

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO
DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS E MEDICINAIS
BRASILEIRAS DE USO NA CICATRIZAÇÃO
E INFECÇÕES DA PELE**

GRACILENE SCHMOURLO

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do
Grau de Doutora em Ciências (Química de Produtos Naturais)

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Julho

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
NÚCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS

**“Contribuição para o estudo químico e biológico de plantas alimentícias e medicinais
brasileiras de uso na cicatrização e infecções da pele”**

Gracilene Schmourlo

Tese submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

APROVADA POR:

Prof^ª. Dr^ª.: _____
Sônia Soares Costa (presidente)

Prof^º. Dr^º.: _____
Celso Luís Salgueiro Lage

Prof^º. Dr^º.: _____
André Luís Sousa dos Santos

Prof^ª. Dr^ª.: _____
Marta Fernanda Albuquerque da Silva

Prof^ª. Dr^ª.: _____
Gilda Guimarães Leitão

Prof^ª. Dr^ª.: _____
Luzineide Wanderley Tinoco

Suplente: _____
Prof^ª. Dr^ª. Ana Luisa Palhares de Miranda

Suplente: _____
Prof^º. Dr^º. Alessandro B. Simas

Rio de Janeiro, 08 de julho de 2005.

FICHA CATALOGRÁFICA

Schmourlo, Gracilene

Contribuição para o estudo químico e biológico de plantas alimentícias e medicinais brasileiras de uso na cicatrização e infecções da pele. Rio de Janeiro: UFRJ/CCS, 2005.

xxix; 235f.; il.; 29 cm

Orientador: Sônia Soares Costa.

Tese (doutorado) – UFRJ/ Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais/
Programa de Pós- graduação em Química de Produtos Naturais, 2005.

Referências Bibliográficas: f. 199-235.

1. Extratos de plantas medicinais e alimentícias brasileiras. 2. *Bixa orellana* L. (Bixaceae). 3. Bioautografia. 4. Precipitação por etanol. 5. Atividade antifúngica, antibacteriana e antioxidante. 6. MRSA. 7. CLAE-AFD. 8. DPPH. 9. Flavonóides. 10. Teses.

I – Universidade Federal do Rio de Janeiro

II - Título

**Esta tese foi realizada sob a orientação da professora
Sônia Soares Costa, do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais,
Universidade Federal do Rio de Janeiro.**

Aos meus pais, irmãos, esposo e amigos
pelo amor, paciência, compreensão e
companheirismo dispensados.

Um dia você aprende que...

Depois de algum tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam.... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la, por isso.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que, ou você controla os seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem os dois lados.

Aprende que não importa em quantos pedaços o seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar atrás. Portanto, plante seu jardim e decore a sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem agradeço todos os dias a minha existência.

À minha mãe Maria das Graças Barros dos Santos e ao meu marido Nicolas Schmourlo pelo grande incentivo, compreensão e por serem as pessoas mais importantes da minha vida.

À Prof^a. Sônia Soares Costa pela amizade, passagem de conhecimento e orientação no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Carlos Roland Kaiser pelo tempo dispensado na realização de alguns espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono, bem como espectros em duas dimensões.

Ao Prof. Antônio Jorge Ribeiro da Silva e aos técnicos Miguez e Francisco profissionais da Central Analítica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais pela realização de espectros de Ressonância Magnética de Hidrogênio e Carbono.

A Jorginaldo Oliveira pelo apoio técnico na montagem das amostras representativas das espécies estudadas.

À Prof^a Celuta Sales Alviano do pela possibilidade da realização dos testes de atividade antimicrobiana.

À Prof^ª Ana Luiza P. de Miranda do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelos ensaios antioxidantes.

Aos professores Celso Luís Salgueiro Lage e Russolina Benedeta Zingali pelos conselhos dados para a realização do meu exame de qualificação.

Aos professores Francisco José de Abreu Matos, Cláudia P. Bove e Luci de Senna Valle pela coleta de certas plantas e também pela identificação das mesmas.

Ao Prof. Jack Woodall pelas revisões em inglês dos artigos enviados para revistas estrangeiras.

Ao meu amigo Ricardo Mendonça Filho pelo apoio, incentivo companheirismo e grande amizade demonstrada no período de desenvolvimento desse trabalho, além do auxílio na realização dos testes antimicrobianos.

Ao meu amigo e Doutor Zenildo Buarque de Moraes Filho pelo apoio, incentivo e grande amizade demonstrada não só na faculdade, mas também no período de desenvolvimento desse trabalho.

À minha amiga Lisandra Abreu pelas ajuda com a disciplina de Química Orgânica Avançada e também pelo companheirismo demonstrado.

À minha amiga doutoranda Silvana Daflón Castricini pelo bom humor, companheirismo e palavras de incentivos nos momentos difíceis.

À Doutora Daniela Barros de Oliveira pela ajuda na realização dos testes de atividade antioxidante e também pela amizade desprendida durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos de laboratório Giany Oliveira de Melo, Michele Frazão Muzitano, Maria Fernanda Paresqui, Marina Junqueira Santiago e Douglas pela amizade e ajuda na realização dessa tese.

Aos alunos de iniciação científica que fazem ou fizeram parte do laboratório: Amanda Lemos, Aline Peixoto Lamar, Camila Azevedo Linhares, Luiza Maria de Magalhães Camargo, Munike Costa Cavalcante, Luiz Felipe Bona da Fonseca.

Aos amigos adquiridos durante a realização das disciplinas obrigatórias do curso: Débora, Danilo, Cristiane e Anderson pelo apoio naqueles momentos difíceis e pelos finais de semanas que passamos juntos estudando.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na elaboração desse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	p.
Lista de abreviaturas	xiv
Índice de espectros	xvii
Índice de tabelas	xviii
Índice de figuras	xxi
Índice de esquemas	xxiii
Índice de fotos	xxiii
RESUMO	xxiv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUÇÃO	1
Breve descrição sobre a pele	3
Lesões da pele e cicatrização	6
Infecções bacterianas e fúngicas da pele	8
Breve descrição sobre os principais antibacterianos	13
Breve descrição sobre os antimicóticos atuais e futuros	18
Resistência microbiana às drogas	24
Plantas e suas propriedades antimicrobianas	29
Plantas e suas propriedades antioxidantes	34
Polifenóis e via biossintética dos flavonóides	38
Atividade antioxidante de substâncias fenólicas	42
Comparação da atividade antioxidante de substâncias fenólicas modelo	42
Métodos para a determinação da atividade antioxidante	43
Principais flavonóides com atividade antioxidante	45
Deteção e identificação de substâncias fenólicas e flavonóides por CLAE-AFD	47

ÍNDICE (Continuação)

Plantas medicinais como fontes de substâncias antibacterianas e antifúngicas que auxiliam na cicatrização da pele	48
Medicina tradicional e legislações relativas aos fitoterápicos no Brasil	52
OBJETIVOS	56
Objetivo geral	57
Objetivos específicos	57
PARTE EXPERIMENTAL	59
1. Coleta e preparo do material	59
1.1. Preparo dos extratos aquosos	60
1.2. Preparo das frações	60
1.3. Coleta de <i>Bixa orellana</i> e preparo do material	61
Estudo da partição em <i>n</i> -butanol das folhas, caules e sementes de <i>Bixa orellana</i>	64
Isolamento do flavonóide hipolaetina 8- <i>O</i> - β -glucuronídeo (<i>Bixa</i> -1)	66
Isolamento do flavonóide quercetina 3- <i>O</i> - β -xilopiranosídeo (<i>Bixa</i> 2)	69
2. Ensaio biológicos	70
2.1. Atividade antifúngica e antibacteriana	70
2.1.1. Fungos e bactérias	70
2.1.2. Método de difusão em agar e avaliação da concentração mínima inibitória (MIC, <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)	72
2.1.3. Cromatografia em camada fina (CCF)	73
2.1.4. Bioautografia	74
2.2. Atividade antioxidante pelo teste do DPPH	75
2.3. Análise por CLAE-AFD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –Arranjo de Fotodiodo)	76
CAPÍTULO I	78
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	79

ÍNDICE (Continuação)

Seção I – Busca de substâncias bioativas através de triagem de plantas medicinais e alimentícias frente a fungos e bactérias usando precipitação por etanol e bioautografia	80
Resultados e discussão	81
Conclusões	91
Seção II – Atividade antimicrobiana de <i>Bixa orellana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i> contra MRSA e outros microrganismos patogênicos	93
Resultados e discussão	94
Conclusões	103
CAPÍTULO II	104
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	105
Seção I – Atividade antioxidante de plantas alimentícias brasileiras ativas contra fungos e/ou bactérias	106
Resultados e discussão	108
Conclusões	121
Seção II – Atividade antioxidante de plantas medicinais brasileiras ativas contra fungos e/ou bactérias	122
Resultados e discussão	124
Conclusões	136
CAPÍTULO III	137
ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FITOQUÍMICO DE <i>BIXA ORELLANA</i> L.	138
Introdução	139
Descrição da planta	141

ÍNDICE (Continuação)

Seção I – Atividade antioxidante de <i>Bixa orellana</i> ativa contra fungos e bactérias	145
Resultados e discussão	147
Conclusões	155
Seção II – Isolamento e elucidação estrutural dos flavonóides isolados de <i>Bixa orellana</i> L.	156
1. Elucidação estrutural de <i>Bixa</i> 1	156
Espectro de UV	157
RMN de ^1H	159
RMN de ^{13}C	161
COSY (^1H - ^1H)	163
HMQC	164
HMBC	165
2. Elucidação estrutural de <i>Bixa</i> 2	177
CLAE – AFD para o flavonóide <i>Bixa</i> 2	177
RMN de ^1H	179
RMN de ^{13}C	181
COSY (^1H - ^1H)	183
HMQC	184
HMBC	185

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – absorbância

BAW – butanol/ácido acético/água

BHA – butil hidroxianisol

BHT – 2,6-di-*terc*-butila-4-metilfenol/ butil hidroxitolueno

CCF – cromatografia em camada fina

CLAE-AFD – cromatografia líquida de alta eficiência – arranjo de fotodiodo

CLAE-AFD-EM - cromatografia líquida de alta eficiência – arranjo de fotodiodo – espectrometria de massas

COSY – correlated spectroscopy $^1\text{H} - ^1\text{H}$

d – dubleto

dd – duplo dubleto

DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer

DNA – ácido desoxirribonucleico/ deoxyribonucleic acid

cDNA – DNA complementar

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

ed. – editora

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

EtOH – etanol

F – fração

HDL – lipoproteínas de alta densidade/ high density lipoprotein

HIV – vírus imunodeficiência humana/ human immunodeficiency virus

HMBC - H^1 -Detected Multiply Bond Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence

HMQC – H^1 -Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence

Hz – hertz

J – constante de acoplamento

JB – Jardim Botânico – Rio de Janeiro

LCC – líquido da castanha de caju

LDL – lipoproteínas de baixa densidade/high density lipoprotein

MHz – megahertz

MIC – concentração mínima inibitória

MN – museu nacional

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/methicillin-resistant
Staphylococcus aureus

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina/methicillin-susceptible
Staphylococcus aureus

MTT – metil-tiazol-tetrazólio

n^o – número

OMS/WHO – organização mundial da saúde

p – peso

pág. – página

ppm – partes por milhão

Pt – precipitado

Rdt – rendimento

Rf –retention factor

RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA – ácido ribonucléico/ ribonucleic acid

rpm – rotações por minuto

s – singleto

sl – singleto largo

Sn – sobrenadante

TBARS –espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TMS – tetrametilsilano

T_R (min) - tempo de retenção (minutos)

UV – ultravioleta

v – volume

δ - deslocamento químico

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de <i>Bixa 1</i>	167
Espectro 2. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de <i>Bixa 1</i>	168
Espectro 3. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de <i>Bixa 1</i>	169
Espectro 4. RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 de <i>Bixa 1</i>	170
Espectro 5. DEPT-135 em DMSO- d_6 de <i>Bixa 1</i>	171
Espectro 6. COSY (^1H - ^1H) de <i>Bixa 1</i>	172
Espectro 7. COSY (^1H - ^1H) da parte glucosídica de <i>Bixa 1</i>	173
Espectro 8. HMQC de <i>Bixa 1</i>	174
Espectro 9. HMBC de <i>Bixa 1</i>	175
Espectro 10. HMBC da parte glucosídica de <i>Bixa 1</i>	176
Espectro 11. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de <i>Bixa 2</i>	186
Espectro 12. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de <i>Bixa 2</i>	187
Espectro 13. COSY (^1H - ^1H) de <i>Bixa 2</i>	188
Espectro 14. COSY (^1H - ^1H) da parte glicosídica de <i>Bixa 2</i>	189
Espectro 15. HMQC de <i>Bixa 2</i>	190
Espectro 16. HMBC de <i>Bixa 2</i>	191
Espectro 17. HMBC de <i>Bixa 2</i>	192

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos principais antibióticos	13
Tabela 2. Principais classes de antibacterianos	14
Tabela 3. Antimicóticos atuais	19
Tabela 4. Antimicóticos futuros	22
Tabela 5. Resistência bacteriana	24
Tabela 6. Principais classes de substâncias antimicrobianas a partir de plantas	31
Tabela 7. Algumas plantas medicinais importantes para uso externo	50
Tabela 8. Plantas medicinais utilizadas nos ensaios antifúngicos e antibacterianos	87
Tabela 9. Plantas alimentícias utilizadas nos ensaios antifúngicos e antibacterianos	89
Tabela 10. Atividade antifúngica de plantas medicinais e alimentícias brasileiras	90
Tabela 11. Atividade antibacteriana de extratos totais e frações de plantas medicinais e alimentícias brasileiras	90
Tabela 12: Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e frações de <i>Bixa orellana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	99
Tabela 13. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Bixa orellana</i> analisadas por CLAE-AFD	100
Tabela 14: Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes das folhas e frutos de <i>Anacardium occidentale</i> , frutos <i>Malpighia glabra</i> , folhas, caules e tubérculos de <i>Xanthosoma sagittifolium</i> e folhas e caules de <i>Rosmarinus officinalis</i> analisadas por CLAE-AFD	117

ÍNDICE DE TABELAS (Continuação)

Tabela 15. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos extratos aquosos de <i>Schinus molle</i> e <i>Schinus terebinthifolius</i> , e sobrenadante de <i>Solanum</i> sp., analisadas por CLAE-AFD	130
Tabela 16. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes de <i>Crotalaria pallida</i> e <i>Kalanchoe brasiliensis</i> analisadas por CLAE-AFD	131
Tabela 17. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nas frações das folhas, caules e sementes de <i>Bixa orellana</i> L. analisadas por CLAE-AFD	151
Tabela 18. Dados cromatográficos para <i>Bixa</i> 1	156
Tabela 19. Sinais listados no espectro e distinção entre os hidrogênios e as hidroxilas de <i>Bixa</i> 1.	160
Tabela 20. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆) de <i>Bixa</i> 1 e de amostra relatada na literatura	162
Tabela 21. Correlação ¹ H- ¹ H de <i>Bixa</i> 1	163
Tabela 22. Sinais de correlações direta C-H de <i>Bixa</i> 1.	164
Tabela 23. Sinais de correlações a longa distância C-H de <i>Bixa</i> 1	166
Tabela 24. Dados cromatográficos para <i>Bixa</i> 2	177
Tabela 25: Parâmetro detectado para o flavonóide <i>Bixa</i> 2 isolado a partir das folhas, caules e sementes de <i>Bixa orellana</i> L. analisadas por CLAE-AFD	177

ÍNDICE DE TABELAS (Continuação)

Tabela 26. Sinais listados no espectro e distinção entre os hidrogênios e as hidroxilas de <i>Bixa 2</i>	180
Tabela 27. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) de <i>Bixa 2</i> e comparação com dados obtidos na literatura	182
Tabela 28. Correlação ^1H - ^1H de <i>Bixa 2</i>	183
Tabela 29. Sinais de correlações direta C-H de <i>Bixa 2</i> .	184
Tabela 30. Sinais de correlações a longa distância C-H de <i>Bixa 2</i> .	185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Camadas da pele	4
Figura 2. Estruturas químicas de antibióticos	15
Figura 3. Alvos antibacterianos.	17
Figura 4: Estrutura de alguns antimicóticos	20
Figura 5. Mecanismo de ação dos diferentes antimicóticos	21
Figura 6. Mecanismo de resistência genética aos agentes antimicrobianos	28
Figura 7. Estruturas de alguns antimicrobianos de plantas	32
Figura 8. Caminho biossintético de ácidos hidrocínâmicos, antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, catequinas e taninos condensados	41
Figura 9. Forma oxidada dos compostos fenólicos	42
Figura 10. Reação do DPPH	45
Figura 11. Agliconas mais Ativas como Antioxidantes	46
Figura 12: Estrutura da hipolaetina 8- <i>O</i> - β -glucuronídeo	68
Figura 13: estrutura da quercetina 3- <i>O</i> - β -xilopiranosídeo	70
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CCF (A) e ensaio de bioautografia em CCF (B) para os extratos aquosos ativos de <i>Schinus molle</i> (<i>Candida albicans</i>), <i>Schinus terebintifolius</i> (<i>Candida albicans</i>) e sobrenadante de <i>Anacardium occidentale</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	91
Figura 15. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos do sobrenadante de <i>Rosmarinus officinalis</i> t, (a) detecção por DAD em 254 nm e 332 nm, (b) detecção por DAD em 230 nm; e sobrenadante de <i>Bixa orellana</i> , (c) detecção por AFD em 254 nm e 332 nm.	101
Figura 16. Cromatogramas obtidos por CCF revelados com sulfato cérico (A) e ensaio de bioautografia em CCF (B) para os sobrenadantes de <i>Bixa orellana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	102

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuação)

Figura 17. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadante de (a) <i>Anacardium occidentale</i> , (b) <i>Xanthosoma sagittifolium</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	118
Figura 18. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadantes de (c) <i>Malpighia glabra</i> e (d) <i>Rosmarinus officinalis</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	119
Figura 19. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadante de (a) <i>Anacardium occidentale</i> , (b) <i>Xanthosoma sagittifolium</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	132
Figura 20. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadantes de (c) <i>Solanum</i> sp., (d) <i>Crotalaria palida</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	133
Figura 21. Cromatograma de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtido do sobrenadante de (e) <i>Kalanchoe brasiliensis</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	134
Figura 22. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos (a) sobrenadante de <i>Bixa orellana</i> , (b) partição em acetato de etila de <i>Bixa orellana</i> detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	152
Figura 23. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos de (c) F9 bioativa e (d) <i>Bixa</i> 1 detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	153
Figura 24. Deslocamentos em UV para o flavonóide <i>Bixa</i> 1	158
Figura 25. Cromatograma de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtido de <i>Bixa</i> 2 detecção por AFD em 254 nm e 332 nm	178

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Etapas de fracionamento para <i>Bixa orellana</i> e procedimentos posteriores ao fracionamento	62
Esquema 2. Etapas para a obtenção do sobrenadante, precipitado e das partições em diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e fase aquosa IV a partir do extrato aquoso total de <i>Bixa orellana</i> .	63
Esquema 3. Fracionamento da partição butanólica das folhas caules e sementes de <i>Bixa orellana</i> L.	65

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Arbusto <i>Bixa orellana</i>	141
Foto 2. Folhas de <i>Bixa orellana</i>	141
Foto 3. Flores de <i>Bixa orellana</i>	142
Foto 4. Frutos maduros de <i>Bixa orellana</i>	142
Foto 5. Frutos maduros de <i>Bixa orellana</i>	143

RESUMO

Contribuição para o estudo químico e biológico de plantas alimentícias e medicinais brasileiras de uso na cicatrização e infecções da pele.

Gracilene Schmourlo

Orientador: Sônia Soares Costa

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Uma variedade grande de plantas nativas ou exóticas é utilizada pela população brasileira no tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias e que auxiliam na cicatrização de feridas da pele. Existem poucos trabalhos publicados na literatura que façam uma abordagem mais aprofundada sobre essas plantas. O objetivo deste trabalho é colaborar com o conhecimento químico e biológico de plantas que atuam na cura de doenças da pele, dando maior ênfase à espécie *Bixa orellana* L (urucum).

Os extratos aquosos totais de 19 espécies de plantas foram submetidos à precipitação por etanol, obtendo-se precipitado (macromoléculas) e sobrenadante (micromoléculas), o que permitiu verificar a importância da interação entre macro e micromoléculas na bioatividade de extratos de

plantas. Esses extratos aquosos e frações foram avaliados contra três fungos (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and *Cryptococcus neoformans*) e quatro bactérias (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA, *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina – MSSA, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*). As espécies *Momordica charantia* L. (melão-de-São-Caetano), *Schinus molle* L. (aroeira) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) apresentaram atividade antimicrobiana apenas no extrato aquoso. *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Solanum* sp., *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. (taioba), *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (coirama) e *Malpighia glabra* L. (acerola) mostraram atividade antimicrobiana apenas no sobrenadante. *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *B. orellana* e *Crotalaria pallida* Aiton (chocalho-de-cascavel) mostraram atividade antimicrobiana tanto para os extratos aquosos totais quanto para os sobrenadantes.

Os estudos da atividade antimicrobiana também permitiram verificar que as espécies *R. officinalis* e *B. orellana* apresentam atividade contra MRSA. O melhor resultado foi para o extrato aquoso de *R. officinalis* (6 µg/ml).

A análise do conteúdo flavanoídico (fenólicos) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência – arranjo de fotodiodo (CLAE – AFD) para as espécies que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana. *A. occidentale* e *K. brasiliensis* e *B. orellana* apresentaram uma grande riqueza em flavonóides. *R. officinalis*, *S. molle*, *Solanum* sp. e *C. pallida* mostraram

um conteúdo médio em flavonóides. *X. sagittifolium*, *M. glabra* e *S. terebinthifolius* apresentaram um conteúdo baixo ou ausente em flavonóides.

O estudo fitoquímico da espécie *B. orellana* forneceu dois flavonóides *O*-glicosilados: a hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo e a quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo. É a primeira vez que esses dois flavonóides foram isolados de *B. orellana*.

O estudo da atividade antioxidante pelo método do DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila) revelou melhor resultado para a espécie *S. terebinthifolius* (extrato aquoso). Das frações, o melhor resultado foi para a partição em acetato de etila de *B. orellana*.

Palavras-chave: Extratos de plantas medicinais e alimentícias brasileiras, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), bioautografia, precipitação por etanol, atividade antifúngica, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, MRSA, CLAE-AFD, DPPH, flavonóides, teses.

ABSTRACT

Contribuição para o estudo químico e biológico de plantas alimentícias e medicinais brasileiras de uso na cicatrização e infecções da pele.

Gracilene Schmourlo

Orientador: Sônia Soares Costa

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Many native or exotics plants are used by the Brazilian population to treat skin diseases related to fungi, bacteria and wounds. In published data there are few reports addressing this subject more deeply. This work is aiming to contribute in the chemical and biological knowledge of plants that heal skin diseases, with a special attention to the specie *Bixa orellana* L. (annatto).

The aqueous extracts of 19 plants were submitted to ethanol precipitation, generating the precipitate (macromolecules) and supernatant (micromolecules). The results showed the importance of interaction between micro and macromolecules in the bioactivity of plant extracts. The total aqueous extracts and fractions were used to assess the activity against three

fungi (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*) and four bacteria (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA, methicilin-susceptible *Staphylococcus aureus* – MSSA, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*). The species *Momordica charantia* L., *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi revealed antimicrobial activity only for the aqueous extract. *Anacardium occidentale* L., *Solanum* sp., *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott., *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Malpighia glabra* L. showed antimicrobial activity only for the supernatant. *Rosmarinus officinalis* L., *B. orellana* e *Crotalaria pallida* Aiton presented antimicrobial activity for aqueous extract and supernatant.

The studies of antimicrobial activity also allowed the identification of the species *Rosmarinus officinalis* L. and *Bixa orellana* as active plants against MRSA. The best result was for *Rosmarinus officinalis* (6 µg/ml).

The analysis of the flavonoidic (phenolics) content was performed by high-performance liquid chromatography – photodiode array (HPLC-PDA) for the species that presented antimicrobial activity. *A. occidentale* and *K. brasiliensis* revealed abundance in flavonoids. *R. officinalis*, *S. molle*, *Solanum* sp. and *C. pallida* were mildly rich in flavonoids. *X. sagittifolium*, *M. glabra* and *S. terebinthifolius* had low or total absence in flavonoids.

The phytochemical study *B. orellana* provided two *O*-glycosilated flavonoids: hypolaetin 8-*O*-β-glucuronide and quercetin 3-*O*-β-

xylopyranoside. It is the first time that both flavonoids have been isolated from this plant species.

The study of the antioxidant activity by the DPPH (radical 1,1-diphenil-2-picril-hydrazil) method showed best results for the specie *S. terebinthifolius* (aqueous extract). In relation to the fractions the best results detected were for the ethyl acetate partition of *B. orellana*.

Key-words: Extracts of Brazilian medicinal and food plants, *Bixa orellana* L. (Bixaceae), bioauthography, ethanol precipitation, antifungal activity, antibacterial activity, antioxidant activity, MRSA, HPLC-DAD, DPPH, flavonoids, thesis.



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A busca de poder curativo nas plantas é uma idéia antiga. As pessoas em todos os continentes desde a pré-história usam cataplasmas e chás de inúmeras plantas (Cowan, 1999). A medicina tradicional não só serve de base medicamentosa para as populações, mas também tem contribuído para a descoberta de novos produtos naturais bioativos importantes para a indústria farmacêutica (Barreiro e Fraga, 2002; Buenz *et al.*, 2005). Diferentes classes químicas de produtos naturais originaram diversos fármacos, de distintas categorias farmacêuticas, como: alcalóides (quinina, morfina, atropina, efedrina, pilocarpina, vincristina e vimblastina, artemisinina, taxol e muitos outros), terpenos (zoapatanol, ésteres de forbol, forskolina, ginkgolídeos), derivados fenólicos (gossipol, hipericina, hiperforina), flavonóides (rutina), etc. (Barreiro e Fraga, 2002).

Uma variedade grande de plantas nativas ou exóticas é utilizada pela população brasileira no tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias e que auxiliam na cicatrização de feridas da pele. Existem poucos trabalhos publicados na literatura que façam uma abordagem mais aprofundada sobre essas plantas. Neste trabalho serão analisadas química e biologicamente espécies de plantas que atuam na cura de doenças da pele, dando maior ênfase à espécie *Bixa orellana* L (urucum).

Breve descrição sobre a pele

A pele é um órgão dotado de capacidade de auto-reparação que assegura as relações entre o meio interno e externo. A sua anatomia e fisiologia são adaptadas às relações e sobrevivência do organismo. Ela constitui uma barreira mecânica e imunitária ativa, sendo composta de epiderme, derme e hipoderme. A epiderme, onde entre outras células estão os queratinócitos, está envolvida na produção de queratina, na defesa contra substâncias estranhas e formação de pigmento. A derme compreende a camada capilar, nervos e vasos sanguíneos e tem função de nutrir a epiderme. Já a hipoderme é o local de depósito para gordura e água (Figura 1) (Rook *et al.*, 1998).

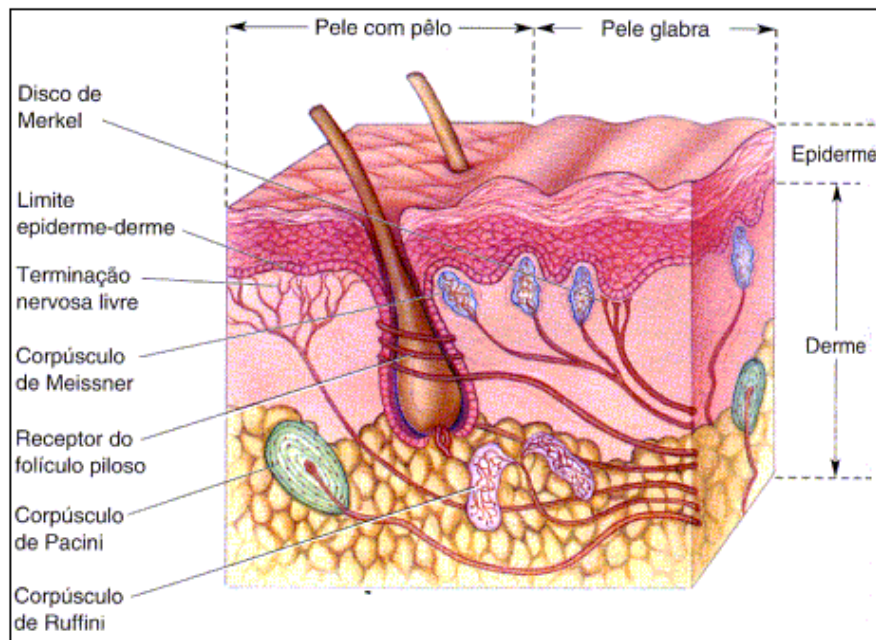


Figura 1: Camadas da pele (Bear *et al.*, 2002).

A epiderme é morfológicamente dividida em quatro camadas diferentes: estrato basal ou germinativo, mais profundo, é constituído de uma camada de células basais capazes de sofrer divisão mitótica; estrato espinhoso encontra-se logo acima da camada basal e é constituído de queratinócitos conectados por desmossomas; estrato granuloso, superpõe-se ao estrato espinhoso, é formado de duas a cinco camadas de células achatadas ricas em grânulos intracelulares de queratoialina; e, finalmente, o estrato córneo que é a camada mais externa da pele, onde as células perderam o núcleo e organelas citoplasmáticas (Jacob *et al.*, 1990; Rook *et al.*, 1998).

A flora microbiana cutânea é constituída por *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus aureus*,

Corynebacterium acnes, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pitirosporium ovale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. Alguns desses microrganismos podem se tornar patogênicos dependendo das condições sócio-econômicas, climáticas, idade, imunidade em que se encontra o hospedeiro. A maioria das bactérias da pele reside na superfície do estrato córneo e na parte superior dos folículos pilosos. Algumas, entretanto, residem mais profundamente. Essas têm a função de recolonizar a pele quando as bactérias mais superficiais são removidas. Esses microrganismos se distribuem por toda a extensão da pele, sendo mais concentrados, entretanto, nas áreas mais úmidas e quentes como axilar e períneo. A microbiota da pele, assim como a das mucosas, protege o hospedeiro da invasão por patógenos. Os mecanismos envolvidos são desconhecidos, mas incluem saturação dos sítios de ligação, competição por nutrientes, produção de bacteriocinas e outros inibidores químicos (Rook *et al*, 1998; Trabulsi *et al*, 2002).

Lesões da pele e cicatrização

Vários são os traumas que pode sofrer a pele. O mais óbvio é a ferida por incisão com pouco ou quase nada de tecido perdido. Em seguida, vem o ferimento com grande quantidade de tecido lesionado ou perdido sem interferir no fornecimento de sangue para a pele. E por último, ferimentos, como no caso de queimaduras graves, onde há danos para atividade funcional da pele, dificultando a proliferação de células e, conseqüentemente, o processo de cicatrização (Shakespeare, 2001). Em qualquer ferida pode ocorrer infecção. Muitos fatores como idade e estado geral da saúde podem aumentar a probabilidade de infecção, fatores determinantes na morbidade associada com feridas abertas. Uma ferida infectada não somente cura mais lentamente, mas também apresenta o risco de infecção sistêmica, que pode culminar com morte (Ward e Saffle, 1995). A pele também pode sofrer agressões microbianas sem necessidade de um ferimento para que isso ocorra como, por exemplo, acne.

A cicatrização em pessoas adultas consiste de vários estágios, começando pela agregação e desgranulação de plaquetas, coagulação sanguínea e formação de um tampão de fibrina que preenche a ferida inicialmente. Em seguida, vem a fase inflamatória com o aparecimento de leucócitos polimorfonucleares que estimulam o aparecimento de macrófagos e linfócitos que eliminam os microrganismos e secretam uma variedade de

fatores de crescimento e citocinas que modulam outras respostas para o processo de cicatrização. Essas células do sistema imunológico invadem o espaço da ferida preenchido por fibrina e, juntos com fibroblastos e vasos sanguíneos adjacentes começam a depositar uma matriz temporária de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e tecido rico em fibrinógeno que serve como substrato para as células de migração e proliferação (Rook *et al.*, 1998).

O uso de agentes anti-sépticos para auxiliar no processo de cicatrização é delicado. Apesar de reduzirem o crescimento de microrganismos, eles podem aumentar a intensidade e duração da inflamação, sendo tóxicos aos queratinócitos e fibroblastos retardando, assim, a epitelização. São exemplos, solução de iodo, que irrita o tecido, mancha a pele e provoca sensibilização, e peróxido de hidrogênio, que é um bactericida pouco eficaz, tóxico para os fibroblastos e prejudica a microcirculação (Ward e Saffle, 1995).

Os antibióticos tópicos são comumente utilizados na acne, na acne rosácea e nas infecções secundárias superficiais. A eritromicina, clindamicina, peróxido de benzoíla, metronidazol, pomada de bacitracina com zinco e creme de mupirocina são exemplos de formulações farmacêuticas tópicas. Os antibióticos de uso tópico normalmente são conjugados como, por exemplo, o Nebacetin, que é uma associação de sulfato de neomicina e bacitracina usado em infecções bacterianas da pele e mucosas. O tratamento de infecções fúngicas é feito com um grande número de antifúngicos tópicos e orais. A

griseofulvina, os azóis tópicos e orais e as alilaminas são os agentes mais eficazes disponíveis. A relevância da aplicação tópica é particularmente aparente em feridas isquêmicas, onde os antibióticos administrados por via sistêmica não conseguem penetrar. Além disso, existem formulações farmacêuticas encontradas no comércio para auxiliar no processo de cicatrização que incluem uma substância de limpeza, como por exemplo, colagenase e fibrinolisinase, e um antibiótico para evitar a contaminação da ferida. Alguns produtos à base de calêndula e centela também são usados para auxiliar no processo de cicatrização (Gilman *et al.*, 2003; DEF, 2003).

Infeções bacterianas e fúngicas da pele

A entrada de agentes patogênicos, que provocam infecções na pele e tecidos subcutâneos, pode ocorrer de várias maneiras através de via exógena (cortes, feridas, picadas de insetos ou outros animais, doenças da pele, ou outros fatores que levem à quebra da integridade do tecido) e via endógena (via hematogênica ou linfática). As lesões da pele podem ser dos tipos superficial eritematosa e ulcerativa e nodular (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

As lesões superficiais eritematosas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* recebem diferentes designações, tais como foliculite,

furunculose, carbúnculo e impetigo, de acordo com a localização e outras características. A foliculite é a infecção de um folículo piloso, que surge em decorrência da sua obstrução. O furúnculo é a infecção de folículo piloso ou glândulas sebáceas obstruídas, com envolvimento de tecido celular subcutâneo. Quando o furúnculo apresenta vários sítios de drenagem chama-se carbúnculo estafilocócico. O hordéolo ou terçol é uma infecção de uma glândula sebácea marginal das pálpebras. Outras infecções importantes são a erisipela provocada por *Streptococcus pyogenes*; o impetigo por *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*; paroníquia por *Staphylococcus aureus*; erisipelóide por *Erysipelotrix insidiosa* e eritrasma por *Corynebacterium minutissimum* (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

As infecções ulcerativas ou nodulares que aparecem na pele são principalmente difteria cutânea, antraces, tularemia e hanseníase, cujos agentes etiológicos são: *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* e *Mycobacterium leprae*, respectivamente (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

Os agentes mais comuns de infecção de lesões por queimaduras são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* sp. hemolíticos (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

Os principais patógenos causadores de infecções através de incisões cirúrgicas são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Bacteriodes* sp., *Clostridium* sp. e outras bactérias anaeróbias. As fontes de infecções normalmente são os próprios sítios colonizados do paciente, como cavidade oral, pele, trato genital feminino, trato digestivo. O corpo médico e de enfermagem pode ser também uma fonte de infecção, assim como os microrganismos presentes no ambiente hospitalar. Outros fatores como a diabete, a insuficiência vascular e a imunidade deprimida contribuem para a patogênese da infecção do corte cirúrgico (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

Os estreptococos *viridans* constituem um grupo de microrganismos (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis* e *S. anginosus*) também associados a infecções de feridas da pele (Stulberg *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

As infecções fúngicas formam um conjunto de enfermidades que atualmente desafiam os avanços da medicina. Podemos dividir as infecções fúngicas em cinco grupos: as infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e, finalmente, as oportunistas (Pfaller, 1996).

As infecções superficiais compreendem o grupo de infecções que afetam a camada mais externa de nossa pele e fâneros cutâneos, sendo

divididas naquelas que atingem a pele (tinea nigra e pitíriase versicolor) e as que atingem os fios de cabelo (Piedra branca e negra). Essas infecções geralmente são limitadas atingindo apenas a camada córnea da pele, não apresentando resposta imune. Etiologicamente os fungos *Malassezia furfur*, *Exophiala werneckii*, *Piedra hortae* e *Trichosporon beigelli* causam as respectivas síndromes: pitíriase versicolor, tinea nigra, piedra branca e piedra negra. Geralmente esse tipo de infecção apresenta um excelente prognóstico, sendo o principal problema, o estético (Aly *et al.*, 1996).

As infecções cutâneas estão quase sempre restritas às camadas queratinizadas da pele e dos fâneros cutâneos; os fungos responsáveis por essas infecções possuem queratinases, enzimas capazes de degradar a queratina, a geração de resposta imune, nesses casos, pode ocorrer. Etiologicamente os fungos causadores destas enfermidades são conhecidos como dermatófitos sendo divididos em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Essas infecções são mais severas quando comparadas às infecções superficiais, e se não tratadas de maneira correta (tratamento longo e trabalhoso, com assepsia local e diária), podem evoluir de forma grave (Weitzman *et al.*, 1995).

As infecções subcutâneas compreendem um grupo de infecções onde o fungo atinge as camadas mais inferiores da derme através de um trauma e conseqüente ruptura da derme. Geralmente ocorre o aparecimento de lesões

subseqüentes ao sítio de trauma. Etiologicamente qualquer fungo seria capaz de causar esse tipo de infecção, mas aqueles que predominam no solo aparecem em isolados clínicos mais freqüentemente. Algumas síndromes clínicas são conhecidas atualmente na medicina: esporotricose linfocutânea, com a formação de nódulos ulcerativos e a disseminação através do sistema linfático que drena a lesão, podendo atingir o pulmão e causar doença sistêmica, caso não tratada prontamente; a cromoblastomicose, caracterizada pela formação de verrugas no sítio primário de infecção, a feo-hifomicose, com a formação de cistos e os micetomas, com a inflamação generalizada da derme e tecidos subjacentes (Fothergill, 1996).

Alem disso, fungos que normalmente estão englobados no grupo que afetam as mucosas ou vias sistêmicas como a *Candida* sp. também podem infectar a pele (Sebghati *et al.*, 2000).

Breve descrição sobre os principais antibacterianos

A maioria dos antibióticos utilizados na clínica é produzida por bactérias do gênero *Streptomyces* e alguns por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium* (Tabela 1).

Tabela 1. Origem dos principais antibióticos (Trabulsi *et al.*, 2002).

Microrganismos produtores	Antibióticos
<i>Penicillium</i>	Penicilinas
<i>Cephalosporium</i>	Cefalosporinas
<i>Streptomyces</i>	Estreptomicina, neomicina, canamicina, tobramicina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, vancomicina, tienamicina
<i>Micromonospora</i>	Gentamicina, sisomicina
<i>Bacillus</i>	Polimixinas, bacitracina
<i>Chromobacterium</i>	Aztreonam

A estrutura química dos antibacterianos é bastante variada pelo fato de serem compostos orgânicos cíclicos. Os principais grupos são: betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, rifamicinas, macrolídeos, glicopeptídeos, lincosamidas, quinolônicos, sulfonamidas entre outras (Tabela 2 e Figura 2) (Coates *et al.*, 2002; Trabulsi, 2002).

Tabela 2. Principais classes de antibacterianos (Coates *et al.*, 2002).

Classes	Exemplos
β-lactâmicos	
Penicilinas	Penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina, temocilina
Cefalosporinas	
Primeira geração	Cepalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina
Segunda geração	Cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozila, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefmetazol
Terceira geração	Cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxoma, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir
Quarta geração	Cefpiroma, cefepima
Carbapenems	Imipenem, meropenem
Monobactams	Astreonam
Inibidores de β-lactamase	Clavulanato, sulbactam, tazobactam
Aminoglicosídeos	Estreptomicina, neomicina, canamicina, paromicina, gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, espectinomicina, sisomicina, dibecalina, isepamicina
Tetraciclina	Tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina
Rifamicinas	Rifampicina, rifapentina, rifabutina, bezoxazinorifamicina, rifaximina
Macrolídeos	Erithromicina, azitromicina, claritromicina
Lincosamides	Lincomicina, clindamicina
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina
Estreptograminas	Quinupristina, dafolpristina
Sulfonamidas	Sulfanilamida, ácido para-aminobenzoico, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfamethoxazol, sulfatidina
Oxazolidinonas	Linezolida
Quinolonas	Ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacino, pefloxacino, enoxacino, ofloxacino/levofloxacino, ciprofloxacino, temafloxacino, lomefloxacino, fleroxacino, grepafloxacino, esparfloxacino, trovafloxacino, clinafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, sitafloxacino
Outros	Metronidazol, polimixina, trimetoprim

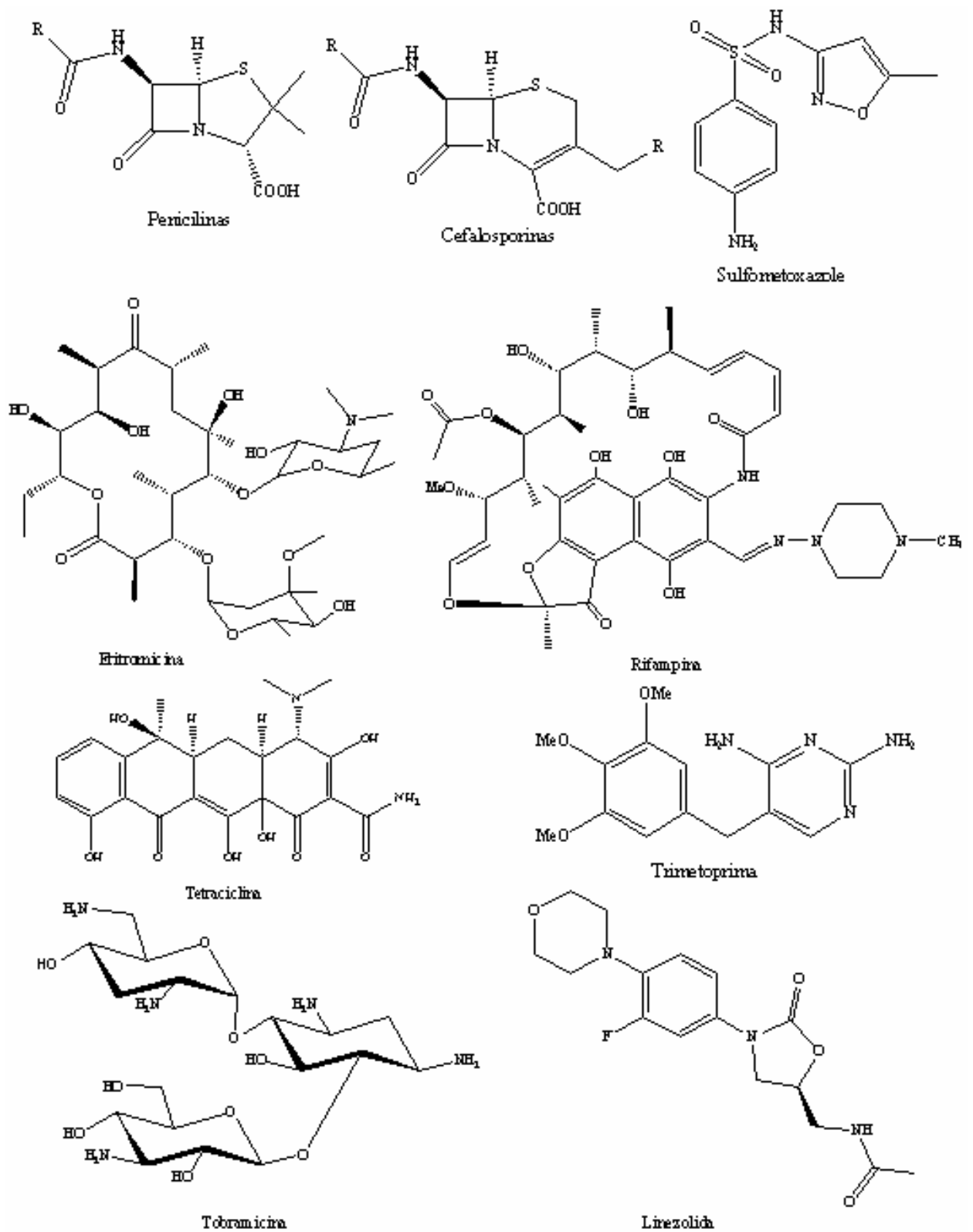


Figura 2. Estruturas químicas de antibióticos (Coates *et al.*, 2002)

Os agentes antibacterianos visam componentes específicos da célula bacteriana. Os mecanismos de interações dos antibacterianos com a célula

bacteriana podem ocorrer no nível da parede celular (antibióticos betalactâmicos, fosfomicina), síntese protéica (aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina e clindamicina, oxazolidinonas), síntese de ácidos nucleicos (metronidazol, derivados quinolônicos e rifamicinas) e inibição de enzimas (sulfonamidas, trimetoprim) (Figura 3) (Walsh, 2000; Coates *et al.*, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002).

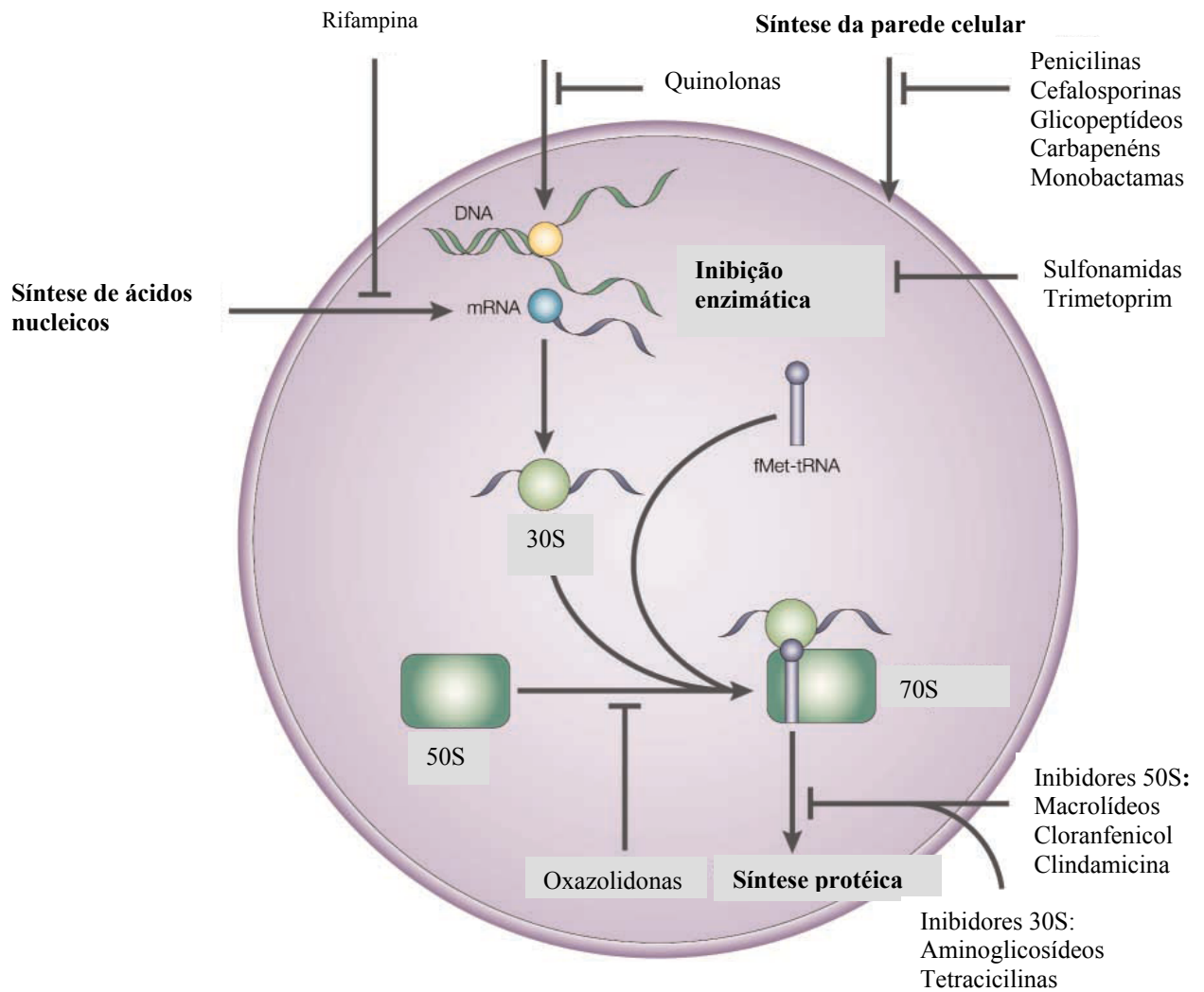


Figura 3. Alvos antibacterianos. Existem quatro alvos antibacterianos principais: síntese da parede celular, síntese de ácidos nucleicos, inibição enzimática de vias metabólicas centrais e síntese proteica. A figura acima mostra os antibióticos que são direcionados para cada alvo. No caso da síntese proteica, os aminoglicosídeos e as tetracilinas inibem a unidades 30 S e os macrolídeos, cloranfenicol e clindamicina inibem a 50S (Walsh, 2000; Coates *et al.*, 2002).

Breve descrição sobre os antimicóticos atuais e futuros

Em 1952 a anfotericina B (derivado poliênico) foi introduzida para o tratamento de infecções sistêmicas por fungos. Ela interage com ergosterol, a lipídio majoritário da membrana das células de fungos, através da formação de um complexo com a cadeia hidrofóbica dessa. No entanto, a semelhança do ergosterol com o colesterol explica os problemas de toxicidade que acontecem com a administração sistêmica da anfotericina B, principalmente nefrotoxicidade (Mechlinski *et al.*, 1970; Hartsel *et al.*, 1996; Viviani *et al.*, 1998).

