86, 2011.

ALVES, C.T.; FERREIRA, I.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida species*. ***Future Microbiology***, 9(2), 139-146, 2014.

AMPARO, T.R.; VASCONCELOS, I.R.; LOPES, N.P.; de SOUZA, G.H.B. Estudo fitoquímico de fração polar do extrato etanólico de casca e caule de *Protium spruceanum* (benth.) Engler. ***Infarma Ciências Farmacêuticas***, 27(1), 165, 2014.

ARAÚJO, I. S. Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. S. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, 18(1), 90-97, 2008.

BAI, X.; CHENG, J.; LIANG, W.; MA, L.; LIU, Y.; SHI, G.; WANG, Y. Antifungal Activity of Extracts by Supercritical Carbon Dioxide Extraction from Roots of

Stellera chamaejasme L. and Analysis of Their Constituents Using GC-MS. **Information Technology and Agricultural Engineering**, 134, 653-662, 2012.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* march. **Química Nova**, 25 (6b), 2002.

BHUVANESWARI, R.; GOBALAKRISHNAN, R. Antimicrobial potencial and structural elucidation of bioactive compounds from flower extract of *Cassia javanica* L. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 5(1), 34-35, 2014.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, 27, 1–9, 2015.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(16), 5195-200, 2004.

BREHM-STECHER, B.F.; JOHNSON, E.A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, 47(10), 3357–60, 2003.

CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts. **American Society of Brewing Chemists**, 1, 1-7, 2008.

CAMARDA, L.; DAYTON, T.; STEFANO, V.D.; PITONZO, R.; SCHILLACI, D. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Some Oleogum Resin Essential Oils from *Boswellia* spp. (Burseraceae). **Annali di Chimica**, 97(9), 837-44, 2007.

CARRETERO, M.E.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; TILLET, S.; ISRAEL, A.; NOGUERA-P, B. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 116(1), 11-15, 2008.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, 10 (3), 178-182, 2002.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 10(25), 2011.

CHUNLONG, C.; SONG, L.; RONGSU, L.; FENGPING, W.; JUNQING, L. Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in Ejina oasis, Inner Mongolia, China. **Acta Ecologica Sinica**, 28(1), 2008.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, 343–356, 2005.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23(2),174–181, 2012.

DALY, D.C.B.; FINE, P.V.A.; MARTINEZ-HABIBE, M.C. Burseraceae: a model for studying the Amazon flora. **Rodriguésia**, 63 (1), 21-30, 2012.

DEROUAUX, A.; SAUVAGE, E.; TERRAK, M. Peptidoglycan glycosyltransferase substrate mimics as templates for the design of new antibacterial drugs. *Frontiers in immunology*, 4, 2013.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411 (1), 843–847, 2001.

ELOFF, J.N. Quantification the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay guided fractionation. *Phytomedicine*, 11, 370–371, 2004.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21 (1), 99-105, 1998.

FITZGERALD, S.N.; FOSTER, T.J. Molecular analysis of the tagF gene, encoding CDP-Glycerol:Poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1046-52, 2000.

GARCÍA, A.Á.; CARRIL, E.P. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145, 2009.

GINER, M.J.; VEGARA, S.; FUNES, L.; MARTÍ, N.; SAURA, D.; MICOL, V.; VALERO, M. Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1917-23, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374-381, 2007.

GOEL, R.K., SINGH, D., LAGUNIN, A., POROIKOV, V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Medicinal Chemistry Research*, 20, 1509-14, 2011.

GOTO, Y.; HIRAMATSU, K.; NASU, M. Improved efficacy with nonsimultaneous administration of netilmicin and minocycline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in in vitro and in vivo models. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 11 (1), 39-46, 1999.

GYAWALIA, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, 46, 412–429, 2014.

HAGERMAN, A. Vanillin assay. <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf> (Acessado em janeiro 2016), 2002.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(7), 1027-31, 2002.

HSOUNA, A.B.; TRIGUI, M.; JARRAYA, R.M.; DAMAK, M.; JAOUA, S. Identification of phenolic compounds by high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS) and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Ceratonia siliqua* leaves extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, 9 (14), 479-485, 2015.

IAMSAARD, S.; ARUN, S.; BURAWAT, J.; SUKHORUM, W.; WATTANATHORN, J.; NUALKAEW, S.; SRIPANIDKULCHAI, B. Phenolic contents and antioxidant capacities of Thai-Makham Pom (*Phyllanthus emblica* L.) aqueous extracts. **Journal of Zhejiang University**, 15(4), 405-408, 2014.

