

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**FATORES AMBIENTAIS E FENOLÓGICOS NA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E PRODUÇÃO DE ATIVOS EM *Cochlospermum
regium* (SCHRANK) PILG.**

MARIELLE CASCAES INÁCIO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Dezembro – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**FATORES AMBIENTAIS E FENOLÓGICOS NA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E PRODUÇÃO DE ATIVOS EM *Cochlospermum
regium* (SCHRANK) PILG.**

MARIELLE CASCAES INÁCIO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Dezembro – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

I35f Inácio, Marielle Cascaes, 1985-
Fatores ambientais e fenológicos na atividade antimicrobiana e produção de ativos em *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg / Marielle Cascaes Inácio. - Botucatu : [s.n.], 2013
xiii, 94 f. : fots. color., grafs., tabs., ils. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2013

Orientador: Ana Maria Soares Pereira

Coorientador: Bianca Waléria Bertoni

Inclui bibliografia

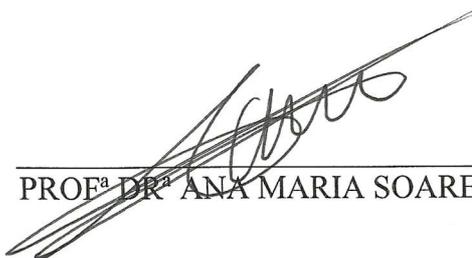
1. Plantas medicinais. 2. Bioclimatologia. 3. Agentes antiinfeciosos. 4. Fenologia vegetal. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Bertoni, Bianca Waléria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FATORES AMBIENTAIS E FENOLÓGICOS NA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E PRODUÇÃO DE ATIVOS EM *Cochlospermum regium*
(Schrank) pilg

ALUNA: MARIELLE CASCAES INÁCIO

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANA MARIA SOARES PEREIRA
CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a BIANCA WALERIA BERTONI



PROF^a DR^a ANA MARIA SOARES PEREIRA



PROF^a DR^a GLYN MARA FIGUEIRA



PROF^a DR^a ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES



PROF. DR. LIN CHAU MING



PROF^a DR^a ELIZABETH ORIKA ONO

Data da Realização: 09 de dezembro de 2013.

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido.”

Blaise Pascal

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer três pessoas: ao Tiago, que permaneceu comigo em todos os momentos difíceis e alegres desta caminhada, e que presenciou todos os meus sonhos e planos durante esse período; a minha amada orientadora Ana Maria Soares Pereira, que me deu não somente auxílio profissional, mas acompanhou todo meu crescimento durante esses anos de pós graduação, auxiliando em todas as minhas dificuldades, incluindo as pessoais; e ao meu pai, João Luiz, que mesmo longe, sempre me apoiou e me deu suporte emocional. A vocês, meu imenso agradecimento.

Aos meus irmãos, Johnny e Débora, por fazerem parte da minha vida.

A todos os familiares, inclusive os adquiridos durante a minha vida, os de coração.

Aos meus grandes amigos, pelas risadas e momentos de alegria, que são extremamente importantes na nossa vida.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Bianca Waléria Bertoni pela atenção eterna, grande paciência e pelo imenso suporte neste aprendizado.

A todos os meus queridos mestres da UNESP, meus ídolos, minha fonte de inspiração. Sem a contribuição de vocês eu não poderia fazer este trabalho.

Aos professores, membros da banca de qualificação: Prof^a Dr^a Sarita Leonel e Prof^a. Dr^a Elizabeth Orika Ono, pela importante contribuição nesta etapa importante da pós graduação.

Aos membros da banca de defesa, Dr^a Rosa de Belém das Neves Alves, Dr^a Glyn Mara Figueira, Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono e Prof^o Dr^o Lin Chau Ming, por dedicarem seu precioso tempo na leitura desse trabalho.

À Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em especial, à Prof^a Suselei de Castro França, por me receber de portas abertas para desenvolver meu projeto de Doutorado.

A todos os funcionários e professores da UNAERP pelo auxílio e por me receberem tão calorosamente.

À UNESP por me dar a chance de crescer profissionalmente e confiar no meu trabalho.

À FAPESP pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 A espécie <i>Cochlospermum regium</i>	06
2.2.1 Taxonomia e habitat.....	06
2.2.2 Etnobotânica e etnofarmacologia.....	07
2.2.3 Estudos Agronômicos.....	08
2.2.4 Fitoquímica.....	10
2.2.5 Farmacologia.....	10
2.2.6 Atividade antimicrobiana.....	11
2.3 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais.....	12
2.4 Caracterização química de plantas medicinais.....	12
2.5 Fatores que interferem na pesquisa com plantas medicinais nativas não domesticadas.....	14
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. HIPÓTESE.....	17
CAPÍTULO I. TESTE DE TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM PLANTAS MEDICINAIS: UTILIZAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS.....	18
1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Dados Gerais.....	19
3.2 Material vegetal.....	20