Na metade da década de 1970 vários derivados azólicos foram introduzidos na terapêutica das micoses. Isso se deu pelo fato de a biossíntese do ergosterol ter sido elucidada detalhadamente, permitindo a interferência em vários passos metabólicos. Vários derivados azólicos podem ser aplicados topicamente, no entanto, somente alguns derivados imidazólicos como miconazol e cetoconazol e triazólicos como itraconazol e fluconazol podem ser administrados sistemicamente devido à alta toxicidade desses produtos. Os derivados imidazólicos são um grupo de antifúngicos que possuem na sua estrutura um núcleo imidazólico (Bastert *et al.*, 2001). As principais classes químicas de agentes antifúngicos podem ser visualizadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Antimicóticos atuais (Bastert *et al.*, 2001)

Classes químicas principais	Antifúngicos	Mecanismo de ação	Espectro de ação	Resistência	Efeitos colaterais
Derivados poliênicos	Anfotericina B(s,l), nistatina (l)	Complexa com o ergosterol e causa desorganização da membrana	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Trichosporum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Nefrotoxicidade
Derivados azólicos	(a) Imidazólicos (l,s)- miconazol e cetoconazol, (b) Triazólicos(s)- itraconazol, fluconazol	Inibe o citocromo P450	Largo	<i>Pneumocystis carinii</i>	Hepatotoxicidade rara, ginecomastia, insuficiência da adrenal, teratogenicidade
Alilaminas	Naftifina (l), Terbinafina (s,l)	Inibe a esqualeno epoxidase	Dermatófitos, largo espectro in vitro	<i>Pneumocystis carinii</i>	Efeitos adversos raros
Fluoropirimidinas	Flucitosina (5-FC) (s)	Interferência com RNA	Espectro limitado, incluindo <i>Candida</i> sp. em combinação com anfotericina B	Resistência primária e secundária, exceto monoterapia	Reduz a toxicidade renal da anfotericina B
Morfolinas	Amorolfina (l)	Inibe a -14 redutase e -7-8-isomerase	Dermatófitos, <i>Candida</i> sp.	Inativo quando administrado oralmente em micoses com perigo de vida	
Benzofuranos	Griseofulvina (s)	Inibe a síntese de guanina	Dermatófitos	<i>Candida</i> sp.	Teratogenicidade

l, Terapia local; s, terapia sistêmica

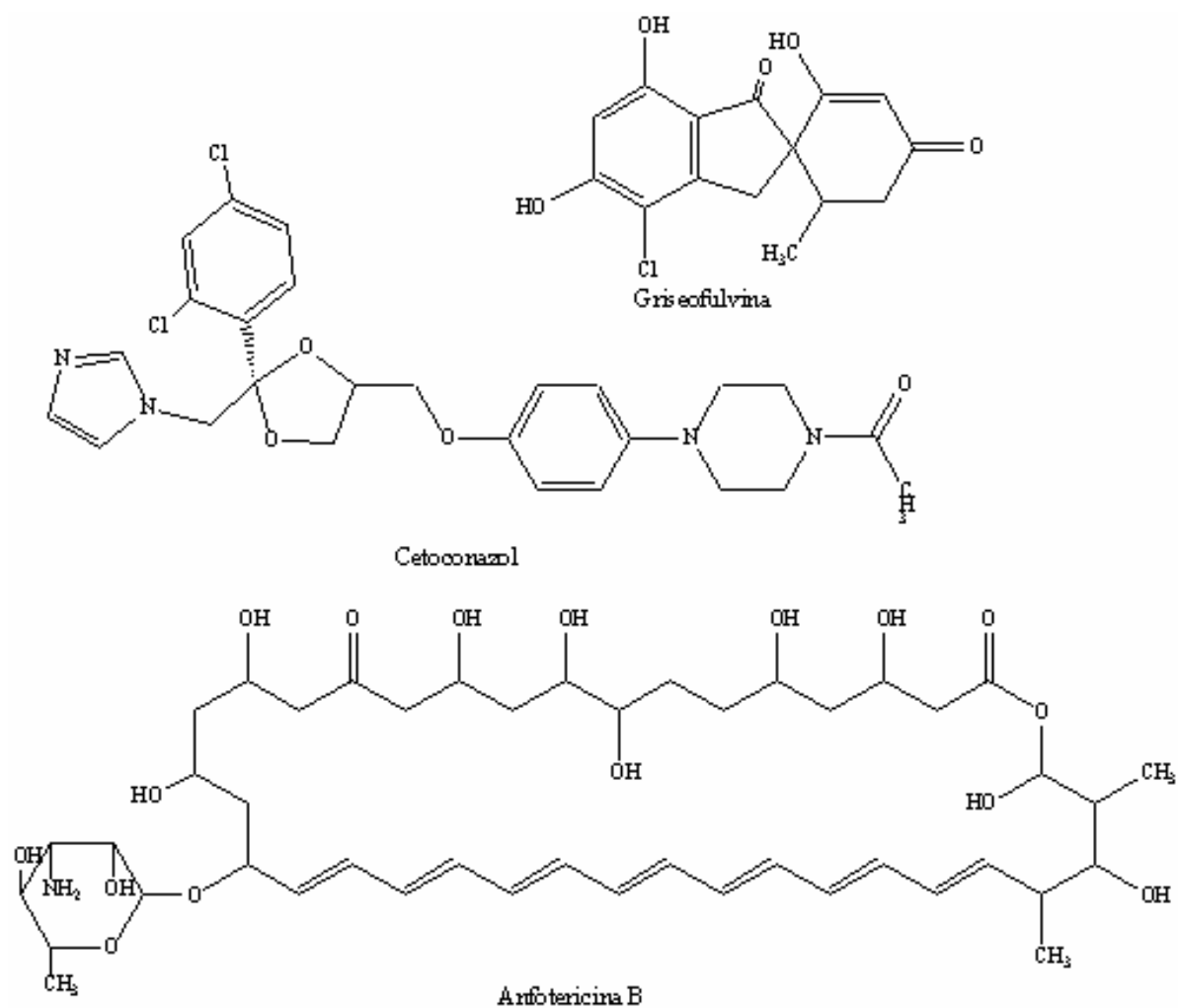


Figura 4: Estrutura de alguns antimicóticos

As interações dos antimicóticos com a célula fúngica podem ocorrer no nível de biossíntese da parede celular (candinas e micinas), na função do ácido nucléico (pentamidina), biossíntese de ácido nucléico (fluoropirimidinas, cotrimoxazol), mitose (griseofulvina), função da membrana (polienos) e biossíntese do ergosterol (alilaminas, azóis e morfolinas) (Bastert *et al.*, 2001) (Figura 5).

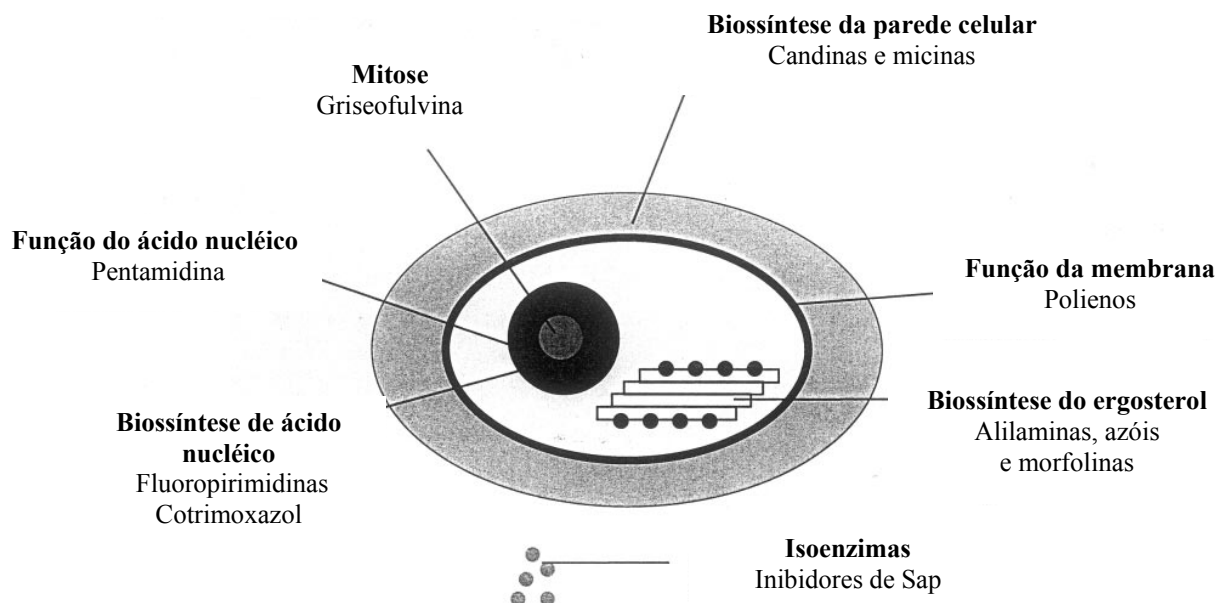


Figura 5. Mecanismo de ação dos diferentes antimicóticos (Bastert *et al.*, 2001)

Entre os novos antimicóticos estão aqueles que interferem com a biossíntese ou integridade da membrana fúngica como candinas e micinas. As candinas já estão em estágio mais avançado de avaliação de uso clínico. As pneumocandinas, papulocandinas e echinocandinas são ativas contra a maioria dos patógenos responsáveis por micoses sistêmicas. As micinas incluem as nikkomicinas, pramidicinas e benanomicinas (Tabela 4) (Bartizal *et al.*, 1992; Vasquez *et al.*, 1995; Wardle *et al.*, 1996; Stevens *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Zaoutis *et al.*, 2005).

Tabela 4. Antimicóticos futuros (Bastert *et al.*, 2001)

Classes químicas principais	Mecanismo de ação	Espectro de ação	Resistência	Efeitos colaterais
Echinocandinas	Inibição não competitiva da β -1,3-glucano-sintase	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	<i>C. neoformans</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Baixa toxicidade, hemólise
Pneumocandinas	Inibição não competitiva da β -1,3-glucano-sintase	<i>Candida</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>P. carinii</i>	<i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i>	Baixa toxicidade, hemólise
Papulocandinas	Inibição não competitiva da β -1,3-glucano-sintase	<i>Candida</i> sp.		
Nikkomicinas	Inibição da quitina sintase 3	<i>Coccidiodes</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Pramidicinas	Ligação as manoproteínas da parede celular	<i>Candida</i> sp., <i>C. neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Zigomicetos</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Sem toxicidade importante para os órgãos, descoloração da urina, aumento das transaminases hepáticas
Benanomicinas	Ligação as manoproteínas da parede celular	<i>Candida</i> sp., <i>P. carinii</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i>		

Nos últimos anos as aspárticas peptidases secretadas (Sap) são consideradas um dos principais fatores de virulência de *Candida albicans* (Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999). A Sap tem papel importante na adesão e penetração, os passos mais importantes na patogênese. A pepstatina A foi capaz de reduzir a aderência de *Candida* em ensaios com queratinócitos humanos. Outros inibidores de Sap são drogas como saquinavir e indinavir inibidores de peptidase-HIV (Bastert *et al.*, 2001).

Um exemplo de substância de origem natural é a caspofungina, amina semi-sintética solúvel em água, derivada da pneumocandina Bo que, por sua vez, é derivada da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis*. A caspofungina interfere com a biossíntese da parede celular através da inibição de 1,3- β -D-glucana em mecanismo semelhante o da pneumocandina e echinocandina (Ripeau *et al.*, 2002). Além disso, seis novos antimicóticos foram citados: rilopirox, laconazol, NND-20, butafenadine, eberconazol e voriconazol. O rilopirox é uma substância de aplicação tópica que é eficaz contra candidíase, tinea versicolor e dermatite seborréica. O laconazol, um imidazol utilizado no Japão desde de 1994, tem potencial contra tinea e candidíase das mucosas. O uso de laconazol 0,5 ou 1% em feridas acelera o processo de cicatrização. O NND-20, um análogo estereoseletivo do laconazol, tem pontencial contra tinea pedis. A butenafina é eficaz contra tinea pedis, tinea corporis e tinea cruris. O eberconazol, derivado imidazólico, é eficiente contra tinea. O voriconazol, derivado do fluconazol, é usado no tratamento de candidíase orofaríngeanas e aspergiloses em pacientes imunodeprimidos (Bastert *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2002).

Resistência microbiana as drogas

As bactérias podem ser classificadas como sensíveis, parcialmente resistentes ou resistentes aos agentes antimicrobianos. A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau de resistência adquirida, é propriedade bastante variável em bactérias (Tabela 5). Algumas raramente adquirem resistência e outras adquirem com grande frequência a resistência, podendo ser moderada ou intensa (Walsh, 2000; Trabulsi *et al.*, 2002).

Tabela 5. Resistência bacteriana (Trabulsi *et al.*, 2002)

Capacidade de adquirir resistência pelas principais bactérias patogênicas	
Bactérias	Grau de capacidade
<i>Staphylococcus</i>	+++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	± ^a
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	± ^a
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	++
<i>Neisseria meningitidis</i>	±
Enterobactérias	++++ ^b
<i>Pseudomonas</i>	+++
<i>Haemophilus influenzae</i>	++
Anaeróbias	± ^c
Micobactérias	++
Espiroquetídeos	±

a- Adquirem resistência com alta facilidade para certos antibióticos, mas não para as penicilinas; b- a *Salmonella typhi* raramente se torna resistente; c- o *Bacterioides fragillis* adquire resistência com facilidade; ± a +++++, graus de capacidade.

As doenças infecciosas são responsáveis por causar a morte prematura de mais de 50.000 pessoas por dia em todo mundo. Atualmente, a resistência a antibióticos por patógenos humanos como bactérias e fungos têm sido comumente relatadas. A resistência a drogas por bactérias e fungos torna ainda mais complicado o tratamento de pacientes imunocomprometidos e debilitados, especialmente aqueles acometidos com o HIV, transplantados e com câncer (Asres *et al.*, 2001). Tem sido constatada resistência em pacientes infectados com HIV, tratados com fluconazol, em infecções por *Candida albicans*. Em alguns casos, resistência ao fluconazol confere resistência cruzada com outros azoles, ou ainda, a transferência de patogenicidade de *C. albicans* para *C. glabrata* e *C. krusei* (Sanglard *et al.*, 1995; Albertson, 1996; Bastert, 2001). Um outro patógeno relevante quando o assunto é resistência é o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) envolvido em infecções nosocomiais em estabelecimentos de saúde incluindo hospitais e casas de convalescença (Iyer e Jones, 2004). O MRSA está associado com tempo de internação mais prolongado, custos e taxas de mortalidade maiores do que o *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) (Farr, 2004). O isolamento de cepas de MRSA não está mais restrito somente a pacientes com infecções nosocomiais ou com outros fatores de predisposição. O MRSA adquirido dentro de comunidades está aumentando em crianças e adultos (Herold *et al.*, 1998; Iyer e Jones, 2004; Sharma *et al.*, 2005).

Nenhuma classe de novos antibióticos foi produzida em 37 anos entre a introdução do ácido nalidíxico em 1962 e a linezolida em 2000. Todas as substâncias antibacterianas que entraram no mercado durante essa época foram modificações de moléculas existentes. Para piorar esse quadro, o número de cientistas envolvidos em pesquisa básica foi reduzido. Atualmente, todos os países têm bactérias resistentes aos antibióticos. Em algumas regiões, a causa de 25% de pneumonia adquirida em comunidades, está relacionada com *S. pneumoniae*, resistente à penicilina, e mais de 70% das bactérias que provocam infecções hospitalares nos Estados Unidos resistem a pelo menos uma das principais substâncias usadas na terapêutica contra infecções bacterianas. Até para o antibiótico vancomicina - a droga de escolha para o tratamento de *S. aureus* resistente a múltiplas drogas - já foram relatados casos de resistência (Silver e Bostian, 1993; Coates *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005).

Para sua sobrevivência as bactérias têm desenvolvido uma grande gama de mecanismos de resistência. Os fatores que determinam o desenvolvimento de resistência são complexos e interdependentes, e incluem mecanismos de ação, caso o antibiótico seja dependente do tempo ou da concentração para matar a bactéria, ou ainda, da potência do antibiótico contra uma população de bactérias e magnitude e duração da concentração sérica disponível. Foi proposto que os antibióticos como rifampicina, que tem como alvo uma única enzima, são mais propensos ao desenvolvimento de resistência, enquanto

substâncias como a penicilina que inativam vários alvos irreversivelmente, geram resistência mais lentamente. As bactérias encontraram antibióticos naturais, como β -lactâmicos e macrolídeos, no meio ambiente, portanto a resistência em relação aos produtos naturais evoluiu e é disseminada por transferência horizontal. Dessa forma, acreditou-se que resistência a antibióticos sintéticos apareceria lentamente, infelizmente a resistência a esses agentes sintéticos tem surgido rapidamente. O uso extenso de antibióticos na população humana, pelo menos para algumas espécies de micróbios, provoca o aparecimento de resistência (Coates *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana são inativação da droga, modificação do sítio de ação (enzima, ribossoma, precursores da parede celular), modificação da permeabilidade da parede celular, superprodução de enzimas alvo e desvio de etapas (Figura 6) (Coates *et al.*, 2002).

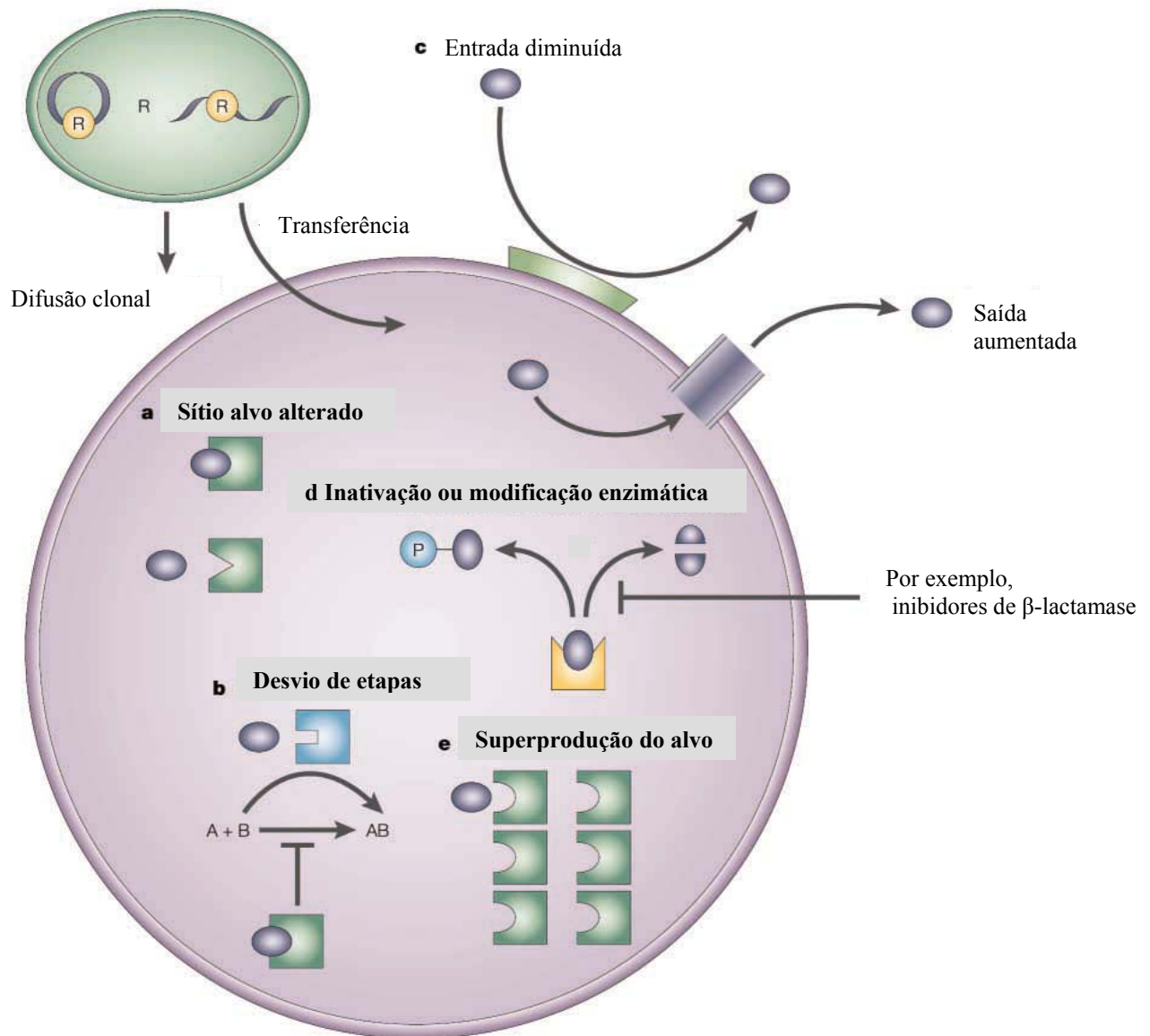


Figura 6. Mecanismo de resistência genética aos agentes antimicrobianos. As bactérias têm desenvolvido, ou desenvolverão, resistência genética a todos os antibióticos encontrados no comércio. Os cinco principais mecanismos que as bactérias utilizam para resistir aos antibióticos são mostrados nessa figura. **a** O sítio de ação (enzima, ribossomo ou precursores da parede celular) pode ser alterado. **b** As etapas inibidas podem ser desviadas. **c** As bactérias podem reduzir a concentração intracelular de antibióticos, seja reduzindo a permeabilidade da membrana, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*, ou aumentando o efluxo. **d** Elas podem inativar a droga. Por exemplo, algumas bactéria produzem β-lactamase, que destroem o anel β-lactâmico das penicilinas. **e** A enzima alvo pode ser superproduzida pela bactéria (Coates *et al.*, 2002).

No presente cenário de surgimento de patógenos multi-resistentes às drogas utilizadas, surge a imediata necessidade da descoberta de novas substâncias antimicrobianas de outras fontes, incluindo as plantas. Pois, as substâncias antimicrobianas presentes em plantas talvez inibam os microrganismos por mecanismos diferentes dos antibióticos usados correntemente e podem ter valor clínico no tratamento de cepas resistentes (Elof, 1998; Lee *et al.*, 1998).

Plantas e suas propriedades antimicrobianas

Estima-se que exista entre 250000 a 500000 espécies de plantas na terra. Apenas um pequeno percentual (1 a 10%) é usado como alimento pelos humanos e animais. A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta das espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460 – 337 a.C.) mencionou 300 a 400 plantas medicinais e recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Encontram-se também documentados, dados de 2.500 a 3.000 anos atrás, que alguns povos como chineses e indianos, e/ou ainda povos mais primitivos, utilizavam mofo, pão mofado, papa de soja e outros produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios. No primeiro século d.C., Dioscorides escreveu *De Materia Medica*, um catálogo de plantas medicinais que se tornou o protótipo para as

farmacopéias modernas, oferecendo a descrição de aproximadamente 30 plantas medicinais. Durante a Idade Média, os relatos pontuam o uso do cloreto de mercúrio para o tratamento de infecções. Posteriormente, os estudos e descobertas das etiologias microbianas das infecções por Louis Pasteur e Robert Koch, as investigações e o uso de substâncias com atividade antimicrobiana, foram conduzidas de forma mais científica (Cowan, 1999; Lima, 2001).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, a busca das mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina. As plantas apresentam várias vias metabólicas secundárias que dão origem a substâncias, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, carboidratos, terpenos, poliacetilenos, óleos que, por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (Tabela 6, Figura 7) (Simões *et al.*, 1999; Cowan, 1999; Lima, 2001).

Tabela 6. Principais classes de substâncias antimicrobianas isoladas de plantas (Cowan, 1999)

Classe de Substância	Subclasse	Exemplo(s)	Atividade	Mecanismo
Fenólicos e polifenóis	Fenóis Simples	Catecol	Antimicrobiano em geral	Privação de substrato
		Epicatequina	-	Rompe a membrana
	Ácidos fenólicos	Ácido cinâmico	-	-
		Ácido gálico	<i>S. aureus</i>	-
		Ácido caféico	Vírus, bactérias e fungos	-
	Quinonas	Hipericina (antraquinona, <i>Hipericum perforatum</i>)	Antimicrobiano em geral	Ligam-se as adesinas, complexa com a parede celular, inativa enzimas
	Flavonóides	Crisina	Contra HIV	Liga-se as adesinas
	Flavonas	-	-	Complexam com a parede celular
		Abssinona	-	Inativa as enzimas
	Flavonóis	Totarol	<i>P. acnes</i> , bactérias Gram-positivas	-
	Taninos	Elagitaninos	Vírus, bactérias e fungos	Liga-se às adesinas, inibe enzimas, privação de substrato, complexa com a parede celular, rompe da membrana, complexa com íons metálicos
	Coumarinos	Warfarina	-	Interação com o DNA de moléculas eucarióticas
Terpenóides, óleos essenciais	-	Capsaicina	Bactéria	Rompimento da membrana
Alcalóides	-	Berberina	Bactérias, protozoários	Intercala-se com o interior da membrana e/ou com o DNA
		Piperina	Fungos, bactérias	
Lectinas e polipeptídeos	-	Aglutinina específica para manose (MAP 30 da <i>Momordica charantia</i>)	Vírus	Bloqueia a fusão viral ou adsorção
		Fabatina	Bactérias	Forma pontes de dissulfeto
Poliacetilenos	-	85-Hepatodeca-2(2), 9(2)-dieno-4, 6-diino-1,8-diol	Bactérias, fungos, vírus	-

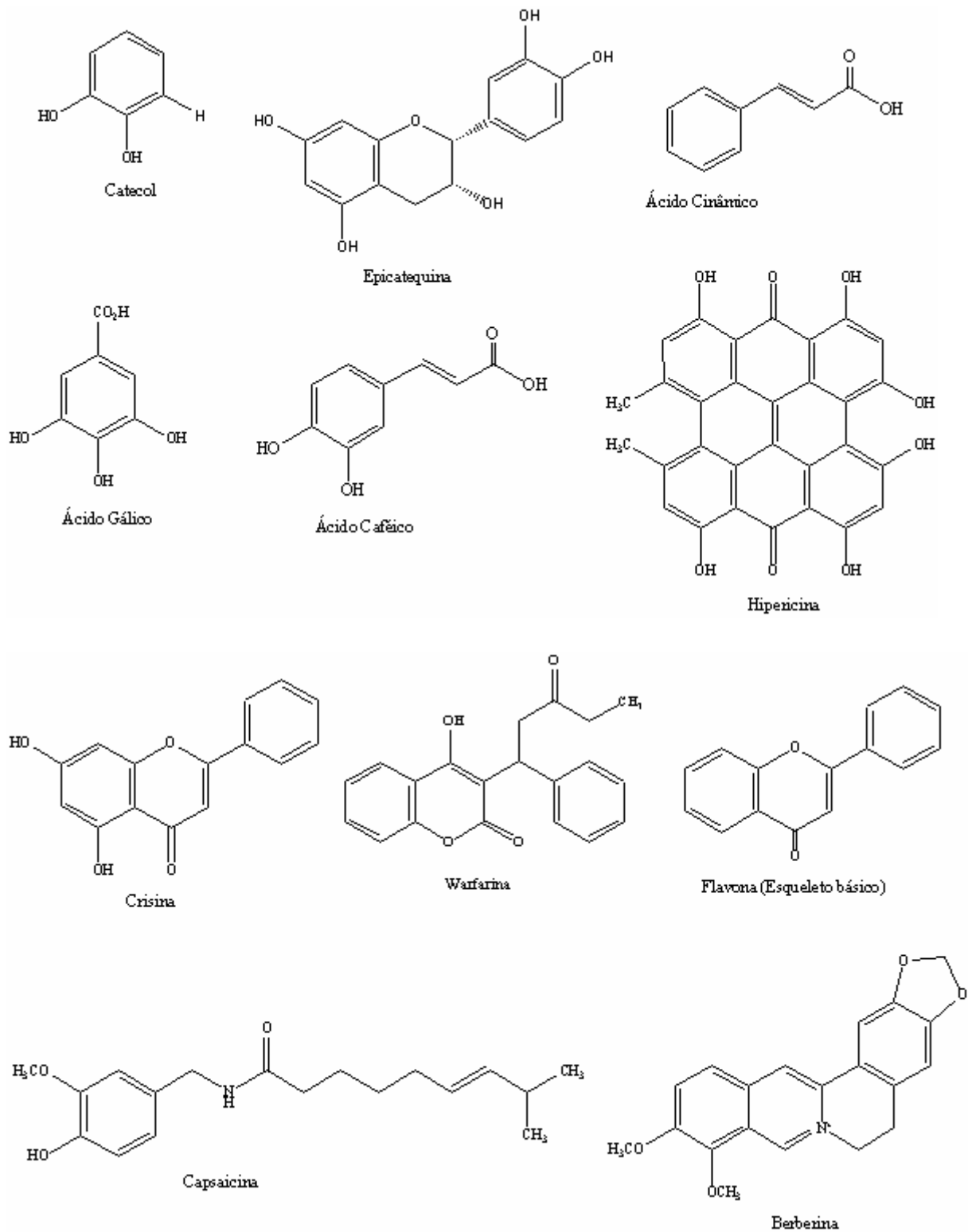


Figura 7. Estruturas de alguns antimicrobianos de plantas (Cowan, 1999).

A produção pelas plantas das substâncias anteriormente citadas pode dar-se em determinadas espécies vegetais quando as mesmas são agredidas por bactérias, fungos, parasitos, vírus ou outros agentes agressores. Nessas condições, as plantas rapidamente começam a sintetizar substâncias de defesa, como resultado da interação entre os sistemas metabólicos do hospedeiro e do parasito. Essas substâncias, as fitoalexinas, não existem nas plantas antes da infecção. Entre os metabólitos secundários que constituem as fitoalexinas estão os fenóis, lignanas, isoflavonóides, fenantrenóides, flavonóides, benzofuranos, naftoquinonas, poliacetilenos, monoterpênos e diterpênos (Simões *et al.*, 1999; Cowan, 1999; Lima, 2001).

Neste século, os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn pesquisando a atividade dos extratos de 2.300 plantas contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* verificou que as espécies vegetais de 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou ambos microrganismos (Lima, 2001).

A partir da década de 1950 foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais, como diterpeno biflorina, oriundo das raízes de *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae) e a maitenina, um triterpeno isolado de espécies das famílias Celastraceae e Hippocrataceae. Incluem-se, entre os compostos importantes como antimicrobianos, a primina e a miconidina, isolados da *Miconia* (Melastomaceae), lapachol e derivados, oriundos da *Tabebuia*

avellaneda Lor ex. Griseb (Bigoniaceae), a plumbagina, das raízes de *Pera ferruginea* Muell. Arg., família Euphorbiaceae. Todos esse compostos produziram atividade antibacteriana e antifúngica em baixas concentrações sobre o crescimento dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Nicondia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Cândida* e *Cryptococcus*. Dentre eles, a biflorina foi usada com eficácia na terapêutica de candidíase cutânea (Cai e Wu 1996; Lima, 2001; Park *et al.*, 2005).

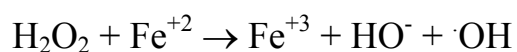
Plantas e suas propriedades antioxidantes

O uso terapêutico de plantas parece ser tão antigo quanto a própria espécie humana. Entretanto, o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente recente, especialmente nas duas últimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica nesse sentido, envolvendo desde o efeito de extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados (Budzianowski *et al.*, 1991). As plantas estudadas até o momento, e que apresentam propriedades antioxidantes, compreendem desde algas, passando por briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas, ou seja, todos os grandes grupos taxonômicos vegetais (Wilhelm Filho *et al.*, 2001).

As oxidações biológicas realizadas através do oxigênio molecular representam a principal fonte de energia utilizada pela grande maioria de plantas e animais. As reações bioquímicas geram produtos secundários conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), na ordem de 2 - 5 % dos produtos finais (H_2O e CO_2), tanto através da produção biológica de oxigênio pelo processo fotossintético, como através da utilização do oxigênio pela respiração celular (Halliwell, 1987; Wilhelm Filho *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo ou produção excessiva de EROs está implicado em muitas doenças, tais como câncer, aterosclerose e diabetes entre outras, assim como no envelhecimento precoce (Finkel e Holbrook, 2000; Naik *et al.*, 2004). O alvo principal dos EROs na célula são os lipídeos de membrana, DNA e proteínas. Os EROs são metabólitos ativos que incluem radical hidroxila ($\cdot OH$), ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e radical peroxila ($ROO\cdot$) e os seus precursores ativos, a saber, oxigênio singlete (1O_2), hidroperóxido (H_2O_2) e ozônio (Svobodová *et al.*, 2003).

Das espécies acima citadas, três são radicais livres de oxigênio, oxirradicais ou ERO: $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ e $ROO\cdot$, o primeiro é uma ERO pouco reativa, atuando quimicamente como um redutor suave, enquanto os outros dois são oxirradicais de reatividades químicas capazes de proporcionar reações de iniciação. O H_2O_2 é uma molécula estável, com capacidade de reagir com o Fe^{+2} dos sistemas biológicos, produzindo o radical, através da reação de Fenton:



O oxigênio singlete é um estado eletrônico excitado do oxigênio molecular, que possui alta reatividade e capacidade oxidante. Paralelamente e mais recentemente, ficou evidenciada a contribuição deletéria de espécies reativas de nitrogênio (ERN) nos sistemas biológicos, pela ação do monóxido de nitrogênio ou óxido nitroso (NO), mas principalmente através de sua combinação com o O_2^- formando peroxinitrito (ONOO^-), o qual, mesmo não sendo um radical, é uma forma muito reativa (Pietta, 2000).

Várias plantas já foram estudadas como fonte potencial de antioxidantes naturais seguros para a indústria de alimentos; várias substâncias tem sido isoladas, muitas delas são polifenóis. A proteção que frutas e legumes proporcionam contra várias doenças tem sido atribuída a vários antioxidantes como vitamina C, vitamina E, β -caroteno e compostos polifenólicos. Antioxidantes biológicos, especialmente vitamina E, foram os primeiros a serem estudados (Abushita *et al.*, 1997; Aruoma, 1998; Moure *et al.*, 2001). Muitos estudos mostraram que os compostos fenólicos reduzem a oxidação *in vitro* das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), principalmente àqueles fenólicos que apresentam várias hidroxilas que são geralmente os mais eficazes na prevenção da oxidação de lipídios e LDL (Meyier *et al.*, 1998; Moon e Terao, 1998; Nakagawa *et al.*, 1999; Moure *et al.*, 2001). Os

flavonóides podem também prevenir a destruição de antioxidantes endógenos de LDL, como: tocoferóis, carotenos como o licopeno e ubiquinona, inibir a oxidação de LDL mediada pelas células ou enzimas envolvidas nas reações de inicialização (xantina-oxidase, glutiona-redutase, lipooxygenase e NADPH-oxidase) e podem preservar a atividade da enzima associada às lipoproteínas de alta densidade (HDL), paraoxonase (Vaya *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos fazem parte de uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas (Rice-Evans *et al.*, 1996; Svobodová *et al.*, 2003). São encontrados, essencialmente, nas suas formas glicosiladas nas folhas, flores e frutos e outros tecidos de plantas, aparecendo na forma de agliconas em madeiras enquanto nas sementes podem ser encontrados em duas formas. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, incluindo os seus derivados funcionais (Simões *et al.*, 1999). A sua ocorrência em tecidos animais e outros que não os das plantas é explicado pela ingestão de produtos de origem vegetal. Os compostos fenólicos existentes nos alimentos são geralmente ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas e taninos. Muitas das propriedades dos produtos de origem vegetal estão associadas com a presença e o seu conteúdo em polifenóis.

Em relação aos antioxidantes vegetais, os flavonóides constituem o grupo mais representativo, encontrado nas mais diversas formas (Rice-Evans, 2001), tendo sido descritas mais de seis mil substâncias distintas até a

presente data (Harborne e Williams, 2000). Em segundo lugar vêm os carotenóides que apresentam uma variedade de quase mil tipos de diferentes descritos em plantas (Wilhelm Filho *et al.*, 2001). Além destes dois grupos principais, existem representantes de outras classes químicas encontrados em plantas com propriedades antioxidantes já descritas na literatura, como terpenóides, cumarinas, saponinas, curcuminas, ácido caféico, ácidos hidrocínâmicos, entre outros (Rice-evans *et al.*, 1996, 2001).

Polifenóis e via biossintética dos flavonóides

Os fenilpropanóides derivados da via biossintética do ácido chiquímico são precursores de diversas classes de fenólicos, tais como ligninas, flavonóides, isoflavonóides, taninos, ácidos fenólicos, cumarinas e estilbenos. Uma das características intrigantes dos fenilpropanóides é a modificação rápida nos fluxos e nas taxas de sua síntese e metabolismo. Esse aspecto é confirmado pela ocorrência de fenólicos específicos em determinados tipos de células, em resposta a estímulos específicos (luz, patógenos e ferimentos) ou durante estágios de desenvolvimentos particulares. Os produtos finais da via biossintética do chiquimato, os aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina são gerados a partir dos precursores fosfo-enol-piruvato e eritrose-4-fosfato. Fenilalanina amonialiase (PAL), a primeira enzima da via biossintética dos fenilpropanóides, remove fenilalanina da via biossintética

dos aminoácidos para gerar ácido cinâmico e NH₃ em uma desaminação não-oxidativa (Rohde *et al.*, 2004).

Os flavonóides são produtos naturais importantes e nas plantas estão envolvidos na polinização por insetos, na proteção contra raios UV, na resistência contra doenças e estresse biológico (Winkel-Shirley, 2001a, b). A biossíntese dessas substâncias vem sendo estudada há muitos anos, especialmente nas flores, frutas e sementes. Em relação à cor de flores, a biossíntese das antocianinas foi estudada extensivamente, incluindo pesquisas bioquímicas e genéticas usando mutantes ou linhas cruzadas de petúnia e de milho (Holton e Cornish, 1995). Variedades mutantes conjugadas com elementos transponíveis realizadas em milho, petúnia e *Arabidopsis* facilitaram a clonagem rápida de genes responsáveis pela biossíntese de flavonóides (Winkel-Shirley, 2001a, b). Em *Arabidopsis*, todas as enzimas da via biossintética central dos flavonóides, exceto flavonol sintase (FLS), são codificadas por um único gene.

A formação de cor em flores, frutos e outras partes de plantas se estabelece pela produção de enzimas envolvidas em muitos casos na biossíntese de flavonóides. Noda *et al.* (2004) conseguiram o isolamento e caracterização de clones de seqüências completas de cDNA dos principais genes responsáveis pela via biossintética de flavonóides, incluindo a chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), flavonóide 3',5'-hidroxilase (F3'5'H), diidroflavonol 4-redutase (DFR),

antocianidina sintase (ANS) e FLS em flores de *Eustoma grandiflorum* (Figura 8). Nessa planta, os estágios de acumulação dos flavonóis e das antocianinas parecem ser claramente divididos. O índice de flavonóis aumenta antes da acumulação de antocianinas durante o desenvolvimento floral e declina quando as antocianinas começam a se acumular. As enzimas CHS, o CHI, e F3H são necessárias para a biossíntese de flavonóis e antocianinas e são expressas coordenadamente durante todo o estágio de desenvolvimento floral.

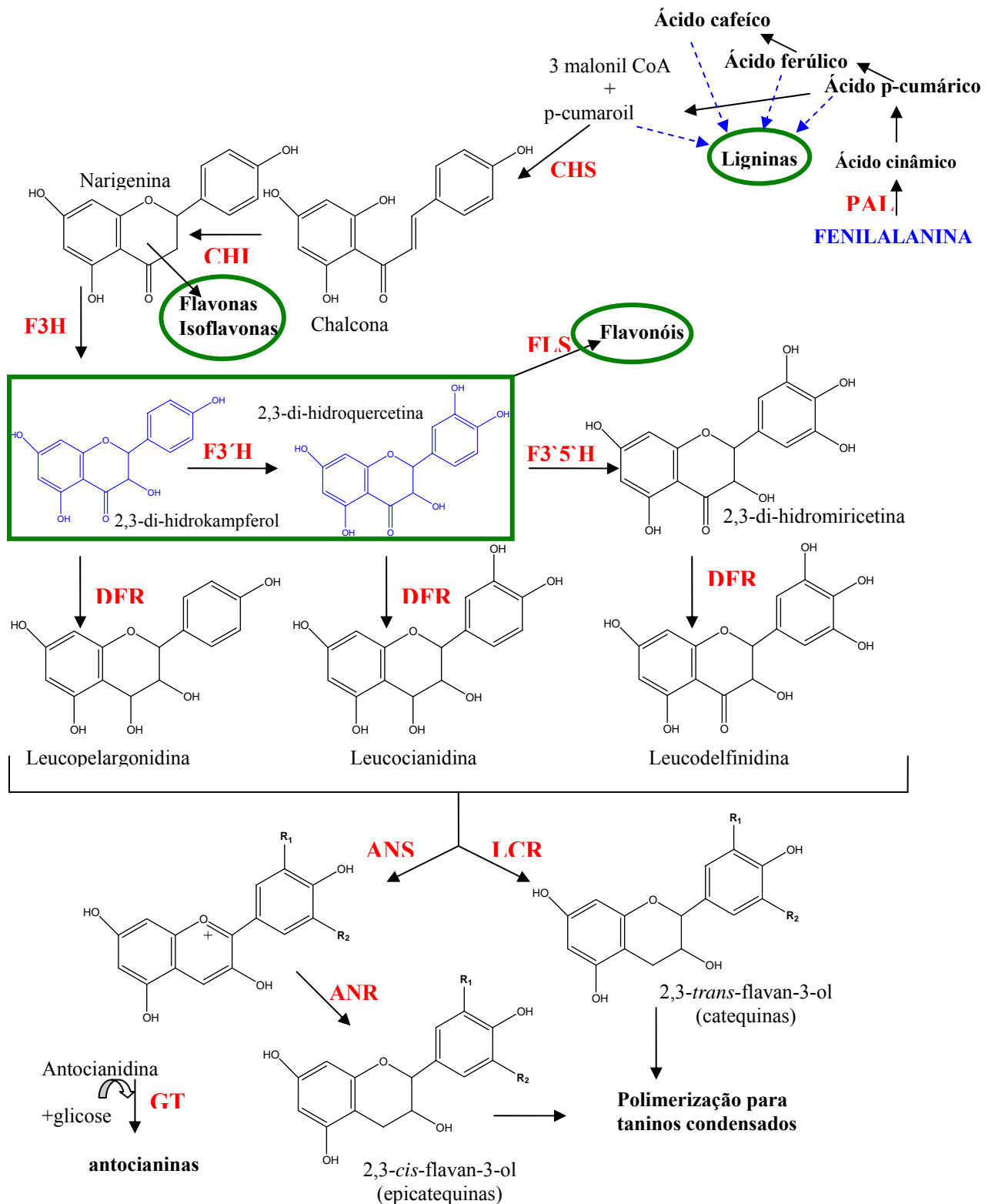


Figura 8. Caminho biossintético de ácidos hidrocinâmicos, antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, catequinas e taninos condensados. PAL, Fenilalanina amonialiase; CHS, Chalcona sintase; CHI, Chalcona isomerase; F3H, (2S) flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonóide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonóide 3',5'-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; DFR, diidroflavonol redutase; ANS, antocianina sintase; ANR, antocianina redutase; GT, antocianina glucosil transferase; LCR, leucoantocianidna redutase (Dixon e Paiva, 1995; Winkel-Shirley, 2001; Xie *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Noda *et al.*, 2004).

Atividade antioxidante de substâncias fenólicas

A presença de grupos doadores de elétrons nas posições *orto* e *para* em fenólicos aumenta a sua atividade antioxidante através de efeito indutivo. Embora a atividade de vários antioxidantes dependa de um certo número de fatores, a estabilidade ou reatividade do radical antioxidante primário formado após a perda do hidrogênio é sem dúvida o mais importante. Assim, a deslocalização (estabilização) do elétron radical ao longo do anel aromático dos compostos em questão é determinante neste processo (Figura 9) (Rice-Evans, 2001).

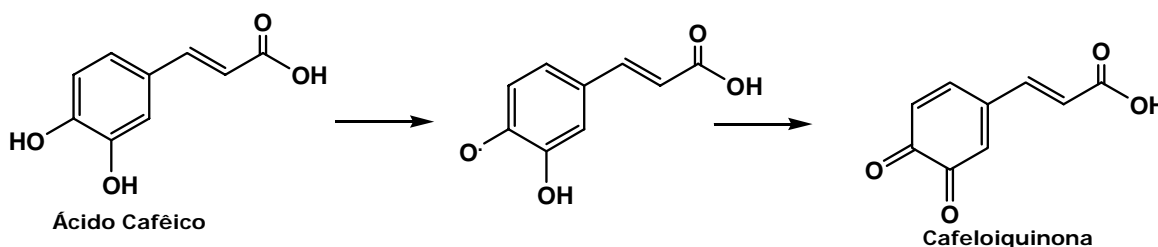


Figura 9. Forma oxidada dos compostos fenólicos (Rice-Evans, 2001).

Comparação da atividade antioxidante de substâncias fenólicas modelo

A relação estrutura-atividade tem sido usada como método teórico para prognóstico da atividade antioxidante. Muitos autores têm estudado esse aspecto da atividade antioxidante de substâncias (Hudson e Lewis, 1983; Das e Pereira, 1990; Ogata *et al.*, 1997; Zhang, 1999; Moure *et al.*, 2001).

Polifenóis poliméricos são antioxidantes mais potentes do que fenóis monoméricos simples; a capacidade antioxidante de taninos condensados e hidrolisáveis é, por exemplo, maior do que fenóis simples em relação a radicais peroxila (Hagerman *et al.*, 1998). Yamaguchi *et al.* (1999) observaram que quanto maior o grau de polimerização de flavonóis maior a capacidade seqüestradora de superóxido. O mesmo foi possível observar para a capacidade de inibir o radical O_2^- , que aumenta com o grau de polimerização de procianidinas (Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999), ou maior inibição da lipoperoxidação lipídica por dímeros de ácido ferúlico do que pelo ácido ferúlico (García-Conesa *et al.*, 1999). Também o efeito de anti-lipoperoxidação depende do número e da posição dos grupos de hidroxila e de metoxila no anel benzênico e da possibilidade de deslocalização de elétrons nas ligações duplas (Milic *et al.*, 1998; Moure *et al.*, 2001).

Métodos para a determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante pode e deve ser avaliada com testes diferentes para mecanismos distintos. Os métodos mais freqüentemente usados para medir os níveis de dano oxidativo em humanos avalia (1) dano oxidativo total ao DNA, (2) níveis de enzimas antioxidantes, níveis de antioxidantes de baixo peso molecular (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidases, ácido úrico, glutathione, flavonóides, catequinas e antocianinas) e vitaminas (E, C e

β -caroteno), (3) dano oxidativo aos lipídios (isoprostanos, TBARS) e (4) danos a proteínas (número de carbonilas protéicas e resíduos de tirosina modificados) (Aruoma *et al.*, 1997; Aruoma, 1999; Moure *et al.*, 2001). A maioria dos métodos é baseada na capacidade de seqüestrar diferentes radicais livres, mas também absorção de UV e capacidade de quelar também são responsáveis pela atividade antioxidante de sistemas oleosos (Moure *et al.*, 2001). Testes que medem a atividade seqüestradora de substâncias frente a radicais como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), óxido nítrico ($\cdot NO$), radicais alquilperoxila, $ABTS^{\cdot+}$ (cátion radical de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiozolina-6-sulfonato) e DPPH têm sido desenvolvido (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (Moure *et al.*, 2001; Aruoma *et al.*, 1997).

A metodologia mais comumente empregada para medir a capacidade seqüestradora de extratos totais e frações de plantas é o ensaio *in vitro* com o radical DPPH (Amié *et al.*, 2003). Esta substância apresenta uma coloração roxa em solução, que muda para o amarelo ao adicionar-se uma solução contendo a substância antioxidante (Figura 10).

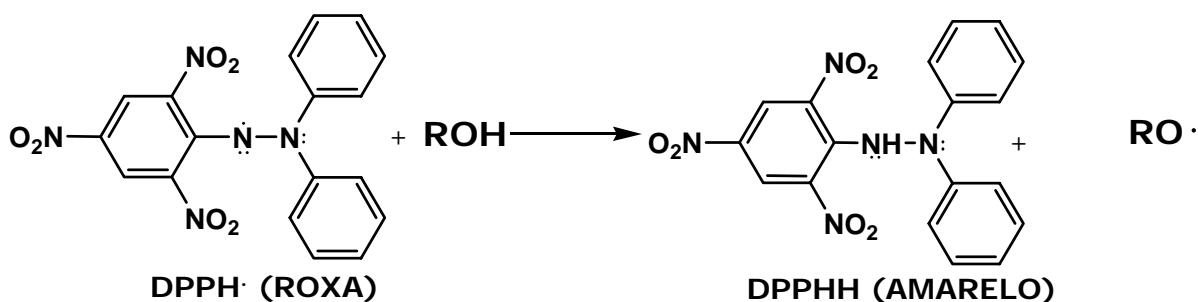


Figura 10. Reação do DPPH (Amié *et al.*, 2003).

Principais flavonóides com atividade antioxidante

Em geral os flavonóides que apresentaram maiores atividades antioxidantes nas diversas formas de teste, estruturalmente contêm grupos galoila (por exemplo, (-)-epigallocatequina) e catecólico (quercetina e (-)-epicatequina) ou são isoflavonóides (genisteína da soja). Isso foi comprovado em diversos testes *in vitro* (Terao *et al.*, 1994; Mohsen *et al.*, 2002). Metabólitos dessas substâncias no plasma sanguíneo também são ativos (Terao *et al.*, 1994; Hollman *et al.*, 1996; Manach *et al.*, 1999; Mohsen *et al.*, 2002). A presença de glicosilação nesses flavonóides até momento não foi comprobatória do aumento da atividade, mas podem facilitar o transporte e o processo de absorção pelo organismo. Os principais flavonóides antioxidantes têm como agliconas a epicatequina (Terao *et al.*, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1996; Harborne e Williams, 2000; Mohsen *et al.*, 2002), quercetina (Rice-Evans *et al.*, 1996; Hollman *et al.*, 1996; Manach, *et al.*, 1999; Pietta, 2000;

Murota e Terao, 2003) e genkuanina (Harborne e Williams, 2000). Esses esqueletos básicos podem ser observados na Figura 11.