JEONG, M.; KIM, H.; CHA, J. Antimicrobial Activity of Methanol Extract from *Ficus carica* Leaves Against Oral Bacteria. **Journal of Bacteriology and Virology**, 39(2), 97-102, 2009.

JIANG-LING, L.; PAUL-KEILAH, L.; YUN-LI, Z.; XU-JIE, Q.; XING-WEI, Y.; YA-PING, L.; XIAO-DONG, L. Antibacterial constituents from *Melodinus suaveolens*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 13(4), 307-310, 2015.

JOHANN, S.; SOLDI, C.; LYON, J.P.; PIZZOLATTI, M.G.; RESENDE, M.A. Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, 45, 148–153, 2007.

JÚNIOR, M. V.; DE SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de Protium heptaphyllum: Isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, 28 (2), 183-187, 2005.

KARCHESY, J.J; REMINGWAY, R.W. Condensed tannins: (4 β →8;2 β →O→7)-Linked Procyanidins in *Arachis hypogea* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34, 966-971, 1986.

KASSIM, M.J; HUSSIN, M.H.; ACHMAD, A.; HAZWANI, D.; SUAN, T.K.; HAMDAN, H.S. Determination of total phenol, condensed tannin and flavonoid contents and antioxidant activity of *Uncaria gambir* extracts. **Majalah Farmasi Indonesia**, 22(1), 50-59, 2011.

KESTER, M. Farmacologia – Série elsevier de formação básica integrada. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2008.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, 18, 2328-75, 2013.

KIM, Y.; FARRAH, S.; BANEY, R.H. Structure–antimicrobial activity relationship for silanols, a new class of disinfectants, compared with alcohols and phenols. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 29, 217–22, 2007.

KIPLIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5(8), 1150-1156, 2011.

KISSEIH, E.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; SENDKER, J.; BRANDT, S.; AGYARE, C.; HENSEL, A. Phytochemical characterization and *in vitro* wound

healing activity of leaf extracts from *Combretum mucronatum* Schum. &Thonn.: Oligomeric procyanidins as strong inducers of cellular differentiation. ***Journal of Ethnopharmacology***, 2015.

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. ***Journal of Microbiological Methods***, 81, 121–126, 2010.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. ***Nature Reviews Microbiology***, 8(6): 423–435, 2010.

KOUADIO, I.A.; CHATIGRE, O.K.; DOSSO, M.B. Phytochemical screening of the antimicrobial fraction of *Solanum indicum* L. berries extract and evaluation of its effect against the survival of bacteria pathogens of plants. ***International Journal of Biotechnology and Food Science***, 2(1), 21-30, 2014.

LIMA-FILHO, J.V.M.; CARVALHO, A.F.F.U.; FREITAS, S.M.; MELO, V.M.M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. ***Brazilian Journal of Microbiology***, 33 (4), 311-314, 2002.

MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. ***Flavour and Fragrance Journal***, 18, 338-41, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J.R.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. ***Química Nova***, 25 (3), 429-438, 2002.

MAHLKE, J.D.; BOLIGON, A.A.; MACHADO, M.M.; SPADER, T.B.; ALVES, S.H.; CANTO-DOROW, T.; ATHAYDE, M.L. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. ***Química Nova***, 32(2), 277-281, 2009.

- MARCH, R.E. e MIAO, X.S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 231, 157–167, 2004.
- MARQUES, D.D.; SARTORI, R.A.; LEMOS, T.L.G., MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N.; MONTE, F.J.Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*, 40(1), 227-230, 2010.
- MARTINS, A.; VASAS, A.; VIVEIROS, M.; MOLNÁR, J.; HOHMANN, J.; AMARAL, L. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 438-444, 2011.
- MARTUCCI, M.E.P.; DE VOS, R.C.H.; CAROLLO, C.A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the genus *Vernonia Schreb.* *Plos one*, 9(4), 2014.
- MATIKAINEN, J.; LEHTINEN, M.; PELTTARI, E.; ELO, H. Toxicity of Fatty Acid Autoxidation Products: Highest Anti-Microbial Toxicity in the Initial Oxidative Phase. *Molecules*, 20, 35-42, 2015.
- MAURER, B.; MATHIAS, U.; PAPATHEODOROU, P.; SHEKFEH, S.; ORTH, J.; JANK, T.; SCHWAN, C.; SIPPL, W.; AKTORIES, K.; JUNG, M. From cosubstrate similarity to inhibitor diversity—inhibitors of ADP-ribosyltransferases from kinase inhibitor screening. *Molecular BioSystems*, 7, 799–808, 2011.
- MBAMBO, B.; ODHAV, B.; MOHANLALL, V. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 2012.
- MOELLERING JR, R.C. Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37 (1), 2–9, 2011.
- MUKAKA, M.M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*; 24(3), 69-71, 2012.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1), 108-113, 2007.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, 139(1), 81–89, 2012.