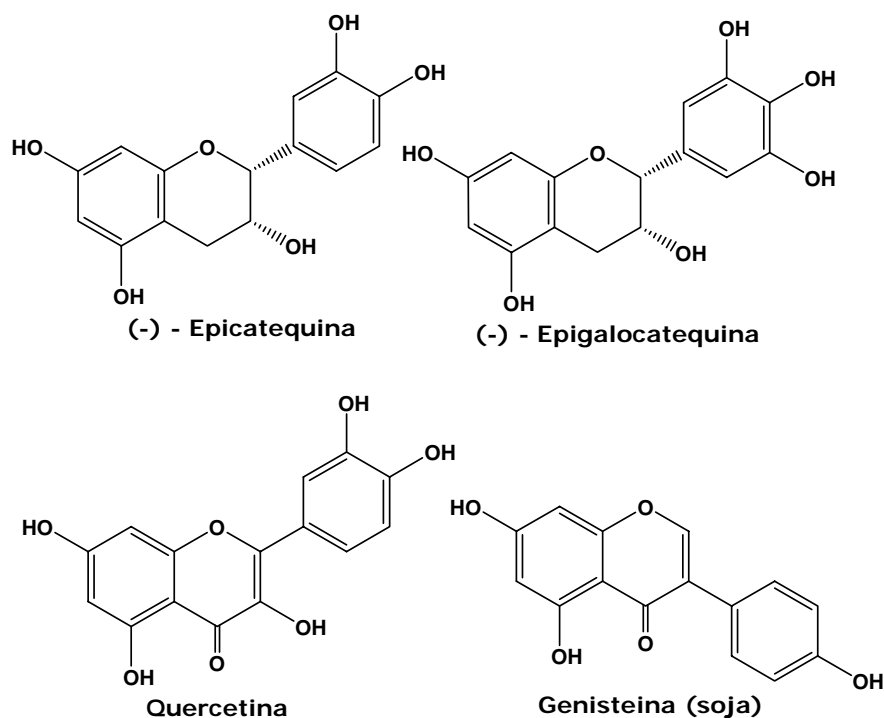


Figura 11. Agliconas mais ativas como antioxidantes (Svobodová *et al.*, 2003).

Os flavonóides e outros fenólicos de plantas são descritos, além da sua atividade seqüestradora de radicais livres, como tendo propriedades biológicas múltiplas, uma delas a antimicrobiana (Rice-Evans, 1996). Até agora foram feitos poucos estudos que tentam correlacionar a atividade antimicrobiana dessas substâncias com o seus potenciais antioxidantes e/ou habilidade seqüestradora de EROs (Osato *et al.*, 1993).

Detecção e identificação de substâncias fenólicas e flavonóides por CLAE-AFD

As substâncias fenólicas absorvem na região de UV e a maioria dos detectores para CLAE são feitos em comprimento de onda UV variável ou UV-visível (Lee e Widmer 1996). Nenhum comprimento de onda é ideal para monitorar todas as classes de fenólicos, pois eles apresentam máximos de absorbância em comprimentos de onda diferentes (Delage *et al.*, 1991). A maioria dos derivados do ácido benzóico exibe seus máximos de absorbância em 271-262 nm, exceto o ácido gálico e ácido siríngico que possuem máximos de absorbância em 271 nm e 275 nm, respectivamente (Torres *et al.*, 1987). Os ácidos hidrocínamicos absorvem em duas regiões, um máximo varia entre 225-235 nm e o outro entre 290-330 nm (Torronen *et al.*, 1997). Em 320 nm, os derivados de ácido cinâmico podem ser detectados sem nenhuma interferência dos derivados de ácido benzóico, que possuem uma absorvidade maior em 254 nm. No entanto, a detecção em 280 nm é a melhor alternativa para a determinação das duas classes de substância (Pussayanawin e Wetzel, 1987). A absorção entre 350-370 nm tem sido largamente usada para agliconas de flavonóis e 280 nm para flavonóis glicosilados (Hakkinen *et al.*, 1999, 2000).

O uso extensivo de detecção por arranjo de fotodiodo (AFD) na análise de flavonóides e outros fenólicos pode ser atribuído à capacidade de coleta

dos espectros *on-line* (Torrönen *et al.*, 1997; Hakkinen *et al.*, 1999, 2000) sem ter que usar técnicas que param o fluxo. Isso levou a um melhoramento considerável na análise por CLAE com o objetivo de identificação e demonstrou a utilidade da informação qualitativa na análise de fenólicos que é baseada no espectro da absorção (Torrönen *et al.*, 1997; Hakkinen *et al.*, 1999, 2000). A detecção de substâncias por AFD tem as seguintes vantagens principais: detecção múltipla do comprimento de onda, identificação dos picos e determinação da pureza dos picos (Lee e Widmer, 1996).

Plantas medicinais como fontes de substâncias antibacterianas e antifúngicas que auxiliam na cicatrização da pele

Diversos produtos dermatológicos contêm ingredientes ativos de origem vegetal que são isolados como substâncias puras ou produzidos sinteticamente a partir de protótipos de origem natural. Substâncias como β -caroteno, crisarobina, antralina, metoxsalem e salicilatos estão além da fronteira da fitoterapia (Schulz *et al.*, 2001).

Dentre aproximadamente 300 plantas medicinais e produtos vegetais oficialmente avaliados pela Comissão E (Alemanha), 47 são usados em indicações dermatológicas. A Comissão avaliou positivamente 25 dessas plantas, mas apenas aproximadamente metade tem papel significativo na prática terapêutica. A tabela 7 mostra algumas plantas e preparações vegetais

importantes para o uso tópico em dermatologia. Sete plantas com aplicações tradicionais em dermatologia tiveram avaliação negativa devido a sérios riscos e efeitos colaterais. Dentre elas podem ser mencionadas a casca de noqueira (*Juglans regia* L.; contém a potencialmente carcinogênica juglona), pulsatila (*Anemone pulsatilla* L.; pode causar irritação cutânea grave), mirtilo (*Vaccinium asbey* Read) e folhas de oleandro (*Nerium oleander* L., tóxico em altas doses). Essas plantas e suas preparações não devem ser mais usadas. Além disso, há plantas que tiveram avaliação positiva da Comissão E, mas que têm pouca importância terapêutica (Schulz *et al.*, 2001). É importante ressaltar que, embora essas plantas sejam cultivadas no Brasil elas são de ocorrência européia e tidas como exóticas no nosso país.

Tabela 7. Algumas plantas medicinais importantes para uso externo (Schulz *et al.*, 2001)

Monografia, planta de origem	Ano	Indicações dermatológicas
Flores de camomila (<i>Matricariae flos</i>)	1984	Inflamações cutâneas e de mucosa e de infecções bacterianas; doenças envolvendo as regiões anal e genital (duchas)
Folhas e casca de hamamelis (<i>Hamamelidis folium et cortex</i>)	1985	Lesões cutâneas leves, inflamações da pele e membranas mucosas; hemorróidas, veias varicosas
Óleo de prímula (<i>Oenotherae seminis oleum</i>)	-	Eczema atópico, neurodermatite
Flores de calêndula (<i>Calendulae flos</i>)	1986	Ferimentos, inclusive os de cicatrização difícil; ulcerações crurais
Flor de equinácea (<i>Echinacea purpureae herba</i>)	1989	Ferimentos superficiais de cicatrização difícil
Óleo de hipérico (<i>Oleum hyperici</i>)	1984	Tratamento primário e secundário de lesões mais ou menos profundas, mialgias e queimaduras
Flores de arnica (<i>Arnicae flos</i>)	1984	Usadas externamente para condições traumáticas e reumáticas dos músculos e juntas

As flores de camomila, usadas na medicina desde os tempos antigos, foram mencionadas nos trabalhos de Hipócrates, Dioscorides, Galeno e Asclépio. Atualmente, a eficácia praticamente inquestionável da camomila para uma certa quantidade de indicações dermatológicas ainda é amplamente baseada em evidências empíricas, isto é, na experiência de pacientes e médicos. Os constituintes ativos da camomila podem ser divididos em dois grupos de substâncias, um lipofílico e outro hidrofílico. O grupo lipofílico inclui principalmente os componentes do óleo volátil, cujo conteúdo na droga vegetal (inflorescências secas) é de 0,3-1,5%. O óleo volátil, por sua vez, é composto principalmente (cerca de 15%) de camazuleno de cor azul escuro, sendo que a maior parte dele se forma a partir de seu precursor incolor, a

matricina, durante a destilação com vapor. Outro componente importante do óleo de camomila é sesquiterpeno α -bisabolol, que é acompanhado por seus derivados mais ricos contendo oxigênio na sua estrutura, os bisaboloxidos A, B e C. Os constituintes hidrofílicos mais importantes são os flavonóides e as mucilagens. O conteúdo total de flavonóide da droga vegetal varia de 1% a 3%. As preparações de camomila também revelaram atividade antibacteriana e fungicida, principalmente contra organismos Gram-positivos e *Candida albicans*. O óleo de camomila foi ativo em concentrações de 25 mg/ml ou mais, e o bisabolol em concentrações de 1mg/ml. Tal fato poderia contribuir para os efeitos positivos obtidos com as preparações de camomila aplicadas topicamente em feridas infectadas (Schulz *et al.*, 2001).

A hamamélis, originalmente nativa do leste da América do Norte, foi introduzida na Inglaterra em 1736 e desde então se tornou um arbusto de floração no inverno popular em parques e jardins da Europa central. As folhas, a casca e os galhos são processados para fazer a droga vegetal. A casca é particularmente rica em taninos (hamamelitanino, galotanino) que pode conter até 12% dessas substâncias. A ação de adstringência nos tecidos priva as bactérias de um meio de crescimento favorável, produzindo um efeito antibacteriano indireto (Schulz *et al.*, 2001).

Medicina tradicional e legislações relativas aos fitoterápicos no Brasil

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população utiliza a medicina tradicional para o tratamento de suas necessidades primárias de saúde, e a maior parte desta terapia (cerca de 85%) envolve o uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (Tshibangu *et al.*, 2002).

O Brasil certamente se insere nesse quadro, concentrando cerca de 10 a 20% do número de espécies de plantas do planeta, apresentando a flora mais diversificada com cerca de 56.000 espécies de Fanerógamas descritas, aproximadamente 22% do total estimado no mundo (Alves *et al.*, 2000).

Recentemente, um crescente interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente àqueles derivados de plantas, tem sido observado. Esse interesse por drogas de origem vegetal começou devido a várias razões, dentre elas o fato da medicina convencional poder ser às vezes ineficiente provocando sérios efeitos colaterais. É importante lembrar que uma grande percentagem da população mundial não tem acesso ao tratamento pela farmacologia convencional (Watt *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, a demanda e o uso de plantas medicinais como opção de tratamento e cura tem aumentado em todas as camadas sociais. Os fitoterápicos deixaram de ser vistos como um simples instrumento de

medicina popular e se constituem, atualmente, como matéria-prima para indústrias e produtos farmacêuticos (Vermani *et al.*, 2002).

Entende-se por planta medicinal todo vegetal que tem atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos úteis à saúde do homem. Os princípios ativos produzidos pelas plantas medicinais resultam de uma resposta metabólica secundária, em função da interação ecológica do vegetal com o meio ambiente (Ferreira, 1998).

A importância social das plantas medicinais tem sido abordada pela OMS, especificamente a partir das décadas de 70 e 80, quando os sistemas de medicina tradicionais tornaram-se um tópico de importância global e a OMS reconheceu os benefícios da medicina tradicional chinesa. Além disso, estimativas sugeriam que em muitos países em desenvolvimento, grande parte da população confiava fortemente nas práticas tradicionais e plantas medicinais para tratar diversos males referentes à carência de cuidados primários à saúde (WHO, 1999).

Em nosso país, as plantas medicinais são consideradas produtos não-éticos pelos órgãos federais de saúde e tratadas, em muitos casos, como suplementos alimentares, quando descaracterizada e/ou destituída de ação farmacológica. Não existe fiscalização e uma legislação específica que regulamente tecnicamente o uso de plantas medicinais, a não ser que esta seja comercializada na forma de medicamento fitoterápico, empregando-se

matérias-primas vegetais ativas, com estudos científicos que garantam sua eficácia e segurança.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que regulamenta o registro e a comercialização de medicamentos fitoterápicos no Brasil, definiu através das Resoluções- RDC nº 17 (24.02.2000) e RDC nº 48 (16.3.2004) medicamento fitoterápico como “medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”.

Estudos recentes permitem afirmar que o valor da diversidade biológica brasileira e dos investimentos oriundos dos ecossistemas nacionais situa-se na casa dos trilhões de dólares anuais, muitas vezes o valor do PIB nacional (Alves *et al.*, 2000). Assim, a prospecção da Biodiversidade na busca de substâncias bioativas é um componente de relevância na estratégia de desenvolvimento econômico do Brasil.

Considerando ainda que a maioria das espécies de vegetais brasileiros não tem qualquer estudo químico e/ou farmacológico, fica claro que este universo representa um potencial econômico a ser explorado na busca de princípios biologicamente ativos (Alves *et al.*, 2000).

A camomila, a hamamélis e outras espécies mostradas na tabela 7 são exemplos de plantas utilizadas pela população e que eventualmente tornaram-

se fitoterápicos importantes na dermatologia. Plantas alimentícias ou medicinais originalmente brasileiras ou exóticas, mas que são utilizadas tradicionalmente pela população local no tratamento de queimaduras, abscessos purulentos, furúnculos e que auxiliam no processo de cicatrização de feridas, podem tornar-se fonte potencial de fitoterápicos e/ou fonte de substâncias bioativas relevantes em relação à atividade antioxidante e na terapêutica contra microrganismos patogênicos que infectam a pele, ou ainda, em infecções sistêmicas mais graves como, por exemplo, em infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*, nas quais o uso de antibióticos é ineficaz.



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é a busca de novos agentes terapêuticos de origem natural, através de uma triagem de plantas alimentícias e medicinais originalmente brasileiras ou exóticas de uso tópico ou sistêmico que contribuam para o processo de cicatrização da pele e que possuam atividade antibacteriana, antifúngica e/ou antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Realizar uma triagem preliminar contra fungos e bactérias de algumas plantas brasileiras utilizadas popularmente para cicatrização de feridas como anti-sépticos e em micoses em geral.
- 2 - Escolher, após a triagem, algumas plantas promissoras para o estudo fitoquímico.
- 3 - Verificar a atividade antimicrobiana desses constituintes isolados das plantas estudadas.
- 4 - Verificar a atividade antioxidante das plantas que apresentaram atividade antimicrobiana.
- 5 - Traçar um paralelo entre atividade antioxidante e antimicrobiana a partir do conteúdo flavonoídico das plantas estudadas.



PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

1. Coleta e preparo do material

Das 81 plantas que fizeram parte do levantamento (Caribé e Campos, 1999; Martins *et al.*, 1995; Mors *et al.*, 2000; van den Berg, 1996) somente 19 foram coletadas (ver capítulo I, Tabela 8 e 9, pág. 87-89) em diferentes lugares nos Estados do Rio de Janeiro, Maranhão e Ceará (Brasil). Amostras representativas das espécies coletadas foram depositadas no herbário do Museu Nacional (MN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e Jardim Botânico (JB) do Rio de Janeiro (Brasil). A *Echinodorus grandiflorus* foi coletada e classificada pela professora Cláudia P. Bove do (Museu Nacional, UFRJ, Brasil). A maioria dos extratos foi preparada a partir das partes aéreas (somente em alguns casos foram usadas as raízes). Todas as espécies usadas eram frescas, exceto pela *Marsyphiantes chamaedrys* gentilmente doada pelo Professor Francisco José de Abreu Matos (UFC, Brazil). A Professora Luci de Senna Valle (MN, UFRJ) foi responsável pela identificação do restante das espécies.

1.1. Preparo dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram preparados na forma de extração aquosa a frio ou decocto de acordo com a utilização popular. O extrato aquoso a frio foi preparado adicionando-se o menor volume possível de água destilada (à temperatura ambiente) ao material triturado no liquidificador (ARNO para uso doméstico), obedecendo a uma proporção peso/volume (p/v) para cada espécie. Os decoctos foram obtidos adicionando-se o material triturado (p/v) em água destilada em ebulição durante 10 minutos. Os extratos foram filtrados em algodão e congelados. Foram liofilizados (liofilizador Edwards do Brasil) 50 ml de cada amostra para a realização dos testes. Os cálculos de rendimento foram feitos com a massa total obtida e em seguida para 100 g de cada espécie (ver capítulo I, Tabela 8 e 9, pág. 87-89).

1.2. Preparo das frações

Objetivando separar as macromoléculas (por exemplo, polipeptídeos e polissacarídeos, entre outros) das micromoléculas, uma amostra de 200 mg de cada extrato aquoso liofilizado foi diluída em 30 ml da água destilada e submetida à precipitação com volume igual de etanol. Após filtração em algodão obteve-se um precipitado (macromoléculas) solúvel em água e um sobrenadante (micromoléculas) solúvel em água e etanol. O etanol desse

último foi evaporado sob banho-maria a 60 °C. Tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram liofilizados e mantidos em congelador.

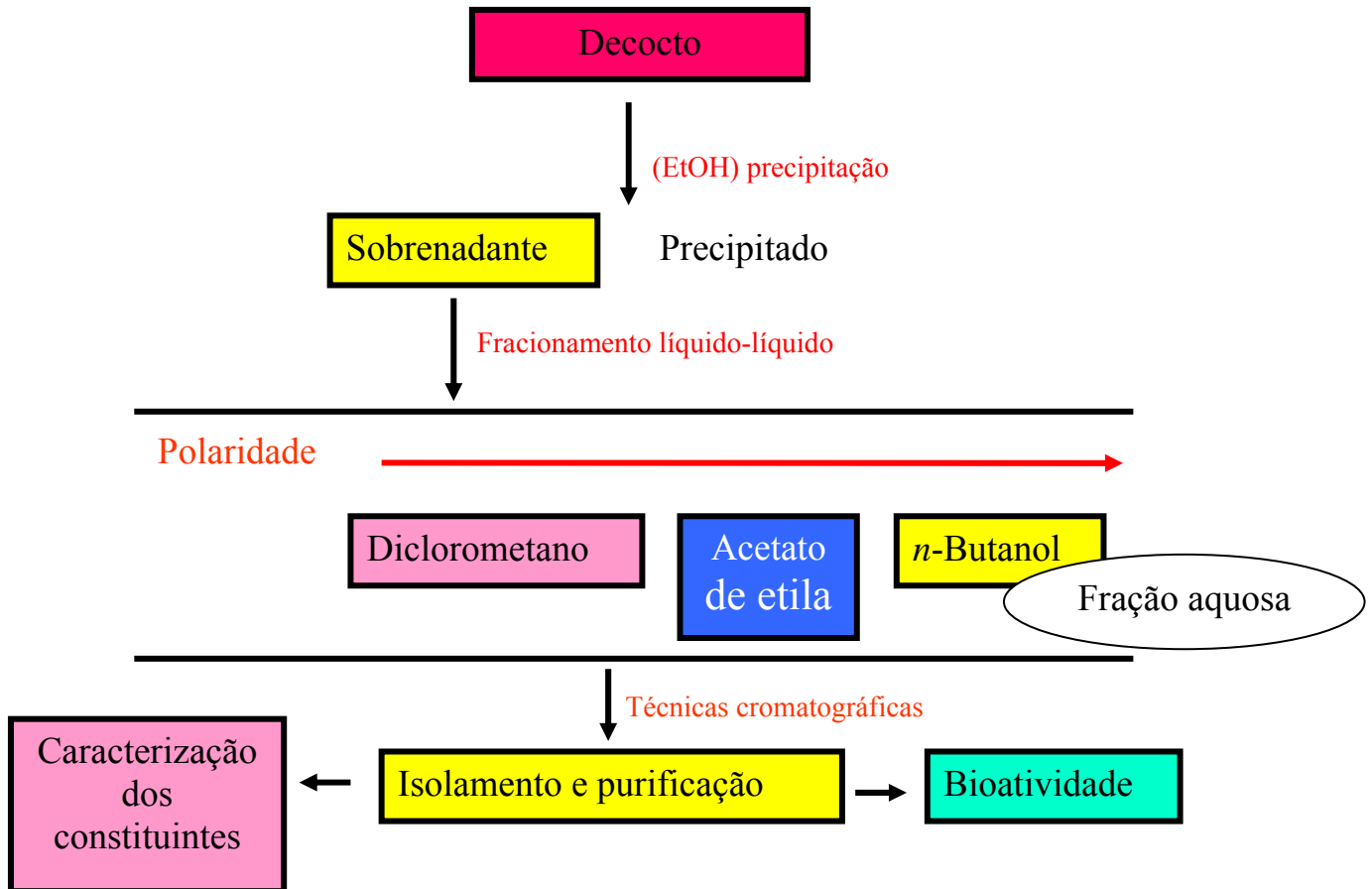
1.3. Coleta de *Bixa orellana* e preparo do material

As folhas, caules e sementes de *Bixa orellana* utilizada nesse trabalho foram coletados no dia 05 de janeiro de 2003 em Coxixo, município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro (Brasil). Uma amostra representativa dessa espécie está depositada no herbário do Museu Nacional (MN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número 203747. A Dr^a. Luci de Senna Valle do Museu Nacional fez a identificação dessa espécie. O esquema 1 (pág. 62) sumariza as etapas empregadas para o estudo de *Bixa orellana*.

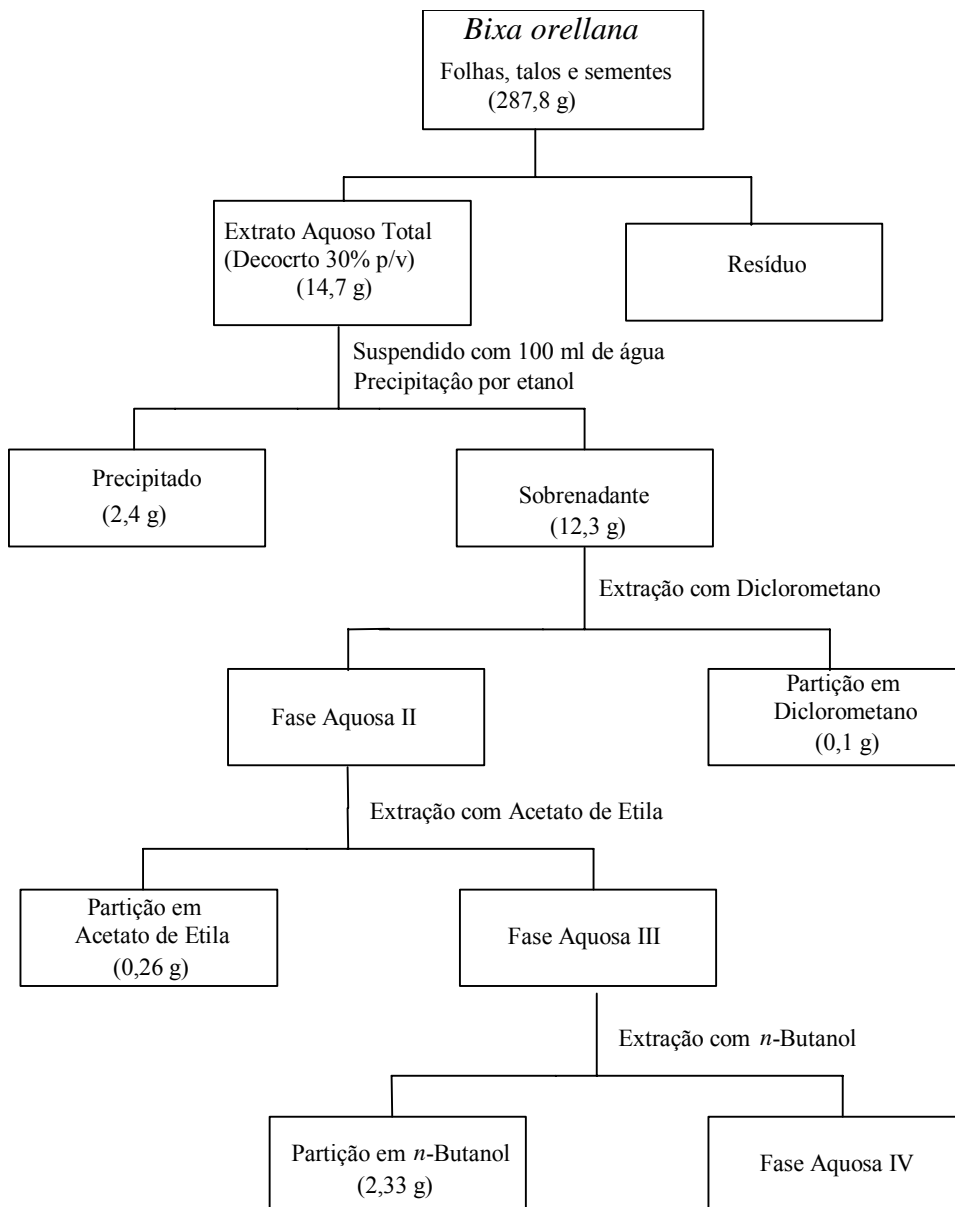
- Preparação dos extratos e frações

As folhas, caules e sementes (287,8 g) foram extraídos por decocção em água destilada. Obteve-se um extrato aquoso a 30% (p/v) que foi liofilizado (14,7 g), ressuspenso em 100 ml de água destilada e submetido à precipitação com igual volume de etanol, obtendo-se precipitado e sobrenadante. Após evaporação do etanol e liofilização, o sobrenadante (12,3 g) foi submetido à partição por solventes de polaridades crescentes, rendendo

as partições em diclorometano (0,1 g), em acetato de etila (0,26 g), em *n*-butanol (2,33 g) e uma fase aquosa residual (9,15 g) (Esquema 2, pág. 63).



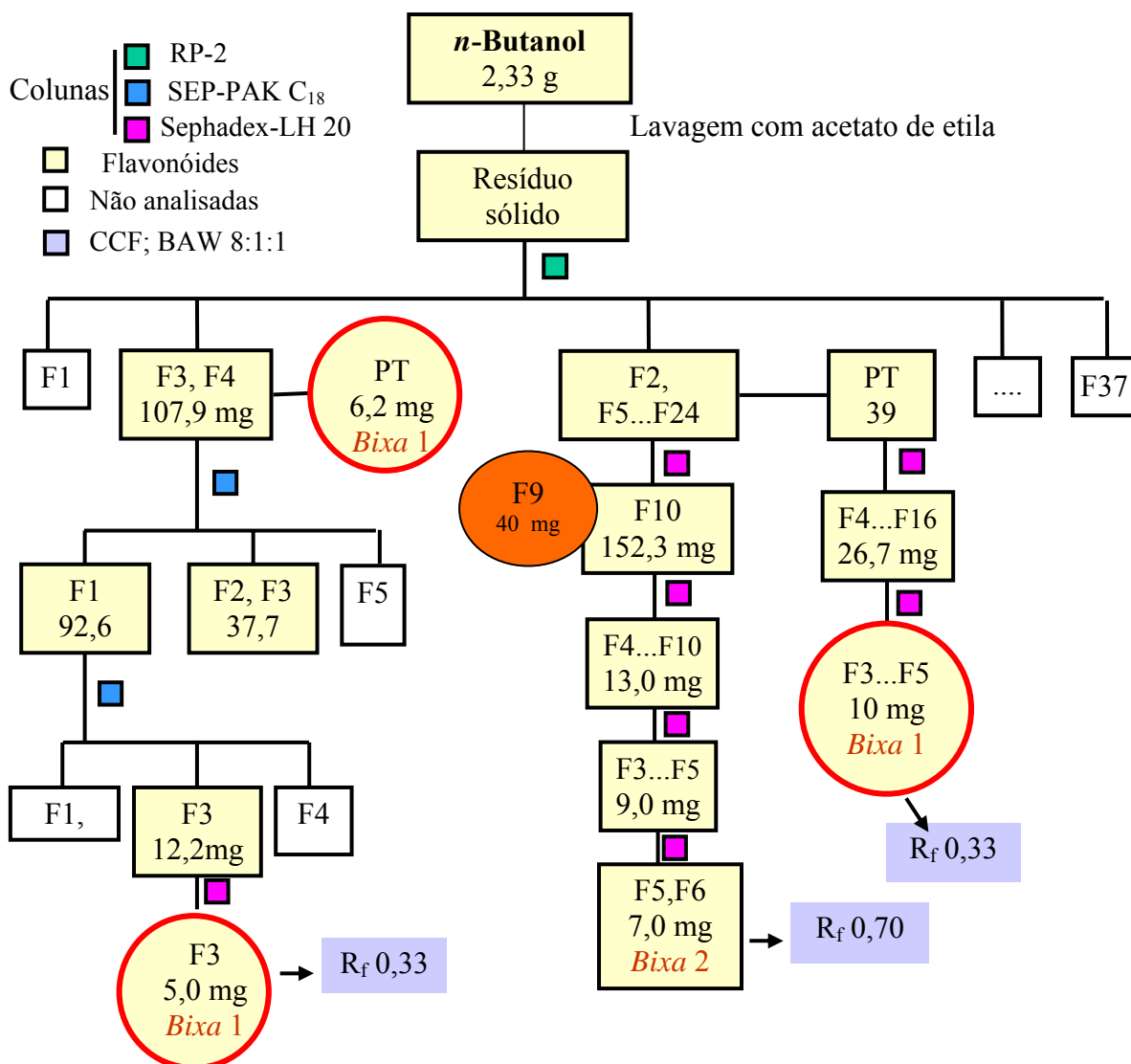
Esquema 1. Mostra as etapas de fracionamento para *Bixa orellana* e procedimentos posteriores ao fracionamento como, por exemplo, isolamento e purificação, caracterização dos constituintes e acompanhamento da bioatividade através de testes para atividade antifúngica, antibacteriana e antioxidante.



Esquema 2. Etapas para a obtenção do sobrenadante, precipitado e das partições em diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e fase aquosa IV a partir do extrato aquoso total de *Bixa orellana*.

- Estudo da partição em *n*-butanol das folhas, caules e sementes de *Bixa orellana*

A partição em *n*-butanol, depois da evaporação para retirada do solvente orgânico, foi lavada com acetato de etila (100 ml), fornecendo sob centrifugação uma parte solúvel e uma insolúvel em acetato de etila. Esse resíduo sólido (1,2 g) foi cromatografado em coluna, tendo como fase estacionária sílica de fase inversa RP2 (gel de sílica silanizada, tamanho de partícula 0,063-0,200 mm, 70-230 Mesh ASTM, MERCK Art. 8819); coluna 25,0 cm de altura x 2,0 (cm de diâmetro), eluído com água destilada, gradientes crescentes de água/metanol e finalmente metanol puro, rendendo um total de 37 frações (Esquema 3, pág. 65). A evaporação à secura das frações obtidas nas etapas cromatográficas foi efetuada à temperatura ambiente em capela com exaustão.



Esquema 3. Fracionamento da partição butanólica das folhas caules e sementes de *Bixa orellana* L. Ativo contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina). PT, precipitado; F, fração.

Isolamento do flavonóide hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (*Bixa-1*)

Primeiramente, as frações F3 e F4 (107,9 mg) obtidas da 1ª coluna em RP-2, diluídas em 1ml água destilada apresentaram um precipitado amarelo insolúvel. Esse precipitado foi eluído com BAW 8:1:1 em gel de sílica (R_f 0,33) e sob luz ultravioleta e pela revelação com sulfato cérico apresentou coloração amarela característica de flavonóides, sendo codificado como *Bixa* 1. Essa amostra foi enviada para análises espectroscópicas. O material solúvel em água destilada foi cromatografado em cartucho SEP-PAK C₁₈ (Part. n. 51910) e eluído com gradientes crescentes de água, água/metanol, metanol, rendendo 5 frações. A fração 1 (92,6 mg após liofilização), eluída em água, foi novamente cromatografada em cartucho SEP-PAK C₁₈ (Part. n. 51910), rendendo novamente 5 frações. A fração 3 (12,3 mg após liofilização), eluída em água/metanol foi submetida a uma coluna de Sephadex LH-20 (lipofílica, 25 mm, da sigma para uso com solventes orgânicos; coluna: 25 cm de altura x 1,2 cm de diâmetro), obtendo-se 4 frações. A fração 3 (*Bixa* 1) (R_f 0,33) também apresentou através de luz ultravioleta e revelação com sulfato cérico coloração característica de flavonóides (Esquema 3, pág. 65).

A partir dessas etapas pode-se verificar que essa substância era pouco solúvel em metanol e que estava presente na união das frações F2, F5 a F24 (307,6 mg após liofilização) da partição butanólica de *Bixa orellana* a partir da 1ª coluna em RP-2. Por essa razão, esse conjunto de frações foi diluído em

1,5 ml de metanol, obtendo-se uma parte solúvel e uma insolúvel em metanol. A parte insolúvel (39,0 mg) em metanol dessas frações, após cromatografia em coluna de gel de Sephadex-LH 20 (lipofílica, 25-100 mm, sigma para uso com solventes orgânicos; coluna: 32,0 cm de altura x 1,0 cm diâmetro) e eluição em água destilada forneceu 16 frações. As frações F4 a F16 (26,7 mg) foram novamente eluídas em água destilada, em coluna de gel de Sephadex-LH 20 (lipofílica, 25-100 mm, sigma para uso com solventes orgânicos; coluna: 28,0 cm de altura x 0,5 cm de diâmetro), rendendo 6 frações, das quais F3 a F5 também correspondiam ao flavonóide (***Bixa 1***) (Esquema 3, pág. 65).

As amostras de *Bixa 1*, obtidas nas diferentes etapas do isolamento, foram submetidas à análise por RMN ^1H , RMN ^{13}C e as técnicas de DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC (DMSO- d_6 ; espectrofotômetro de 300 e 500 MHz, Bruker Avance, modelo DRX 300 MHz e Bruker Avance, modelo DRX 500 MHz), o que tornou possível identificá-la como sendo a hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo.

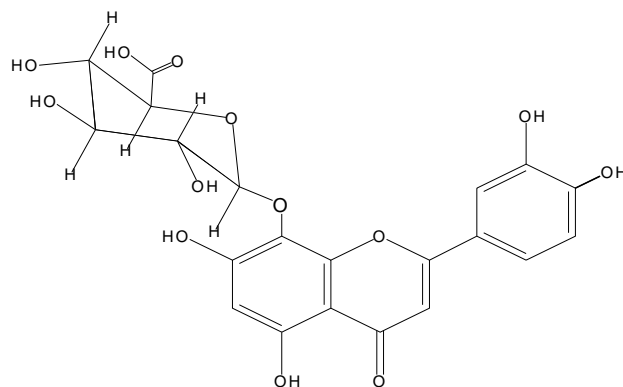


Figura 12: Estrutura da hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (**I**)

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS), fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$, peso molecular 480: δ (ppm) aglicona 6,20 (*s*, H-6); 6,60 (*s*, H-3); 6,75 (*d*, *J* 8,35 Hz, H-5'); 7,35 (*dd*, *J* 8,35 Hz e 1,9 Hz, H-6'); 7,97 (*d*, *J* 1,65 Hz, H-2'); 12,95 (*s*, hidrogênio da hidroxila da posição 5); δ (ppm) parte carboidrato 3,25 (H-4''); 3,30 (H-5''); 3,39 (*d*, *J* 8,0 Hz, H-2''); 3,51 (*d*, *J* 9,1, H-3'') e 4,60 (*d*, *J* 7,58 Hz, H-1''), hidrogênio anomérico).

RMN ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS): δ (ppm) aglicona 99,8 (C-6); 103,3 (C-3 e C-10); 114,7 (C-2'); 116,1 (C-5'); 118,9 (C-6'); 122,1 (C-1'); 126,5 (C-8); 147,1 (C-3'); 149,9 (C-9); 150,2 (C-4'); 157,9 (C-7); 158,7 (C-5); 165,5 (C-2); 181,9 (C-4); δ (ppm) parte carboidrato 72,3 (C-5''); 74,7 (C-2''); 76,1 (C-4''); 76,9 (C-3''); 107,7 (C-1'') e 172,2 (C-6'').

Isolamento do flavonóide quercetina 3-O- β -xilopiranosídeo (*Bixa 2*)

Como já foi dito anteriormente, o material resultante da reunião das frações F2, F5 a F24 (307,6 mg) da partição butanólica de *Bixa orellana* foi diluído em 1,5 ml de metanol, obtendo-se uma parte solúvel e uma insolúvel em metanol. A parte solúvel (268,6 mg), após cromatografia em coluna de gel de Sephadex-LH 20 (lipofílica, 25-100 mm, sigma para uso com solventes orgânicos; coluna: 25,0 cm de altura x 1,0 cm de diâmetro) e eluição em metanol/água destilada 30% rendeu 10 frações, sendo que a fração F10 (152,3 mg) foi cromatografada no mesmo suporte anterior (eluente: etanol 100%), fornecendo 18 frações. Em seguida, as frações F4 a F10 (13,0 mg) dessa coluna foram purificadas em Sephadex-LH 20 (lipofílica, 25-100 mm, sigma para uso com solventes orgânicos; coluna: 28,0 cm de altura x 0,5 cm de diâmetro), utilizando-se etanol 100% como eluente e obtendo-se 9 frações. As frações F3 a F5 (9,0 mg) foram eluídas em etanol 100% na mesma coluna anterior fornecendo mais uma vez 9 frações. Dessa última coluna as frações F5 e F6 correspondiam ao flavonóide *Bixa 2* (Esquema 3, pág. 65).

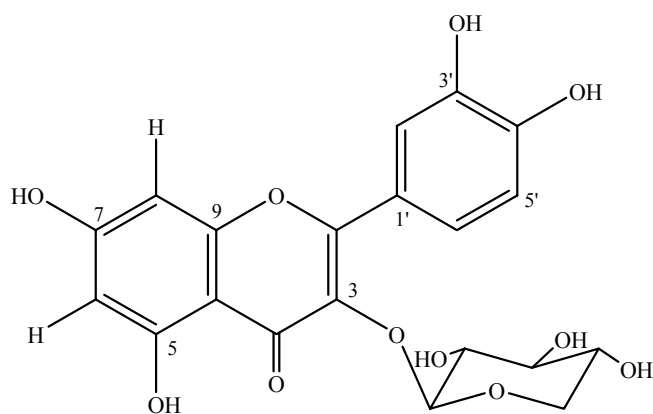


Figura 13: estrutura da quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo (II)

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ (ppm) aglicona 6,17 (*s*, J 1,82, H-6); 6,38 (*s*, J 1,89, H-8); 6,85 (*d*, J 9,0, H-5'); 7,56 (*m*, H-6' e H-2'); δ (ppm) parte carboidrato 3,07 (*m*, H-3'' e H-4''); 3,21 (*m*, H-2''); 3,23 (*m*, H-5''); 3,55 (*d*, J 11,7, H-5'') e 5,44 (*d*, J 7,1, H-1'', hidrogênio anomérico).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ (ppm) aglicona 94,0 (C-8); 99,9 (C-6); 104 (C-10); 115,8 (C-5'); 116 (C-2'); 121,8 (C-6'); 122 (C-1'); 146,0 (C-4'); 150,0 (C-3'); 158,0 (C-9); 162 (C-5); 165,0 (C-7); δ (ppm) parte carboidrato 61,0 (C-5''); 70,0 (C-3''); 75,0 (C-2''); 77,0 (C-4'') e 102,0 (C-1'').

2. Ensaio biológicos

2.1. Atividade antifúngica e antibacteriana

2.1.1. Fungos e bactérias

Foram usadas para os testes três cepas diferentes de fungos patogênicos: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (#OS-AM) isolados de paciente com criptococose no Hospital Evandro Chagas, Rio de Janeiro/RJ (Brasil), sendo esta gentilmente cedida pela Dra. Márcia Lazéra HEC/FIOCRUZ; *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum* isoladas de pacientes do Departamento de Micologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro/RJ (Brasil). As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 obtidas no "American Type Culture Collection" em Rockville, Md., EUA., *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MARSA, Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) obtidas de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro/RJ (Brasil), e *Lactobacillus casei*. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Celuta Sales Alviano, no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com a colaboração do aluno de doutorado Ricardo Ramos Mendonça Filho.

2.1.2. Método de difusão em agar e avaliação da concentração mínima inibitória (MIC, *Minimal Inhibitory Concentration*)

Com o objetivo de identificar a atividade antifúngica e antibacteriana dos extratos totais e frações (1mg/ml) contra *C. neoformans*, *C. albicans* e *T. rubrum*, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Streptococcus mutans*, MARSA e *Lactobacillus casei*, o método de difusão em ágar foi realizado em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Merck) para os fungos e Mueller-Hinton (Merck) para as bactérias, pH 6,5. As células de fungos e bactérias foram obtidas por centrifugação a 1500 g/4 °C durante 15 minutos e ressuspensas com tampão fosfato 0,01 M, em solução salina fisiológica 0,9% (PBS), pH 7,2. Como inóculo padrão para a realização dos experimentos estabelecemos uma suspensão de 10⁶ células/ml para fungos e 10⁵ UFC/ml para bactérias. No meio de cultura adequado semeou-se 100 µl da suspensão de fungos ou de bactérias e, finalmente, aplicou-se 25 µl (amostras dissolvidas em água destilada) de cada extrato total ou fração no agar contido nas placas de Petri. Os fungos foram incubados em estufa durante 48 horas e as bactérias durante 24 horas a 37°C.

Para a avaliação do MIC, os fungos (10⁶ células/ml) foram incubados em meio de cultura BHI e as bactérias (10⁵ UFC/ml) em Mueller-Hinton na presença de várias concentrações (1 pg/ml a 1 mg/ml) de extratos totais e

frações ativas durante 48 horas e 24 horas a 37°C, respectivamente. O crescimento celular foi determinado diariamente a fim de avaliar os resultados pela turvação visível (Newton *et al.*, 2002). A menor concentração de cada amostra ativa capaz de inibir crescimento microbiano foi usada para a determinação do MIC. A anfotericina B foi usada como o controle positivo para fungos e a vancomicina para bactérias em ambos os métodos.

2.1.2. Cromatografia em camada fina (CCF)

Foram utilizadas placas de gel de sílica G60 F₂₅₄, espessura 0,2 mm da MERCK (8x8 cm). Os extratos aquosos totais (1mg) e frações (0,5 mg) das plantas que apresentaram atividade antimicrobiana foram aplicados nas placas e eluídos em BAW 8:1:1 (Butanol/Ácido acético/Água), exceto para o *Rosmarinus officinalis* (BAW 3:1:1). Todas as placas foram eluídas em duplicata, um grupo foi usado para o teste da bioautografia em agar, enquanto o outro serviu de cromatograma de referência. As bandas ativas foram visualizadas através de luz ultravioleta (254 and 365 nm) ou pela revelação com sulfato cérico.

- Preparo da solução de sulfato cérico:

Solubilizaram-se 2 g de sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] em 55 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ conc.). Levou-se então lentamente para 1l de água destilada. A solução foi mantida ao abrigo da luz. As placas

cromatográficas foram borrifadas com a solução acima descrita e aquecidas sobre placa aquecedora em torno de 100 °C durante 2-3 minutos. As manchas referentes aos flavonóides revelavam-se em amarelo a alaranjado nessas condições.

- Os sistemas de solventes utilizados para cromatografia em camada fina (CCF) foram:

1 – BAW (8:1:1) \Rightarrow *n*-Butanol (8 ml)

Ácido acético glacial (1 ml)

Água destilada (1 ml)

2 – BAW (3:1:1) \Rightarrow *n*-Butanol (3 ml)

Ácido acético glacial (1 ml)

Água destilada (1 ml)

2.1.4. Bioautografia

As placas de gel de sílica cromatografadas foram colocadas dentro de placas de Petri 9x9 cm com tampas, esterilizadas e expostas à luz ultravioleta durante 30 minutos. Ao meio de cultura (BHI para fungos e Mueller-Hinton para bactérias) com vermelho de fenol a 1% ainda líquido e à temperatura entre 40 e 50 °C (conservação em banho-maria) adicionou-se 1 ml da cepa microbiana em estudo (concentração final para fungos 10⁶ células/ml e para as bactérias de 10⁵ UFC/ml). Em seguida, esse meio de cultura foi distribuído

sobre as placas de CCF. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas por 48 horas (fungos) e 24 horas (bactérias) a 37°C. Para a visualização dos halos de inibição revelamos as placas com solução aquosa de MTT (metil-tiazol-tetrazólio) 5mg/ml (p/v) (Saxena *et al.*, 1995).

2.2. Atividade antioxidante pelo teste do DPPH

A capacidade sequestradora de radicais livres das amostras testadas foi avaliada por ensaio espectrofotométrico com o radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) como descrito por Blois (1958).

Foram feitas soluções estoque dos extratos aquosos totais e sobrenadantes das espécies que apresentaram atividade antimicrobiana em água destilada a 2,0 mg/ml. No caso da *Bixa orellana* além do extrato aquoso total e sobrenadante algumas partições, frações e substâncias isoladas também foram testadas.

A atividade seqüestradora de radical livre de cada amostra foi expressa como proporção da redução da absorção da solução de DPPH. As amostras foram diluídas em concentrações de 1000, 100 e 10 µg/ml. Foi adicionado 0,5 ml da solução etanólica de DPPH (0,1 mM) a 0,5 ml de solução de amostra (A). Etanol (0,5 ml) mais 0,5 ml de solução amostra foi usado como branco (B). A solução DPPH (0,5 ml) mais etanol (0,5 ml) foi usada como controle (C). A mistura reacional foi agitada durante uma hora à temperatura

ambiente. A absorção do DPPH foi medida em espectrofotômetro UV-Vis em 515 nm (os experimentos foram feitos em triplicata e os dados foram expressos como média aritmética dos resultados obtidos). A atividade seqüestradora de radical (AS%) foi expressa como descrito por Tait *et al.*, 1996. Rutina (Merck), quercetina (Merck), ácido gálico (Merck) foram usados como controle positivo (100%). Esses experimentos foram realizados no laboratório da Prof^a. Dr^a. Ana Palhares de Miranda (Departamento de Fármacos, LASBIO) na Faculdade de Farmácia da UFRJ, com a colaboração da aluna de doutorado Daniela Barros de Oliveira.

2.3. Análise por CLAE-AFD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Arranjo de Fotodiodo)

As amostras em análise foram preparadas dissolvendo 1 mg do sobrenadante liofilizado em 100 µl de água Milli-Q. A separação foi realizada em aparelho de CLAE (Shimadzu DAD equipado com coluna de sílica de fase inversa C₁₈. Touzart&Matignon, Les Ulis, FR), o volume de injeção foi de 20 µl (40 µg de cada amostra), partícula 5 µm, 4,6 x 250 mm. A fase móvel era uma mistura de solvente A (0,01% de ácido orto-fosfórico em água) e solvente B (metanol) de acordo com um gradiente no qual os primeiros 20 minutos consistia de 30% de B e 40% de B de 20 até 60 minutos. A detecção foi realizada usando-se um detector de arranjo de fotodiodo nos

comprimentos de onda de 254 nm e 332 nm para todas as amostras e 230 nm apenas para *Rosmarinus officinalis* na busca de diterpenos fenólicos.



CAPÍTULO I

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Neste capítulo foi primeiramente realizada uma triagem contra fungos e bactérias visando à busca de substâncias bioativas em extratos aquosos de 19 plantas medicinais e alimentícias (Tabelas 8 e 9), associando-se as técnicas de bioautografia e precipitação por etanol de macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, etc.) para a facilitação na identificação dessas substâncias. Assim, foram investigados os sobrenadantes e os precipitados (obtidos pela precipitação por etanol), e os extratos aquosos de plantas medicinais e alimentícias usadas pela população brasileira na cura de doenças da pele (Seção I).

Numa etapa posterior duas plantas foram escolhidas para um estudo mais detalhado por apresentarem atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*). Portanto, os extratos e frações de *Bixa orellana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. foram analisados no sentido de descobrir novos compostos antimicrobianos, especialmente contra MRSA. O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e bioautografia foram usados na busca dos componentes antimicrobianos dessas plantas (Seção II).

Seção I – Busca de substâncias bioativas através de triagem de plantas medicinais e alimentícias frente a fungos e bactérias usando precipitação por etanol e bioautografia

Visando novos agentes antimicrobianos, foi feita uma revisão na literatura etnomédica (Caribé e Campos, 1999; Martins *et al.*, 1995; Mors *et al.*, 2000; van den Berg, 1996) na busca de plantas usadas pela população brasileira na cura de doenças causadas por fungos, bactérias e que auxiliam na cicatrização de feridas da pele. Observou-se que as plantas alimentícias e medicinais são largamente usadas, principalmente como decocções e sumos. Nesse sentido, foram realizados bioensaios antifúngicos e antibacterianos simples com extratos aquosos totais, precipitados e sobrenadantes (obtidos por tratamento do extrato aquoso com etanol) com a finalidade de selecionar extratos e frações bioativas das plantas em estudo. Essas amostras foram em seguida submetidas à bioautografia.

A composição química complexa de extratos de plantas é geralmente um fator limitante para o isolamento de substâncias antimicrobianas. Não obstante, o uso do método de bioautografia permite a detecção de componentes ativos em extratos brutos de plantas. Esse método leva a localização dos componentes antimicrobianos ativos (através dos valores de R_f) separados por CCF (Saxena *et al.*, 1995). Já a precipitação por etanol de

extratos aquosos de planta permite a separação entre polímeros, como polissacarídeos e proteínas, e micrometabólitos (Wu *et al.*, 1995; Zang e Lewis, 1997). Por essa técnica a solvatação entre moléculas presentes é modificada da mesma forma que as interações entre essas moléculas. Os polímeros precipitam e os micrometabólitos ficam no sobrenadante. A precipitação de macromoléculas pode ser conseguida também com sulfato de amônia e acetona (Ng *et al.*, 1986, 1987). A associação de técnicas de precipitação por etanol seguida da bioautografia permite a detecção de componentes ativos de outra maneira não detectáveis.

Resultados e discussão

A atividade antifúngica e antibacteriana dos sobrenadantes, precipitados (obtidos pela precipitação por etanol) e extratos aquosos totais de 19 plantas, ou seja, 11 medicinais e 8 alimentícias, pertencentes a 15 famílias (Tabelas 8 e 9) (Caribé e Campos, 1999; Martins *et al.*, 1995; Mors *et al.*, 2000; van den Berg, 1996) foram avaliadas *in vitro* contra os fungos *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Cryptococcus neoformans*, responsáveis por infecções nas mucosas, pele e infecções sistêmicas e as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Duas dessas plantas também foram ativas contra MRSA, todavia esses resultados serão discutidos na próxima seção.

Das dezenove espécies de plantas testadas oito apresentaram atividade antifúngica significativa (42% das plantas estudadas), enquanto sete foram ativas contra bactérias (37% das plantas estudadas), o que significa que 47% das espécies estudadas é fonte potencial de substâncias bioativas contra esses microrganismos. Os resultados mostram que 26% das espécies de plantas alimentícias e 31,5% das espécies de plantas medicinais apresentam atividade antimicrobiana (Tabela 10 e 11).

Em relação aos fungos o extrato aquoso total (20,5 µg/ml) de *Rosmarinus officinalis* apresentou o menor MIC de todas as espécies de plantas com atividade, seguido do sobrenadante de *Bixa orellana* (40,0 µg/ml) e sobrenadante de *Xanthosoma sagittifolium* apresentando o maior halo de inibição 18 mm e MIC 100 µg/ml contra *Trichophyton rubrum* (Tabela 10).

O fungo *Candida albicans* foi inibido pelo extrato aquoso de *Momordica charantia*, *Schinus terebinthifolius* e *Schinus molle*. O extrato aquoso de *Schinus molle* teve o menor halo de inibição (12 mm), no entanto revelou o menor valor para o MIC 105 µg/ml (Tabela 10). É importante mencionar que o óleo essencial e extrato etanólico de *Schinus molle* foram descritos previamente como tendo atividade antifúngica (Gundidza, 1993; Dikshit *et al.*, 1986; Ross *et al.*, 1980; Quiroga *et al.*, 2001), no entanto é a primeira vez que essa atividade é relatada para o extrato aquoso (decocto 30%).

O extrato aquoso de *Momordica charantia* assim como o sobrenadante de *Anacardium occidentale* e *Solanum* sp. mostram-se ativos contra *Cryptococcus neoformans* (Tabela 10). O LCC (líquido da castanha de caju), um óleo extraído da casca da castanha de caju, é conhecido por apresentar propriedades anti-sépticas (Sousa et al., 1991), todavia esse é o primeiro relato de atividade antifúngica das folhas.

Em se tratando de bactérias, o extrato aquoso de *Bixa orellana* mostrou a melhor atividade (MIC 9,8 µg/ml) contra *Lactobacillus casei* que também foi inibido pelo extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* (MIC 30,5 µg/ml) (Tabela 11).

A bactéria *Staphylococcus aureus* foi inibida pelos sobrenadantes de *Kalanchoe brasiliensis*, *Malpighia glabra*, *Solanum* sp. e *Rosmarinus officinalis*, e o extrato aquoso de *Momordica charantia*. O sobrenadante de *Kalanchoe brasiliensis* foi o mais ativo contra esse microorganismo e o extrato aquoso total dessa planta não apresentou atividade (Tabela 11).

O extrato aquoso e o sobrenadante de *Crotalaria pallida*, e extrato aquoso de *Momordica charantia* mostraram atividade contra *Streptococcus mutans* (Tabela 11).

A precipitação por etanol de extratos aquosos de plantas permite a separação de macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos entre outros, de micromoléculas (metabólitos primários e secundários). Por esse método, a maioria das macromoléculas fica contida no precipitado.

Proteínas com atividade antifúngica e antibacteriana foram descritas pela primeira vez em 1942 (Balls *et al.*, 1942). Elas são frequentemente carregadas positivamente e contêm ligações de bissulfeto (Zang e Lewis, 1997). Aglomerações (*clustering*) dos resíduos hidrofóbicos e catiônicos são tidas como cruciais para a atividade antimicrobiana (Felizmenio–Quimio *et al.*, 2001). O mecanismo de ação delas pode ser devido à formação de canais iônicos na membrana microbiana (Zang e Lewis, 1997) ou inibição competitiva da adesão das proteínas microbianas aos receptores do hospedeiro (Sharon e Ofek, 1986). Lectinas, tioninas, defensinas, proteínas de transferência de lipídeos (LTPs, *lipid transfer proteins*), snakinas, protamina e magaininas são peptídeos antimicrobianos de origem animal e vegetal. Esses são exemplos de proteínas que pertencem a um grupo de mais de 500 peptídeos e são conhecidas pelo papel importante que desempenham como componentes da defesa inata contra microrganismos invasores (Cowan, 1999; López–Solanilla *et al.*, 2003).

A técnica de precipitação por etanol foi utilizada anteriormente para a obtenção de substâncias biologicamente ativas da *Momordica charantia* (Wu *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 1998). Em nosso estudo podemos observar que o extrato aquoso de *Momordica charantia* perdeu completamente a sua atividade inibitória contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* depois do fracionamento. Essa atividade é provavelmente devido a proteínas que apresentam propriedades

hiperglicêmicas, antitumorais, antileucêmicas e antivirais, tais como lectinas (MAP 30), *napin-like ribosome inactivating peptides* (charantina), inibidoras de tripsina (MCTI-I, -II, -III, α -momorcharina, β -momorcharina) e inibidoras de elastase (MCEI-I, -II, -III, IV) (Rathi *et al.*, 2002; Mors *et al.*, 2000; Arazi *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1989; Hamato *et al.*, 1995; Parkash *et al.*, 2002) presentes no extrato aquoso de *Momordica charantia* e que estão ausentes depois da separação do precipitado. Portanto, se o extrato aquoso total apresenta atividade, essa atividade é devida às macromoléculas.

Nenhum dos precipitados foi ativo contra as bactérias e os fungos usados nesse experimento. Substâncias hidrossolúveis, como polissacarídeos (ex.: amido) e proteínas, incluindo fabatinas e várias lectinas, são mais eficazes como inibidores da adsorção do patógeno (geralmente vírus) (Zang e Lewis, 1997). Isso poderia explicar a falta de atividade dos precipitados contra os microrganismos estudados. Essa falta de atividade também poderia ser explicada pela possível mudança da conformação molecular das macromoléculas depois da exposição à precipitação por etanol, secagem dos precipitados por liofilização, concentração das amostras na difusão em ágar ou ainda método antimicrobiano inadequado para macromoléculas. Estudos posteriores devem ser feitos no sentido de determinar o porque dos precipitados não apresentarem nenhuma atividade.

A bioautografia para fungos foi executada apenas para os extratos aquosos e sobrenadantes das plantas que mostraram atividade antifúngica

contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, usando BAW (butanol/ácido acético/água) 8:1:1 para a eluição das placas em CCF de gel de sílica. Foi possível observar halos de inibição para os extratos aquosos de *Schinus molle* (R_f 0,89) e para *Schinus terebinthifolius* (R_f 0,80) contra *Candida albicans*, demonstrando que as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica são fortemente apolares. O sobrenadante de *Anacardium occidentale* apresentou halo de inibição (R_f 0,31) contra *Cryptococcus neoformans* (Figura 14). A visualização do cromatograma sob luz ultravioleta e revelação com sulfato cérico permite sugerir que as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica de *Schinus molle* são provavelmente flavonóides. Para *Schinus terebinthifolius* e *Anacardium occidentale* não foi possível determinar a classe de composto responsável por essa atividade.

Em relação à atividade antibacteriana, os ensaios de bioautografia em CCF foram realizados para o extrato aquoso de *Crotalaria pallida*, *Momordica charantia* e sobrenadantes de *Crotalaria pallida*, *Kalanchoe brasiliensis*, *Solanum* sp. e *Malpighia glabra* com os microrganismos contra os quais essas plantas foram ativas (Tabela 11). No entanto, somente o sobrenadante de *Solanum* sp. apresentou halo de inibição (R_f 0,22).

A ausência de atividade antimicrobiana de outras amostras de plantas pelos métodos de precipitação por etanol e bioautografia pode ser explicada pela falta de seletividade dos compostos presentes contra os microrganismos escolhidos para esse estudo, rompimento do sinergismo entre os constituintes

ativos causado pela CCF e pela precipitação por etanol, ou ainda, concentração muito baixa das substâncias ativas no extrato bruto sob as condições de análise.

Tabela 8. Plantas medicinais utilizadas nos ensaios antifúngicos e antibacterianos.

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Uso popular	Método de extração	Extrato aquoso Rdt (g%)	Frações	
						Pt (%)	Sn (%)
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae) ^A R-203748 (MN)	Mastruz	Folhas, flores, e raízes	Cicatrizante e em contusões	Extrato aquoso a frio (70%)	4,25	36,6	63,4
<i>Crotalaria pallida</i> Aiton (Fabaceae) ^B , R-203739 (MN)	Chocalho-de-cascavel	Folhas, flores e frutos	Impigens, herpes, lepra, erisipelas e sarnas	Decocto (40%)	3,81	16,2	83,8
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham & Scltd.) Mich. (Alismataceae) ^B 1100 (MN)	Chapéu-de-couro	Folhas	Sífilis e doenças da pele	Decocto (30%)	3,75	13,6	86,4
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb. (Crassulaceae) ^A , 304.627 (JB)	Coirama	Folhas	Frieira, cicatrizante	Extrato aquoso a frio (20%)	2,05	43,1	56,9
<i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) O. Ktze (Lamiaceae) ^B	Bóia-caá, hortelã -do-brasil	Folhas e caules	Mordidas de cobra	Decocto (30%)	4,19	28,5	71,5
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. (Celastraceae) ^B , R-203745 (MN)	Espinheira-santa	Folhas	Assepsia de feridas e úlceras da pele	Decocto (40%)	14,8	14,5	85,5
<i>Mimosa</i> sp. (Mimosaceae) ^B , R-203751 (MN)	Dormideira, malícia e sensitiva	Folhas, frutos e caules	Tumores e leucorréia	Decocto (30%)	3,85	11,5	85,5

Rdt, rendimento; Pt, precipitado; Sn, sobrenadante.

Referências bibliográficas usadas: ^A, Martins *et al.*, 1995; ^B, Mors *et al.*, 2000; ^C, van den Berg, 1996; ^D, Caribé e Campos, 1999.

Tabela 8. Plantas medicinais utilizadas nos ensaios antifúngicos e antibacterianos.
(continuação)

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Uso popular	Método de extração	Extrato aquoso Rdt (g%)	Frações	
						Pt (%)	Sn (%)
<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae) ^C , R-203749 (MN)	Melão-de-são-caetano	Folhas, frutos, flores e raízes	Brotoejas	Decocto (30%)	3,27	18,0	82,0
<i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae) ^B R-203741 (MN)	Aroeira	Folhas	Erupções da pele	Decocto (30%)	4,45	7,7	92,3
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae) ^B , R-203740 (MN)	Aroeira	Folhas, caules e flores	Doenças da pele	Decocto (30%)	8,96	9,4	90,6
<i>Solanum sp.</i> (Solanaceae) ^D , R-203746 (MN)	Melancia-da-praia	Folhas, caules e frutos maduros	Abscessos, furúnculos e inflamações da pele	Extrato aquoso a frio (80%)	7,42	48,4	51,6

Rdt, rendimento; Pt, precipitado; Sn, sobrenadante.

Referências bibliográficas usadas: ^A, Martins *et al.*, 1995; ^B, Mors *et al.*, 2000; ^C, van den Berg, 1996; ^D, Caribé e Campos, 1999.

Tabela 9. Plantas alimentícias utilizadas nos ensaios antifúngicos e antibacterianos.

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Uso popular	Método de extração	Extrato aquoso Rdt (g%)	Frações	
						Pt (%)	Sn (%)
<i>Anacardium occidentale</i> L. (Anacardiaceae) ^D , R-203744 (MN)	Cajueiro	Folhas e frutos	Anti-sifilítico, cicatrizante de feridas e úlceras	Decocto (30%)	7,62	13,9	86,1
<i>Averrhoa carambola</i> L. (Oxalidaceae) ^D , R-203750 (MN)	Carambola	Folhas e frutos	Picadas de insetos	Decocto (70%)	5,55	14,2	85,8
<i>Mangifera indica</i> L. (Anacardiaceae) ^A , R-204202 (MN)	Mangueira	Folhas	Cicatrizante	Decocto (30%)	6,70	3,5	96,5
<i>Passiflora edulis</i> Sims (Passifloraceae) ^D , R-203743 (MN)	Maracujá	Folhas e frutos	Erisipela e inflamações cutâneas	Decocto (30%)	5,79	13,5	86,5
<i>Malpighia glabra</i> L. (Malpighiaceae) ^D , R-204590 (MN)	Acerola	Frutos maduros	Frutos (suco): cicatrização difícil	Decocto (20%)	5,41	13,9	86,1
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott. (Araceae) ^B , R-204203 (MN)	Taioba	Folhas, caules e raízes	Cataplasma em furúnculos	Extrato aquoso a frio (70%)	6,99	56,8	43,2
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Labiatae) ^D , R-203742 (MN)	Alecrim	Folhas e caules	Folhas (chá por decocção, pó): feridas e úlceras	Decocto (20%)	4,19	8,2	91,8
<i>Bixa orellana</i> L. (Bixaceae) ^D , R-203747 (MN)	Urucum	Folhas caules e sementes	Sementes (uso externo, chá por infusão): queimaduras	Decocto (30%)	5,85	16,5	83,5

Rdt, rendimento; Pt, precipitado; Sn, sobrenadante.

Referências bibliográficas usadas: ^A, Martins *et al.*, 1995; ^B, Mors *et al.*, 2000; ^C, van den Berg, 1996; ^D, Caribé e Campos, 1999.

Tabela 10: Atividade antifúngica de plantas medicinais e alimentícias brasileiras

Plantas	Fungos	HI (mm)* / MIC ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)**	
		Extrato aquoso	Sobrenadante
<i>Anacardium occidentale</i> L.	<i>Cryptococcus neoformans</i>	(-)	12/ 110
<i>Momordica charantia</i> L.	<i>Candida albicans</i>	16/150	(-)
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	12/180	
<i>Schinus molle</i> L.	<i>Candida albicans</i>	12/105	(-)
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	<i>Candida albicans</i>	15/120	(-)
<i>Solanum</i> sp.	<i>Cryptococcus neoformans</i>	(-)	10/165
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott.	<i>Trichophyton rubrum</i>	(-)	18/100
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Trichophyton rubrum</i>	9/20,5	12/110
<i>Bixa orellana</i> L.	<i>Trichophyton rubrum</i>	(-)	10/40

(-), ausência de atividade inibitória; *Halo de inibição; ** Concentração mínima inibitória; Controle positivo: anfotericina B (HI: 20 mm/ MIC: 950 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

Tabela 11. Atividade antibacteriana de extratos totais e frações de plantas medicinais e alimentícias brasileiras.

Plantas	Bactérias	HI (mm)* / MIC ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)**	
		Extrato aquoso	Sobrenadante
<i>Crotalaria pallida</i> Aiton	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	18/120	13/120
<i>Momordica charantia</i> L.	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	20/130	(-)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19/130	
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(-)	12/12,5
<i>Malpighia glabra</i> L.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(-)	10 /180
<i>Solanum</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(-)	14/120
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(-)	13/105
	<i>Lactobacillus casei</i>	10/30,5	(-)
<i>Bixa orellana</i> L.	<i>Lactobacillus casei</i>	8/9,8	(-)

(-), ausência de atividade inibitória; *Halo de inibição; ** Concentração mínima inibitória; Controle positivo: Vancomicina (HI: 10 mm/ MIC: 800 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

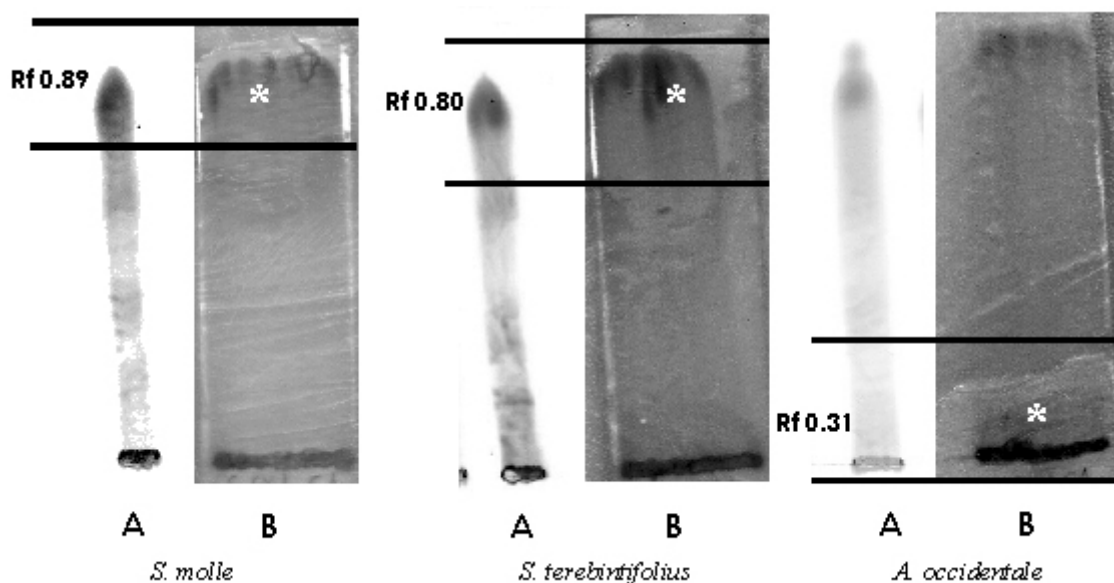


Figura 14. Cromatogramas obtidos por CCF (A) e ensaio de bioautografia em CCF (B) para os extratos aquosos ativos de *Schinus molle* (*Candida albicans*), *Schinus terebintifolius* (*Candida albicans*) e sobrenadante de *Anacardium occidentale* (*Cryptococcus neoformans*). O asterisco indica os halos de inibição na bioautografia e valores de R_f elevados para *Schinus molle* e *Schinus terebintifolius*. O valor de R_f mais baixo para *Anacardium occidentale* mostra que a substância ativa é polar.

Conclusões

- 1 – Tanto os extratos aquosos totais quanto os sobrenadantes de 47% das plantas em estudo apresentam atividade antifúngica e/ou antibacteriana.
- 2 – A separação de macromoléculas das micromoléculas, como é o caso de *Anacardium occidentale*, *Solanum* sp. e *Xanthosoma sagittifolium*,

desencadeia o aparecimento de atividade. Em outros casos a atividade antifúngica desaparece, como foi observado para *M. charantia*, *S. molle*, *S. terebinthifolius*.

- 3 – O mesmo pode ser dito para a atividade antibacteriana, a separação das macromoléculas como foi o caso de *Kalanchoe brasiliensis*, *Malpigha glabra* e *Solanum* sp. e *Rosmarinus officinalis* provoca o aparecimento de atividade. No entanto, essa atividade desaparece para *Momordica charantia*, *Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana*, ou ainda, é mantida como no caso de *Crotalaria pallida*.
- 4 – A atividade de *Momordica charantia* perdeu-se após separação das macromoléculas tanto em relação aos fungos quanto bactérias.
- 5 – A bioautografia permite a determinação da polaridade dos compostos ativos, como foi possível detectar os halos de inibição contra fungos para *A. occidentale*, *S. molle* and *S. terebinthifolius* e contra bactéria para *Solanum* sp.

Seção II – Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis* contra MRSA e outros microrganismos patogênicos

Hoje em dia, como consequência dos problemas associados com o uso indiscriminado de antibióticos, tais como resistência (Iyer e Jones, 2004; Farr, 2004), o interesse em plantas com atividade antimicrobiana tem sido ressurgido (Machado *et al.*, 2003).

Bixa orellana e *Rosmarinus officinalis* são usados como alimento e medicamento em muitos países. *Bixa orellana* é nativa da América do Sul. As suas sementes são usadas como corante conhecido no Brasil como urucum, que é utilizado desde a antiguidade nesse continente e apenas nos últimos cem anos na Europa. Atualmente, *Bixa orellana* é também cultivada na América Central, África e Ásia para uso como um importante aditivo alimentar (Evans, 2000; Mercadante *et al.*, 1996). Adicionalmente, a *Bixa orellana* é usada pela população brasileira no tratamento de processos inflamatórios, provocados por picadas de mosquitos, faringites, bronquites e feridas (Mors *et al.*, 2000). *Rosmarinus officinalis* (alecrim) é nativo da região Mediterrânea e é especialmente cultivado em países de clima temperado desde Portugal até Austrália. É usado como um excelente tempero em comida, assim como medicamento (hepatoprotetor, antioxidante, colagoga, colerética, antiespasmódico e diurético) (Girre, 2001).

As substâncias antimicrobianas presentes em plantas talvez inibam os microrganismos por um mecanismo diferente dos antibióticos usados correntemente e podem ter valor clínico no tratamento de cepas resistentes (Elof, 1998). Portanto, plantas alimentícias como *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis* podem ser incluídas na lista de plantas de interesse quando o assunto é resistência microbiana, pois elas apresentaram atividade contra MRSA e outros microrganismos patogênicos.

Resultados e discussão

O conhecimento sobre as bases genéticas e a distribuição geográfica de MRSA está bastante avançado. A sua importância tem sido bastante discutida durante anos e, talvez, por essa razão algumas infecções por MRSA têm sido rigorosamente controladas a taxas muito baixas, enquanto outros permitem taxas máximas da propagação e taxas de infecção muito elevadas (Farr, 2004). A vancomicina é a primeira droga de escolha para o tratamento de doenças infecciosas provocadas pelas cepas de MRSA, todavia o aumento do seu uso levou à resistência de enterococos e outras espécies (Sato *et al.*, 1997; Farr, 2004). Portanto, a procura de novos tratamentos contra as infecções por MRSA e outros microrganismos estimula a investigação de produtos naturais como uma alternativa.

Os extratos aquosos totais de *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis* foram selecionados para fracionamento guiado por bioensaio, depois que descobrimos que essas plantas apresentavam atividade contra MRSA. Os extratos aquosos e frações foram testados contra todos os microrganismos mencionados na parte experimental e alguns dos resultados em relação aos extratos aquosos e sobrenadantes já foram mostrados na seção I.

Para MRSA o extrato aquoso total de *Rosmarinus officinalis* mostrou o melhor resultado com o maior halo de inibição (11 mm) e menor MIC (6 µg/ml) quando comparado com o extrato aquoso de *Bixa orellana* e as outras frações dessas duas plantas (Tabela 12).

O extrato etanólico das folhas e sementes de *Bixa orellana* foi descrito na literatura como tendo atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* entre outros (Fleischer *et al.*, 2003; Galindo-Cuspinera *et al.*, 2003). Para o extrato hidroalcoólico (50%) da casca foi relatada atividade *in vitro* contra *Neisseria gonorrhoeae* (Cáceres *et al.*, 1995). Mais recentemente Galindo-Cuspinera e Rankin (2005) conseguiram identificar através de bioautografia e CLAE-AFD-EM (cromatografia líquida de alta eficiência-arranjo de fotodiodo-espectrometria de massas) como componentes majoritários de extratos aquosos obtidos a partir de amostras comerciais de *Bixa orellana* a 9'-*cis*-norbixina e *trans*-norbixina, que segundo eles é responsável pela atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Nesse estudo a atividade antimicrobiana foi detectada no extrato aquoso total, no sobrenadante, e frações em acetato de etila, butanol e fração F9 bioativa.

O extrato aquoso total, sobrenadante, fração butanólica e fração F9 (bioativa) de *Bixa orellana* foram ativos contra a cepa de MRSA. O sobrenadante também inibiu *Trichophyton rubrum*, enquanto a fração em acetato de etila apresentou atividade contra *Candida albicans* (Tabela 12).

A espécie *Rosmarinus officinalis* tem sido largamente estudada como antimicrobiana. Essa planta produz um óleo essencial amarelo claro cujo odor lembra a cânfora e que possui essa atividade (Panizzi *et al.*, 1993; Boatto *et al.*, 1994; Perruci *et al.*, 1994; Larrondo *et al.*, 1995; Montes e Wilkomirsky, 1998; Mangena e Muyima, 1999). Pandit e Shelef (1994) descreveram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, o extrato aquoso e a planta moída foram eficazes contra *Listeria monocytogenes*. Collins e Charles (1987) investigaram a atividade antimicrobiana de dois antioxidantes extraídos das folhas dessa planta: carnosol, um diterpeno, e ácido ursólico, um ácido monocarboxílico de triterpeno pentacíclico. Em geral, o carnosol ($150\mu\text{g ml}^{-1}$) mostrou-se mais eficaz do que o BHA (butil hidroxianisol) and BHT (butil hidroxitolueno), comumente usados como antioxidante em alimentos, contra *Staphylococcus aureus* e cinco outros microrganismos associados aos alimentos, e o ácido ursólico foi mais eficaz do que o BHT. O ácido rosmarínico também foi descrito como sendo uma substância antimicrobiana (Kuhnt *et al.*, 1995; Petersen e Simmonds, 2003; Walker *et al.*, 2004). O

estudo atual revelou que, além da atividade contra MRSA, *Rosmarinus officinalis* também foi ativo contra MSSA (sobrenadante), *Lactobacillus casei* (extrato aquoso total) e *Trichophyton rubrum* (extrato aquoso total e sobrenadante) (Tabela 12).

A fim de identificar a composição química dos sobrenadantes de *Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana* foi realizada a CLAE de fase inversa (Tabela 13, Figura 15). A detecção foi executada nos comprimentos de onda de 254 nm e 332 nm à procura de substâncias fenólicas nas duas plantas (como ácido rosmarínico e flavonóides), e em 230 nm para *Rosmarinus officinalis* na busca de diterpenos como carnosol, rosmadial, ácido carnósico, carnosato de metila, isômeros de carnosol e flavonóides descritos por Okamura *et al.* (1994) e Señoráns *et al.* (2000). As substâncias e/ou classes de substâncias foram tentativamente identificadas pelos seus tempos de retenção (t_R) e espectro de UV com base em dados publicados na literatura por outros autores (Señoráns *et al.*, 2000; Ibañez *et al.*, 2003; Mabry *et al.*, 1970; Cuvelier *et al.*, 1994; Parejo *et al.*, 2004). Nós identificamos para *Rosmarinus officinalis* (detecção em comprimento de onda de 254 nm e 332 nm) em t_R (min) 34,4 um pico com máximo de absorbância em UV de 284 nm compatível com rosmanol, carnosol e ácido carnósico. Também foi observado em comprimento de onda 230 nm um pico t_R (min) 47,0. Para esse pico o máximo de absorbância foi observado em 280 nm, como previamente descrito por Señoráns *et al.* (2000) para um derivado de carnosol com base nos

espectros de UV e espectros de massa característicos. Isso faz sentido, pois o ácido carnósico é considerado instável, sendo convertido em carnosol, rosmanol e epirosmanol em contato com o oxigênio do ar (Wenkert *et al.*, 1965; Okamura *et al.*, 1994). O ácido rosmarínico também foi detectado nos comprimentos de onda de 254 nm e 332 nm em t_R (min) 15,9 com máximo de absorvância de 218 nm e 322 nm como descrito por Parejo *et al.* (2004). Para *Bixa orellana* a maioria dos máximos de absorvância foram característicos de flavonóides, quando comparados com aqueles descritos por Mabry *et al.* (1970) (Tabela 13).

A bioautografia permite a detecção guiada por bioensaio e ajuda na identificação de substâncias ativas de plantas. Os sobrenadantes das duas plantas foram submetidos a bioautografia apenas para MRSA, usando BAW 8:1:1 para a eluição dos cromatogramas (CCF). Foi possível observar para a *Bixa orellana* um halo de inibição (R_f 0,68), mostrando que as substâncias responsáveis pela atividade anti-MRSA são ligeiramente apolares. A leitura em luz ultravioleta e revelação com sulfato cérico do segundo grupo de cromatogramas levaram a crer que se tratava de flavonóides (Figura 16). Esses achados foram confirmados por relatos prévios da presença de flavonóides em *Bixa orellana* e de substâncias ativas contra MRSA isoladas de *Scutellaria barbata*, tais como os flavonóides apigenina e luteolina (Harborne, 1975; Sato *et al.*, 2000). Já o cromatograma de *Rosmarinus officinalis* mostrou um halo de inibição em R_f 0,16, sugerindo que as

substâncias eficazes contra o MRSA são muito polares. Finalmente, umas das substâncias mais polares detectadas pelo CLAE em T_R (min) 15,9 é o ácido rosmarínico.

Tabela 12: Atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e frações de *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis*

Microrganismos	BO et		BO s		BO ae		BO b		RO et		RO s	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
MRSA	7	10,7	8	14,3	(-)	(-)	11	15,0	11	6,0	10	11,0
MSSA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	13	105,0
<i>Lactobacillus casei</i>	8	9,8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	30,5	(-)	(-)
<i>Candida albicans</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	12	30,0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Trichophyton rubrum</i>	(-)	(-)	10	40,0	(-)	(-)	(-)	(-)	9	20,5	12	110

1 corresponde ao diâmetro do halo de inibição (mm), 2 corresponde ao MIC (concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/ml}$), vancomicina foi usada como controle positivo para bactérias e anfotericina B para fungos; BO, *Bixa orellana*; RO, *Rosmarinus officinalis*; et, extrato aquoso total; s, sobrenadante; ae, acetato de etila; b, butanol, (-) ausência de atividade inibitória. MIC da anfotericina B e diâmetro do halo de inibição (média para *C. albicans* e *T. rubrum*) 950 $\mu\text{g/ml}$ e 20 mm, respectivamente; MIC da vancomicina e halo de inibição (média para MRSA, MSSA e *L. casei*) 800 $\mu\text{g/ml}$ e 10 mm, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes de *Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana* analisadas por CLAE-AFD

Amostras (Sobrenadantes)	Comprimento de onda de detecção (nm)	Pico n°	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorvância de UV (nm)	Classes químicas /substâncias detectadas
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	254 and 332 *	1	15,9	218, 322	Ácido rosmarínico
		2	34,4	284	Rosmanol, carnosol ou ácido carnósico
		3	35,9	331	Desconhecido
		4	38,8	265, 335	Flavonóide
		5	41,3	265, 331	Flavonóide
	230 **	1	6,7	240	Desconhecido
		2	37,5	325	Desconhecido
		3	47,0	286	Derivado de carnosol
		4	49,3	331	Desconhecido
		5	57,3	288	Desconhecido
<i>Bixa orellana</i> L.	254 and 332 ***	1	3,4	217, 267	Desconhecido
		2	4,6	217, 273	Desconhecido
		3	15,3	221, 271	Desconhecido
		4	25,7	223, 277	Desconhecido
		5	32,4	223, 273, 339	Flavonóide
		6	34,9	221, 261, 354	Flavonóide
		7	37,1	254, 364	Flavonóide
		8	37,8	219, 263, 354	Flavonóide
		9	39,7	225, 250, 362	Flavonóide
		10	40,7	221, 271, 339	Flavonóide

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura: *, Mabry *et al.*, 1970, Cuvelier *et al.*, 1994, Señoráns *et al.*, 2000, Ibañez *et al.*, 2003, Parejo *et al.*, 2004; **, Señoráns *et al.*, 2000, Ibañez *et al.*, 2003; ***, Mabry *et al.*, 1970. Para as condições cromatográficas veja figura 15.

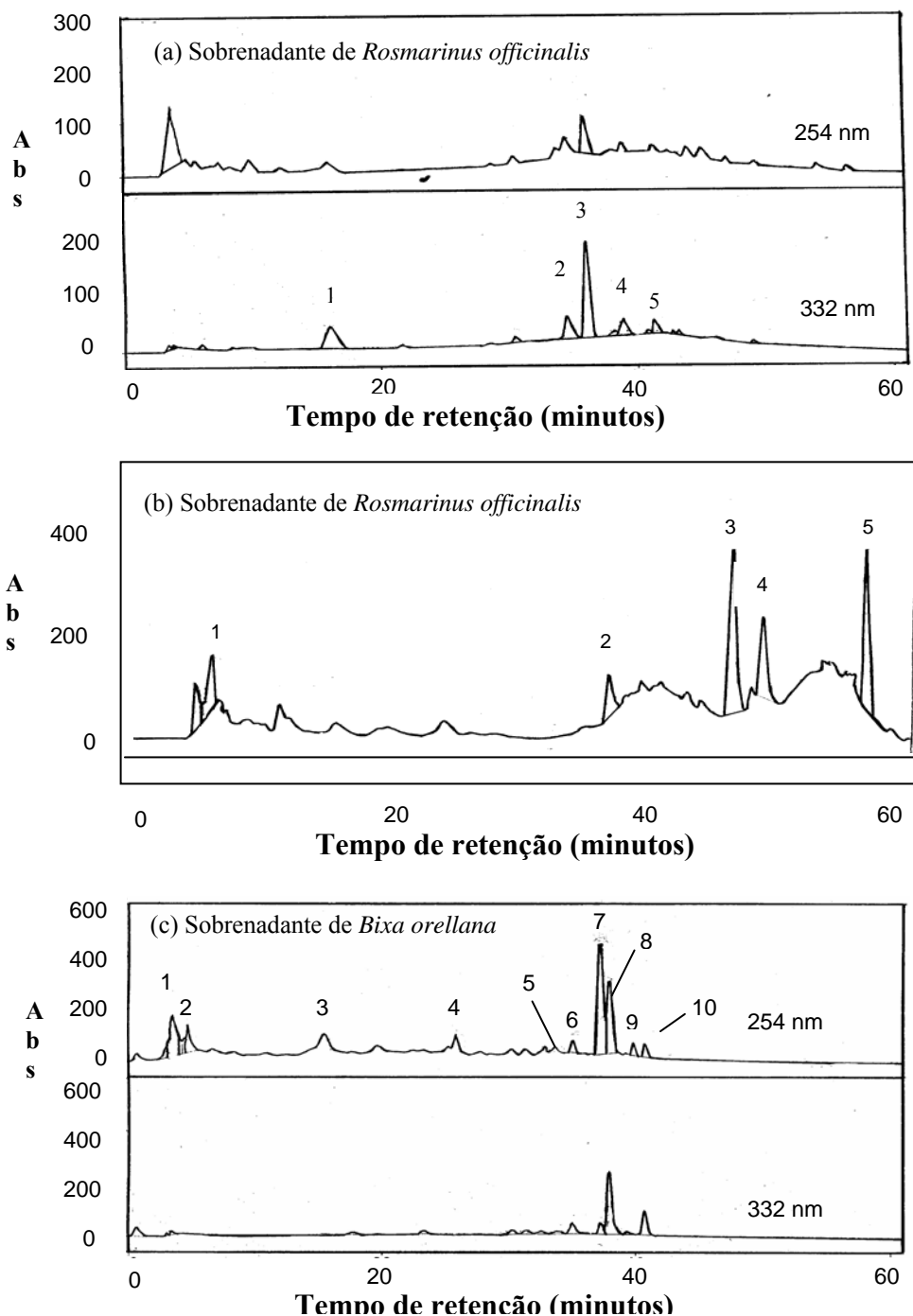


Figura 15. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos do sobrenadante de *Rosmarinus officinalis* t, (a) detecção por DAD em 254 nm e 332 nm, (b) detecção por DAD em 230 nm; e sobrenadante de *Bixa orellana*, (c) detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C18 de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 μm , 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 μl (40 μg de cada amostra), a fase móvel era uma mistura de solvente A (0,1% ácido orto-fosfórico em água) e solvente B (metanol) de acordo com um gradiente, no qual os primeiros 20 minutos consistia de 30% de B e , finalmente 40% de B de 20 até 60 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 6.

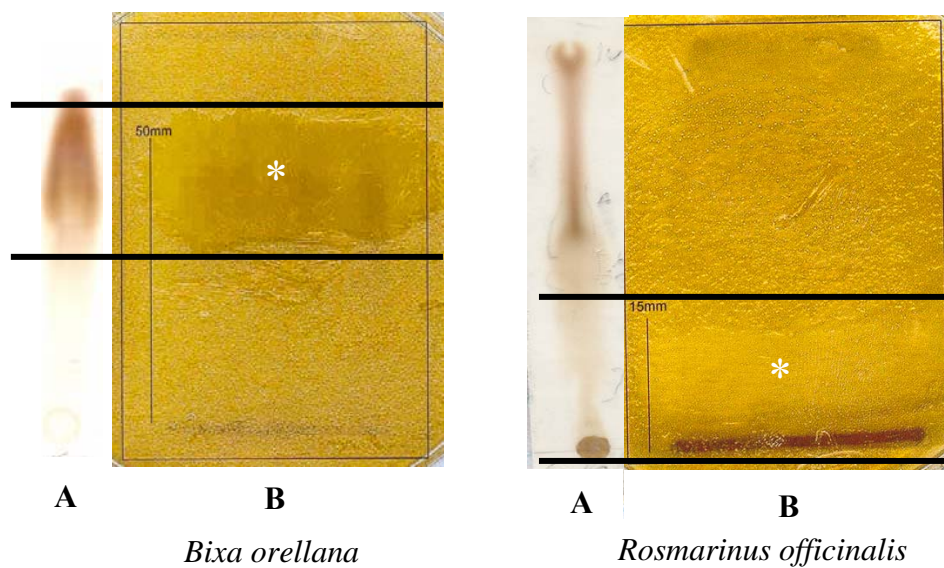


Figura 16. Cromatogramas obtidos por CCF revelados com sulfato cérico (A) e ensaio de bioautografia em CCF (B) para os sobrenadantes de *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis*. O asterisco indica os halos de inibição na bioautografia e valores de R_f elevado para *Bixa orellana*. O valor de R_f mais baixo para *Rosmarinus officinalis* mostra que a substância ativa é polar.

Conclusões

- 1 – Contra MRSA (6 µg/ml) o melhor resultado foi para o extrato aquoso total de *Rosmarinus officinalis*.
- 2 – Os resultados obtidos por CLAE, bioautografia e CCF sugerem que as substâncias responsáveis pela atividade de *Bixa orellana* contra MRSA são flavonóides.
- 3 – Utilizando a mesma metodologia do item anterior, os resultados obtidos para *Rosmarinus officinalis* sugerem que substâncias como ácido rosmarínico e carnosol podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana dessa planta, pois essas substâncias foram descritas previamente por apresentar tal atividade. No entanto, a maior probabilidade é que a atividade contra o MRSA esteja ligada ao ácido rosmarínico baseado nos resultados obtidos a partir da bioautografia, que mostrou serem as substâncias ativas extremamente polares.



CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Este capítulo versa sobre o estudo da atividade antioxidante das espécies de plantas que apresentaram atividade antimicrobiana, exceto *Bixa orellana*. Para fins didáticos essas espécies foram classificadas em plantas alimentícias (seção I) e plantas medicinais (seção II).

Foram avaliados como seqüestradores de radicais livres os sobrenadantes (obtidos pela precipitação por etanol a partir dos extratos aquosos totais) das plantas alimentícias: *Anacardium occidentale* L. (cajueiro; folhas e frutos), *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. (taioba; folhas, caules e tubérculos), *Malpighia glabra* L. (acerola; frutos), assim como *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim; folhas e caules).

Com relação às plantas medicinais foram estudados: os extratos aquosos totais das folhas de *Schinus molle* L. (aroeira), as folhas, caules e flores de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e os sobrenadantes, obtidos por precipitação por etanol dos extratos aquosos totais, das folhas, caules e frutos verdes de *Solanum* sp. (melancia-da-praia), folhas, flores e frutos de *Crotalaria pallida* Aiton (chocalho-de-cascavél) e folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (courama-branca) foram avaliados como seqüestradores de radicais livres.

Foram realizadas CLAE-AFD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –Arranjo de Fotodiodo) desses extratos totais e frações para a identificação do conteúdo flavonoídico, objetivando comparar com a atividade antioxidante e antimicrobiana.

Seção I – Atividade antioxidante de plantas alimentícias brasileiras ativas contra fungos e/ou bactérias

A demonstração dos efeitos benéficos de dietas vegetarianas aumenta continuamente. Os alimentos funcionais fornecem uma oportunidade de combinar alimentos de alta qualidade com moléculas biologicamente ativas como estratégia na correção de distúrbios metabólicos que conduzem às doenças crônicas (Rajaram e Sabaté, 2000; Walzem, 2004). A suplementação externa através de antioxidantes é recomendada para proteger as células dos efeitos deletérios dos EROs (Naik *et al.*, 2004). Esses antioxidantes podem ser encontrados em frutas e legumes ricos em vitamina C, β -caroteno e também carotenóides, assim como compostos fenólicos como flavonóides e fenilpropanóides (Rice-Evans, 1996). Um conhecimento mais aprofundado sobre o conteúdo flavonoídico de plantas alimentícias e sobre o potencial da atividade antioxidante delas é essencialmente interessante. Portanto, plantas alimentícias como *Anacardium occidentale* (cajuero), *Xanthosoma sagittifolium* (taioba), *Malpighia glabra* (acerola) e *Rosmarinus officinalis*

(alecrim) previamente estudadas como portadoras de atividade antimicrobiana (ver capítulo I) podem ser incluídas na lista de plantas de interesse em relação ao conteúdo flavonoídico e atividade antioxidante.

A espécie *Anacardium occidentale* L. é uma planta nativa do Brasil. Ela tem um papel econômico importante nas regiões Norte e Nordeste, mas também é encontrada em países como Moçambique, Índia e Quênia. O seu produto principal é a castanha de caju, largamente consumida em todo o mundo. Adicionalmente, como matéria-prima secundária, o pseudofruto é processado em suco que é bem aceito pela população de alguns países (Assunção, & Mercadante, 2003). A espécie *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott é comumente conhecida como taioba. São tubérculos tropicais cultiváveis, ricos em amido, largamente distribuídos no oeste da África, América tropical e Ásia (Duru e Uma, 2003). A espécie *Malpighia glabra* L., é conhecida como acerola. Os seus frutos têm importância comercial e nutricional nos trópicos e é uma fonte natural de vitamina C (Barros *et al.*, 2004). A quarta espécie estudada, *Rosmarinus officinalis* L., é um condimento largamente utilizado pela população ocidental e que possui capacidade antioxidante bem conhecida (Sáenz-López *et al.*, 2002).

A presente seção tem o objetivo de investigar a atividade antioxidante dos frutos e folhas do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), das folhas, caules e tubérculos de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.), dos frutos de acerola (*Malpighia glabra* L.) e dos caules e folhas de *Rosmarinus*

officinalis L., e comparar o conteúdo flavonoídico (fenólicos) dessas plantas tanto com a atividade antioxidante como com a atividade antimicrobiana.

Resultados e discussão

Os extratos aquosos das plantas são compostos de macro e micromoléculas (ver capítulo I, pág. 78). A fim de separar esses dois tipos de metabólitos, o decocto (*Anacardium occidentale* e *Rosmarinus officinalis*) e o extrato aquoso (*Xanthosoma sagittifolium* e *Malpighia glabra*) foram submetidos à precipitação por etanol como descrito na parte experimental. O conteúdo flavonoídico dos sobrenadantes, rico em micrometabólitos, foi analisado por CLAE-AFD (Tabela 14, Figuras 17 e 18). Os constituintes químicos foram identificados tentativamente pelos seus tempos de retenção (T_R) e espectros de UV baseados em dados publicados previamente na literatura por outros autores (Mabry *et al.*, 1970; Tyman, 1978; Rahman *et al.*, 1978; Murthy *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1994; Zapesochneya *et al.*, 2002; Picerno *et al.*, 2003; Klika *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2004; Vendramini e Trugo, 2004). A rutina apresentou T_R (min) 34,5 e máximos de UV 206, 261 e 356 nm, enquanto a quercetina mostrou T_R (min) 39,3 e máximos de UV 206, 256 e 372 nm. Esses dois flavonóis foram usados como padrões. Cinco picos correspondentes a flavonóides foram detectados para o sobrenadante de *Anacardium occidentale* e três a classes de substâncias desconhecidas (Tabela

14). O sobrenadante de *Xanthosoma sagittifolium* mostrou dois picos atribuíveis a classes de substâncias desconhecidas e dois outros assinalados como flavonóides. *Rosmarinus officinalis* apresentou um pico atribuível ao ácido romarínico, um outro ao rosmanol, carnosol ou ácido carnósico, um a classe de substância desconhecida e dois característicos de flavonóides. O sobrenadante de *Malpighia glabra* não apresentou nenhum pico com máximos de UV característicos de flavonóides e apenas um pertencente a classes de substâncias desconhecidas. O baixo conteúdo flavonoídico de *Xanthosoma sagittifolium* e *Malpighia glabra* está de acordo com o método de extração (extrato aquoso a frio), pois o uso de aquecimento melhora a extração de flavonóides como foi o caso de *Anacardium occidentale* (decocto).

De acordo com Mabry *et al.* (1970) os espectros de UV fornecem informação sobre o tipo de flavonóide assim como o seu padrão de oxidação. Portanto, os espectros de UV para flavonas no anel B ou Banda I variam entre 304 e 350 nm, flavonóis 3-hidroxilados substituídos entre 328 e 357 nm, e flavonóis com a hidroxila em 3 livre - entre 352 e 385 nm. Um aumento da oxigenação no anel B produz um deslocamento batocrômico na Banda I. Por exemplo, a rutina é um flavonol 3-hidroxilado substituído (359 nm) e apresenta uma banda de absorbância em UV mais baixa do que a quercetina, um flavonol com a hidroxila em 3 livre (370 nm). No que concerne ao padrão de oxidação, a rutina e a quercetina que apresentam duas hidroxilas no anel B

têm deslocamento batocrômico para a Banda I quando comparadas a vitexina (336 nm) que possui apenas uma hidroxila.

Os metabólitos secundários de *Anacardium occidentale* foram previamente estudados. Especialmente aqueles presentes na casca da castanha de caju (conhecido como LCC), um material bruto rico em fenólicos usado na preparação de certas resinas sintéticas e plásticos (Murthy *et al.*, 1982). O LCC contém uma grande quantidade de fenóis alquilados de cadeia longa (Murthy *et al.*, 1968; Tyman, 1973; Tyman, 1978), ácidos fenólicos (Murthy *et al.*, 1968; Tyman, 1978) e flavonóides (Rahman *et al.*, 1978; Murthy *et al.*, 1982). A partir das flores foram isolados galato de etila, quercetina e hiperosídeo. Além das substâncias anteriores, exceto pela quercetina, galato de metila, e β -sitosterol foram isolados das folhas em brotação (Subramanian *et al.*, 1969). Dados publicados na literatura mostram os máximos de absorvância em UV de algumas substâncias fenólicas previamente isoladas de *Anacardium occidentale*. Por exemplo, o máximo de absorvância em UV do cardol (fenol alquilado de cadeia longa) é 277 nm, o cardanol (também um fenol alquilado de cadeia longa) 275 nm e o ácido anacárdico (um ácido fenólico) 306 nm (Tyman, 1978); enquanto os máximos de absorvância em UV do occidentosídeo (flavonóide) são 282 e 370 nm, (-) salipurposídeo (flavonóide) 227 e 283 nm, prunina-6''-O-p-cumarato (flavonóide) 285 e 314 nm, e narigenina (flavonóide) 289 e 326 nm (Mabry *et al.*, 1970; Rahman *et al.*, 1978; Murthy *et al.*, 1982; Zapesochneya *et al.*, 2002). Além disso, o

máximo de absorbância em UV do galato de etila é 270 nm, hiperosídeo 257 e 362 nm e galato de metila 260 nm (Mabry *et al.*, 1970; Klika *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2004). Nós observamos que os máximos de absorbância em UV podem exibir pequenas variações dependendo do solvente usado. Portanto, os máximos de absorbância em UV que nós obtivemos para a rutina e quercetina não foram idênticos àqueles encontrados na literatura, ou seja, 266 e 359 nm para a rutina e 255 e 370 nm para a quercetina (Mabry *et al.*, 1970). A substância detectada em T_R (min) 30,5 e máximo de absorbância em UV de 215 e 281 nm foi assinalada como um flavonóide, mais precisamente uma flavanona, a partir da sua absorção para a Banda I e II e do seu tempo de retenção que podem ser comparados ao (-) salipurposídeo (227 e 283 nm) (Zapesochnaya *et al.*, 2002). O flavonóide em T_R (min) 35,2 apresentou os mesmos máximos de absorbância em UV que a rutina para as Bandas I e II.

A maioria dos estudos sobre a composição de *Xanthosoma sagittifolium* focaliza em fatores não-nutricionais e/ou toxinas (Pinto *et al.*, 2001; Sefa-Dedeh e Agyir-Sackey, 2004) como fenóis (Agbor-Egbe e Rickard, 1990; Temgo e Boyomo, 2002) e carotenóides (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1990), e fatores nutricionais como carboidratos (Graziano *et al.*, 1992; Sefa-Dedeh e Agyir-Sackey, 2004) e proteínas (Damme *et al.*, 1995; Goldstein, 2002; Sefa-Dedeh e Agyir-Sackey, 2004). Existem relatos de três cultivares diferentes de taioba distinguidos uns dos outros pela cor interna do tubérculo (vermelha, branca e amarela). O de cor amarela é o mais rico em fenóis e foi

relatado como sendo o cultivar mais resistente contra a levedura *Pythium myriotylum* (Temgo e Boyomo, 2002). Os flavonóides detectados pela CLAE-AFD nesse trabalho para *Xanthosoma sagittifolium* (cor interna do tubérculo branca) apresentaram máximos de absorbância em UV próximos daqueles descritos para uma flavona C-glicosilada (apigenina 6-C- β -D-glucopiranosil 8-C- β -D-apiofuranosídeo) previamente isolada de *Xanthosoma violaceum* e também próximo da vitexina (Picerno *et al.*, 2003) (Tabela 14).

Embora os frutos de *Malpighia glabra* sejam conhecidos por conterem grandes quantidades de vitamina C, sob as condições de CLAE-AFD usadas nesse trabalho, ela não foi detectada. Também não foram detectados flavonóides. Segundo Silva (1999) tanto o ácido ascórbico quanto as antocianinas presentes no suco de acerola são extremamente sensíveis à temperatura, mudança de pH e tempo de armazenamento. Portanto, o fato de haver separado as macromoléculas das micromoléculas pela precipitação por etanol deve ter contribuído para um efeito negativo na concentração de ácido ascórbico e antocianinas. Além disso, um trabalho recente publicado por Vendramini e Trugo (2004) relatou sobre o conteúdo de antocianinas, quercetina, kaempferol e ácidos fenólicos da pele do fruto maduro de acerola, usando metanol acidificado para a extração, e condições de CLAE diferentes, incluindo o comprimento de onda de detecção, mais adequados para antocianinas. Isso pode explicar o porque da ausência de flavonóides, pois muitos deles são antocianinas e o nosso método de extração e condições de

CLAE não foram os mesmos. O único pico em T_R (min) 3,4 com máximo de absorvância em UV de 242 nm não era característico de vitamina C (265 nm) (Zhao *et al.*, 2004).

Os resultados da detecção química e comparação com os dados publicados na literatura para *Rosmarinus officinalis* já foram discutidos no capítulo I (pág. 96). No entanto, além das substâncias discutidas no capítulo anterior, vale a pena ressaltar que os flavonóides isolados dessa planta até o presente momento são luteolina 3'-*O*- β -D-glucoronídeo (os máximos de absorvância em UV são 269 e 345 nm), luteolina (os máximos de absorvância em UV são 242, 253, 267 nm e 349 nm), luteolina 3'-*O*-(4''-*O*-acetil)- β -D-glucoronídeo (os máximos de absorvância em UV são 208, 269 e 337 nm), luteolina 3'-*O*-(3''-*O*-acetil)- β -D-glucoronídeo (os máximos de absorvância em UV são 284 e 336 nm) (Okamura *et al.*, 1994; Mabry *et al.*, 1970). Comparando esses dados com os picos relativos a flavonóides no nosso experimento é possível dizer que eles são derivados da luteolina (Tabela 14).