NICHOLAS, G. M.; ECKMAN, L. L.; RAY, S.; HUGHES, R. O.; PFEFFERKORN, J. A.; BARLUENGA, S.; NICOLAOU, K. C.; BEWLEY, C. A. Bromotyrosine-Derived Natural and Synthetic Products as Inhibitors of Mycothiol-S-Conjugate Amidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 12, 2487-90, 2002.

OKUNJI, C. O.; OKEKE, C. N.; GUGNANI, H. C.; IWU, M. M. An antifungal saponin from fruit pulp of *Dracaena mannii*. **International Journal of Crude Drug Research**, 28, 193-199, 1990.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, 49(2), 105-11, 2004.

OLIVEIRA, M. L. G., ASSENCO, R. A. G., SILVA, G. D. F., LOPES, J. C. D., SILVA, F. C., LANNA, M. C. S., DE MAGALHÃES, J. C., DUARTE, L. P., FILHO, S. A. V. Cytotoxicity, anti-poliovirus activity and in silico biological evaluation from *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, 6, 130-137, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18 (2), 2008.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNESB, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. ***European Journal of Pharmacology***, 507(1), 253-59, 2005.

PEREZ, D.M.; MAIER, J.C.; BRUM, P.A.R.; MARTINS, C.S.; GOMES, P.C. Determinação do Teor de Tanino de Quatro Variedades de Sorgo por Intermédio de Métodos Quantitativos. ***Revista brasileira de zootecnia***, 28 (3), 453-458, 1999.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. ***Revista Fitos***, 2 (3), 39-53, 2006.

RADULOVIC, N.S.; BLAGOJEVIC, P.D.; STOJANOVIC-RADIC, Z.Z.; STOJANOVIC, N.M. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. ***Current Medicinal Chemistry***, 20 (1), 932-952, 2013.

RAJAGOPAL, M.S. *Canarium patentinervium* miq. (Burseraceae kunth.): a phytochemical and pharmacological study. PhD thesis, University of Nottingham, 2014.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. ***Toxicon***, 39 (5), 603-61, 2001.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. ***Revista Escola de Enfermagem da USP***, 36(3), 282-288, 2002.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, 100 (1-2), 80-84, 2005.

RIVERO-CRUZ, J. F.; SÁNCHEZ-NIETO, S.; BENÍTEZ, G.; CASIMIRO, X.; IBARRA-ALVARADO, C.; ROJAS-MOLINA, A.; RIVERO-CRUZ, B. Antibacterial

compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. **Revista Latinoamericana de Química**, 37(2), 155-163, 2009.

RODRIGUES, I. V.; SOUZA, J. N. P.; SILVA, A. C. G.; CHIBLI, L. A.; CABRAL, V. A. R.; VIERA-FILHO, S. A.; PERAZZO, F. F.; GUIMARÃES, A. G.; SOUZA, G. H. B. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). **Pharmacognosy Journal**, 5, 6-12, 2013.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, 27 (3), 507-513, 2009.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The Chemistry and Pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews**, 1 (1), 2007.

RUSTAN, I.; FABRE, N.; HOFFMANN, E. e QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 12, 707-715, 2001.

SAADAT, M.; ROUDBARMOHAMMADI, S.; YADEGARI, M.; KHAVARINEJAD, R. Evaluation of antibacterial effects of catechin and EDTA on planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. **Malaysian Journal of Microbiology**, 9(2), 184-188, 2013.

SALEM, M.Z.M.; GOHAR, Y.M.; CAMACHO, L.M.; EL-SHANHOREY, N.A.; SALEM, A.Z.M. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, 7(5), 418-426, 2013.

SANTANA, A.I.; VILA, R.; ESPINOSA, A.; OLMEDO, D.; GUPTA, M.P.; CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of essential oils from *Protium confusum*. **Natural Product Communications**, 4(10), 1401-6, 2009.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17 (2), 215-219, 2007.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28 (1), 25-34, 2007.

SHANKAR, N.L.G.; MANAVALAN, R.; VENKAPPAYYA, D.; RAJ, C.D. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Commiphora berryi* (Arn) Engl bark extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 46(9), 3182–85, 2008.

SIANI, A.C.; NAKAMURA, M.J.; TAPPIN, M.R.R.; MONTEIRO, S.S.; GUIMARÃES, A.C.; RAMOS, M.F.S. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. **Phytochemical Analysis**, 23 (5), 529–539, 2012.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; DE LIMA, M.O.; SANTOS, R.; FERREIRA, F.E.; SOARES, E.C. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, 57–69, 1999.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, 50 (5), 1790-95, 2012.

SILVÁN, J.M.; MINGO, E.; HIDALGO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; CARRASCOSA, A.V.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A.J. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp. **Food Control**, 29 (1), 25-31, 2013.

SILVEIRA, S.M.; JÚNIOR, A.C.; SCHEUERMANN, G.N.; SECCHI, F.L.; VIEIRA, C.R.W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, 42(7), 1300-06, 2012.

SIMLAI, A.; ROY, A. Analysis of and correlation between phytochemical and antimicrobial constituents of *Ceriops decandra*, a medicinal mangrove plant, from Indian Sundarban estuary. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6 (32), 4755-65, 2012.

SINGH, R.S. G.; NEGI, P.S.; RADH, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **Journal of Functional Foods**, 5, 1883 - 91, 2013.

SUÁREZ, A.I.; COMPAGNONE, R.S.; ACOSTA, D.; VÁSQUEZ, L.; DIAZA, B.; CANELÓNA, D.J. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Oleoresin of *Protium neglectum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 10 (1), 70-75, 2007.

SULEIMAN, M.H.A. Prenylated flavonoids from the stem wood of *Commiphora opobalsamum* (L.) Engl. (Burseraceae). **Journal of King Saud University**, 27 (1), 71-75, 2015.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. **Molecules**, 14, 2167-80, 2009.

TAJUDDEEN, N.; SALLAU, M.S.; MUSA, A.M.; HABILA, D.J.; YAHAYA, S.M. Flavonoids with antimicrobial activity from the stem bark of *Commiphora*

pedunculata (Kotschy & Peyr.) Engl. **Natural Product Research**, 28 (21), 1915-18, 2014.

THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. **LWT - Food Science and Technology**, 41 (10), 2029–35, 2008.

TIAN, F.; LI, B.; JI, B.; YANG, J.; ZHANG, G.; CHEN, Y.; LUO, Y. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry**, 113, 173-179, 2009.

TIBERTI, L.A.; YARIWAKE, J.H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, 18(1), 100-105, 2007.

TOMÁS-MENOR, L.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARTÍ, N.; SAURA, D.; MENÉNDEZ, J.A.; JOVEN, J.; MICOL, V. The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics? **Phytotherapy Research**, 29 (1), 466–473, 2015.

VALDES, H. L., LEYES, E. R., & LÉON, H. P. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, 5, 17–22, 2000.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 369-380, 2007.

VIEIRA, F. A.; Diversidade e Estrutura Genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do alto Rio Grande – MG, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, 2005.

- VIEIRA, F.A., APPOLINÁRIO, V., FAJARDO, C.G., CARVALHO, D. Reproductive biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, 33, 711-715, 2010
- VIOLANTE, I.M.P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W.S.; BATISTA, A.L.; CHANG, M.R., POTT, V.J.; GARCEZ, F.R. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 43(4), 1302-1308, 2012.
- WANG, C.; HSU, Y.; JHAN, Y.; TSAI, S.; LIN, S.; SU, C.; CHOU, C. Structure Elucidation of Procyanidins Isolated from *Rhododendron formosanum* and Their Anti-Oxidative and Anti-Bacterial Activities. **Molecules**, 20, 2015.
- WEBB, M.E.; SMITH, A.G.; ABELL, C. Biosynthesis of pantothenate. **Natural Product Reports**, 21(6), 695-721, 2004.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, 64, 3–19, 2003.
- YANHUA, L.; ZHEN, Z.; GUOXIN, S.; JUNCAI, M.; RENXIANG, T. A new antifungal flavonol glycoside from *Hypericum perforatum*. **Acta Botanica Sinica**, 44(6):743-745, 2002.
- ZOGHBI, M.G.B.; CUNHA, E.V.L.; WOLTER-FILHO, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum* (Burseraceae). **Acta Amazonica**, 23, 15-16, 1993.
- ZORAGHI, R.; SEE, R.H.; AXERIO-CILIES, P.; KUMAR, N.S.; GONG, H.; MOREAU, A.; HSING, M.; KAUR, S.; SWAYZE, R.D.; WORRALL, L.; AMANDORON, E.; LIAN, T.; JACKSON, L.; JIANG, J.; THORSON, L.; LABRIERE, C.; FOSTER, L.; STRYNADKA, N.C.; CHERKASOV, A.; YOUNG, R.N.; REINER, N.E. Identification of Pyruvate Kinase in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Novel Antimicrobial Drug Target. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55(5), 2042-53, 2011.