A substância DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila) é um radical livre largamente usado para testar a capacidade seqüestradora de radical livre de amostras extraídas de plantas por um mecanismo de doação de hidrogênio (Sakanaka *et al.*, 2005; Lo e Cheung, 2005). O uso do radical estável de DPPH tem a vantagem de não ser afetado por reações secundárias como inibição de enzimas e quelação por metais (Wettasinghe e Shahidi, 1999). O Gráfico 1 mostra a percentagem da capacidade seqüestradora de radicais

livres dos sobrenadantes em 1000 µg/ml, 100 µg/ml e 10 µg/ml. *Anacardium occidentale* e *Malpighia glabra* mostraram capacidade seqüestradora de radicais livres acima de 90% nas concentrações de 1000 µg/ml e 100 µg/ml. Essa atividade diminuiu na concentração de 10 µg/ml para os sobrenadantes das duas plantas, no entanto *Anacardium occidentale* manteve sua atividade em quase 50%. *Rosmarinus officinalis* mostrou a terceira melhor atividade antioxidante. Na concentração de 100 µg/ml de amostra tanto *Rosmarinus officinalis* quanto *Malpighia glabra* mostraram melhor atividade antioxidante do que o BHT. O *Xanthosoma sagittifolium* mostrou a atividade antioxidante mais baixa na concentração de 1000 µg/ml (70%) e menor do que 20% nas concentrações de 100 µg/ml e 10 µg/ml pelo método do DPPH. Quando se compara a atividade antioxidante com o conteúdo flavonoídico, o sobrenadante de *Anacardium occidentale* apresentou a maior quantidade de flavonóides e melhor atividade antioxidante. No entanto, o sobrenadante dos frutos de *Malpighia glabra*, pobre em flavonóides, exibiu a segunda melhor atividade antioxidante, mostrando que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante não são flavonóides detectáveis sob as nossas condições de análise. O conteúdo baixo de flavonóides mostrados pelo CLAE-AFD em *Xanthosoma sagittifolium* corrobora com a sua atividade antioxidante menor. *Rosmarinus officinalis* apresentou apenas dois picos detectáveis para flavonóides, no entanto sabe-se que a sua atividade

antioxidante está também relacionada a diterpenos fenólicos como carnosol, ácido carnósico, metil carnosato, rosmanol e isorosmanol (Sáenz-López *et al.*, 1997; Señoráns *et al.*, 2000; Basaga *et al.*, 1997). Extratos de *Rosmarinus officinalis* são usados, na prática, na prevenção da autoxidação dos alimentos (Basaga *et al.*, 1997).

Quando acontece uma infecção ou danos físicos muitos processos de defesa das plantas são ativados. Algumas substâncias são produzidas imediatamente, enquanto as fitoalexinas estão presentes apenas depois de dois a três dias. As substâncias fenólicas geralmente têm atividade antimicrobiana significativa assim como os flavonóides (Basile *et al.*, 1999; Cowan, 1999; Sato *et al.*, 2000; Martini *et al.*, 2004). Nesse estudo podemos observar pela CLAE que o sobrenadante obtido a partir do extrato aquoso das folhas e frutos de *Anacardium occidentale*, ativo contra *Cryptococcus neoformans* (ver capítulo I, pág. 90), é rico em flavonóides. O sobrenadante das folhas caules e tubérculos de *Xanthosoma sagittifolium* provou ser ativo contra *Trichophyton rubrum* (ver capítulo I, pág. 90) revelou apenas traços de flavonóides, embora Temgo e Boyomo (2002) tenham observado que os clones dessa planta resistentes contra *Pythium myriotylum* tivessem um conteúdo fenólico maior do que os clones tolerantes e sensíveis. O sobrenadante dos frutos de *Malpighia glabra* ativos contra *Staphylococcus aureus* (ver capítulo I, pág. 90) não mostrou a presença de nenhum flavonóide

detectável sob as nossas condições de CLAE (Tabela 14 e Figura 18). O CLAE-AFD de *Rosmarinus officinalis* (Figura 18) revelou a presença de diterpenos fenólicos e de flavonóides que devem contribuir para a atividade antimicrobiana (ativa contra *Trichophyton rubrum*, MSSA, MRSA, *Lactobacillus casei*) dessa planta (ver capítulo I, pág. 99).

Tabela 14. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes das folhas e frutos de *Anacardium occidentale*, frutos *Malpighia glabra*, folhas caules e tubérculos de *Xanthosoma sagittifolium* e folhas e caules de *Rosmarinus officinalis* analisadas por CLAE-AFD

Amostras (Sobrenadantes)	Atividade antimicrobiana	Pico nº	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorvância de UV (nm)	Classes químicas/ substâncias detectadas
<i>Anacardium occidentale</i> L.	*Antifúngica (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	1	3,4	223	Desconhecido
		2	4,9	213, 273	Desconhecido
		3	7,8	204, 263	Desconhecido
		4	30,5	215, 281	Flavanona
		5	35,2	261, 356	Flavonol
		6	35,6	265, 356	Flavonóide
		7	38,1	261, 352	Flavonóide
		8	41,2	265, 344	Flavonóide
<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott.	*Antifúngica (<i>Trichophyton rubrum</i>)	1	3,2	221	Desconhecido
		2	3,9	242	Desconhecido
		3	24,8	213, 271, 335	Flavona
		4	28,8	271, 335	Flavona
<i>Malpighia glabra</i> L.	**Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1	3,4	242	Desconhecido
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	*Antifúngica (<i>Trichophyton rubrum</i>) **Antibacteriana (MSSA, MRSA, <i>Lactobacillus casei</i>)	1	15,9	218,322	Ácido rosmarínico
		2	34,4	284	Rosmanol, carnosol ou ácido carnósico
		3	35,9	331	Desconhecido
		4	38,8	265,335	Flavonóide
		5	41,3	265,331	Flavonóide

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura (Mabry *et al.*, 1970; Tyman, 1978; Murthy *et al.*, 1982; Zapesochnaya *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 1978; Klika *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2004; Picerno *et al.*, 2003; Vendramini e Trugo, 2004; Okamura *et al.*, 1994). Para as condições cromatograficas veja figuras 17 e 18.

* Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, 2005.

**Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, submetido.

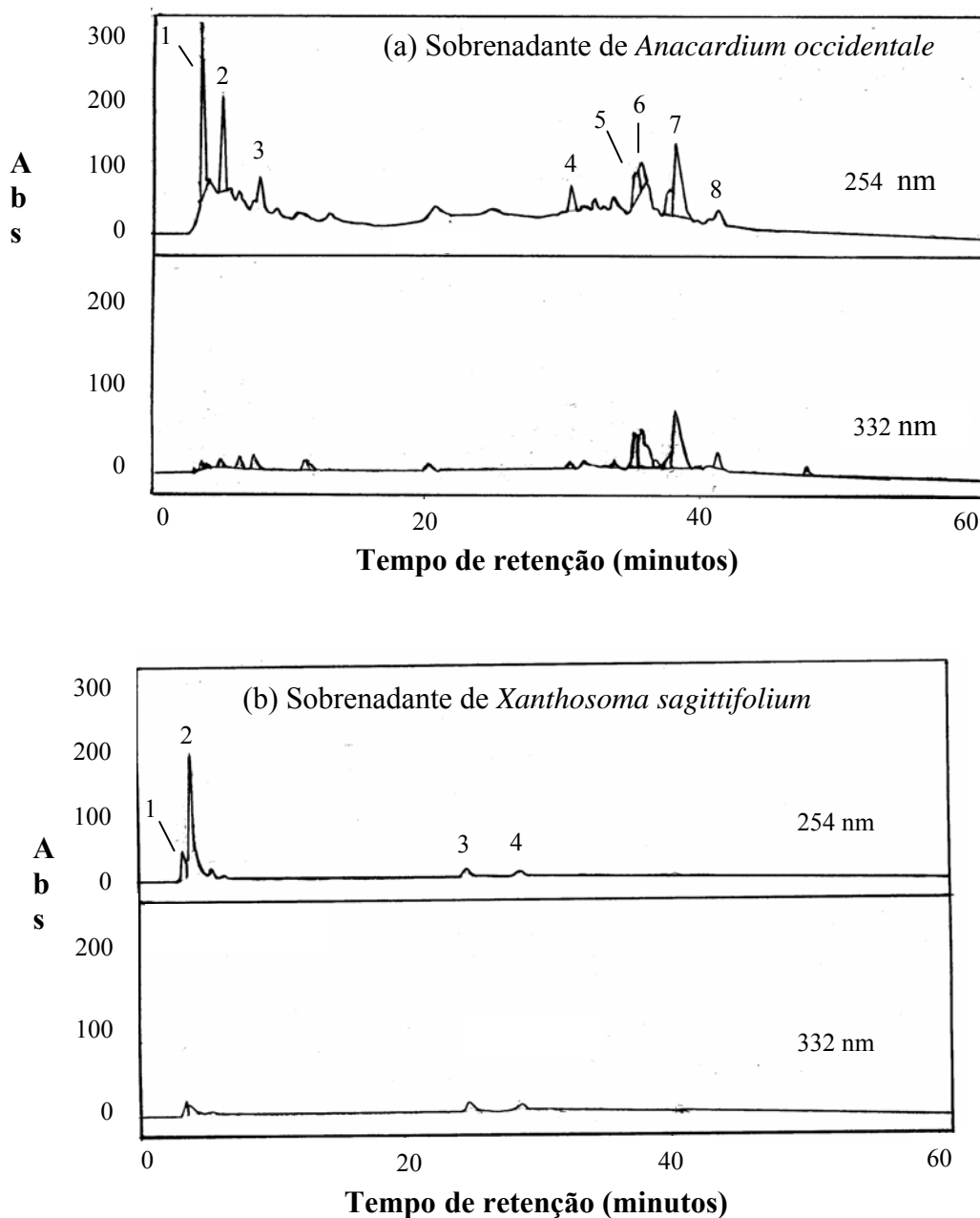


Figura 17. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadante de (a) *Anacardium occidentale*, (b) *Xanthosoma sagittifolium* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4,6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 14.

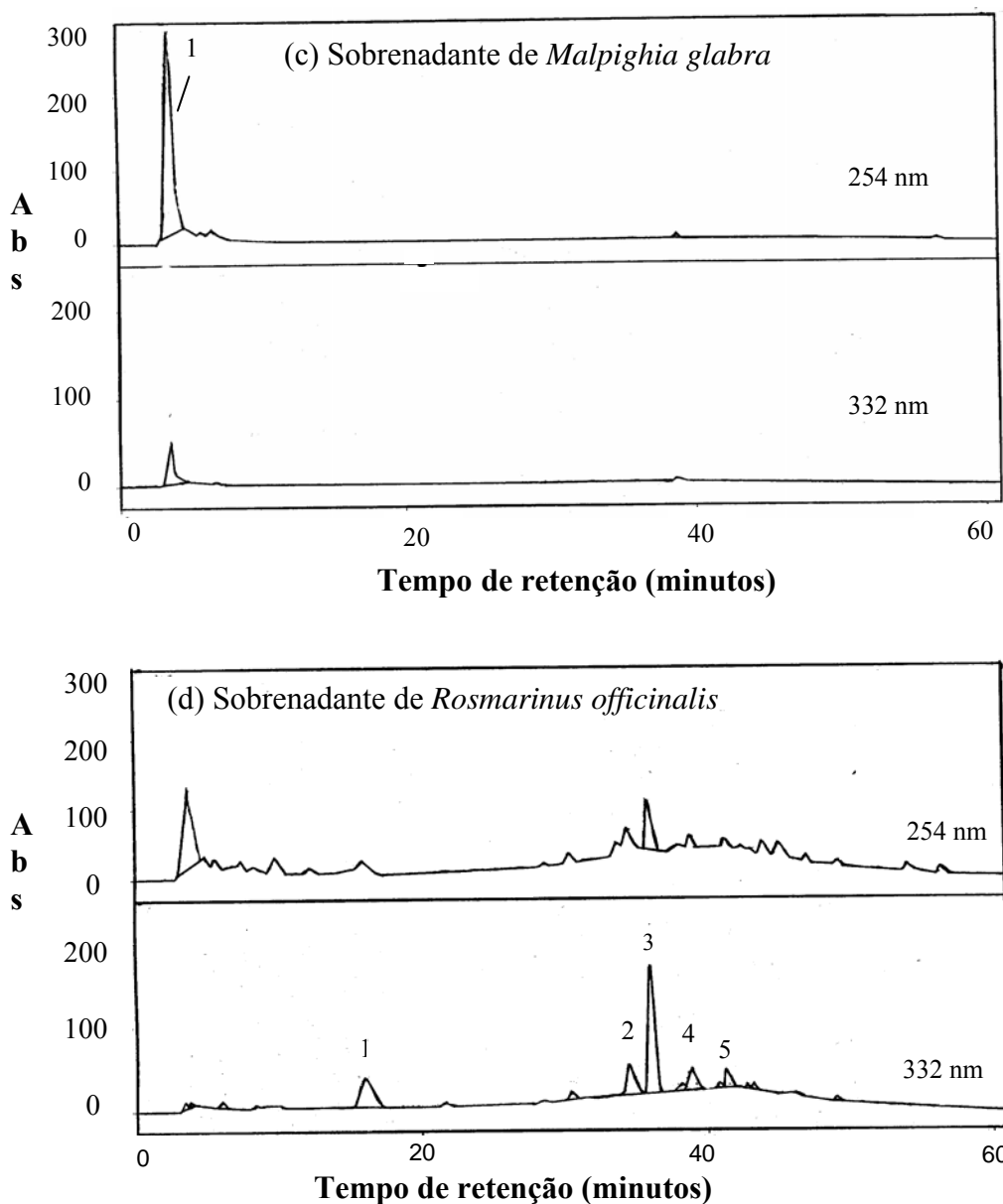


Figura 18. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadantes de (c) *Malpighia glabra* e (d) *Rosmarinus officinalis* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 14.

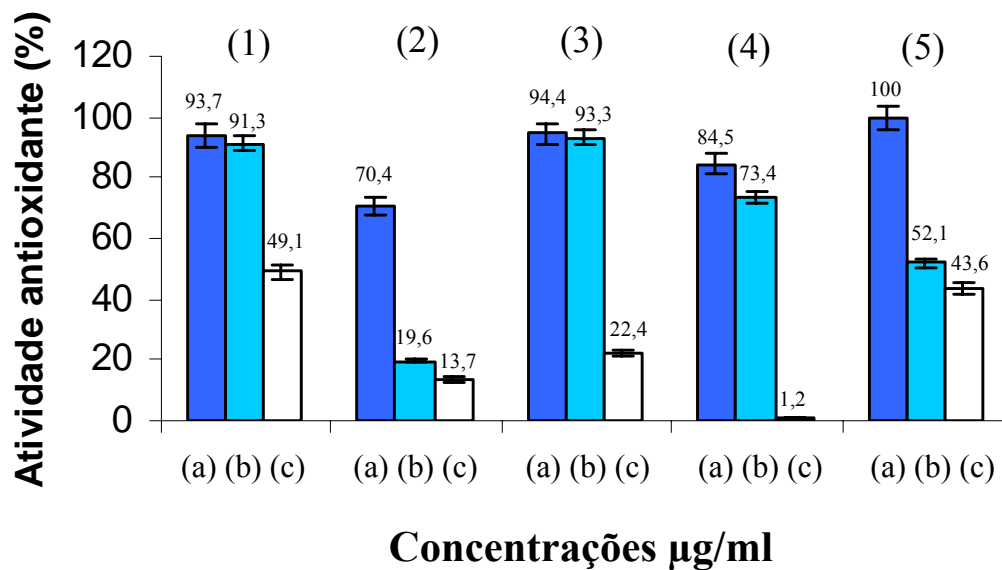


Gráfico 1. Atividade sequestradora de radicais livres dos sobrenadantes de (1) folhas e frutos de *Anacardium occidentale*, (2) folhas, caules e tubérculos de *Xanthosoma sagittifolium*, (3) frutos de *Malpighia glabra*, (4) folhas e caules de *Rosmarinus officinalis* e (5) BHT [2,6-di-(terc-butil)-4-metilfenol] nas concentrações de (a) 1000 µg/ml, (b) 100 µg/ml e (c) 10 µg/ml pelo método do DPPH. Rutina, quercetina e ácido gálico foram usados como controle positivo (100%). Os valores são médias aritméticas (n=3)

Conclusões

1 – Podemos concluir que o conteúdo flavonoídico pode influenciar na atividade antioxidante como foi o caso para *Anacardium occidentale* e *Xanthosoma sagittifolium*.

2 - Em relação a *Malpighia glabra* a atividade antioxidante não está relacionada ao conteúdo flavonoídico detectável pelo método de CLAE utilizado.

3 – O conteúdo flavonoídico não parece influenciar na atividade antimicrobiana de *Xanthosoma sagittifolium*.

4 – *Rosmarinus officinalis* parece ter a sua atividade antimicrobiana e antioxidante relacionada ao seu conteúdo em diterpenos fenólicos, ácido romarínico e flavonóides.

Seção II – Atividade antioxidante de plantas medicinais brasileiras ativas contra fungos e/ou bactérias

As plantas têm desenvolvido um enorme arsenal químico para sobreviver aos ataques pelas invasões microbianas (Grayer e Harborne, 1994; Zipfel e Felix, 2005). Isso inclui tanto barreira física quanto química na presença ou acúmulo de metabólitos antimicrobianos. Esses metabólitos são pré-sintetizados pela planta (proibitinas) ou induzidos após infecção (fitoalexinas). As fitoalexinas também podem ser induzidas por fatores abióticos como radiação UV, e por essa razão foram definidas como “antibióticos” formados na planta por metabolismo induzido bioticamente ou em resposta a fatores químicos e ambientais (Martini *et al.*, 2004).

O uso em humanos de plantas contendo substâncias bioativas tem se tornado uma das abordagens mais importantes na medicina preventiva (Osato *et al.*, 1993). Embora muitos antibióticos tenham sido descobertos em plantas, a falta de garantia da ausência de efeitos colaterais e a resistência microbiana requerem a busca constante de antimicrobianos clinicamente úteis. No entanto, ainda existe uma grande lacuna relativa aos efeitos farmacológicos e composição química de plantas. Plantas como *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Solanum* sp., *Crotalaria pallida* e *Kalanchoe brasiliensis* com comprovada atividade antimicrobiana (ver capítulo I, pág. 90) também

podem ser incluídas na lista de plantas de interesse em relação ao conteúdo flavonoídico e antioxidante.

A espécie *Schinus molle* L. é nativa da América do Sul e Central. Essa espécie tem sido aclimatada com sucesso em diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo algumas partes da Europa. Os frutos secos são usados como substituto da pimenta-do-reino e as folhas servem como corantes. Os frutos e as folhas são usados na medicina tradicional (Yueqin *et al.*, 2003). *Schinus terebinthifolius* Raddi é também nativa da América do Sul e Central. Foi introduzida na Flórida, nos Estados Unidos (Lloyd *et al.*, 1977), onde é considerada uma planta perturbadora da flora natural local. No Brasil, é amplamente cultivada na arborização de ruas e praças e também utilizada na medicina caseira (Lorenzi e Matos, 2002). O gênero *Solanum* tem sido extensivamente estudado. *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum* são as plantas mais representativas desse gênero pela sua utilização como alimento, apresentando na literatura vasto estudo químico e farmacológico (Lorenzi e Matos, 2002). *Crotalaria pallida* Aiton é uma planta freqüente em quase todo o território brasileiro em pastagens de beira de estradas. Suas sementes são consideradas tóxicas ao gado. É esporadicamente cultivada para cobertura do solo e como adubo verde, tendo o poder de controlar nematóides (Lorenzi, 2000). A espécie *Kalanchoe brasiliensis* Camb. é uma planta medicinal brasileira da família Crassulaceae, largamente utilizada na

medicina popular para o tratamento de processos inflamatórios crônicos e na cicatrização de feridas da pele (Ibrahim *et al.*, 2002).

Nessa seção tem-se o objetivo de avaliar a atividade antioxidante das espécies de plantas medicinais *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius*, *Solanum* sp., *Crotalaria pallida* e *Kalanchoe brasiliensis* e correlacionar o conteúdo flavonoídico (fenólicos) dessas plantas à atividade antioxidante quanto e à atividade antimicrobiana.

Resultados e discussão

Os extratos aquosos totais das folhas de *Schinus molle* (decocto 30%), das folhas, caules e flores de *Schinus terebinthifolius* (decocto 30%); e os sobrenadantes, obtidos a partir da precipitação por etanol dos extratos aquosos totais como descrito na parte experimental (pág. 60), das folhas, caules e frutos verdes de *Solanum* sp. (extrato aquoso a frio 80%), folhas, flores e frutos de *Crotalaria pallida* (decocto 40%) e folhas de *Kalanchoe brasiliensis* (extrato aquoso a frio 20%) tiveram seus conteúdos flavonoídicos analisados por CLAE-AFD (Tabelas 15 e 16 e Figuras 19, 20 e 21). Os constituintes químicos foram identificados tentativamente pelos seus tempos de retenção (T_R) e espectros de UV baseados em dados publicados previamente na literatura por outros autores (Mabry *et al.*, 1970; Dominguez *et al.*, 1971; Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Niwa *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 1989; Costa *et al.*,

1994; Weng *et al.*, 2002; Yueqin *et al.*, 2003; Weng *et al.*, 2003). A rotina apresentou T_R (min) 34,5 e máximos de UV 206, 261 e 356 nm, enquanto a quercetina mostrou T_R (min) 39,3 e máximos de UV 206, 256 e 372 nm, os dois flavonóis foram usados como padrões. Três picos correspondentes a flavonóides foram detectados para o extrato aquoso total de *Schinus molle* e seis a classes de substâncias desconhecidas (Tabela 15). O extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* mostrou seis picos correspondentes a substâncias ou grupo de substâncias desconhecidas e um emaranhado de picos também de substâncias desconhecidas. O sobrenadante de *Solanum* sp. revelou três picos característicos de flavonóides e dois pertencentes a classes de substâncias desconhecidas. O sobrenadante de *Crotalaria pallida* apresentou três picos de substâncias desconhecidas e dois característicos de flavonóides. E finalmente, o sobrenadante de *Kalanchoe brasiliensis* exibiu a maior quantidade de picos característicos da classe dos flavonóides (6 picos) e apenas três pertencentes a classe de substâncias desconhecidas.

Os principais componentes isolados dos frutos de *Schinus molle* são triterpenos, principalmente cetoácidos (Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Yueqin *et al.*, 2003). Ácido lignocérico e β -sitosterol foram isolados dos caules e folhas dessa planta (Dominguez *et al.*, 1971). Uma biflavona foi isolada dos frutos (Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Yueqin *et al.*, 2003). A partir de uma fração apolar das folhas foi isolada uma cetona sesquiterpênica monocíclica (Delvalle e Schwenker, 1986). Foi possível obter os máximos de absorvância em UV de

algumas dessas substâncias isoladas em dados publicados na literatura. Os triterpenos – os ésteres metílicos dos ácidos 3-epi-isomasticadienolálico, isomasticadienodiólico e 3-epi-isomasticadienodiólico - exibem máximos de absorvância em 212 nm, 208 nm e 212 nm, respectivamente (Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Yueqin *et al.*, 2003). O máximo de absorvância para o ácido lignocérico é 212 nm (Dominguez *et al.*, 1971). Finalmente, o máximo de absorvância da biflavona chamaejasmina é 296 nm (Niwa *et al.*, 1986; Yueqin *et al.*, 2003). Nenhuma das substâncias citadas acima fora detectada pelo método utilizado (Tabela 15).

Estudos dos constituintes químicos de *Schinus terebinthifolius* levaram ao isolamento de schinol, terebintona (Kaistha e Kier, 1962; Kier *et al.*, 1963), ácido masticadienóico, sitosterol e simiarenol (Campello e Marsaioli, 1974), bauerenona, ácido terebentifólico (Campello e Marsaioli, 1975), pentagaloilglucose (Hayashi *et al.*, 1989) e outros terpenos (Lloyd *et al.*, 1977). O único máximo de absorvância em UV encontrado na literatura foi para a pentagaloilglucose em 280 nm (Hayashi *et al.*, 1989). Esse máximo de absorvância corresponde a alguns picos do cromatograma de CLAE-AFD do nosso estudo (Tabela 15).

O gênero *Solanum* tem sido extensivamente estudado. *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum* são as plantas mais representativas desse gênero pela sua utilização como alimento, apresentando na literatura vasto

estudo químico e farmacológico (Lorenzi e Matos, 2002). A planta desse estudo é conhecida localmente no Estado do Maranhão como melancia-da-praia, no entanto não foi possível classificá-la além do gênero. Mas, acredita-se que seja a *Solanum aculeatissimum* ou *Solanum palinacanthum* pela visualização de fotos em livros. Para a espécie *Solanum aculeatissimum* já foram isolados glicosídeos esteroidais aculeatisídeo A e B (Saijo *et al.*, 1983), porém os máximos de absorbância em UV dessas substâncias não foram publicados até o presente momento e não foi possível a partir dos picos detectados, por CLAE-AFD nesse estudo, correlacionar os máximos de absorbância com relatos da literatura.

Algumas substâncias tem sido isoladas a partir de *Crotalaria pallida*. Os flavonóides pterocarpanos (isoflavonóides), apigenina (flavona), genisteína (isoflavona) e a isoflavona *alpinum* foram isolados recentemente por Weng *et al.* (2002, 2003). Os dados publicados na literatura mostram os máximos de absorbância de alguns desses flavonóides previamente isolados de *Crotalaria pallida*. Por exemplo, os pterocarpanóides têm máximos de absorbância nos seguintes comprimentos de onda: crotafurano A em 245, 279 e 288 nm; crotafurano B em 237, 288 e 338 nm; crotafurano C em 275, 285, e 306 nm; e finalmente, crotafurano E em 243, 256 e 286 nm (Weng *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2003). A apigenina apresenta máximos de absorbância em 267 e 336 nm e a genisteína em 261 e 328 nm (Mabry *et al.*, 1970). Nesse estudo as substâncias ou classes de substâncias detectadas pelo CLAE-AFD

apresentam proximidade com os máximos de absorvência encontrados na literatura. O flavonóide em T_R (min) 30,1 apresentou máximos de absorvência em UV próximos da genisteína que é uma isoflavona. A substância detectada em T_R (min) 32,1 e máximo de absorvência em UV de 269 e 239 nm foi assinalada como um flavonóide, mais precisamente uma flavona, a partir da sua absorção para a Banda I e II que pode ser comparada a apigenina (267 e 336 nm).

Apesar de ser largamente utilizada como medicamento popular, só na década de 90, a espécie *Kalanchoe brasiliensis* foi estudada sob o ponto de vista fitoquímico. Vários flavonóides glicosilados foram isolados dessa espécie (Costa *et al.*, 1994). Os dados publicados na literatura permitiram a comparação de alguns máximos de absorvência com aqueles encontrados no nosso estudo. O kalambrosído A possui máximo de absorvência em 263, 268 e 356 nm, kalambrosído B em 260 e 355 nm e kalambrosído C em 260 e 357 nm (Costa *et al.*, 1994). Esses flavonóides são derivados da patuletina e verificou-se que os picos correspondentes a flavonóides no nosso estudo possuem máximos de absorvência próximos desses derivados.

O estudo da atividade antioxidante pelo método do DPPH apresentou resultados interessantes. O gráfico 2 mostra a percentagem da capacidade seqüestradora de radicais livres dos sobrenadantes em 1000 µg/ml, 100 µg/ml e 10 µg/ml. Os extratos aquosos totais de *Schinus molle*, *Schinus terebinthifolius* e o sobrenadante de *Kalanchoe brasiliensis* mostraram

capacidade seqüestradora de radicais livres acima de 90% na concentração de 1000 µg/ml e, ainda, *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius* mantiveram essa capacidade acima de 90% na concentração de 100 µg/ml. Apenas *Schinus terebinthifolius* mostrou atividade antioxidante acima de 50% em 10 µg/ml, um resultado melhor do que o obtido para o BHT nas mesmas condições.

Quando se compara a atividade antioxidante com o conteúdo flavonoídico, o sobrenadante de *Kalanchoe brasiliensis* mostrou maior conteúdo flavonoídico, todavia não apresentou a melhor atividade antioxidante. Embora *Schinus terebinthifolius* não tenha apresentado flavonóides na sua composição pelos métodos utilizados (CCF e CLAE-AFD) essa planta apresentou a melhor atividade antioxidante.

Todas as espécies medicinais apresentadas na seção II que possuem atividade antimicrobiana também mostraram atividade antioxidante significativa pelo método do DPPH.

Tabela 15. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos extratos aquosos de *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*, e sobrenadante de *Solanum* sp., analisadas por CLAE-AFD

Amostras	Atividade antimicrobiana	Pico n ^o	Comprimento de onda de detecção (nm)	Máximo de absorvância em UV (nm)	Classes químicas/ substâncias detectadas
<i>Schinus molle</i> L. (Ext. Aquoso)	*Antifúngica (<i>Candida albicans</i>)	1	3,2	227	Desconhecido
		2	4,6	217, 273	Desconhecido
		3	7,0	219, 281	Desconhecido
		4	13,7	221, 277	Desconhecido
		5	30,7	221, 281	Desconhecido
		6	32,4	219, 281	Desconhecido
		7	34,0	219, 275, 350	Flavonóide
		8	38,3	219, 263, 352	Flavonóide
		9	41,4	221, 265, 344	Flavonóide
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Ext. Aquoso)	*Antifúngica (<i>Candida albicans</i>)	1	3,3	215, 275	Desconhecido
		2	4,8	215, 273	Desconhecido
		3	7,3	213, 281	Desconhecido
		4	13,7	215, 277	Desconhecido
		5	30,7	215, 281	Desconhecido
		6	32,3	217, 281	Desconhecido
		7	32,9 a 38,6	Emaranhado de picos: 217, 279 ou 281 ou 284	Desconhecido
<i>Solanum</i> sp. (Sobrenadante)	*Antifúngica (<i>Cryptococcus neoformans</i>) **Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1	3,6	271	Desconhecido
		2	4,2	261	Desconhecido
		3	32,0	256,335	Flavonóide
		4	35,0	265,348	Flavonóide
		5	40,2	263,339	Flavonóide

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura (Mabry *et al.*, 1970; Dominguez *et al.*, 1971; Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Niwa *et al.*, 1986; Yueqin *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 1989; Weng *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 1994). Para as condições cromatograficas veja figuras 19 e 20.

* Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, 2005;

**Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, submetido.

Tabela 16. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nos sobrenadantes de *Crotalaria pallida* e *Kalanchoe brasiliensis* analisadas por CLAE-AFD

Amostras (Sobrenadantes)	Atividade antimicrobiana	Pico nº	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorvância de UV (nm)	Classes químicas/ substâncias detectadas
<i>Crotalaria pallida</i> Aiton.	**Antibacteriana (<i>Streptococcus mutans</i>)	1	3,5	202, 263	Desconhecido
		2	4,1	206, 252	Desconhecido
		3	6,0	254	Desconhecido
		4	30,1	261, 344	Isoflavona
		5	32,1	269, 339	Flavona
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Camb.	**Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1	3.7	217	Desconhecido
		2	22.7	242, 329	Desconhecido
		3	27.6	227, 310	Desconhecido
		4	28.7	229, 315	Desconhecido
		5	34.8	223, 265, 356	Flavonol
		6	37.7	225, 265, 356	Flavonol
		7	38.8	225, 265, 356	Flavonol
		8	39.7	227, 265, 356	Flavonol
		9	40.9	223, 265, 358	Flavonol
		10	42.9	231, 265, 356	Flavonol

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura (Mabry *et al.*, 1970; Dominguez *et al.*, 1971; Pozzo-Balbi *et al.*, 1978; Niwa *et al.*, 1986; Yueqin *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 1989; Weng *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 1994). Para as condições cromatograficas veja figura 20 e 21.

* Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, 2005.

**Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, submetido

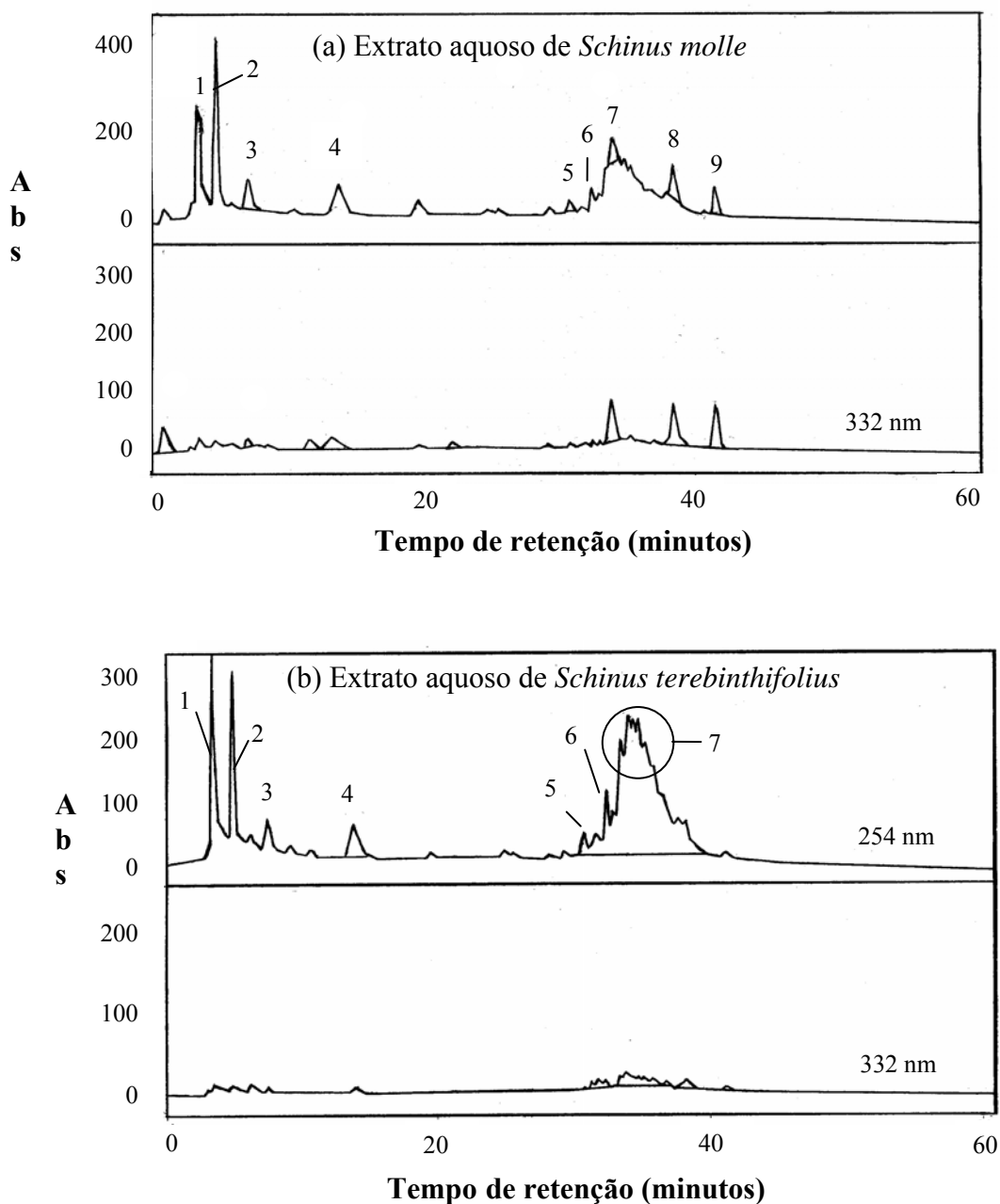


Figura 19. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadante de (a) *Anacardium occidentale*, (b) *Xanthosoma sagittifolium* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 15.

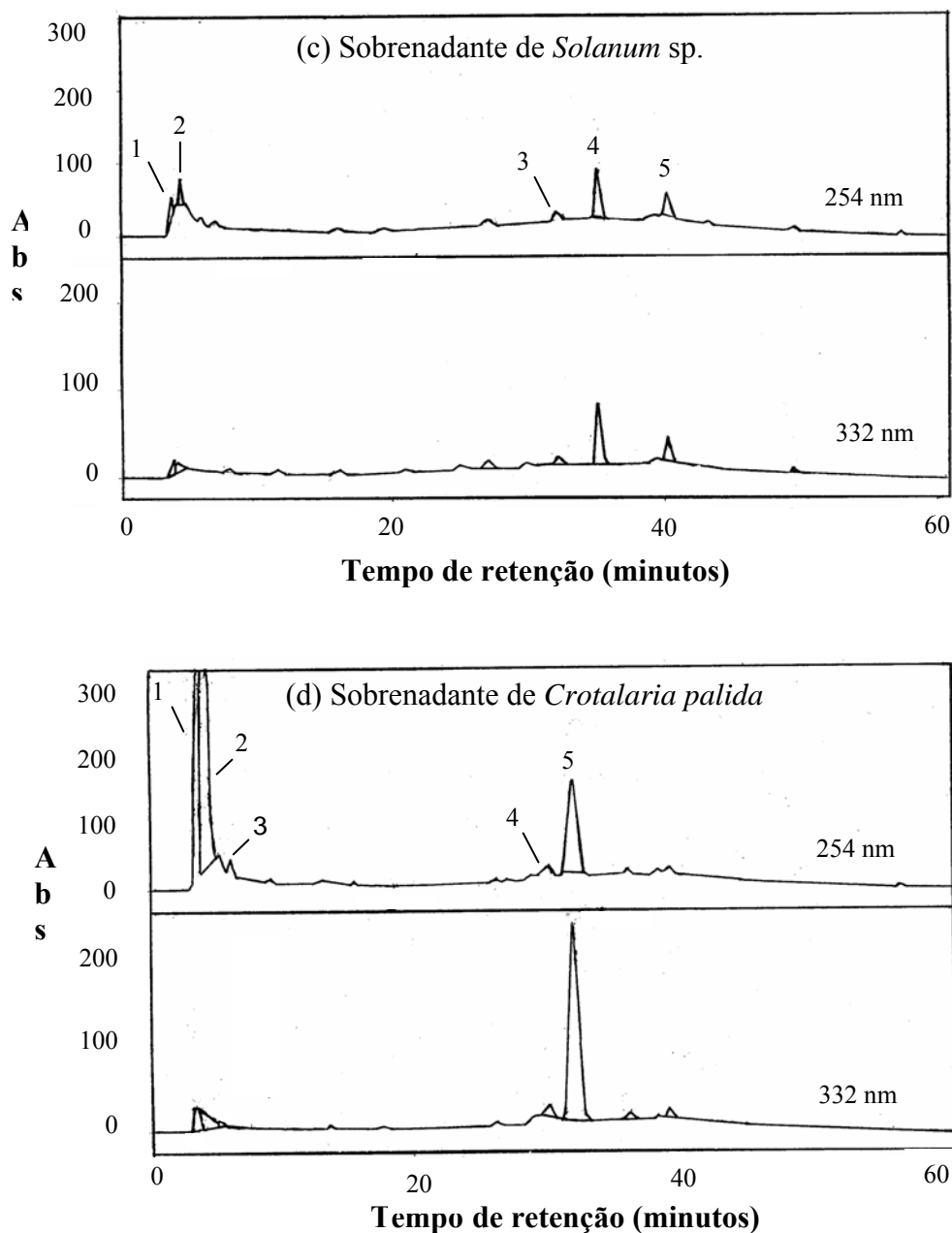


Figura 20. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos sobrenadantes de (c) *Solanum* sp., (d) *Crotalaria palida* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabelas 15 e 16.

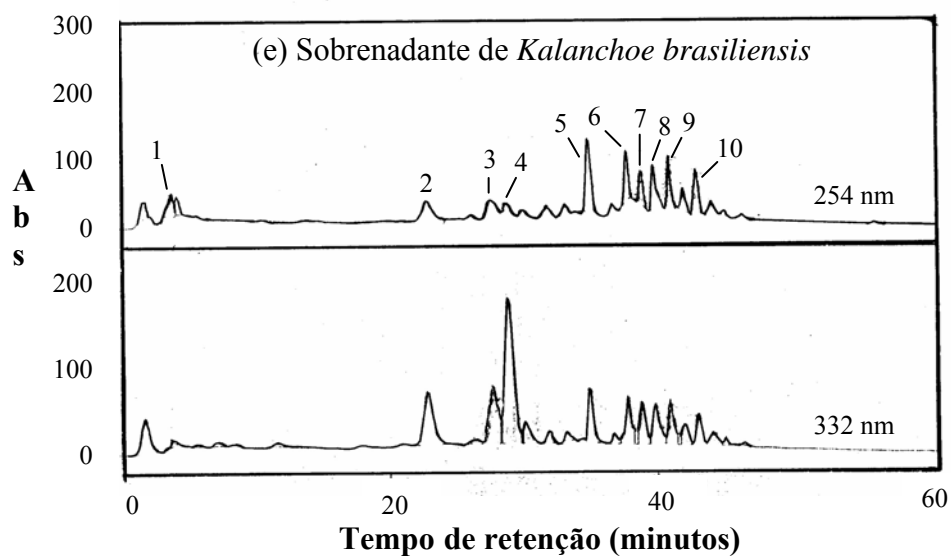


Figura 21. Cromatograma de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtido do sobrenadante de (e) *Kalanchoe brasiliensis* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase reversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição foi realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 16.

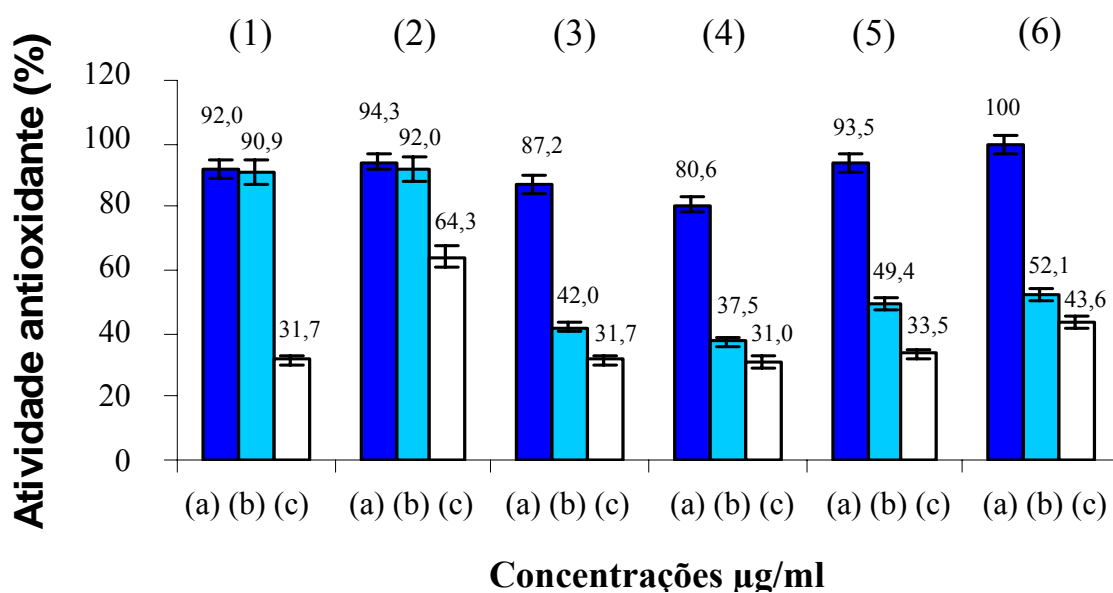


Gráfico 2 - Atividade sequestradora de radicais livres dos extratos aquosos de (1) folhas de *Schinus molle*, (2) folhas, caules e flores de *Schinus terebinthifolius*, e sobrenadantes de (3) folhas, caules e frutos verdes de *Solanum sp.*, (4) folhas, flores e frutos de *Crotalaria pallida*, (5) folhas de *Kalanchoe brasiliensis* e (6) BHT [2,6-di-(terc-butil)-4-metilfenol] nas concentrações de (a) 1000 µg/ml, (b) 100 µg/ml e (c) 10 µg/ml pelo método do DPPH. Rutina, quercetina e ácido gálico foram usados como controle positivo (100%). Os valores são médias aritméticas (n=3)

Conclusões

- 1- Podemos concluir que o conteúdo flavonoídico nem sempre é responsável pela atividade antioxidante, ou seja, *Schinus terebinthifolius* que não apresentou nenhum pico característico de flavonóide apresentou a melhor atividade antioxidante. Já o *Kalanchoe brasiliensis* que apresentou o maior número de picos no cromatograma de CLAE correspondentes a flavonóides mostrou a terceira melhor atividade antioxidante pelo método do DPPH. Outras substâncias pertencentes a outras classes químicas também podem atuar como antioxidantes.
- 2- Todas as plantas medicinais com atividade antimicrobiana comprovada apresentaram atividade antioxidante significativa.



CAPÍTULO III

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FITOQUÍMICO DE *BIXA ORELLANA* L.

Este capítulo faz uma abordagem da atividade antioxidante e fitoquímica dos constituintes de *Bixa orellana*, sempre no intuito da busca de substâncias bioativas. Dessa forma, após a descoberta da atividade antifúngica de *Bixa orellana* (ver capítulo I) contra *Trichophyton rubrum*; e antibacteriana contra *Lactobacillus casei* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), o sobrenadante do extrato aquoso foi submetido a fracionamentos posteriores na tentativa do isolamento de substâncias guiado por bioensaios. Foram usados os métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Arranjo de Fotodiodo (CLAE-AFD) e análise quantitativa da atividade antioxidante pelo método de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila), objetivando correlacionar atividade antioxidante e antimicrobiana com o conteúdo flavonoídico dessa planta.

Introdução

Na carta de Pero Vaz de Caminha a *El-rei* D. Manoel, considerada por muitos como “a certidão de nascimento do Brasil”, o escrivão dá a notícia da descoberta da nova terra que os descobridores chamaram de Ilha de Vera Cruz. Além da nudez das índias e de suas pinturas, chamavam a atenção do cronista alguns ouriços que os índios levaram aos portugueses:

“Certidão de nascimento”

Uma daquelas moças estava toda tinta, de baixo acima, daquela tintura, a qual, na verdade era tão bem feita e tão redonda; a sua vergonha, que ela não tinha, tão graciosa, que a muitas mulheres de nossa terra, vendo-lhes tais feições, faria vergonha, por não terem a sua como ela..

.....

.....

Traziam alguns deles ouriços verdes, de arvores, que na cor, quase queriam parecer de castanheiros; apenas que eram mais e mais pequenos. E os mesmos eram cheios de grãos vermelhos, pequenos, que, esmagando-os entre os dedos, faziam tintura muito vermelha, da que eles andavam tintos; e quanto se mais molhavam mais vermelhos ficavam.

Esses ouriços nada mais eram do que o urucu – *Bixa orellana* (Bixaceae) – que na língua tupi significa vermelho. A tintura dos indígenas era feita com as sementes, cujo principal corante é o norcarotenóide bixina. Esse foi o primeiro *cis*-polieno reconhecido na natureza (Pinto, 1995).

O urucuzeiro pertence, portanto, à família Bixaceae e ao gênero *Bixa*. Quanto à espécie, apesar de existirem várias, a mais freqüente em nosso meio

é a *Bixa orellana*, em homenagem a Francisco Orellana, primeiro europeu a navegar o Amazonas (Franco *et al.*, 2005).

Segundo Engler (1964) a *Bixa orellana* é uma angiosperma que pertence: à classe Dicotyledoneae, ordem Parietales, subordem Cistianeae, família *Bixaceae*, gênero *Bixa*. Além de *Bixa orellana* L. (tipo cultivado) podem ser citadas as espécies *Bixa arborea*, *Bixa americana*, *Bixa urucurana*, *Bixa purpurea*, *Bixa upatensis* e *Bixa oviedi*.

O urucuzeiro é uma planta ornamental, pela beleza e colorido de suas flores e utilíssima como fornecedora de sementes condimentares, estomáquicas, laxativas, cardiotônico, hipotensor, expectorante e antibiótico, agindo como antiinflamatório para as contusões e feridas, apresentando, ainda, emprego interno na cura das bronquites e externo nas queimaduras. Dela se extrai também o óleo industrial. A infusão das folhas tem ação contra a bronquite, faringite e inflamação dos olhos. A polpa que envolve a semente é reputada refrigerante e febrífuga, obtendo-se valiosas matérias tintoriais amarela (orelina) e vermelha (bixina), esta última, constituindo um princípio cristalizável. A raiz contém um princípio digestivo; o pó resultante da trituração das sementes, passa por afrodisíaco; a infusão a frio dos renovos serve para lavar os olhos inflamados e a decocção das folhas é usada para combater os vômitos da gravidez (Corrêa, 1978).

Descrição da planta

A *Bixa orellana* L. é um arbusto, com 3-5 m de altura, de tronco revestido por casca parda e copa bem desenvolvida (Lorenzi e Matos, 2002).



Foto 1. Arbusto *Bixa orellana* (Franco *et al.*, 2005).

Folhas simples, glabras, medindo 8-11 cm de comprimento (Lorenzi e Matos, 2002).



Foto 2. Folhas de *Bixa orellana* (Franco *et al.*, 2005).

Flores levemente róseas, dispostas em panículas terminais muito vistosas (Lorenzi e Matos, 2002).



Foto 3. Flores de *Bixa orellana* (Franco *et al.*, 2005).

Fruto do tipo cápsula deiscente, ovóide, com dois ou três carpelos (divisões), coberto de espinhos flexíveis, de cor vermelha, esverdeada ou parda, com 3-5 cm de comprimento, contendo muitas sementes pretas cobertas por um arilo ceroso de cor vermelha e odor característico. Os frutos encontram-se em cachos com até 17 unidades (Lorenzi e Matos, 2002).



Foto 4. Frutos maduros de *Bixa orellana* (Franco *et al.*, 2005).



Frutificação



Maturação



Maturação plena

Foto 5. Frutos maduros de *Bixa orellana* (Franco *et al.*, 2005).

Essa planta é originária da América tropical incluindo a Amazônia brasileira, sendo cultivada com finalidade doméstica e/ou industrial principalmente no Peru e em menor escala no Brasil, Paraguai e Bolívia (Lorenzi e Matos, 2002).

Do ponto de vista químico, já foram isolados das sementes dos frutos de *Bixa orellana* carotenóides: apocarotenóides (C_{30} a C_{32}), diapocarotenóides (C_{19} , C_{22} , C_{24} e C_{25} , bixina e norbixina) (Mercadante *et al.*, 1996, 1999). O pericarpo das sementes é composto quase 80% de carotenóides *cis*-bixina: metil hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6-6'-dioato (9'-*cis*-bixina ou α -

bixina) e os restantes 20% incluem *trans* e *cis*-norbixina (ácido 6,6'-diapocaroteno-6-6'-dióico e 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6-6'-dióico), vários apocarotenóides, compostos voláteis e outras substâncias não caracterizadas (Galindo-Cuspinera e Rankin, 2005). Em estudos anteriores isolaram-se derivados de apigenina (7-glicosídeo e 7-bissulfato), luteolina (7-glicosídeo e 7-bissulfato), hipolaetina (7-bissulfato) e ácido elágico (Harborne, 1975). Além disso, relatou-se a presença de um sesquiterpeno tetracíclico chamado ishwarane, componente majoritário (54%) do óleo das folhas de *Bixa orellana*. O óleo também apresentou em menor proporção: selina-4(15),11-dieno, valenceno, β -elemeno, cariofileno, germacreno, *trans*-nerolidol, selina-3,11-dieno, selina-3,11-dieno, β -selineno, copaeno, δ -cadineno, α -terpineol, espatulenol, γ -cadineno, δ -elemeno, ledol, α -muuroleno, α -cadinol, aromadendreno, aristolocheno, *trans*-ocimeno, óxido de cariofileno (Lawrence e Hogg, 1973).

O extrato etanólico das folhas e sementes de *Bixa orellana* foi descrito na literatura como tendo atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* entre outros (Fleischer *et al.*, 2003; Galindo-Cuspinera *et al.*, 2003). O extrato hidroalcoólico (50%) da casca foi relatado como tendo atividade *in vitro* contra *Neisseria gonorrhoeae* (Cáceres *et al.*, 1995). Mais recentemente, Galindo-Cuspinera e Rankin (2005) conseguiram identificar através de bioautografia e CLAE-AFD-EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Arranjo de Fotodiodo-Espectrometria de Massas), 9'-*cis*-norbixina e *trans*-

norbixina como componentes majoritários de extratos aquosos obtidos a partir de amostras comerciais de *Bixa orellana*, que segundo esses autores é responsável pela atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Seção I – Atividade antioxidante de *Bixa orellana* ativa contra fungos e bactérias

No preparo e comercialização de alimentos, o objetivo é obter um produto de qualidade máxima que é preservado antes de alcançar o consumidor. A prática normal é adicionar substâncias que previnem a degradação (estabilizadores, antioxidantes), melhoram o sabor (adoçantes), aumenta a firmeza (espessantes, aglutinantes), mantenha a cor, ou ainda, antimicrobianos (Martínez-Tomé *et al.*, 2001).

Apesar do uso generalizado de antioxidantes, a oxidação lipídica ainda é a maior causa de deterioração da qualidade dos alimentos durante o armazenamento de óleos, gorduras e alimentos que contenham gordura. Os antioxidantes mais utilizados, BHA (butil hidroxianisol) (E-310), BHT (butil hidroxitolueno) (E-321) e galato de propila (E-310), são inibidores da quebra de cadeia na peroxidação lipídica. No entanto, BHA e BHT são um pouco voláteis e se decompõem facilmente em altas temperaturas (Martínez-Tomé *et al.*, 2001).

As sementes de *Bixa orellana* são uma fonte rica em pigmentos laranja-avermelhado extensamente utilizados na indústria de corantes alimentícios. Esse pigmento é comercialmente conhecido como urucum (Brasil) e *annatto* (no exterior). Atualmente, a ingestão diária de urucum está padronizada em 0-2,5 mg/kg de peso corpóreo para uma preparação contendo 2,6% de carotenóides expresso como percentagem de bixina (Júnior *et al.*, 2005).

Os extratos de *Bixa orellana* estão listados entre os corantes que podem ser usados isoladamente ou em combinação com aditivos como sais emulsificantes (citrato de sódio e fosfato dissódico), na indústria de cremes e manteiga e em certos alimentos como queijo, desenvolvendo uma cor marron-rosácea ou salmão durante a manufatura (Martínez-Tomé *et al.*, 2001).

O uso de condimentos, como *Bixa orellana*, por exemplo, em alimentos processados é uma alternativa promissora ao uso de antioxidantes sintéticos, especialmente pelo interesse crescente em aditivos alimentícios naturais e poderá ser tido como um alimento funcional de alta qualidade. Além disso, o conhecimento da composição química dessa planta permitirá a sua utilização como nutracêutico e em doenças que afetam a pele.

A presente seção tem o objetivo de investigar a atividade antioxidante do extrato aquoso total, de frações e substâncias isoladas a partir de caules, folhas e sementes de *Bixa orellana* e comparar o conteúdo flavonoídico (fenólicos) dessa planta tanto com a atividade antioxidante quanto com a atividade antimicrobiana.

Resultados e discussão

O extrato aquoso total de *Bixa orellana* foi submetido à precipitação por etanol como descrito na parte experimental desse trabalho. O conteúdo flavonoídico do sobrenadante, de outras frações e dos flavonóides isolados foi analisado por CLAE-AFD (Tabela 17 e Figuras 22 e 23). Os constituintes químicos foram identificados tentativamente pelos seus tempos de retenção (T_R) e espectros de UV baseados em dados publicados previamente na literatura por outros autores (Mabry *et al.*, 1970; Harborne, 1975). Os flavonóides citados anteriormente nos capítulos I e II, rutina e quercetina foram usados como padrões. Cinco picos correspondentes a flavonóides foram detectados para o sobrenadante de *Bixa orellana* e quatro a classes de substâncias desconhecidas. A partição em acetato de etila apresentou seis picos atribuíveis a flavonóides e um único pico a classe de substância desconhecida. A fração que apresentou atividade contra MRSA, F9 bioativa, mostrou sete picos atribuíveis a flavonóides e um único pico a classe de substância desconhecida (pico majoritário). O flavonóide *Bixa* 1 apresentou pico em T_R (min) 36,3 minutos.

Dados publicados na literatura mostram os máximos de absorbância em UV de algumas substâncias fenólicas previamente isoladas de *Bixa orellana*. Os derivados de apigenina (7-glicosídeo e 7-bissulfato) apresentam máximos

de absorvância em UV em 268, 335 e 269, 335 nm, respectivamente (Harborne, 1975). Enquanto as luteolinas 7-glicosídeo e 7-bissulfato mostram os seguintes máximos de absorvância em UV: 255, 268 e 353 nm; 257, 267 e 352 nm. A hipolaetina 7-bissulfato apresenta máximos de UV em 260, 271 e 360 nm (Harborne, 1975).

Nesse estudo as substâncias detectadas em T_R (min) 34,9 do sobrenadante, T_R (min) 34,4 da partição em acetato de etila, T_R (min) 32,5 da fração F9 bioativa, T_R (min) apresentaram máximos de absorvância em UV próximos daqueles da rutina, que é uma quercetina 3-*O*-glicosilada. Também foi possível assinalar os flavonóides em T_R (min) 40,4 da partição em acetato de etila como derivado da apigenina e em T_R (min) 35,4 da fração F9 bioativa como derivado da luteolina (Tabela 17).

A atividade antioxidante de *Bixa orellana* já foi testada por outros métodos de análise. Extratos aquosos e etanólicos *Bixa orellana* foram avaliados frente ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), usando como método um sistema enzimático de peroxidases e um outro baseado na estabilidade oxidativa de óleos refinados pelo método de Rancimat, mostrando atividade antioxidante significativa (Martínez-Tomé *et al.*, 2001). Em um trabalho apresentado por Júnior *et al.* (2005) a norbixina, um ácido dicarboxílico de carotenóide solúvel em água e presente como um componente do pericarpo dos frutos de *Bixa orellana* foi avaliada quanto ao seu efeito na resposta a danos provocados ao DNA de células de *Escherichia coli* induzidas pela

radiação UV, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (O^{·-}) e verificou-se que a norbixina protege as células bacterianas contra esses agentes. A norbixina aumentou a sobrevivência desses microrganismos em pelo menos 10 vezes.

A atividade antioxidante medida pelo método do DPPH nesse trabalho mostrou que o extrato aquoso total, o sobrenadante, a partição em acetato de etila, a fração que mostrou atividade contra MRSA F9 bioativa e o flavonóide *Bixa 1* possuem capacidade sequestradora de radicais livres significativa. A partição em acetato de etila apresentou a melhor atividade antioxidante em 100 µg/ml e 10 µg/ml seguido do flavonóide *Bixa 1* e da fração F9 bioativa, que revelaram melhor atividade antioxidante do que o BHT nessas concentrações.

Nesse estudo podemos observar pelo CLAE-AFD que as frações obtidas a partir do extrato aquoso total das folhas, caules e sementes de *Bixa orellana* são ricas em flavonóides, apresentam atividade antioxidante significativa e, além disso, atividade antimicrobiana.

O flavonóide *Bixa 1* isolado nesse estudo, apesar de apresentar atividade antioxidante significativa não apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos utilizados nesse estudo.

A fração que apresentou atividade contra MRSA F9 bioativa mostrou sete picos atribuíveis a flavonóides e um único pico majoritário a classe de

substância desconhecida. Esse pico majoritário em T_R (min) 9,7 constitui 62,5% (leitura em 252 nm) da amostra dessa fração.

Tabela 17. Parâmetros característicos de classes químicas e substâncias detectadas nas frações das folhas caules e sementes de *Bixa orellana* L. analisadas por CLAE-AFD

Amostras	Atividade antimicrobiana	Pico nº	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorvância em UV (nm)	Classes químicas/ substâncias detectadas
Sobrenadante de <i>Bixa orellana</i> L.	*Antifúngica (<i>Trichophyton rubrum</i>) **Antibacteriana (MRSA)	1	3,4	217, 267	Desconhecido
		2	4,6	217, 273	Desconhecido
		3	15,3	221, 271	Desconhecido
		4	25,7	223, 277	Desconhecido
		5	34,9	221, 261, 354	Flavonóide 3-O-glicosilado
		6	37,1	254, 364	Flavonóide
		7	37,8	219, 263, 354	Flavonóide
		8	39,7	225, 250, 362	Flavonóide
		9	40,6	221, 271, 339	Flavonóide
Partição em acetato de etila de <i>Bixa orellana</i> L.	*Antifúngica (<i>Candida albicans</i>)	1	6,0	219, 275	Desconhecido
		2	7,3	223, 277	Desconhecido
		3	12,1	221, 279	Desconhecido
		4	13,6	223, 273	Desconhecido
		5	24,3	221, 277	Desconhecido
		6	33,1	217, 263, 350	Flavonóide
		7	34,4	215, 261, 356	Flavonóide 3-O-glicosilado
		8	36,7	254, 364	Flavonóide
		9	37,5	219, 263, 352	Flavonóide
		10	38,9	219, 263, 354	Flavonóide
		11	40,4	219, 271, 335	Flavonóide
F9 bioativa	**Antibacteriana (MRSA)	1	9,7	217, 269	Desconhecido
		2	24,7	265, 348	Flavonóide
		3	31,1	263, 350	Flavonóide
		4	32,5	261, 354	Flavonóide 3-O-glicosilado
		5	34,2	254, 362	Flavonóide
		6	35,4	265, 352	Flavonóide
		7	38,7	271, 337	Flavonóide
		8	41,5	259, 348	Flavonóide
<i>Bixa</i> 1	Não ativo	1	36,3	219, 261, 346	Flavonóide

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura (Mabry *et al.*, 1970; Harborne, 1975). Para as condições cromatograficas veja figura 22.

* Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, 2005.

**Schmourlo & Mendonça-Filho *et al.*, submetido.

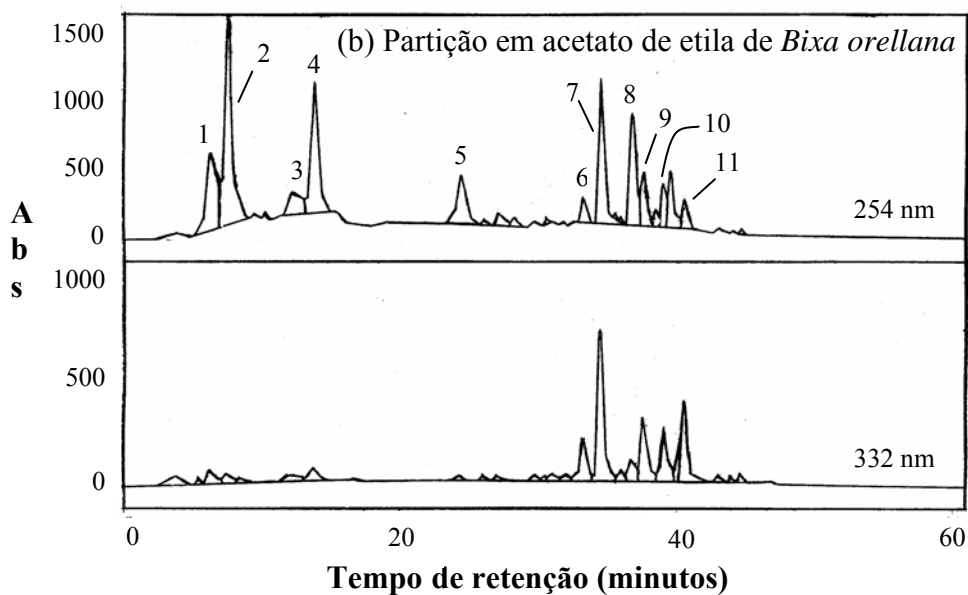
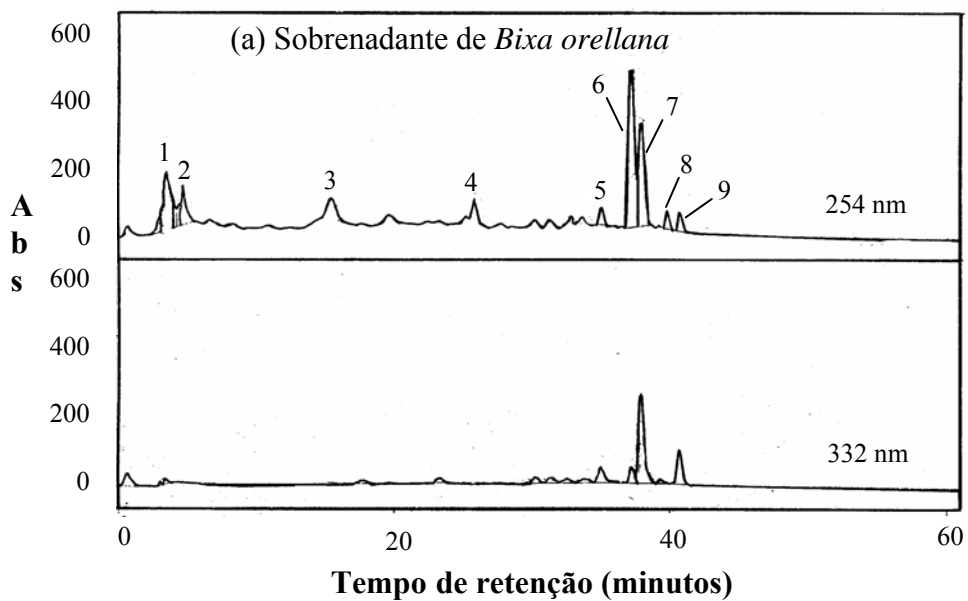


Figura 22. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos dos (a) sobrenadante de *Bixa orellana*, (b) partição em acetato de etila de *Bixa orellana* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase inversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 17.

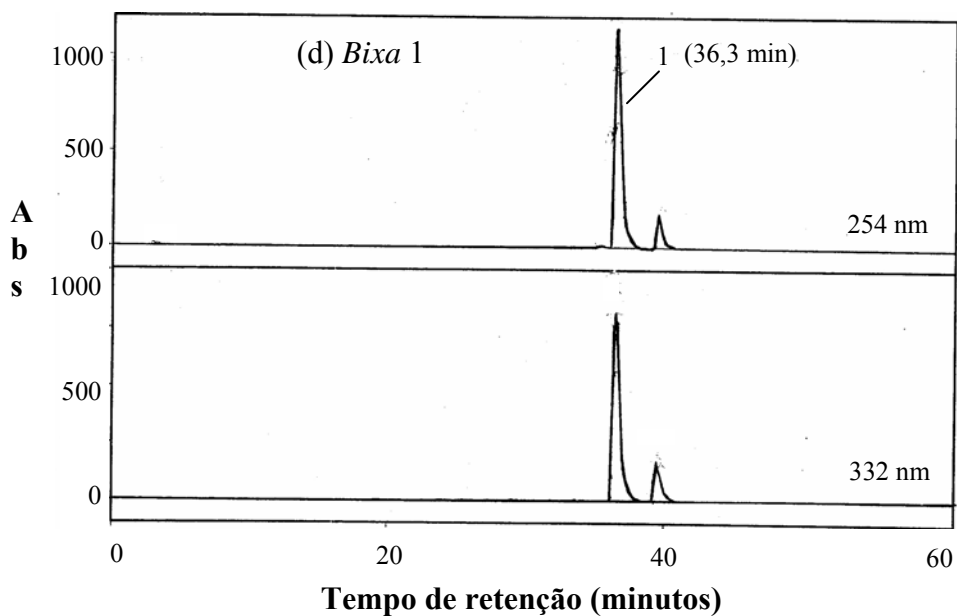
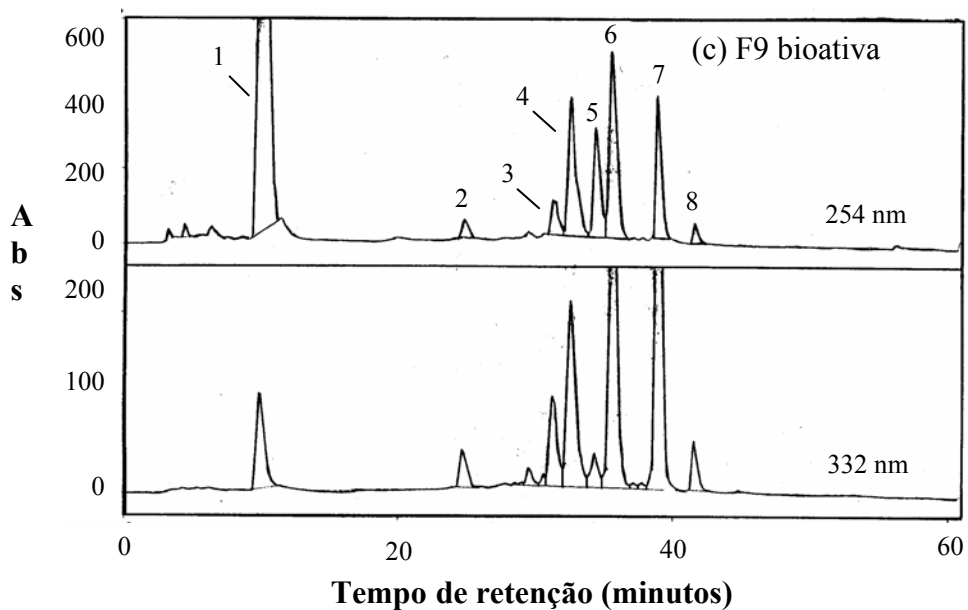


Figura 23. Cromatogramas de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtidos de (c) F9 bioativa e (d) *Bixa 1* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase inversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição foi realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 17.

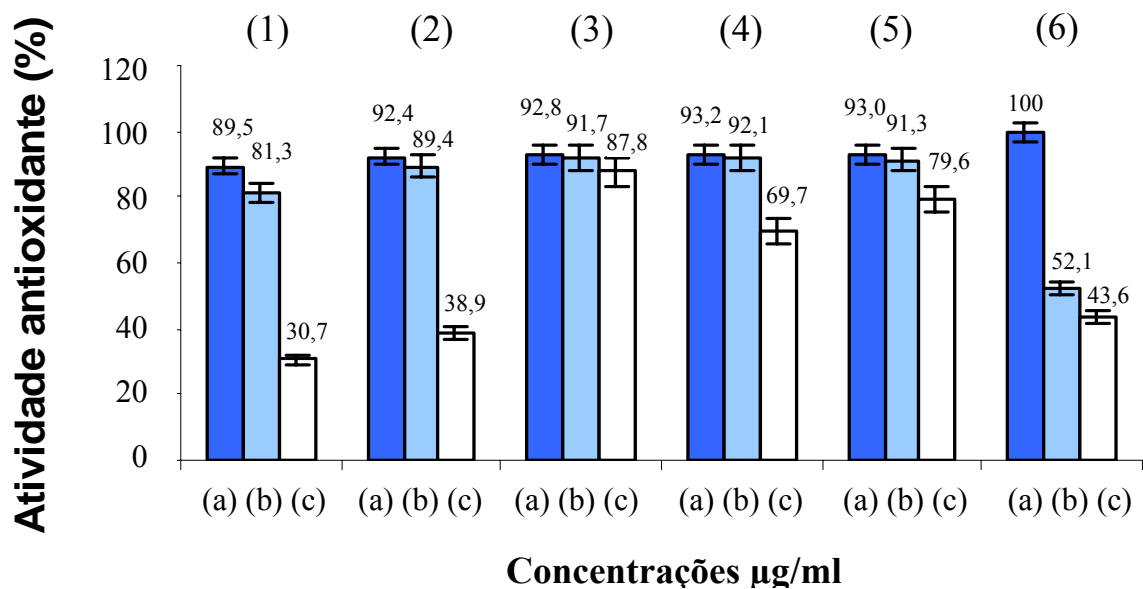


Gráfico 3 - Atividade sequestradora de radicais livres do (1) extrato aquoso de folhas, caules e sementes de *Bixa orellana*, (2) sobrenadante de *Bixa orellana*, (3) partição em acetato de etila de *Bixa orellana*, (4) F9 bioativa, (5) *Bixa 1* e (6) BHT [2,6-di-(terc-butil)-4-metilfenol] nas concentrações de (a) 1000 µg/ml, (b) 100 µg/ml e (c) 10 µg/ml pelo método do DPPH. Rutina, quercetina e ácido gálico foram usados como controle positivo (100%). Os valores são médias aritméticas (n=3)

Conclusões

- 1 – Podemos concluir, a partir dos dados obtidos por CLAE-AFD, que *Bixa orellana* apresenta na sua constituição química flavonóides 3-*O*-glicosilados no sobrenadante, partição em acetato de etila e F9 bioativa; derivado da apigenina na partição em acetato de etila e um derivado de luteolina na fração F9 bioativa.
- 2 – Tanto o extrato aquoso total quanto as frações de *Bixa orellana* apresentaram atividade antioxidante significativa pelo método do DPPH.
- 3 – O flavonóide *Bixa* 1, apesar de apresentar atividade antioxidante significativa, não apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos usados nesse estudo.

Seção II – Isolamento e elucidação estrutural dos flavonóides isolados de *Bixa orellana* L.

1. Elucidação estrutural de *Bixa* 1

A partir da fração butanólica do extrato aquoso de folhas, caules e sementes de *Bixa orellana* foi isolado o flavonóide codificado como *Bixa* 1. Cromatografias e precipitações sucessivas foram necessárias para a obtenção dessa substância (para maior detalhes ver parte experimental).

Portanto, a substância codificada como *Bixa* 1 (21,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelada, cujos valores de R_f estão mostrados na tabela 18, com características de flavonóide *O*-glicosilado.

Tabela 18. Dados cromatográficos para *Bixa* 1

Valor de R _f	Cor em 356 nm (UV#)
0,33 (BAW 8:1:1)	R
0,62 (BAW 3:1:1)	R

CCF: Cromatografia em camada fina.

Suporte placas de sílica gel 60 F254 em alumínio, Merck.

BAW 8:1:1, BuOH/AcOH/H₂O 8:1:1.

BAW 3:1:1, BuOH/AcOH/H₂O 3:1:1.

R, roxo.

A proposta estrutural para o flavonóide *Bixa* 1 foi baseada nos dados de RMN de ¹H e ¹³C, HMQC, HMBC e COSY obtidos em DMSO-*d*₆ (300 MHz).

Os dados obtidos para *Bixa* 1 revelaram tratar-se de uma flavona que apresenta a hipolaetina (8-hidroxiluteolina) como estrutura da aglicona. Possui uma unidade no carbono 8 de ácido glicurônico.

Espectro de UV

O flavonóide *Bixa* 1 foi diluído em água/metanol 50% numa concentração final de 2 µg/ml. A mostra foi analisada em varredura de 200 a 500 nm. Essa amostra foi submetida aos reagentes de deslocamento (Figura 24): NaOMe, NaOAc, NaOAc+H₃BO₄, AlCl₃ 5%, AlCl₃ 5% + HCl 10%.

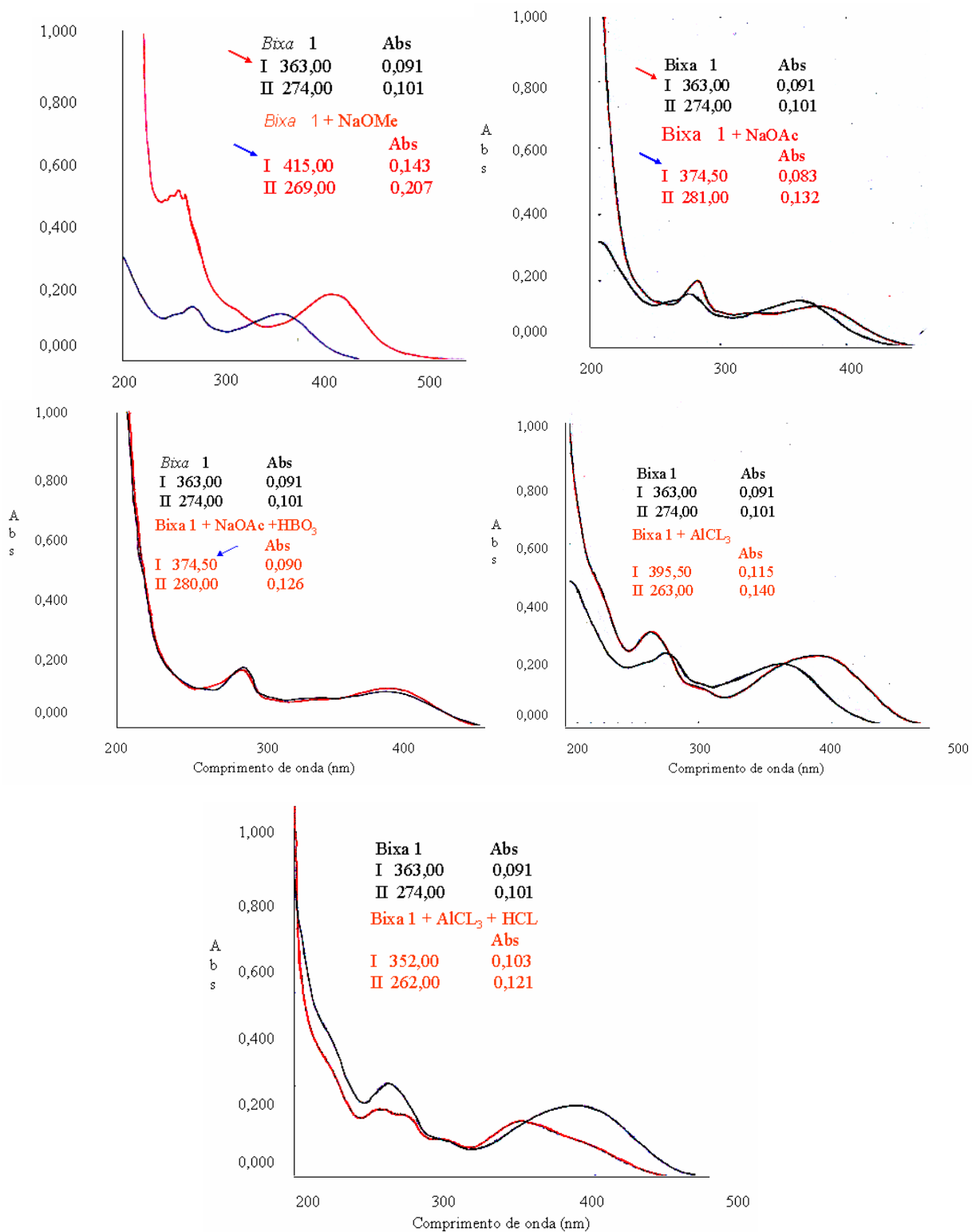


Figura 24. Deslocamentos em UV para o flavonóide *Bixa 1*.

RMN de ^1H

Foram observados seis sinais na região entre 6,20 e 12,95 ppm correspondentes a aglicona.

O sinal mais desprotegido do espectro 12,95 é do hidrogênio da hidroxila na posição 5. Os sinais referentes aos hidrogênios 6 e 3 situam-se em 6,20 e 6,60 ppm, respectivamente. Pela ausência de constante de acoplamento do H-6 com outros hidrogênios do anel A conclui-se que existem uma hidroxila no carbono 7 e um *O*-glicosídeo em C-8. Um único sinal de hidrogênio na posição 3 do anel C confirma que a aglicona é uma flavona.

Os sinais em 6,75; 7,35 e 7,97 ppm correspondem aos hidrogênios do anel B. A constante de acoplamento observada entre os hidrogênios H-5' (6,75 ppm) e H-6' (7,35 ppm) é aproximadamente 8,35 Hz confirmando um acoplamento *orto* desses hidrogênios e acoplamento em *meta* entre H-6' e H-2' (7,97 ppm).

Um sinal em 4,60 é atribuído ao hidrogênio anomérico ligado à aglicona. O sinal é um dubleto, cuja constante de acoplamento é 7,58 Hz e indica uma relação diaxial.

Portanto, a hipolaetina de *Bixa* 1 é monoglicosilada na posição 8. A unidade glicosídica corresponde ao ácido glicurônico.

A tabela 19 mostra os sinais listados no espectro de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$
(Espectros 1 - 3, pág. 167-169)

Tabela 19. Sinais listados no espectro e distinção entre os hidrogênios e as hidroxilas de *Bixa 1*.

<i>Bixa 1</i>	H	m	J(Hz)
Hipolaetina			
H-6	6,20	<i>s</i>	-
H-3	6,60	<i>s</i>	-
H-5`	6,75	<i>d</i>	8,35
H-6`	7,35	<i>dd</i>	8,35 e 1,65
H-2`	7,97	<i>d</i>	1,65
OH-5	12,95	<i>s</i>	-
<i>O</i> - β -glucuronídeo			
H-4``	3,25	-	-
H-5``	3,30	-	-
H-2``	3,39	<i>d</i>	8,0
H-3``	3,51	<i>d</i>	9,1
H-1``	4,60	<i>d</i>	7,58

RMN de ^{13}C

Vinte sinais foram listados no espectro, 15 foram atribuídos a aglicona e 5 a parte glicosídica da molécula.

Os sinais atribuídos à aglicona e ao carboidrato de *Bixa 1* puderam ser comparados com dados obtidos na literatura (Agrawal, 1989).

O deslocamento químico observado para o C-3 (103,3) sugere para essa estrutura um esqueleto básico de flavona, pois o deslocamento característico em C-3 de um flavonol é superior a 130 ppm. A confirmação para essa proposta estrutural foi obtida no espectro de HMQC.

Os sinais atribuídos a parte glicosídica de *Bixa 1* sugerem a presença de uma hexose (Tabela 20, espectros 4-5, pág. 170 e 171).

Tabela 20. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) de *Bixa 1* e de amostra relatada na literatura (Agrawal, 1989).

^{13}C	<i>Bixa 1</i> (δC) (DMSO- d_6)	Literatura (δC) (DMSO- d_6)
Hipolaetina		
2	165,5	164,1
3	103,3	107,0
4	181,9	181,8
5	157,9	157,4
6	99,8	99,5
7	158,7	158,8
8	126,5	125,9
9	149,9	149,7
10	103,3 (HMBC)	103,0
1'	122,1	121,9
2'	114,7	113,8
3'	147,1	145,8
4'	150,2	150,0
5'	116,1	116,2
6'	118,9	120,1
<i>O</i> - β -glucuronídeo		
1''	107,7	104,6
2''	74,7	73,7
3''	76,9	76,7
4''	76,1	76,3
5''	72,3	72,4
6''	172,2	175,7

COSY (^1H - ^1H)

Todas as correlações entre os hidrogênios da aglicona foram observadas através dessa técnica.

O COSY (^1H - ^1H) possibilitou estabelecer as correlações dos hidrogênios da unidade glicosídica (Tabela 21).

Tabela 21. Correlação ^1H - ^1H de *Bixa 1*

<i>Bixa 1</i>	^1H δH (ppm)	^1H δH (ppm)
Hipolaetina		
H-6' \longrightarrow H-5'	7,35	6,60
H-5'/H-6' \longrightarrow H-2'	6,60/7,37	7,96
<i>O</i> - β -glucuronídeo		
H-1'' \longrightarrow H-2''	4,60	3,39
H-2'' \longrightarrow H-3''	3,39	3,51
H-3'' \longrightarrow H-4''	3,51	3,25
H-5''	Não foi possível verificar correlação ^1H - ^1H para H _{5''}	

Pelo COSY ^1H - ^1H foi possível determinar a correlação entre os hidrogênios H-3'' e H-4'' do ácido glicurônico apesar da ausência de sinais no espectro de hidrogênio em δ 3,25 ppm (H-4'') (Espectros 6 e 7; pág. 172 e 173).

HMQC

Os dados de correlação direta carbono-hidrogênio para *Bixa 1* estão na tabela 22 (Espectro 8, pág. 174).

Tabela 22. Sinais de correlações direta C-H de *Bixa 1*.

<i>Bixa 1</i>	$^{13}\text{C}/\delta\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}/\delta\text{H}$ (ppm)
Hipolaetina		
H-3	103,3	6,60
H-6	99,8	6,20
H-2'	114,7	7,97
H-5'	116,1	6,75
H-6'	118,9	7,35
<i>O</i> - β -glucuronídeo		
H-1''	107,7	4,60
H-2''	74,7	3,39
H-3''	76,9	3,51
H-4''	76,1	3,25
H-5''	72,3	3,30

Pelo HMQC pode se verificar a correlação entre o hidrogênio em δ 3,25 ppm (H-4'') com o carbono em δ 76,1 ppm (C-4'') e também a correlação entre o hidrogênio em δ 3,30 ppm (H-5'') com o carbono em δ 72,3 ppm (H-5'') apesar da ausência de sinais no espectro de RMN de ^1H e δ 3,25 e 3,30

ppm, o que faz sentido pois o C-5'' do ácido glicurônico é mais protegido pelo efeito indutivo da carbonila.

HMBC

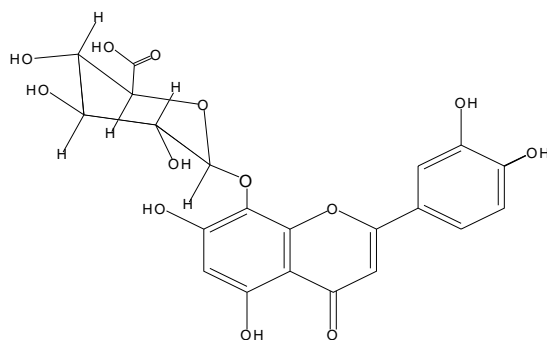
Através da correlação hidrogênio-carbono a longa distância (Tabela 23; Espectros 9 e 10, pág. 175 e 176) pode-se constatar que o hidrogênio anomérico do ácido glicurônico correlaciona-se com o carbono 8 da genina (Espectro 9, pág. 175).

Podemos afirmar que o núcleo glucosídico está ligado a aglicona pela posição 8 através dos espectros obtidos em comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989).

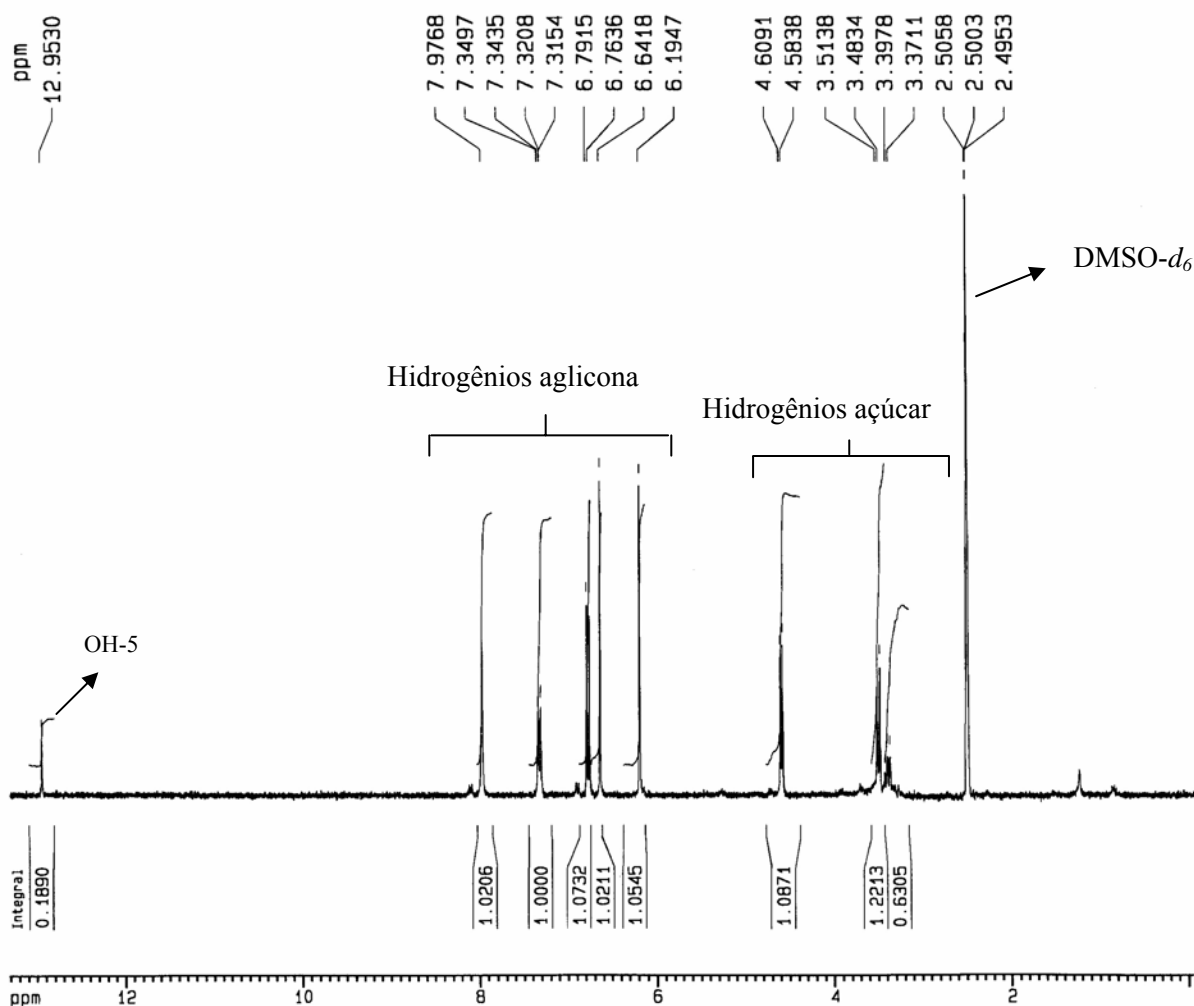
Tabela 23. Sinais de correlações a longa distância C-H de *Bixa 1*.

<i>Bixa 1</i>	¹ H δ H(ppm)	¹³ C δ C(ppm)
Hipolaetina		
H-6 → C(10; 1''; 8; 5 e 7)	6,20	103,3; 107,7; 126,5; 157,9 e 158,7
H-3 → C(10; 1''; 1'; 2 e 4)	6,60	103,3; 107,7; 122,1; 165,5 e 181,9
H-5' → C(1'; 3' e 4')	6,75	122,1; 147,1 e 150,2
H-6' → C(5'; 4' e 2)	7,35	116,1; 150,2 e 165,5
H-2' → C(2'; 6'; 3'; 4' e 2)	7,97	114,7; 118,9; 147,1; 150,2 e 165,5
<i>O</i> -β-glucuronídeo		
H-4'' → C(5'')	3,25	72,3
H-5''	3,30	-----
H-2'' → C(1''; 6''; 4'' e 3'')	3,39	107,7; 172,2; 76,1 e 76,9
H-3'' → C(1''; 6''; 5'' e 2'')	3,51	107,7; 172,2; 72,3 e 74,7
H-1'' → C(8; 9; 7 e 4'')	4,60	126,5; 149,9; 157,9 e 76,1

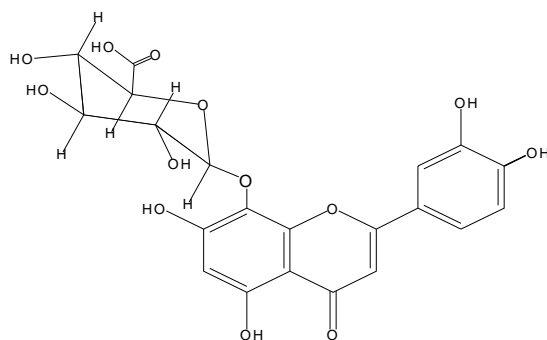
Pelos dados mostrados anteriormente, conclui-se que *Bixa 1* é a hipolaetina ácido 8-*O*-β-glucuronídeo. Não existem relatos sobre essa substância na literatura, portanto é a primeira vez que foi isolada de uma espécie vegetal.



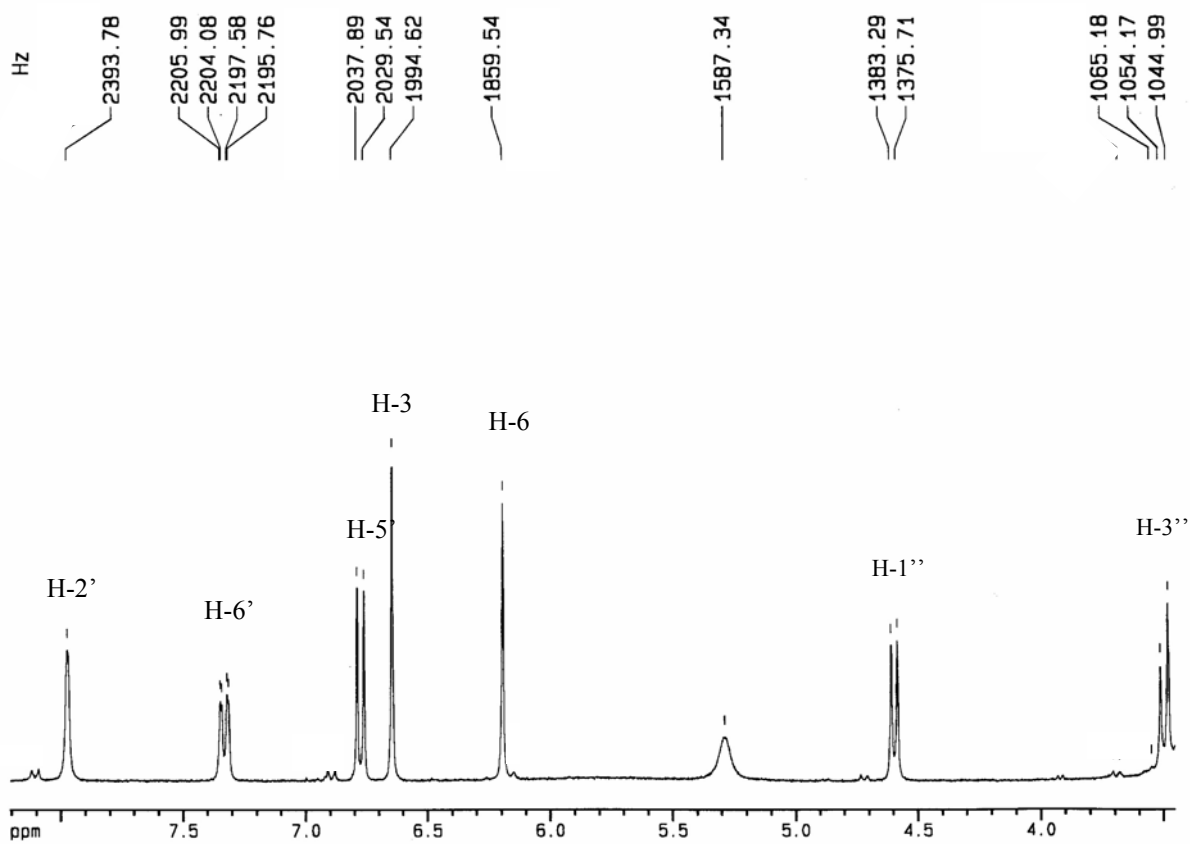
Hipolaetina 8-O- β -glucuronídeo (I)



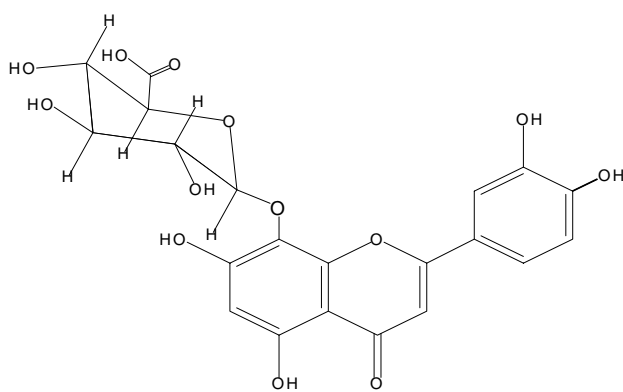
Espectro 1. RMN de ^1H em DMSO- d_6 de *Bixa 1*



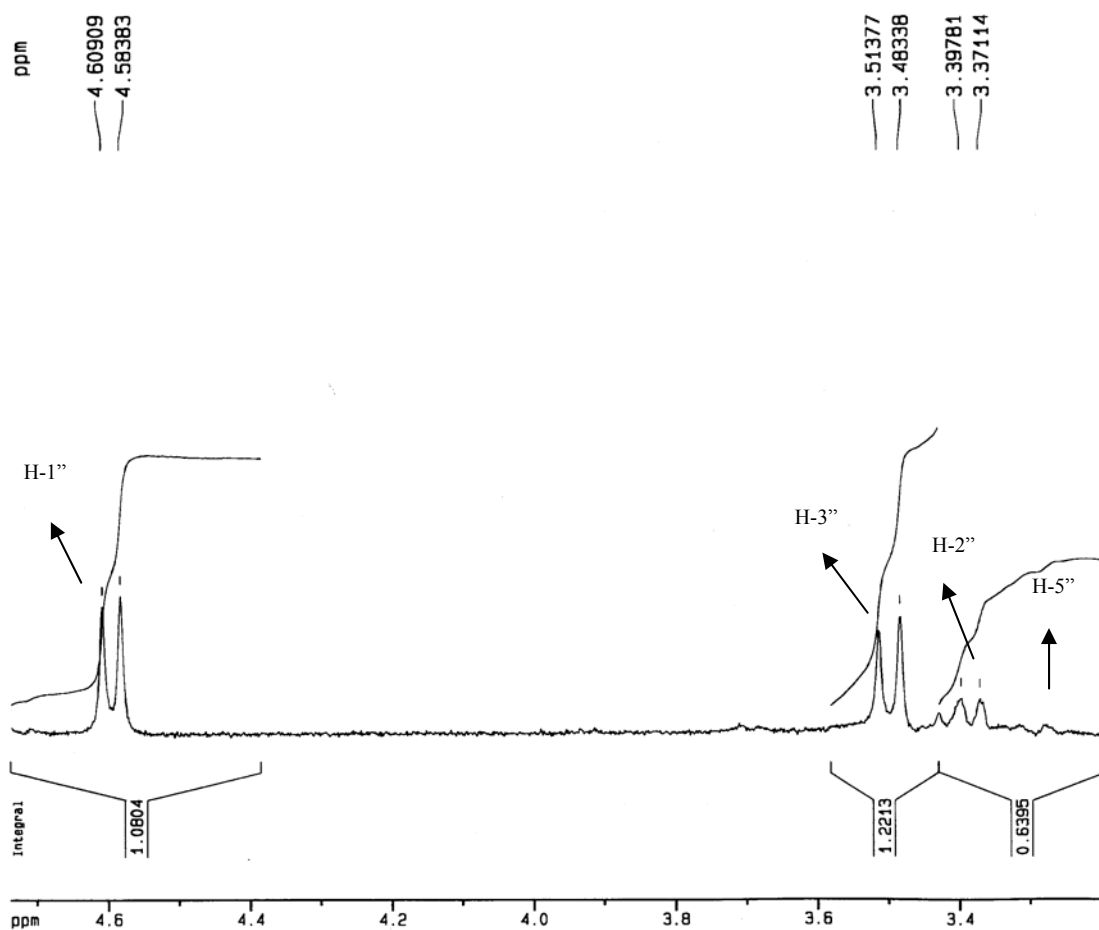
Hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (I)



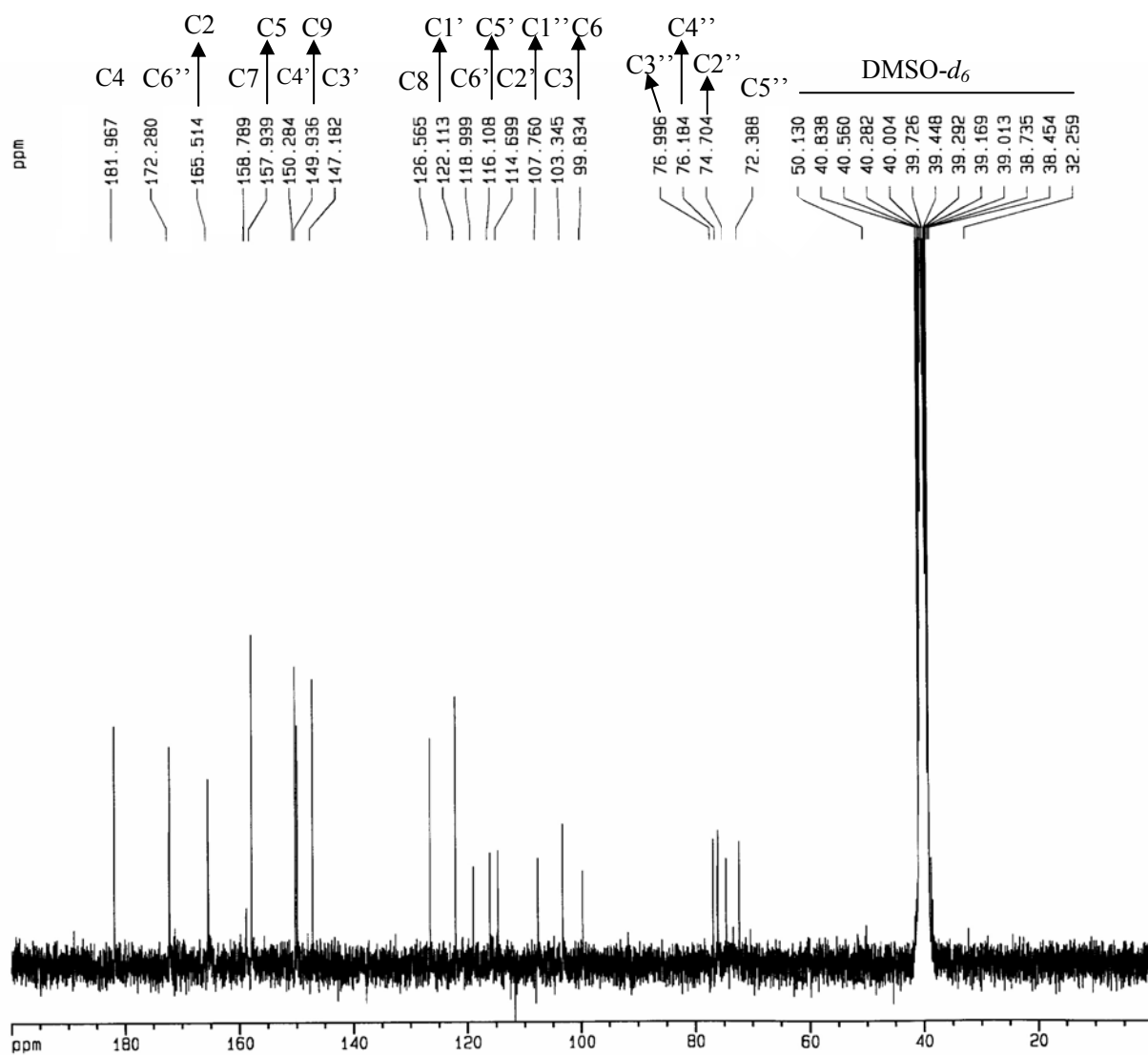
Espectro 2. RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de *Bixa* 1



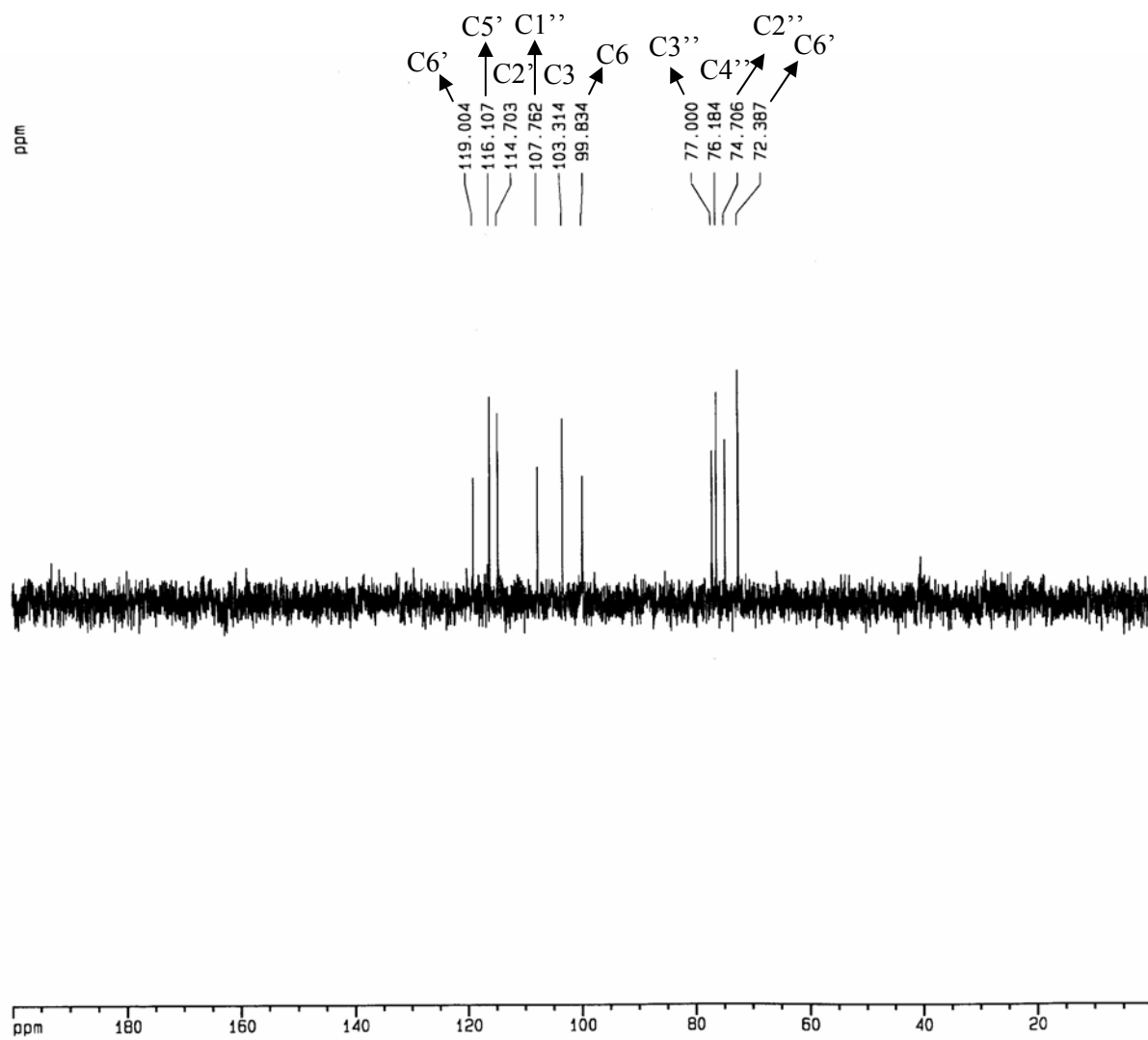
Hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (I)



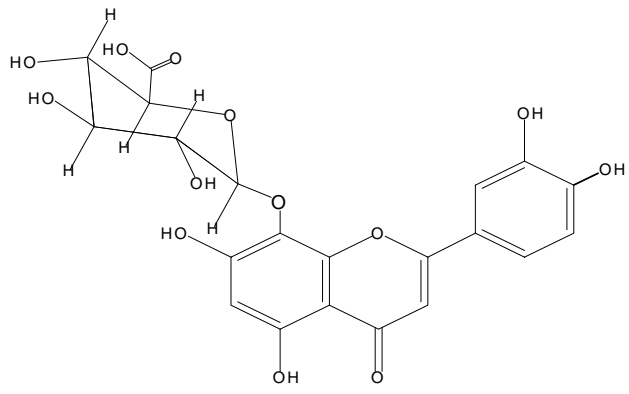
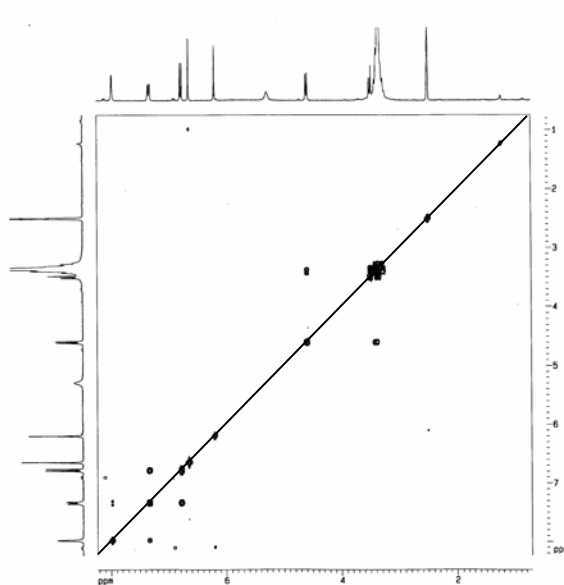
Espectro 3. RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de *Bixa* 1



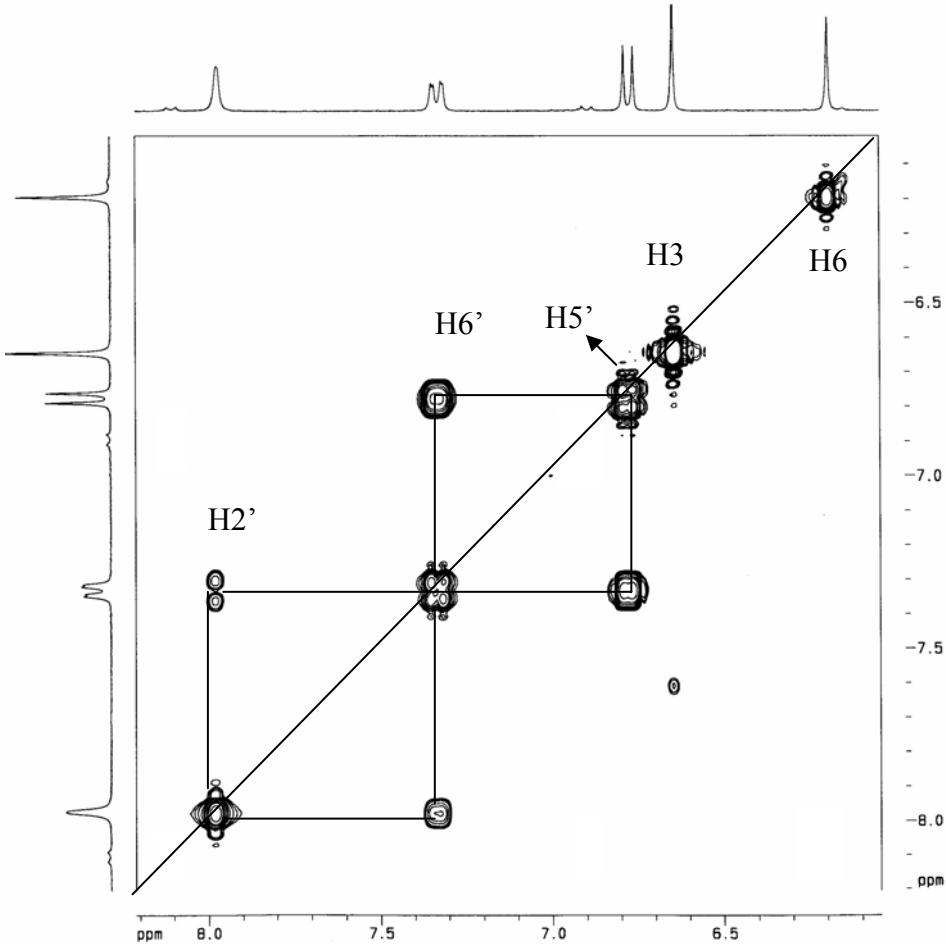
Espectro 4. RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 de *Bixa 1*



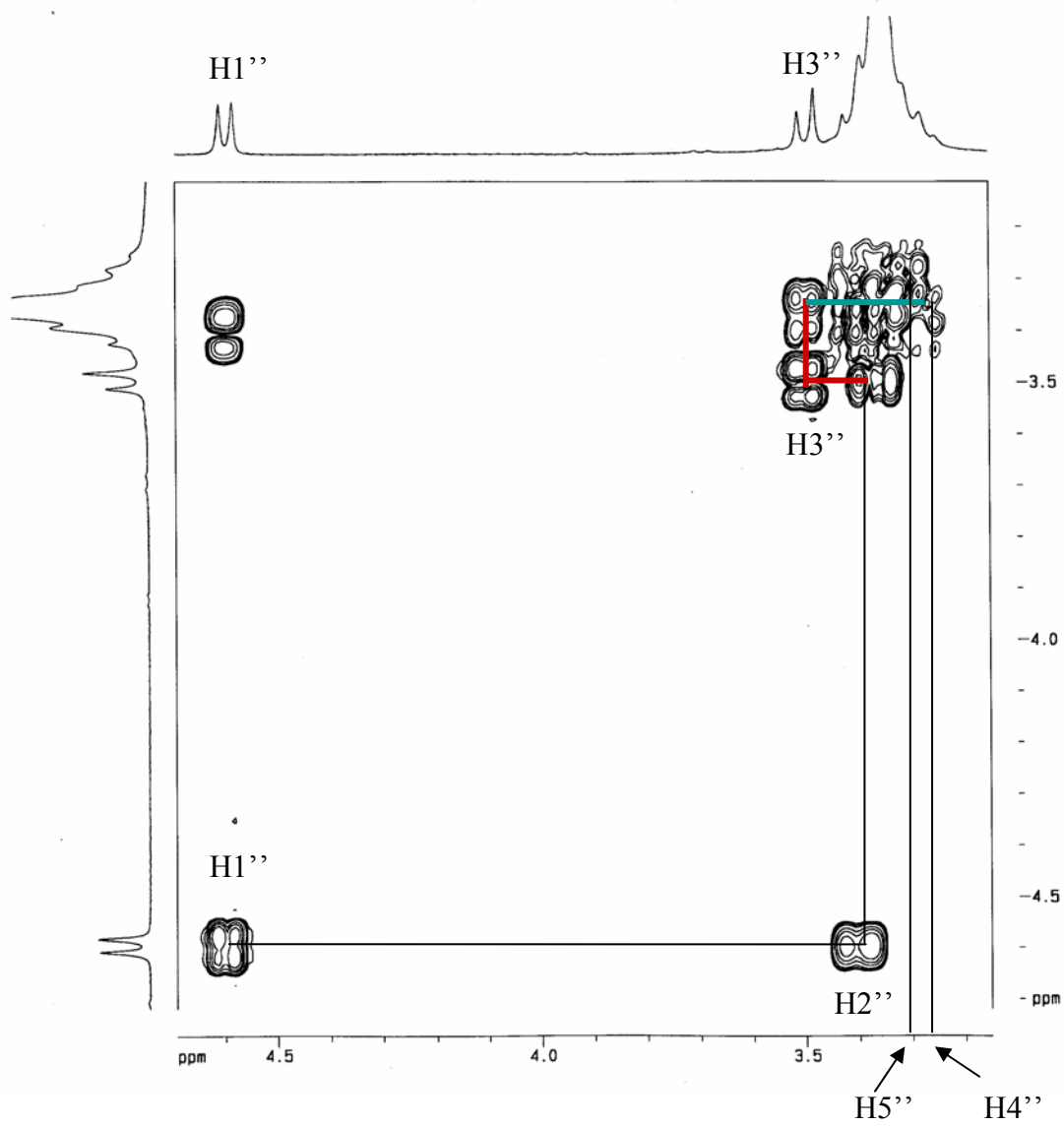
Espectro 5. DEPT-135 em DMSO- d_6 de *Bixa 1*



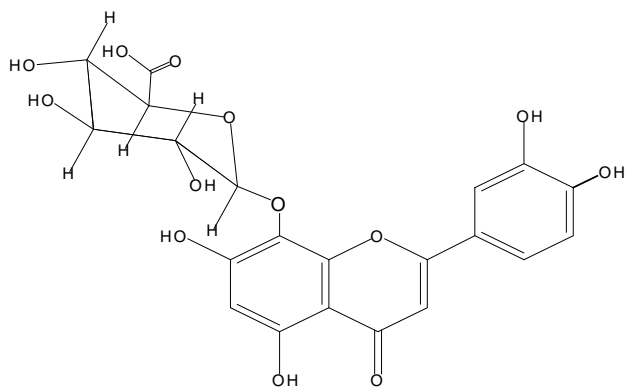
Hipolaetina 8-O-β-glucuronideo (I)



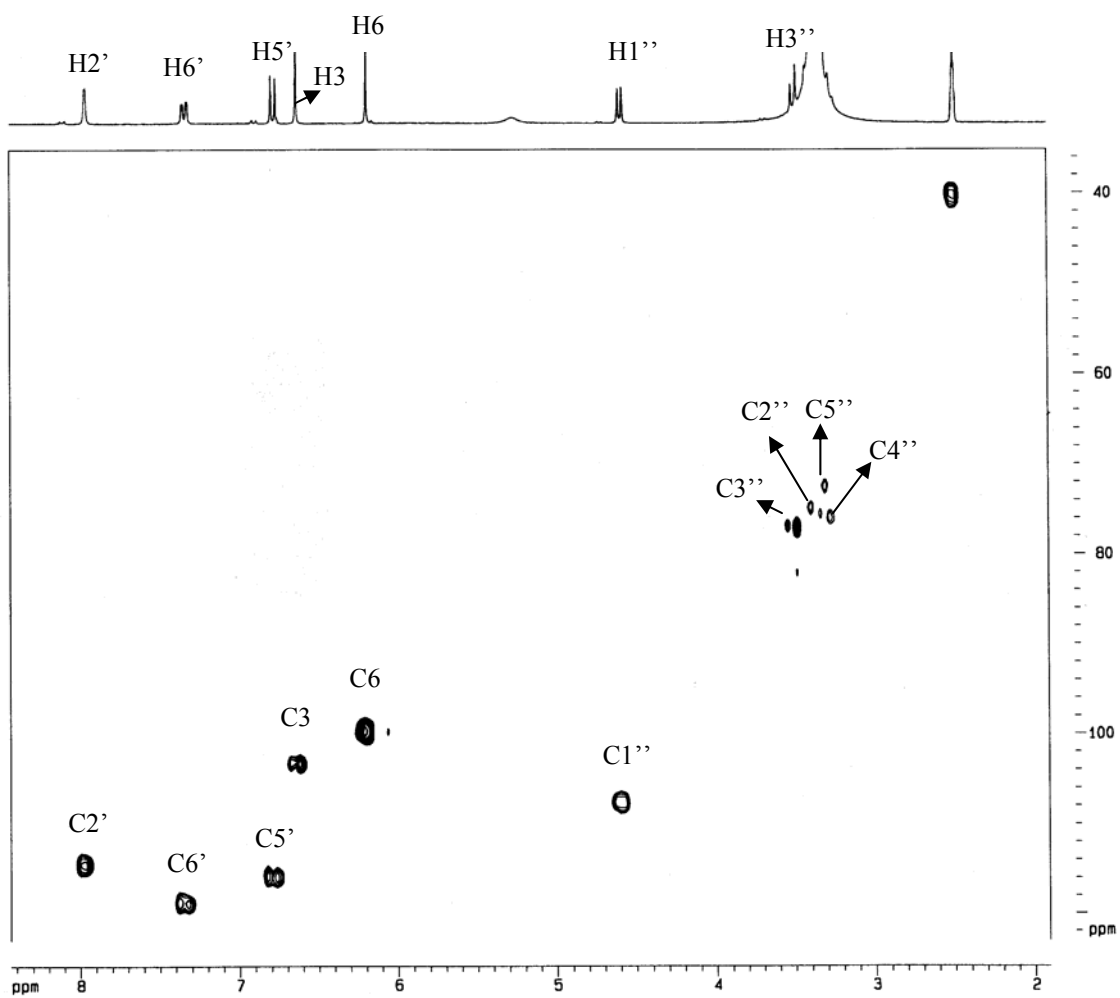
Espectro 6. COSY (^1H - ^1H) de *Bixa* 1



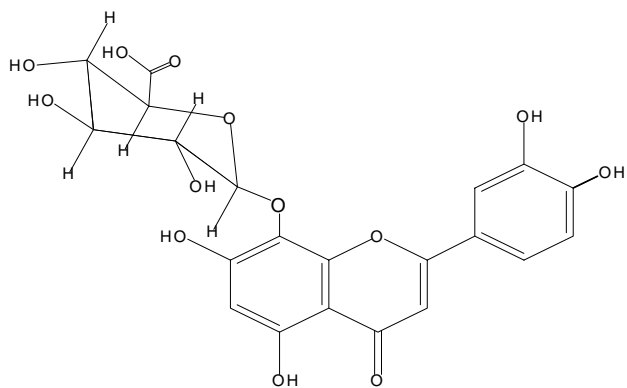
Espectro 7. COSY (^1H - ^1H) da parte glucosídica de *Bixa* 1



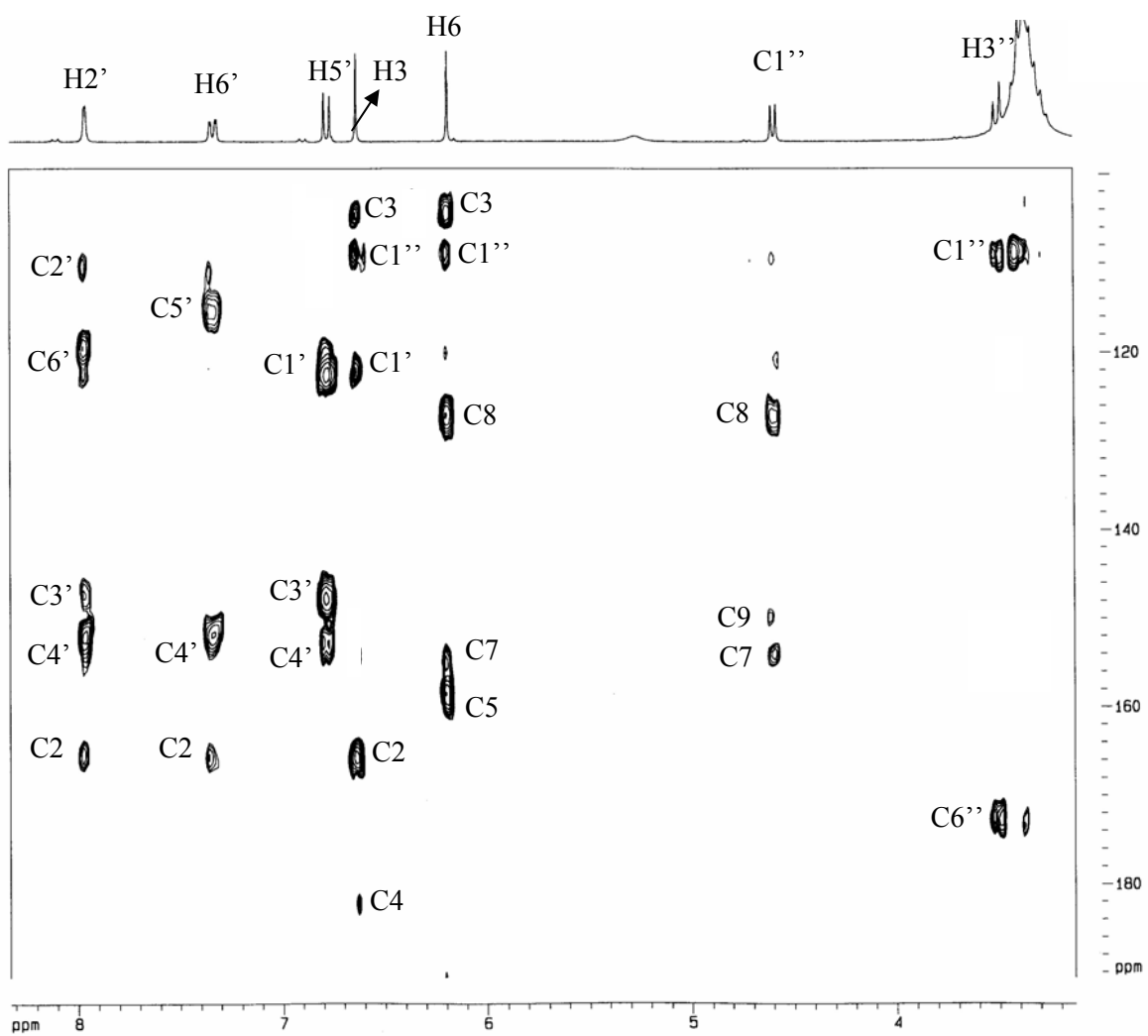
Hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (I)



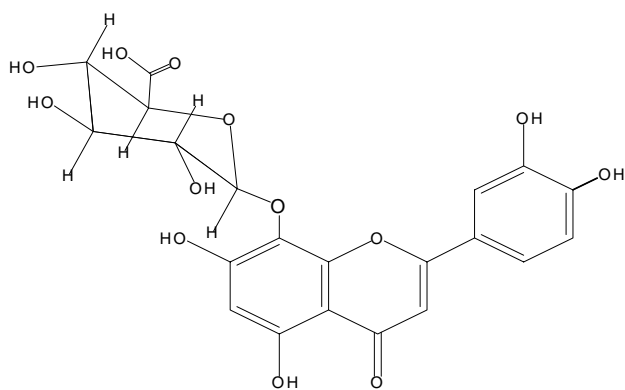
Espectro 8. HMQC de *Bixa* 1



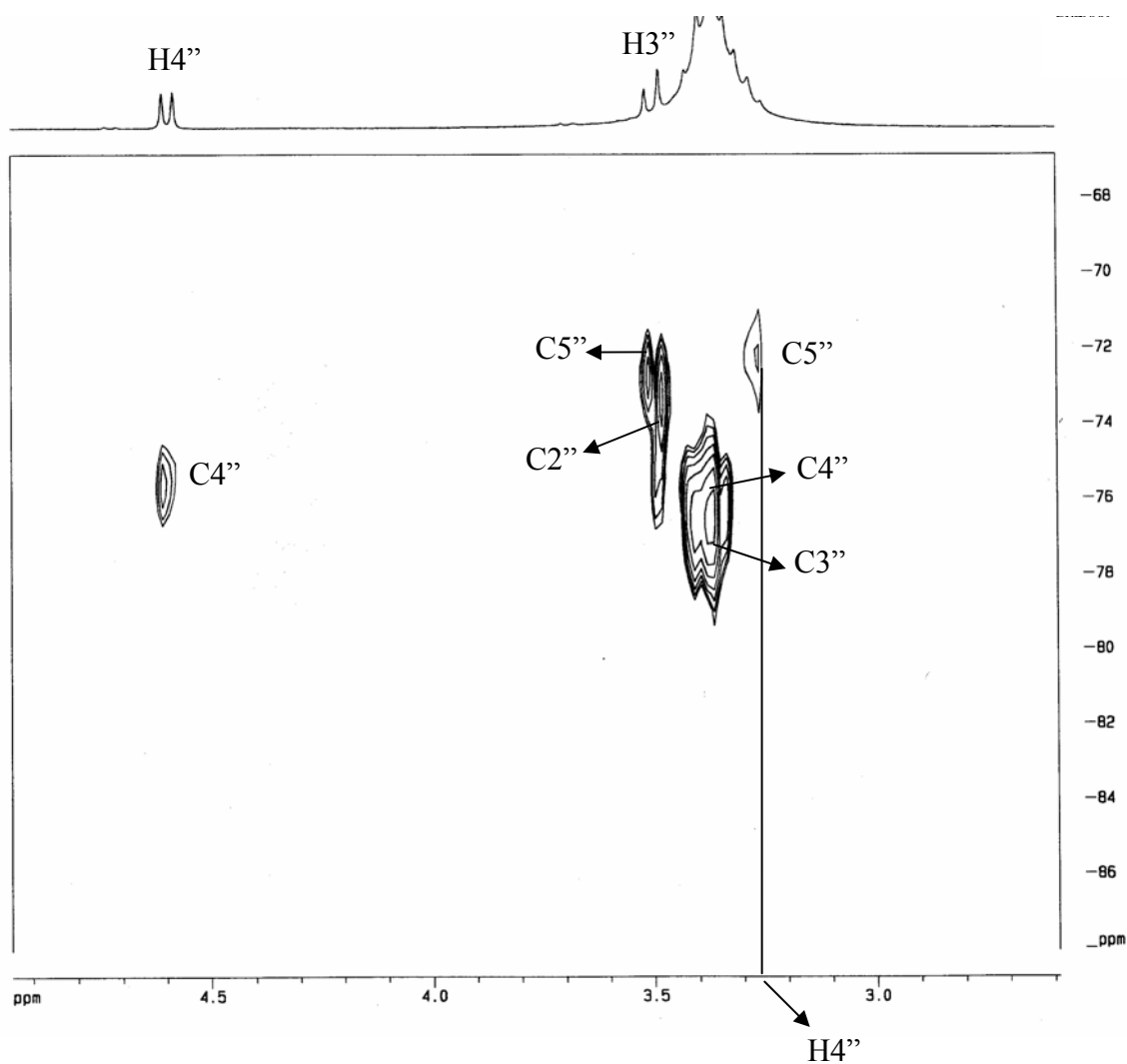
Hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo (**I**)



Espectro 9. HMBC de *Bixa* 1



Hippolactina 8-O- β -glucuronide (I)



Espectro 10. HMBC da parte glucosídica de *Bixa* 1

2. Elucidação estrutural de *Bixa 2*

A substância codificada como *Bixa 2* (7 mg), cujos valores de R_f estão mostrados na tabela 24, apresentou características de flavonóide *O*-glicosilado.

Tabela 24. Dados cromatográficos para *Bixa 2*

Valor de R_f	Cor em 356 nm (UV#)
0,70 (BAW 8:1:1)	R alaranjado
0,76 (BAW 3:1:1)	R alaranjado

CCF: Cromatografia em camada fina.

Suporte placas de sílica gel 60 F254 em alumínio, Merck.

BAW 8:1:1, BuOH/AcOH/H₂O 8:1:1.

BAW 3:1:1, BuOH/AcOH/H₂O 3:1:1.

R, roxo.

A proposta estrutural para o flavonóide *Bixa 2* foi baseada nos dados de RMN de ¹H e ¹³C, HMQC, HMBC e COSY obtidos em DMSO-*d*₆ (300 MHz).

CLAE – AFD para o flavonóide *Bixa 2*

Área do pico: 95%

Tabela 25: Parâmetro detectado para o flavonóide *Bixa 2* isolado a partir das folhas caules e sementes de *Bixa orellana* L. analisadas por CLAE-AFD

Amostra	Pico n°	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorvância em UV (nm)	Classe química/substância detectada
<i>Bixa 2</i>	1	32,8	204, 261, 356	Flavonóide 3- <i>O</i> -glicosilado

Os máximos de absorvância de UV foram comparados com dados encontrados na literatura (Mabry *et al.*, 1970).

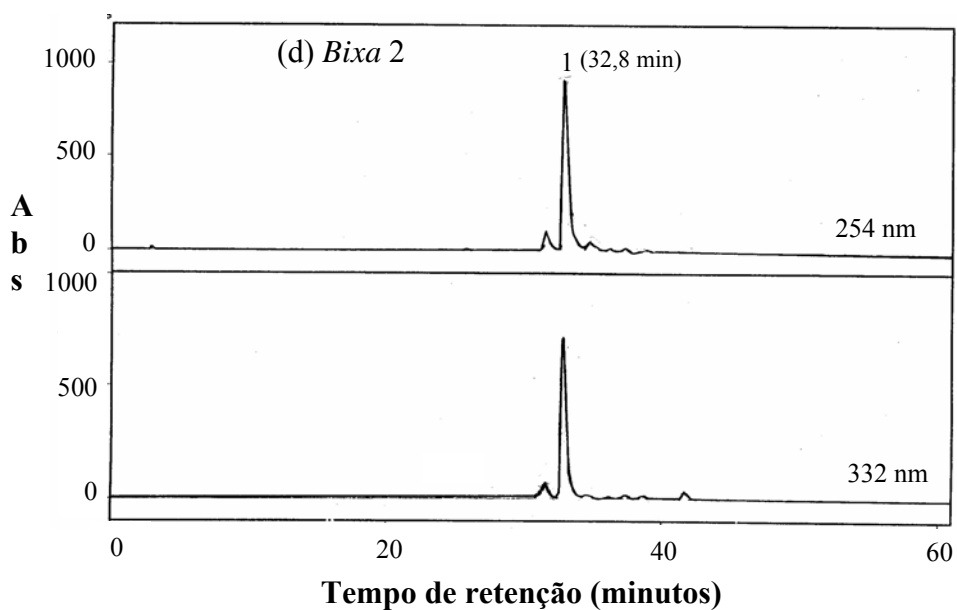


Figura 25. Cromatograma de CLAE (Abs/Tempo, minutos) obtido de *Bixa 2* detecção por AFD em 254 nm e 332 nm. Condições cromatográficas: Coluna C₁₈ de sílica de fase inversa - Lichrosorb, partícula 5 µm, 4.6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µl (40 µg de cada amostra), a eluição for realizada com uma mistura de 0,01% ácido orto-fosfórico em água/metanol em gradiente 70:30 até os 20 minutos e em seguida 60:40 por 40 minutos. Ver identificação dos picos na tabela 25.

RMN de ^1H

Foram observados cinco sinais na região entre 6,17 e 12,30 ppm correspondentes a aglicona de um flavonóide.

O sinal mais desprotegido do espectro (12,30 ppm) sugere a presença de uma hidroxila na posição 5 (anel A), em ponte com uma carbonila na posição 4 do anel C.

Os sinais em 6,85 e 7,57 ppm foram atribuídos aos hidrogênios do anel B. O multiplete observado em 7,57 ppm corresponde aos hidrogênios da posição H-2' e H-6', característicos para um flavonóide diidroxilado no anel B (Mabry *et al.*, 1970). A constante de acoplamento observada para H-5' (6,85 ppm) foi de 9,0 Hz confirmando um acoplamento do tipo *orto* desse hidrogênio com o H-6' (7,57 ppm).

Os sinais em 6,17 e 6,38 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. A constante de acoplamento observada ($J = 1,5$ Hz) sugere um acoplamento do tipo *meta*, comum para estes hidrogênios.

Pode-se concluir, então, a existência de uma substituição no carbono 7.

Um sinal em 5,46 ppm foi atribuído ao hidrogênio anomérico ligado à aglicona. O sinal apresentava-se sobre a forma de um dublete, cuja constante de acoplamento é 7,1 Hz, indicando uma relação diaxial com o hidrogênio da posição 2 do açúcar.

Os demais sinais de hidrogênio observados no espectro (faixa entre 3,00 e 3,60 ppm) foram atribuídos ao açúcar.

Como nenhum hidrogênio foi atribuído ao carbono 3 da aglicona pode-se sugerir como esqueleto básico um flavonol (quercetina).

A tabela 26 mostra os sinais listados nos espectros de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (Espectros 11 e 12, pág. 186 e 187).

Tabela 26. Sinais listados no espectro e distinção entre os hidrogênios e as hidroxilas de *Bixa 2*

<i>Bixa 2</i>	H	m	J(Hz)
Quercetina			
H ₆	6,17	<i>d</i>	1,82
H ₈	6,38	<i>d</i>	1,82
H _{5'}	6,85	<i>d</i>	9,0
H _{2'} e H _{6'}	7,57	<i>m</i>	-
OH ₅	12,30	<i>s</i>	-
Açúcar			
H _{3''} e H _{4''}	3,07	<i>m</i>	-
H _{2''}	3,21	<i>m</i>	-
H _{5'' a}	3,23	<i>m</i>	-
H _{5'' b}	3,58	<i>d</i>	11,7
H _{1''}	5,46	<i>d</i>	7,1

H_{5'' a} e H_{5'' b} são hidrogênios geminais

RMN de ^{13}C

Os sinais de RMN de ^{13}C foram obtidos a partir das correlações diretas (HMQC) e a longa distância (HMBC) tanto para a aglicona quanto para a porção glicosídica da molécula.

Os sinais atribuídos á aglicona e ao açúcar de *Bixa 2* puderam ser comparados com dados obtidos na literatura e publicados para a quercetina 3-*O*- β -xilopiranosose por Haribal e Renwick, em 1998 isolada de outra espécie vegetal (Tabela 27).

Tabela 27. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) de *Bixa 2* e comparação com dados obtidos na literatura (Haribal e Renwick, 1998).

^{13}C	<i>Bixa 2</i> (δC)*	Literatura (δC)**
Quercetina		
2	-	158,5
3	-	135,3
4	-	179,8
5	162,0	160,0
6	99,9	99,9
7	166,0	166,0
8	94,0	94,7
9	158,0	158,3
10	104,0	105,5
1'	122,0	123,1
2'	116,0	116,2
3'	146,0	146,1
4'	149,0	149,9
5'	115,0	117,5
6'	123,0	123,5
Açúcar		
1''	102,0	105,8
2''	75,0	74,9
3''	70,0	71,1
4''	77,0	77,0
5''	61,0	66,5

* $\text{DMSO-}d_6$; ** CD_3OD , Haribal e Renwick, 1998.

A similaridade observada nos dados espectrais sugere que *Bixa 2* apresenta um esqueleto parecido com a quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo.

COSY (^1H - ^1H)

Quase todas as correlações entre os hidrogênios da aglicona foram observadas através dessa técnica (Espectros 13 e 14, pág. 188 e 189).

O COSY (^1H - ^1H) possibilitou estabelecer as correlações dos hidrogênios da unidade glicosídica (Tabela 28).

Tabela 28. Correlação ^1H - ^1H de *Bixa 2*

<i>Bixa 2</i>	^1H δH (ppm)	^1H δH (ppm)
Quercetina		
H-6'/H-2' \longrightarrow H-5'	7,57	6,85
H-8 \longrightarrow H-6'	6,38	6,17
<i>O</i> - β -Xilopirranose		
H-1'' \longrightarrow H-2''	5,46	3,21
H-2'' \longrightarrow H-3''	3,21	3,07
H-3'' \longrightarrow H-4''	Não foi possível verificar correlação ^1H - ^1H entre H-3'' e H-4'', pois estes sinais estão se sobrepondo	
H-4'' \longrightarrow H-5''a	3,07	3,23
H-5'' a \longrightarrow H-5''b	3,23	3,58

Pelo COSY ^1H - ^1H determinou-se a correlação entre os hidrogênios H-5''a e H-5''b do açúcar. A constante de acoplamento em 11,7 Hz de H-5''b possibilitou verificar que esses hidrogênios são geminais (Espectro 12).

HMQC

Os dados de correlação direta carbono-hidrogênio para *Bixa 2* estão na tabela 29 (Espectro 15, pág. 190).

Tabela 29. Sinais de correlações direta C-H de *Bixa 2*.

<i>Bixa 2</i>	$^{13}\text{C}/\delta\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}/\delta\text{H}$ (ppm)
Quercetina		
H-6	99,9	6,17
H-8	94,0	6,38
H-2'	116,0	7,57
H-5'	115,0	6,85
H-6'	123,0	7,57
3-O- β -Xilopiranosose		
H-1''	102,0	5,46
H-2''	75,0	3,21
H-3''	70,0	3,07
H-4''	78,0	3,07
H-5''a , H-5''b	61,0	3,23 e 3,58

Pelo HMQC pode se verificar que existem dois carbonos se correlacionando com os hidrogênios cujo deslocamento químico é 3,07 ppm. Pode-se também verificar dois sinais de carbono em um único deslocamento (61,0 ppm) se correlacionado com os hidrogênios H-5''a e H-5''b.

HMBC

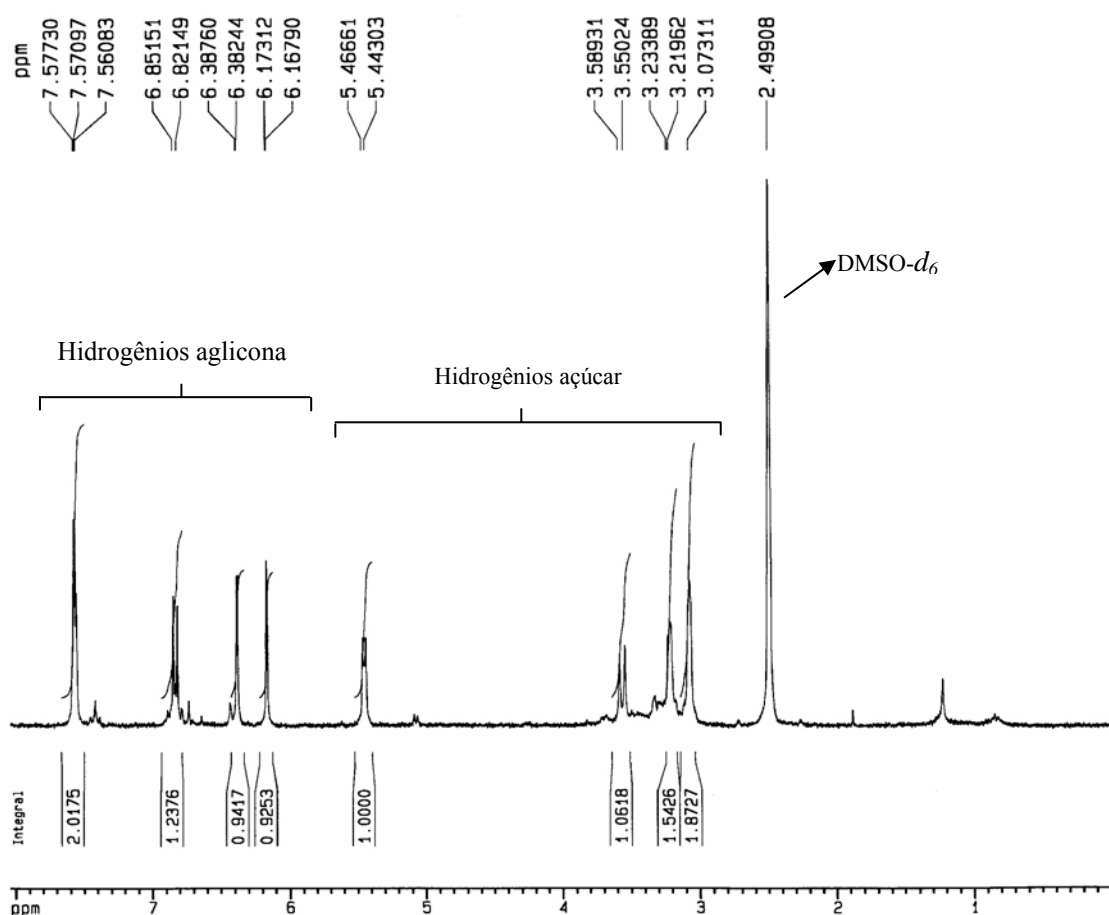
As correlações a longa distância estão sumarizadas na tabela 30 (Espectros 16 e 17, pág. 191 e 192).

Tabela 32. Sinais de correlações a longa distância C-H de *Bixa 2*.

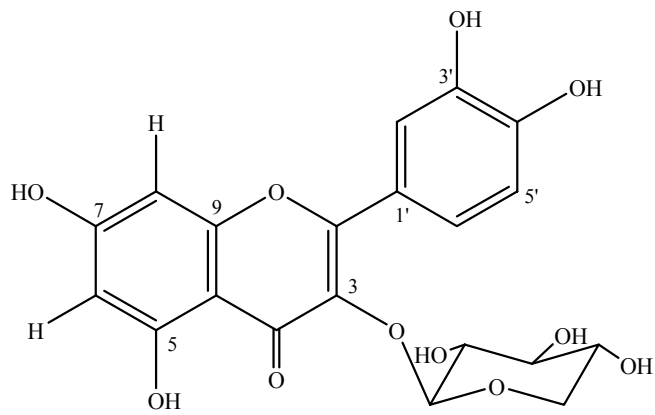
<i>Bixa 1</i>	¹ H δ H (ppm)	¹³ C δ C(ppm)
Quercetina		
H-6 → C(8; 10 e 5)	6,17	94,0; 104 e 162,0
H-8 → C(10; 9 e 7)	6,38	104,0; 158,0 e 166,0
H-5' → C(1' e 3')	6,85	122,0; 146,0
H-2' e H6' → C(2'; 6'; 3' e 4')	7,57	116,0; 123,0; 146,0 e 149,0
β-Xilopiranoze		
H-2'' → C(4'')	3,21	77,0

Pelos dados mostrados anteriormente a glicosilação poderia estar em quatro posições: C-3, C-7, C-3' e C-4', a posição C-5 foi descartada pelo fato do hidrogênio da hidroxila desta posição estar presente no RMN ¹H (12,3 ppm). A glicosilação nas posições C-3' e C-4' foram descartadas pois se a glicosilação estivesse no anel B, em um desses carbonos, o C-1' teria um deslocamento químico na faixa de 125 ppm (Agrawal, 1989), o que não foi observado para este carbono no espectro de *Bixa 2*. Caso a glicosilação fosse em C-7 o deslocamento químico desse carbono ficaria na faixa de 163 ppm e

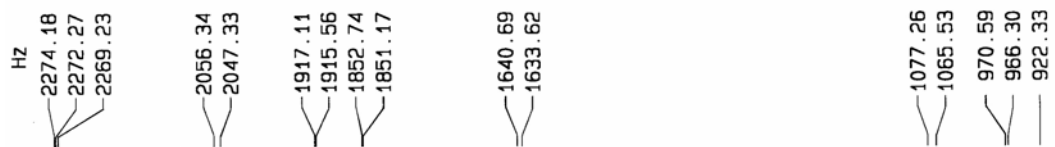
o observado, através do HMBC para este carbono foi de 166,0 ppm (Agrawal, 1989). Por eliminação e comparando com a literatura (Haribal e Renwick, 1998) propõem-se para *Bixa 2* a estrutura da quercetina 3-*O*- β -xilopirranose. Portanto, a quercetina de *Bixa 2* é monoglicosídica em 3, cujo açúcar corresponde a β -xilopirranose (Haribal e Renwick, 1998).



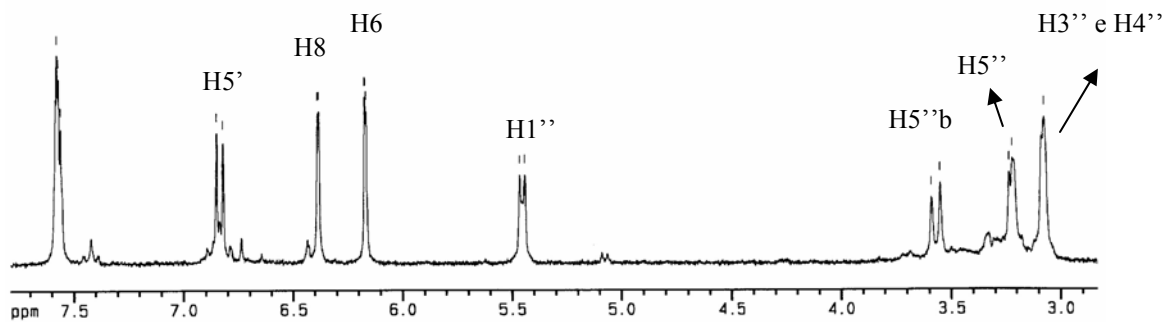
Espectro 11. RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de *Bixa 2*



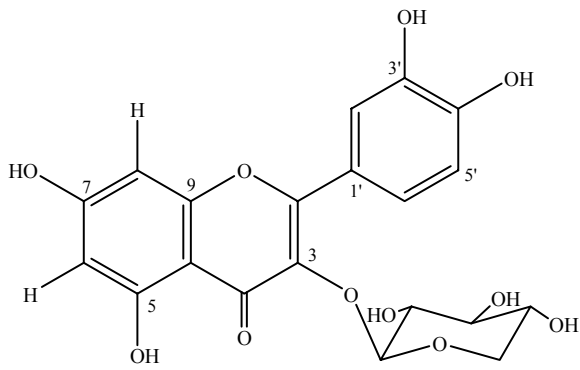
Quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo (II)



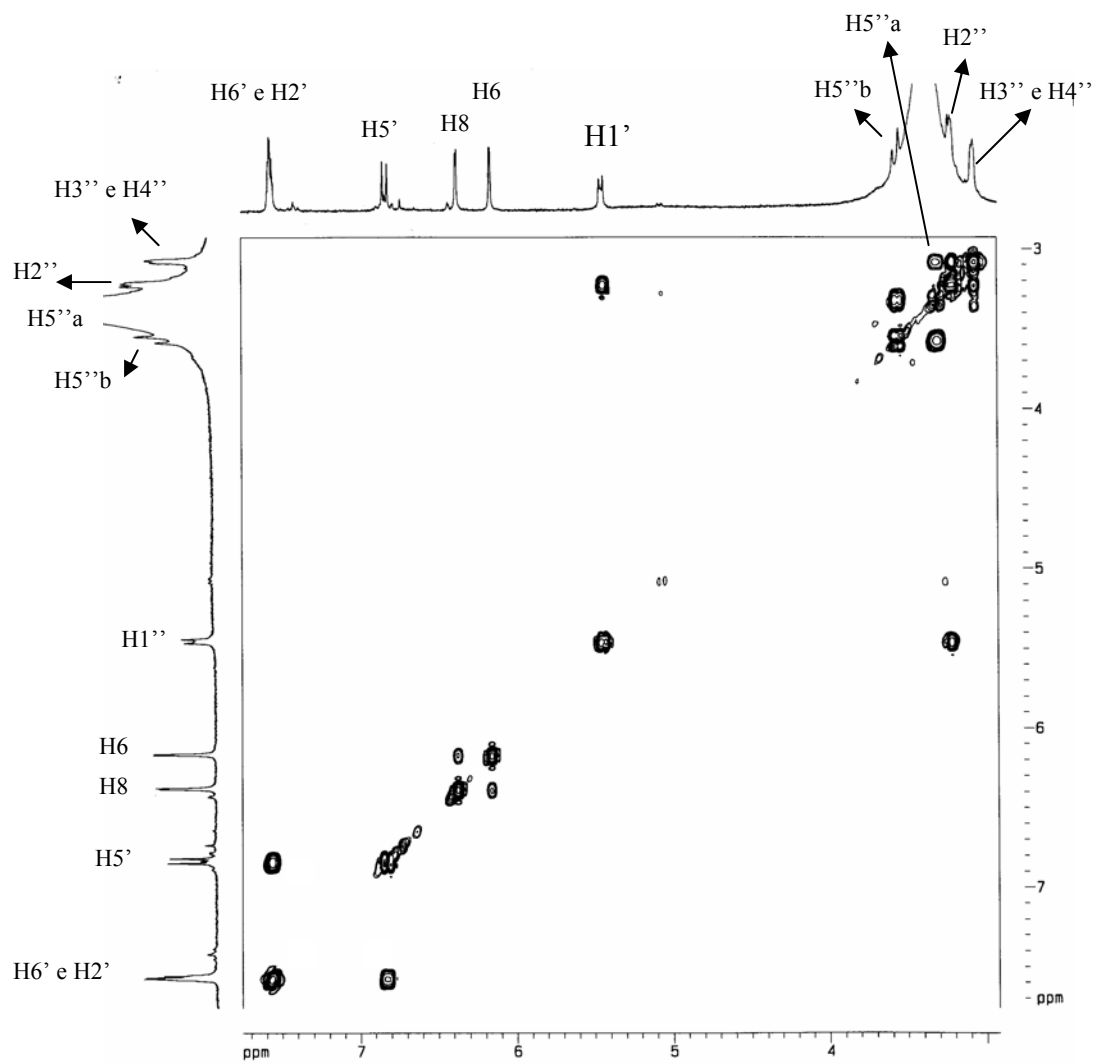
H6' e H2'



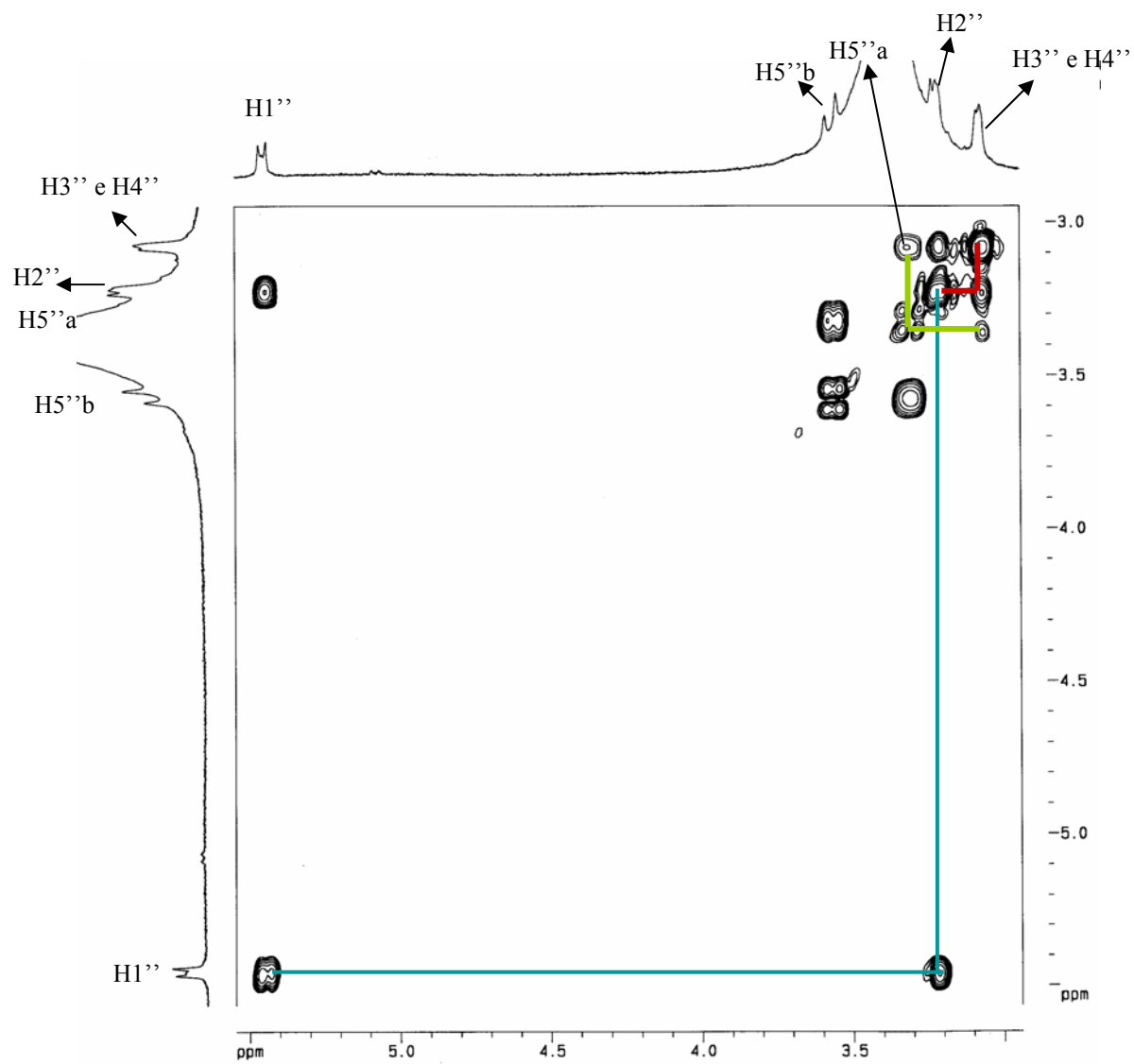
Espectro 12. RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ de *Bixa 2*



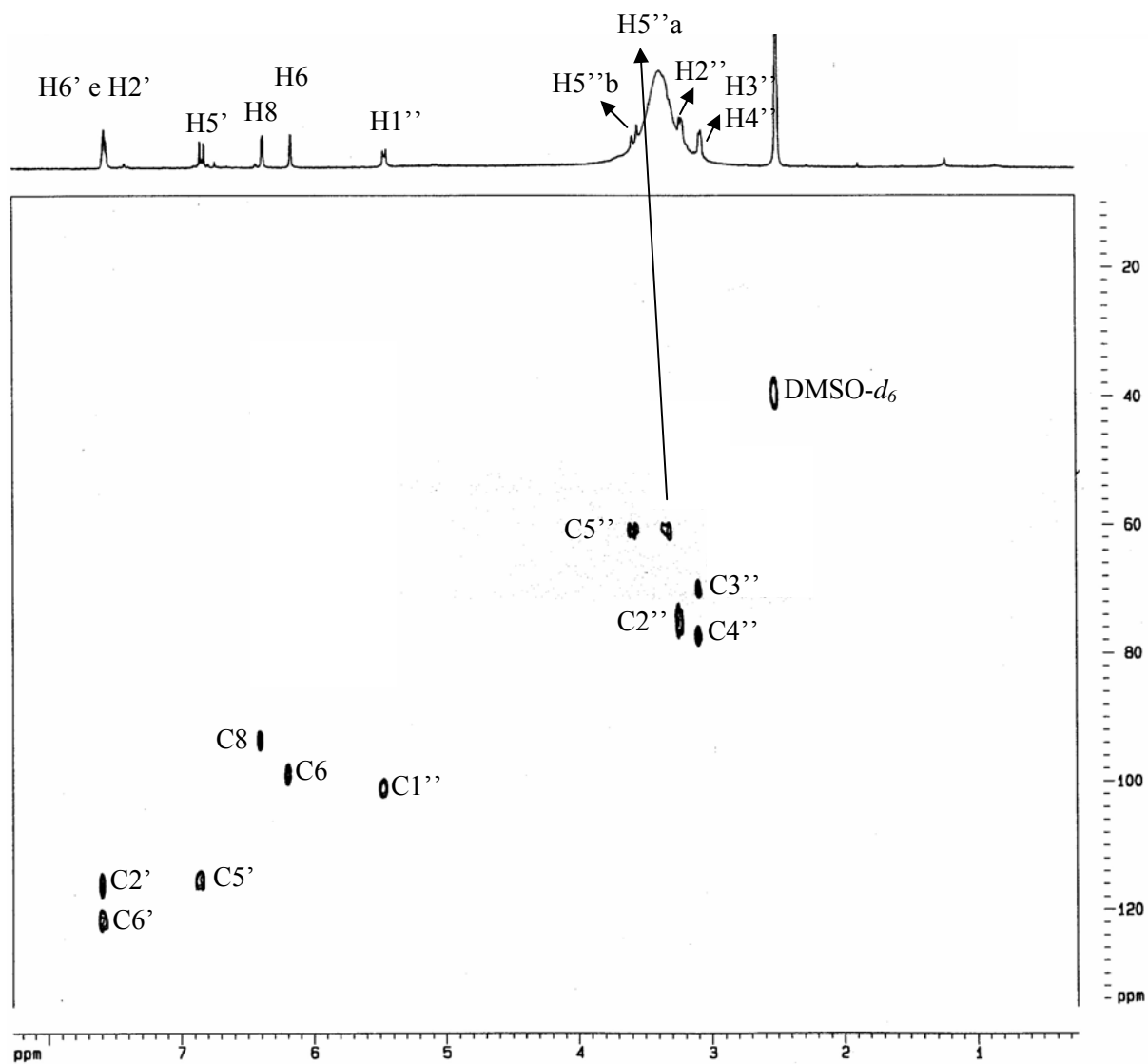
Quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo (II)



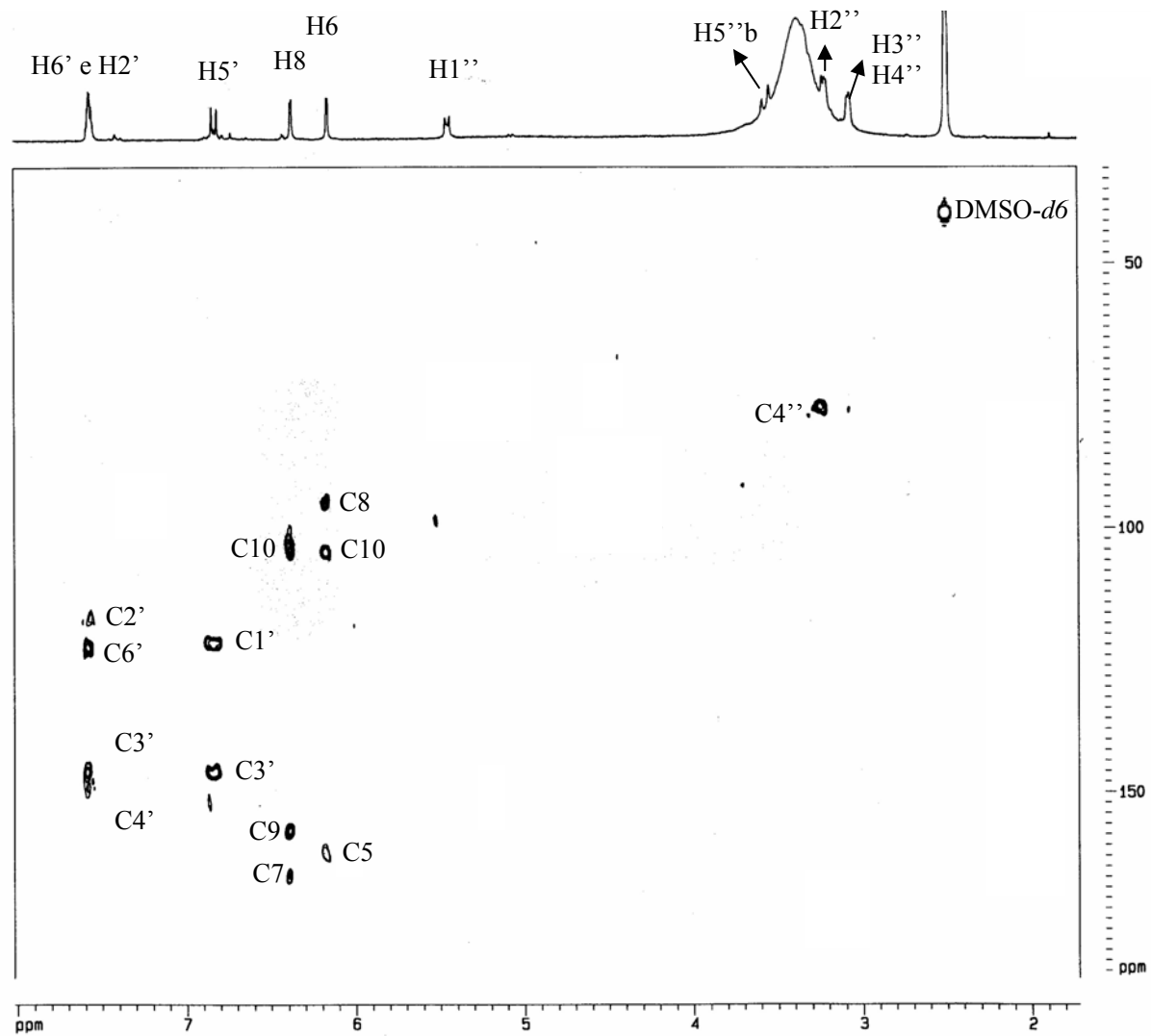
Espectro 13. COSY (^1H - ^1H) de *Bixa 2*



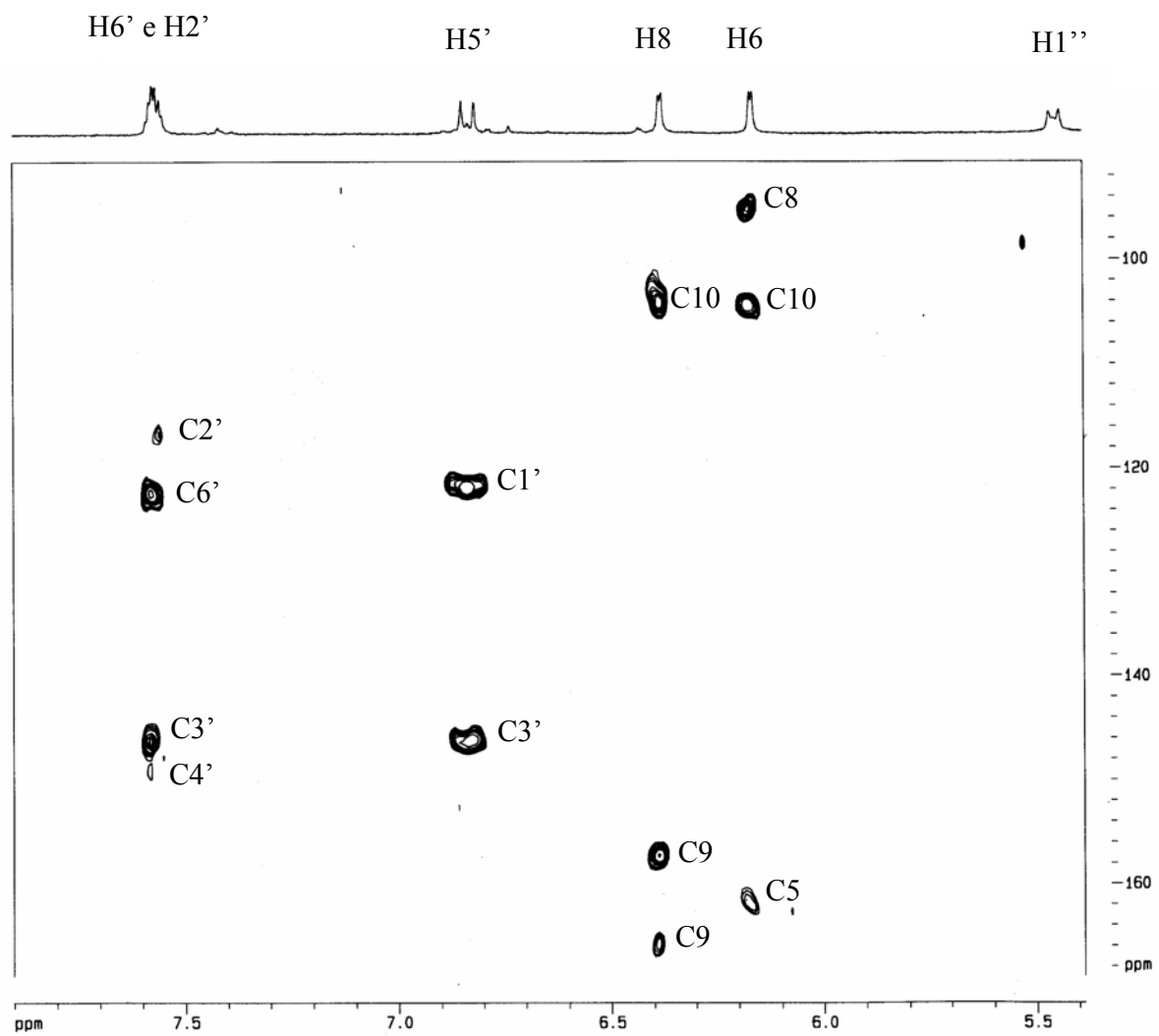
Espectro 14. COSY (^1H - ^1H) da parte glicosídica de *Bixa 2*



Espectro 15. HMQC de *Bixa 2*



Espectro 16. HMBC de *Bixa 2*



Espectro 17. HMBC de *Bixa 2*



CONCLUSÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS

1 - Os testes *in vitro* da atividade antimicrobiana permitiram verificar a importância da interação entre macro e micromoléculas em extratos de plantas. Algumas espécies como *Momordica charantia* L. (melão-de-São-Caetano), *Schinus molle* L. (aroeira) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) apresentaram atividade antimicrobiana apenas no extrato aquoso, a separação entre macro e micromoléculas revelou um efeito negativo na atividade antimicrobiana dessas plantas. No entanto, as espécies *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Solanum* sp., *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. (taioba), *Kalanchoe brasiliensis* Camb. (coirama) e *Malpighia glabra* L. (acerola) mostraram atividade antimicrobiana apenas no sobrenadante (micromoléculas). E outras, como *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Bixa orellana* L. (urucum) e *Crotalaria pallida* Aiton (chocalho-de-cascavel), foram ativos tanto os extratos aquosos totais (conjunto de macro e micromoléculas) quanto os sobrenadantes (apenas micromoléculas).

2 – Também foi possível observar que *Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana* contra certos microrganismos apresentaram atividade somente para o extrato aquoso total (*Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana* contra a bactéria *Lactobacillus casei*), sobrenadante (*Bixa orellana* contra o fungo

Trichophyton rubrum), extrato aquoso total e sobrenadante (*Rosmarinus officinalis* contra *Trichophyton rubrum*; e *Rosmarinus officinalis* e *Bixa orellana* contra MRSA). Esses resultados levam a crer que, além das variáveis como concentração e interrupção do sinergismo entre as substâncias ativas de plantas, também pode haver uma seletividade das substâncias ativas em relação a diferentes alvos no mecanismo antimicrobiano contra fungos e bactérias.

- 3 - Os estudos da atividade antimicrobiana também permitiram verificar que as espécies *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Bixa orellana* apresentam atividade contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. O melhor resultado foi para o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* contra MRSA (6 µg/ml).
- 4 – O ensaio da bioautografia foi realizado para fungos e bactérias. A solução de BAW 8:1:1 foi usada para a eluição das placas de CCF. Foram testados para os fungos somente os extratos e sobrenadantes das plantas que apresentaram atividade contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Halos de inibição visíveis foram observados para o extrato aquoso total de *Schinus molle* (R_f 0,89) e *Schinus terebinthifolius* (R_f 0,80) contra *Candida albicans*, assim como para o sobrenadante de *Anacardium occidentale* (R_f 0,31) contra *Cryptococcus neoformans*. Todos os extratos aquosos e sobrenadantes que apresentaram atividade antibacteriana foram submetidos a bioautografia, exceto os

extratos aquosos de *Bixa orellana* e *Rosmarinus officinalis*. Mostraram halos de inibição, os sobrenadantes de *Solanum* sp. (R_f 0,22) contra MSSA, *Rosmarinus officinalis* (R_f 0,16) e *Bixa orellana* (R_f 0,68) contra MRSA.

- 5 – Ficou clara a abundância em flavonóides pelo método de CLAE-AFD das espécies *Anacardium occidentale*, *Kalanchoe brasiliensis* e *Bixa orellana*. As espécies *Rosmarinus officinalis*, *Schinus molle*, *Solanum* sp. e *Crotalaria pallida* mostraram um conteúdo médio em flavonóides. E algumas espécies apresentaram um conteúdo baixo ou ausente em flavonóides como *Xanthosoma sagittifolium*, *Malpighia glabra* e *Schinus terebinthifolius*.
- 6 - O estudo fitoquímico da espécie *Bixa orellana* forneceu dois flavonóides *O*-glicosilados: a hipolaetina 8-*O*- β -glucuronídeo e a quercetina 3-*O*- β -xilopiranosídeo. É a primeira vez que esses dois flavonóides foram isolados de *Bixa orellana*.
- 7 - O estudo da atividade seqüestradora de radicais livres (antioxidante) pelo método do DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila) apresentou resultados interessantes. A espécie *Schinus terebinthifolius* (extrato aquoso) que não revelou flavonóides detectáveis por CCF (Cromatografia em Camada Fina) e CLAE-AFD mostrou a melhor atividade antioxidante. Das frações, o melhor resultado foi para a partição em acetato de etila de *Bixa orellana*, rica em flavonóides.

- 8 - Foi possível traçar um paralelo entre atividade antioxidante, antimicrobiana e conteúdo flavonoídico. O conteúdo flavonoídico parece não influenciar na atividade antimicrobiana de *Xanthosoma sagittifolium*, no entanto parece está relacionado à atividade antioxidante. Todas as plantas alimentícias e medicinais com atividade antimicrobiana apresentaram capacidade seqüestradora de radicais livres significante, exceto *Xanthosoma sagittifolium*.
- 9 – A partir dos resultados obtidos podemos concluir que diferentes substâncias presentes em extratos de plantas são responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas a essas plantas. Ressaltando que o saber popular transcende o científico em muitos aspectos, pois na sua ignorância da riqueza da constituição química das plantas, rezadoras e curandeiros, entre outros, utilizam na maioria das vezes plantas que são ricas em flavonóides ou fenólicos e outras classes químicas detectadas no nosso experimento. A confirmação desse saber popular é feita pelos relatos científicos sobre as atividades biológicas dessas plantas.

10 – Com base na constituição química e atividade antimicrobiana e antioxidante com certeza, após estudos mais aprofundados em relação à falta de toxicidade e eficácia dessas plantas em ensaios específicos para a pele, as plantas estudadas nesse trabalho poderão ser utilizadas como fitoterápicos ou, ainda, em alguns casos como nutracêuticos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abushita, A.A., Hebshi, E.A., Daod, H.G., Biacs, P.A. (1997). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry* 60, 207-212.
- Agbor-Egbe, T. e Rickard, J.E. (1990). Identification of phenolic compounds in edible aroids. *Journal of the Science Food and Agriculture* 51, 215-221.
- Agrawal, P.K. (1989). *Studies in organic chemistry carbon-13 nmr of flavonoids*. Elsevier, New York, 564 p.
- Albertson, G.D., Niimi, M., Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. (1996). Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 40, 2835-2841.
- Alves, T.M.A., Silva, A.F., Brandão, M., Grandi, T.S.M., Smânia, E.F.A., Smânia-Junior, T., Zani, C.L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 367-373.
- Aly, R. e Berger, T. (1996). Common superficial fungal infections in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases* 22, 128-132.

- Amié, D., Davidović-Amié, D., Beslo, D., Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta* 76, 55-61.
- Arazi, T., Lee-Huang, P., Huang, P.L., Zang, L., Shibolet, Y.M., Gal-On, A., Lee-Huang, S. (2002). Production of antiviral and antitumor proteins MAP 30 and GAP 31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AG II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292, 441-448.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Warren, D., Jenner, P., Butler, J., Halliwell, B. (1997). Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry* 60, 149-156.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 75, 199-212.
- Aruoma, O. (1999). Antioxidant actions of plant foods, use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research* 30, 419-427.
- Asres, K., Bucar, F., Karting, T., Witrouw, M., Pannecouque, C., Clercq, E. D. (2001). Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. *Phytotherapy Research* 15, 62-99.

- Assunção, R.B. e Mercadante, A.Z. (2003). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 647-657.
- Aydogmus, Z., Çetin, S.M., Ozgur, M.U. (2002). Determination of ascorbic acid in vegetables by derivative spectrophotometry. *Turkish Journal of Chemistry* 26, 697-704.
- Balls, A.K., Hale, W. S., Harris, T.H. (1942). A crystalline protein obtained from lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry* 19, 279-288.
- Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M. (2002). Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. Ed. Artmed, Porto Alegre, p. 53-58.
- Barros, S.T.D., Mendes, E.S., Peres, L. (2004). Influence of depectinization in the ultrafiltration of west indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Meer) juices. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24, 194-201.
- Bartizal, K., Abruzzo, G., Trainor, C., Krupa, D., Nollstadt, K., Schmatz, D., Schwartz, R., Hammond, M., Balkovec J., Vanmiddlesworth, F. (1992). In vitro antifungal activities and in vivo efficacies of 1,3- β -D-glucan synthesis inhibitors L-671, 329, L-646, 991, tetrahydroechinocandin B and L-687, 781, a papulocadin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 1648-1657.

- Basaga, H., Tekkaya, C., Acikel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensm-Wiss. u. Technol.* 30, 105-108.
- Basile, A., Giordano, S., López-Saénz, J.A., Cobianchi, R.C., (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52, 1479-1482.
- Bastert, J. (2001). Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 81-91.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2002). *Neurociencias-desvedando o sistema nervoso*. 2^a ed, Artmed Editora, Porto Alegre, 150 p.
- Blois, H.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Boatto, G., Pintore, G., Palomba, M. (1994). Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis*. *Fitoterapia* 65, 279-280.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. “Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos” (DOU 18/03/04).

- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. “Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos” (DOU 25/02/00).
- Budzianowski, J., Pakulski, G., Robak, J. (1991). Studies on Antioxidative activity of some C-Glycosylflavones. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* 43, 395-401.
- Buenz, E.J., Johnson, H.E., Beekman, E.M., Motley, T.J., Bauer, B.A. (2005). Bioprospecting Rumphius’s Ambonese Herbal: Volume I. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 57-70.
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobon, E., Samayoa, B.E., Jauregui, E., Peralta, E., Carrillo, G. (1995). Antigonorrheal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 48, 85-88.
- Cai, L. e Wu, C.D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products* 59, 987-990.
- Campello, J.P. e Marsaioli, A.J. (1974). Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 13, 659-660.
- Campello, J.P. e Marsaioli, A.J. (1975). Terebenthifolic acid and bauerenone: new triterpenoid ketones from *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 14, 2300-2302.

- Caribé, J. e Campos, J.M. (1999). Plantas que ajudam o homem. Guia prático para a época Atual, 11^a ed., Cultrix/Pensamento, São Paulo, p. 11-321.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews* 1, 895-910.
- Collins, M.A. e Charles, H.P. (1987). Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two antioxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology* 4, 311-315.
- Corrêa, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: MA/IBDF, 1978. v.4, p. 358-359.
- Costa, S.S., Jossang, A., Bodo, B. (1994). Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *Journal of Natural Products* 57, 1503-1510.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.
- Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42, 665-669.
- Damme, E.J.M.V., Goossens, K., Smeets, K., Leuven, F.V., Verhaert, P., Peumans, W.J. (1995). The major tuber storage protein of Araceae species is a lectin. *Plant Physiology* 107, 1147-1158.

- Das, N. P. e Pereira, T. A. (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 67, 255-258.
- DEF-Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2002/2003. 31^a ed. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 1234 p.
- Delage, E., Baron, G.B., Drilleau, J.F. (1991). High-performance liquid chromatography of phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. *Journal of chromatography* 555, 125-136.
- Delvalle, D.M.G. e Schwenker, G. (1987). Preisolamenediol, a constituent of *Schinus molle*. *Planta medica* 53, 230.
- Dikshit, A., Naqvi, A., Husain, A.A., 1986. *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1085-1088.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Dominguez, A.X., Carmona, J.F., Venegas, R.B. (1971). Lignoceric acid and other compounds of *Schinus molle*. *Phytochemistry* 10, 1687.
- Duru, C.C. e Uma, N.U. (2003). Protein enrichment of solid waste from cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) cormel processing using *Aspergillus oryzae* obtained from cormel flour. *African Journal of Biotechnology* 2, 228-232.

- Elof, J.N. (1998). Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 1-8.
- Engler, A. (1964). *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 1a ed. Ed. Gebruder Borntraeger. Berlin. v.2, 428 p.
- Evans, W.C. (2000). Annatto: a natural choice. *Biologist* 47, 181-184.
- Farr, B.M. (2004). Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections [nosocomial and hospital related-infections]. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17, 317-322.
- Felizmenio-Quimio, M.A., Daly, N.L., Craik, D.J. (2001). Circular proteins in plants. Solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Mormodica cochinchinensis*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 22875-22882.
- Ferreira, S.H. (1998). *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro, 1ª ed., Academia Brasileira de ciências, 132 p.
- Finkel, T. e Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fleischer, T.C., Ameade, E.P.K., Mensah, M.L.K., Sawyer, I.K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia* 74, 136-138.
- Fothergill, A.W. (1996). Identification of dematiaceous fungi and their role in human disease. *Clinical Infectious Diseases* 22, 179-184.

- Franco, C.F.O, Silva, F.C.P., Cazé Filho, J., Barreiro Neto, M., José, A.R.S., Rebouças, T.N.H., Campos, I.S. Manejo da cultura do urucum (*Bixa orellana* L.). http://www.emepa.org.br/urucum_manejo.php. Consultado em junho de 2005.
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D.C., Rankin, S.A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection* 66, 1074-1078.
- Galindo-Cuspinera, Rankin, S.A. (2005). Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2524-2529.
- García-Conesa, M.T., Wilson, P.D., Plumb, G.W., Ralph, J., Williamson, G. (1999). Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-beta, beta'-bicycinnamic acid (8-8-diferulic acid, noncyclic form). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 379-384.
- Gilman, A.G., Hardman, J.G., Limbird, L.E. (2003). *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10^a ed, editora McGraw-Hill, Rio de Janeiro, p. 1360.
- Girre, L. (2001). *Les plantes et le médicaments. L'origine vegetales des nos médicaments*. 1^a ed. Delachaux et Niestlé. Lausanne (Switzerland)- Paris, p. 143-144.

- Goldstein, I.J. (2002). Lectin structure-activity: the story is never over. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6583-6585.
- Grayer, R.J. e Harborne, J.B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants (1982-1993). *Phytochemistry* 37, 19-42.
- Graziano, T.T., Dietrich, S.M.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. (1992). Characterization of starch of the underground system of *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (Araceae) during plant development. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 4, 7-10.
- Gundidza, M. (1993). Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Central African Journal of Medicine* 39, 231-234.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1887-1892.
- Hakkinen, S., Karenlampi, S.O., Mykkanen, H.M., Torronen, A.R. (2000). Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2960-2965.
- Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkanen, H.M., Torronen, A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2274-2279.

- Halliwell, B. (1987). Oxidants and Human Disease: some new concepts. FASEB Journal 1, 358-364.
- Hamato, N., Koshihara, T., Pham, T.N., Tatsumi, Y., Nakamura, D., Takano, R., Hayashi, K., Hong, Y.M., Hara, S. (1995). Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. Journal of Biochemistry 117, 432-437.
- Hara, S., Makino, J., Ikenaka, T. (1989). Amino acids sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) seeds. Journal of Biochemistry 105, 88-91.
- Harborne, J.B. e Williams, C.A. (2000). Advances in Flavonoid Research since 1992. Phytochemistry 55, 481-504.
- Harborne, J.F. (1975). Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and related families. Phytochemistry 14, 1331-1337.
- Haribal, M. e Renwick, J.A.A. (1998). Identification and distribution of oviposition stimulants for monarch butterflies in hosts and nonhosts. Journal of Chemical Ecology 24, 1998.
- Hartsel, S. e Bolard, J. (1996). Amphotericin B: new life for an old drug. Trends in Pharmacological Sciences 17, 445-449.

- Hayashi, T., Nagayama, K., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N. (1989). Pentagalolglucose, a xanthine oxidase inhibitor from Paraguayan crude drug, "molle-i" (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52, 210-211.
- Herold, B.C., Immergluck, L.C., Maranan, M.C., Lauderdale, D.S., Gaskin, R.E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C.D., Daum, R.S. (1998). Community acquired methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *Journal of the American Medical Association* 279, 593-598.
- Hollman, P.C.H.; Gaag, M.V.D.; Mengelers, M.J.B.; Trijp, J.M.P.V.; Vries, J.H.M.; Katan, M.B. (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology & Medicine* 21, 703-707.
- Hudson, B.J.F. e Lewis, J.I. (1983). Polyhydroxy flavonoid anti-oxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, 47, 47-55.
- Ibañez, E., Kubátová, A., Señorans, F.J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S.B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 375-382.

- Ibrahim, T., Cunha, J.M.T., Madi, K., Fonseca, L.M.B., Costa, S.S., Koatz, V.L.G. (2002). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *International Immunopharmacology* 2, 875-883.
- Iyer, S. e Jones, D.H. (2004). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection: A retrospective analysis of clinical presentation and treatment of a local out break. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50, 854-858.
- Jacob, S.W., Francone, C.A., Lossow, W.J. (1990). *Anatomia e fisiologia humana*. 5^a ed. Ed. Guanabara Koogan, 79-86.
- Júnior, A.C.T.S., Asad, L.M.B.O., Oliveira, E. B., Kovary, K., Asad, N.R., Felzenszwalb, I. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research* 4, 94-99.
- Kaistha, K.K. e Kier, L.B. (1962). Structural studies on triterpenes of *Schinus terebinthefolius*. *Journal of Pharmaceutical Science* 51, 1136-1139.
- Kier, L.B., Lehn, J.M., Ourisson, G. (1963). Résonance magnétique nucléaire de produits naturels (IV). Structure e stéréochimie de la térébinthone e du schinol. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 911.

- Klika, K.D., Saleem, A., Sinkkonen, J., Kähkönen, M., Loponen, J., Tähtinen, P., Pihlaja, K. (2004). The structural and conformational analyses and antioxidant activities of chebulinic acid and its thrice-hydrolyzed derivative, 2,4-chebuloyl- β -D-glucopyranoside, isolated from the fruit of *Terminalia chebula*. *Arkivoc*, (vii), 83-105.
- Kuhnt, M., Pröbstle, A., Rimpler, H., Bauer, R., Heinrich, M. (1995). Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica* 61, 227-232.
- Larrondo, J.V., Agut, M., Calvo-Torras, M.A. (1995). Antimicrobial activity of essences from labiates. *Microbios* 82, 171-172.
- Lawrence, B.M. e Hogg, J.W. (1973). Ishwarane in *Bixa orellana* leaf oil. *Phytochemistry* 12, 2995.
- Lee, C.K., Kim, H., Moon, K.H., Shun, K.H. (1998). Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials – resistance inhibition of volatile components of Korean aromatic herbs. *Archives of Pharmaceutical Research* 21, 62-66.
- Lee, H.S. e Widmer B.W. (1996). In: Nollet, L.M.L., ed Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., v. 1, p. 821-894.

- Lima, E.O. (2001). Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. Em: Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna/ Rosendo Augusto Yunes e João Batista Calixto, Chapecó: Argos, p. 482-495.
- Lloyd, H.A., Jaouni, T.M., Evans, S.L., Morton, J.F. (1977). Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 16, 1301-1302.
- Lo, K.M. e Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89, 533-539.
- López-Solanilla, E., González-Zorn, B., Novella, S., Vázquez-Boland, J.A., Rodríguez-Palenzuela, P. (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Letters* 226, 101-105.
- Lorenzi, H. e Matos, F.J.A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Editora Instituto Plantarum, São Paulo, 512 p.
- Lorenzi, H. (2000). Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª ed., editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 608 p.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Tomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, p. 35-250.

- Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., Neto-dos-Santos, K.R. (2003). In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21, 279-284.
- Manach, C., Texier, O., Morand, C., Crespy, V., Régéat, F., Demigné, C., Rémésy, C. (1999). Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 1259-1266.
- Mangena, T. e Muyima, N.Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology* 28, 291-296.
- Martínez-Tomé, M., Jiménez, A.M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., Murcia, M.A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection* 64, 1412–1419.
- Martini, N.D., Katerere, D.R.P. e Eloff, J.N. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 93, 207-212.
- Martins, E.R., Castro, D.N., Castellani, D.C., Dias, J.E. (1995). Plantas medicinais. Universidade Federal de Viçosa, p. 16-220.

- Matos, A. (1982). Aproveitamento de plantas medicinais da região Nordeste. *Revista Brasileira de Farmacologia* 1, 132-140.
- Mechlinsky, W., Schaffner, C.P., Ganis, P., Avitabile, G. (1970). Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B. *Tetrahedron Letters*, 3873–3876.
- Méndez, J., Vázquez, A., Mato, M.C. (2004). Methyl gallate and its 3-glucoside promote rooting in bean cuttings. *Plant Growth Regulation* 43, 275-278.
- Mercadante, A.Z. e Rodriguez-Amaya, D.B. (1990). Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 25, 213-219.
- Mercadante, A.Z., Steck, A., Rodriguez-Amaya, D., Pfander, H., Britton, G. (1996). Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. *Phytochemistry* 41, 1201-1203.
- Mercadante, A.Z., Steck, A., Pfander, H. (1999). Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Phytochemistry* 52, 135-139.
- Meyer, A.S., Heinonen, M., Frankel, E.N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* 61, 71-75.

- Mohsen, M.M.A.E., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., Rice-Evans, C.A. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 1693-1702.
- Montes, M.A. e Wilkomirsky, T. (1998). Antibacterial activity of essential oils from aromatic plants growing in Chile. *Fitoterapia* 69, 170-172.
- Moon, J. H. e Terao, J. (1998). Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 5062-5065.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A. (2000). *Medicinal plants of Brazil*. Inc. Algonac, Michigan, Reference Publications, 495 p.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M.J., Parajó J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72, 145-171.
- Murota, K. e Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry Biophysics* 417, 12-17.
- Murthy, B.K.G., Samban, M.A.S., Aggarwal, J.S. (1968). Identification of some naturally occurring alkyl substituted phenols in cashew-nut shell liquid by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography* 32, 519-528.

- Murthy, S.S.N., Anjaneyulu, A.S.R., Row, L.R., Pelter, A. Ward, R.S. (1982). Chemical examination of *Anacardium occidentale*. Isolation and structure determination of a novel biflavonoid-C-glycoside. *Planta Medica* 45, 3-10.
- Naik, G.H., Pryadarsini, K.I., Naik, D.B., Gangabhagirathi, R., Mohan, H. (2004). Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector. *Phytomedicine* 11, 530-538.
- Nakagawa, K., Ninomiya, M., Okubo, T., Aoi, N., Juneja, L.R., Kim, M., Yamanaka, K., Miyazawa, T. (1999). Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3967-3973.
- Newton, S.M., Lau, C., Gurcha, S., Besra, G.S., Wright, C.W., (2002). The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea coryfolia* and *Sanguinaria canadenses*. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 57-67.
- Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., Yeung, H.W. (1986). A sterol glycoside fraction from *Momordica charantia* seeds with an inhibitory action on lipid metabolism in vitro. *Biochemistry and Cell Biology* 64, 766-771.

- Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., Yeung, H.W. (1987). Acid ethanol extractable compounds from fruits and seeds of the bitter gourd *Momordica charantia*: effects on lipid metabolism in isolated rat adipocytes. *The American Journal of Chinese Medicine* 15, 31-42.
- Niwa, M., Otsuji, S., Tatematsu, H., Liu, G.Q., Chen, X.F., Hirata, Y. (1986). Stereostructures of two biflavones from *Stellera chamaejasme* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 34, 3249-3251.
- Noda, N., Kanno, Y., Kato, N., Kazuma, K., Suzuki, M. (2004). Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiologia Plantarum* 122, 305–313.
- Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., Endo, T. (1997). Antioxidant activity of magnolol, honokiol and related phenolic compounds. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 74, 557-568.
- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., Yagi, A. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A* 679, 381-386.
- Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* 37, 1463-1466.

- Osato, J.A., Santiago, L.A., Remo, G.M., Cuadra, M.S., Mori, A. (1993). Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sciences* 53, 1383-1389.
- Pandit, V.A. e Shelef, L.A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Food Microbiology* 11, 57-63.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 167-170.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, Burillo, J., Codina, C. (2004). Bioguided isolation and identification of nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52, 1890-1897.
- Park, B.S, Kim, J.R., Lee, S.E., Kim, K.S., Takeoka, G.R., Ahn, Y.J., Kim, J.H. (2005). Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1152-1157.
- Park, J.S., Kim, J.B., Hahn, B.S., Kim, K.H., Ha, S.H., Kim, J.B., Kim, Y.H. (2004). EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization. *Plant Science* 166, 953–961.

- Parkash, A., Ng, T.B., Tso, W.W. (2002). Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome inactivating peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds. *Journal of Peptide Research* 59, 197-202.
- Perrucci, S., Mancianti, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Macchioni, G. (1994). In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Planta Medica* 60, 184-186.
- Petersen, M. e Simmonds, M.S.J. (2003). Molecules of interest. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.
- Pfaller, M. A. (1996). Nosocomial candidiasis: emerging, reservoirs and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 22, 89-94.
- Phillipson, J.D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56, 237-243.
- Picerno, P., Mencherini, T., Lauro, M.R., Barbato, F., Aquino, R. (2003). Phenolic constituents and properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51, 6423-6428.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

- Pinto, A.C. (1995). O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova* 18, 608-615.
- Pinto, N.A.V.D., Carvalho, V.D., Corrêa, A.D., Rios, A.O. (2001). Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Ciência e Agrotecnologia*, 25, 601-604.
- Pozzo-Balbi, T., Nobile, L., Scapini, G., Cini, M. (1978). The triterpenoid acids of *Schinus molle*. *Phytochemistry* 17, 2107-2110.
- Pussayanawin, V. e Wetzel, D.L. (1987). High-performance liquid chromatographic determination of ferulic acid in wheat milling fractions as a measure of bran contamination. *Journal of chromatography* 391, 245-255.
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 89-96.
- Rahman, W., Ishratullah, K., Wagner, H., Seligmann, O., Chari, V.M., Österdahl, B.G. (1978). Prunin-6''-O-p-coumarate, a new acylated flavanone glycoside from *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry* 17, 1064-1065.
- Rajaram, S. e Sabaté, J. (2000). Health benefits of a vegetarian diet. *Nutrition*, 16, 531-533.

- Rathi, S.S., Grover, J.K., Vats, V. (2002). The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytotherapy Research* 16, 236-243.
- Rice-Evans, C.A. (2001). Flavonoids Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797-807.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933-956
- Ripeau, J.S., Aumont, F., Belhumeur, P., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J.H., Repentigny, L. (2002). Effect of the Echincandin Caspofungin on Expression of *Candida albicans* Secretory Aspartyl Proteinases and Phospholipase In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3096-3100.
- Rohde, A., Morreel, K., Ralph, J., Goeminne, G., Hostyn, V., Rycke, R.D., Kushnir, S., Doorselaere, J. V., Joseleau J.P., Vuylsteke, M., Driessche, G. V., Beeumen, J. V., Messens, E., Boerjana, W. (2004). Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *The Plant Cell* 16, 2749–2771.
- Rook, A., Wilkinson, D.S., Ebling, F.J.G. (1998). *Textbook of Dermatology*. 6^a ed. Ed. Blackwell Science. v. 1., 956 p.

- Ross, S., El-Keltawi, N., Megalla, S., 1980. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia* 51, 201-205.
- Rubin, A.I., Bagheri, B., Scher, R.K. (2002). Six Novel antimycotics. *American Journal of Clinical Dermatology* 3, 71-81.
- Sáenz-López, R., Fernández-Zurbano, P., Tena, M.T. (2002). Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of Chromatography A* 953, 251-256.
- Saijo, R., Fuke, C., Murakami, K., Nohara, T., Tomimatsu, T. (1983). Two steroidal glycosides aculeatiside A e B from *Solanum aculeatissimum*. *Phytochemistry* 22, 733-736.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Provost, C., Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 425-431.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry* 89, 569-575.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., Bille, J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve multidrug transporters. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 39, 2378–86.

- Sato, Y., Oketani, H., Singyouchi, K., Ohtsubo, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T. (1997). Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS. against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 20, 401-404.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 483-488.
- Saxena, G., Towers, G.H.N., Farmer, S., Hancock, R.E.W. (1995). Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical Analysis* 6, 125-129.
- Schaller, M., Korting, H.C., Schaefer, W., Bastert J, Chen W.C., Hube B. (1999). Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Molecular Microbiology* 34, 169–180.
- Schaller, M., Schaefer, W., Korting, H.C., Hube, B. (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in a patient samples from the oral cavity. *Molecular Microbiology* 29, 605–615.

- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 563-568.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S. (2004). Screening of antibacterial compounds from aqueous and macromolecules free fractions of Brazilian medicinal and food plant extracts by bioautography TLC assay. Submetido para publicação na *Fitoterapia* em 08 de 2004.
- Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V.E. (2002). *Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 1ª ed. Ed. Manole. 386 p.
- Sebghati, T. S., Engle, J. T., Goldman, W. E. (2000). Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science* 290, 1368-1371.
- Sefa-Dedeh, S. e Agyir-Sackey, E.K. (2004). Chemical composition and the effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma sagittifolium* and *Colocasia esculenta* cormels. *Food Chemistry* 85, 479-487.
- Señoráns, F.J., Ibañez, E., Cavero, S., Tabera, J., Reglero, G. (2000). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *Journal of Chromatography A* 870, 491-499.

- Shakespeare, P. 2001. Burn wound healing and skin substitutes. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 27, 517-522.
- Sharma, R., Sharma, C.L., Kapoor, B. (2005). Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian Journal of Medical Science* 59, 120-129.
- Sharon, N. e Ofek I. (1986). Mannose specific bacterial surface lectins. *Microbial lectins and agglutinins*, Mirelman (ed.), John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y., p. 55-82.
- Silva, M.F.V. (1999). Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento. Tese de doutorado, Campinas, São Paulo, 224 p.
- Silver, L.L. e Bostian, K.A. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 37, 377-383.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (1999). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Ed. UFSC e UFRGS, 833 p.

- Sousa, M.P. e Matos, F.J.A. (1991). Constituintes químicos de plantas medicinais Brasileiras. Imprensa Universitária/UFC, Fortaleza, p. 126-127.
- Stevens, D.A. (1997). New directions in antifungal therapy. *Japanese Journal of Medical Mycology* 38, 141–144.
- Stulberg, D.L., Penrod, M.A., Blatny, R A. (2002). Common bacterial skin infections. *American Family Physician* 66, 119-124.
- Subramanian, S.S., Joseph, K.J., Nair, A.G.R. (1969). Polyphenols of *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry* 8, 673-674.
- Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A Review. *Biomedical Papers* 147, 137-145.
- Tait, A., Ganzerli, S., Di Bella, M. (1996). Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenols. *Tetrahedron*, 52, 12587-12596.
- Temgo, T.J.C. e Boyomo, O. (2002). Variations in the phenolic contents of cocoyam clones in correlation to resistance to *Pythium myriotylum*. *Biologia Plantarum* 43, 433-436.
- Terao, J., Piskula, M., Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry Biophysics* 308, 278-284.

- Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R. (1987). Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolics acids of avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 921-925.
- Torronen, R., Hakkinen, S., Karenlampi, S., Mykkanen, H. (1997). Flavonoids and phenolic acids in selected berries. *Cancer Letters* 114, 191-192.
- Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gompertz, O.F., Candeias, J.A.N. (2002). *Microbiologia*. 3^a ed. Ed. Atheneu. São Paulo, 586 p.
- Tshibangu, N.J., Chifundera, K., Kaminsky, R., Wright, D.A., König, M. G. (2002). Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 25-35.
- Tyman, J.H.P. (1978). Long-chain phenols. XII. Compositional studies: the polymeric material in the unsaturated phenols of *Anacardium occidentale*. *Journal of Chromatography*, 156, 255-266.
- Tyman, J.H.P. (1978). Long-chain phenols. XIII. Quantitative analysis of the phenolic composition of natural cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) by thin-layer chromatography, densitometry and ultraviolet spectrometry. *Journal of Chromatography*, 166, 159-172.
- Tyman, J.H.P. (1973). Long-chain phenols. Part III. Identification of the components of a novel phenolic fraction in *Anacardium occidentale* (cashew nut shell liquid) and synthesis of the saturated member. *Journal of Chemical Society Perkin I*, 1639-1647.

- van den Berg, M.E. (1996). Plantas medicinais na Amazônia. Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Coleção Adolpho Ducke; Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 13-206.
- Vaya, J., Mahamood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R., Tamir, S. (2003). Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry* 62, 89-99.
- Vazquez, J.A., Lynch, M., Sobel, J.D. (1995). In vitro activity of a new pneumocandin antifungal agent, L-733560 against azole-susceptible and -resistant *Candida* and *Torulopsis* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 2689–2691.
- Vendramini, A.L.A. e Trugo, L.C. (2004). Poliphenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15, 664-668.
- Vermani, K. e Grag, S. (2002). Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 49-66.
- Viviani, M.A., de Marie, S., Graybill, J.R., Yamaguchi, H., Anaissie, E., Caillot, D. (1998). New approaches to antifungal chemotherapy. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 36, 194–206.

- Walker, T.S., Bais, H.P., Déziel, E., Schweizer, Hebert, P., Rahme, L.G., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* 134, 320-331.
- Walsh, T.J. e Giri, N. (1997). Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Contraception* 16, 93–97.
- Walzen, R.L. (2004). Functional Foods. *Trends in Food Science & Technology* 15, 518.
- Ward, R.S. e Saffle, J.R. (1995). Tropical Agents in Burn and Wound Care. *Physical Therapy* 75, 526-538.
- Wardle, H.M., Law, D., Denning, D.W. (1996). In vitro activity of BMS-181184 compared with those of fluconazole and amphotericin B against various *Candida* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 2229–2231.
- Watt, E. e Pretorius, J.C. (2001). Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 87-91.

- Weitzman, I. e Summerbell, R. C. (1996). The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 240-247.
- Weng, J.R., Yen, M.H., Lin, C.N. (2002). New pterocarpanoids of *Crotalaria pallida* e *Crotalaria assamica*. *Helvetica Chimica Acta* 85, 847-851.
- Weng J.R., Tsao, L.T., Yen, M.H., Wang, J.P., Lin, C.N. (2003). Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. *Journal of Natural Products* 66, 404-407.
- Wenkert, E., Fuchs, A., McChesney, J.D. (1965). Chemical artefacts from the family Labiatae. *Journal of Organic Chemistry* 30, 2931-2934.
- Wettasinghe, M. e Shahidi, F. (1999). Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of deffated borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chemistry* 63, 399-414.
- WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Genebra, Suíça: World Health Organization. 1999. v. 1. 289 p; 2001. v.2. 287p.
- Wilhelm Filho, D., Silva, E.L., Boveris, A. (2001). Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e medicamentos: importância e expectativas terapêuticas. Em: *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna/ Rosendo Augusto Yunes e João Batista Calixto, Chapecó: Argos*, p. 318-334.

- Winkel-Shirley, B. (2001a). Flavonoids biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology* 126, 485-493.
- Winkel-Shirley, B. (2001b). It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* 127, 1399–1404.
- Wu, A.M., Jiang, Y.J., Hwang, P.Y., Shen, F.S. (1995). Characterization of the okra mucilage by interaction with Gal, GalNAc and GlcNAc specific lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1243, 157-160.
- Xie, H., Huang, S., Deng, H., Wu, Z., Ji, A. (1998). Study on chemical components of *Momordica charantia*. *Zhong Yao Cai* 21, 458-459.
- Xie, D.Y., Jackson, L.A., Cooper, J.D., Ferreira, D., Paiva, N.L. (2004). Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 134, 979–994.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Ariga, T. (1999). Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2544-2548.

- Yeung, H.W., Li, W.W., Feng, Z., Barbieri, L., Stirpe, F. (1988). Trichosanthin, alpha- momorcharin and beta-momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *International Journal of Peptide and Protein Research* 31, 265-268.
- Yueqin, Z., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M., Rios, J.L. (2003). Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta medica* 69, 893-898.
- Zang, Y. e Lewis, K. (1997). Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiology Letters* 149, 59-64.
- Zaoutis, T.E., Benjamin, D.K., Steinbach, W.J. (2005). Antifungal treatment in pediatric patients. *Drug Resistance Updates*.
- Zapesochnaya, G.G., Kurkin, V.A., Braslavskii, V.B., Filatova, N.V. (2002). Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chemistry of Natural Compounds* 38, 314-319.
- Zhang, H.Y. (1999). Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 76, 745-748.

- Zhao, B., Tham, S.Y., Lu, J., Lai, M.H., Lee, L.K.H., Moochhala, S.M. (2004). Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science* 7, 200-204.
- Zipfel, C. e Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes ?. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 353-60.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)