SUMÁRIO

	Página
3.3 Preparo das drogas vegetais.....	21
3.4 Preparo dos extratos aquosos.....	22
3.5 Preparo dos extratos hidroalcólicos.....	22
3.6 Isolamento da maitenina e netzalcoieno.....	23
3.7 Triagem para atividade antimicrobiana (STAMP: <i>Screening test for antibiotics in medicinal plants</i>).....	23
3.8 Concentração inibitória mínima (CIM).....	25
3.9 Análise estatística.....	26
4. Resultados e Discussão.....	26
5. Conclusão.....	34
CAPÍTULO II: INFLUÊNCIAS DA SAZONALIDADE, ESTÁDIO FENOLÓGICO, LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, SUBSTRATO DE CULTIVO E IDADE DE PLANTAS DE <i>Cochlospermum regium</i> NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE RAÍZES E INTERAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO SOLO COM A ATIVIDADE OBTIDA.....	36
1. Introdução.....	36
2. Objetivos.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. Material e Métodos.....	38
3.1 Condições gerais.....	38
3.2 Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de <i>C. regium</i>	39
3.3 Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de <i>C. regium</i>	39
3.4 Efeito da localização geográfica dos indivíduos de <i>C. regium</i> na atividade antimicrobiana.....	39
3.5 Efeito da idade e substrato de cultivo de plantas de <i>C. regium</i> na atividade antimicrobiana.....	39
3.6 Interação dos constituintes do solo x atividade biológica de raízes de <i>C. regium</i>	40
4. Resultados e Discussão.....	40

SUMÁRIO

	Página
4.1 Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de <i>C. regium</i>	40
4.2 Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de <i>C. regium</i>	45
4.3 Efeito da localização dos indivíduos de <i>C. regium</i> na atividade antimicrobiana.....	48
4.4 Influência da idade da planta e substrato na atividade farmacológica de <i>C. regium</i> .	53
4.5 Interação dos constituintes do solo <i>x</i> atividade biológica de raízes de <i>C. regium</i>	55
5. Conclusões.....	57
CAPÍTULO III. ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE RAÍZES DE <i>Cochlospermum regium</i>	58
1. Introdução.....	58
2. Objetivos.....	59
2.1 Objetivo Geral.....	59
2.2 Objetivos Específicos.....	59
3. Material e Métodos.....	59
3.1 Preparo da amostra e do extrato.....	59
3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato acetato de etila (EAE).....	60
3.3 Bioautografia.....	61
3.4 Bioautografia do extrato acetato de etila (EAE) obtido da partição.....	61
3.5 Fracionamento em coluna do extrato acetato de etila (EAE) obtido da partição.....	62
3.6 Análise da fração ativa F1 (8:2 acetato de etila: metanol) em CG-EM.....	63
3.7 Otimização das condições cromatográficas em camada delgada da fração ativa F1..	64
3.8 Otimização da quantidade de massa aplicada na CCD para bioautografia da fração ativa F1.....	65
3.9 Partição da fração ativa F1.....	65
3.10 Purificação da fração aquosa ativa obtida da fração F1 por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).....	66
3.11 Identificação dos flavonóides isolados por CLAE preparativo.....	67
3.12 Concentração inibitória mínima (CIM) da substância Diidrokaempferol-3-O- β - glicopiranosideo.....	67

SUMÁRIO

	Página
4. Resultados e Discussão.....	68
4.1 STAMP da partição 1.....	68
4.2 Bioautografia da partição acetato de etila (EAE).....	70
4.3 Fracionamento em coluna da partição acetato de etila (EAE).....	71
4.4 Análise da fração ativa F1 em CG-EM.....	72
4.5 Identificação dos flavonóides isolados por HPLC preparativo.....	75
4.5.1 Identificação estrutural da substância Diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosideo (1).....	75
4.5.2 Identificação estrutural da substância Diidroquercetina-3-O- β -glicopiranosideo (2).....	76
4.6 Concentração inibitória mínima (CIM) da substância Diidrokaempferol-3-O- β - glicopiranosideo.....	77
5. Conclusão.....	77
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Modo de uso e indicação terapêutica de <i>C. regium</i> por estados brasileiros.....	08
Tabela 2: Lista de espécies vegetais, órgãos de plantas e massa de droga vegetal utilizadas nos poços.....	22
Tabela 3: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).....	27
Tabela 4: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a <i>Candida albicans</i> . Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).....	28
Tabela 5: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a <i>Candida parapsilosis</i> . Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).....	29
Tabela 6: Atividade das drogas vegetais frente a <i>Staphylococcus aureus</i> em meio de cultura Mueller Hinton com pH ajustado para 9,0. Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).....	30
Tabela 7: Espécies identificadas como tendo atividade antimicrobiana de acordo com a droga vegetal e extrato hidroalcolico utilizado.....	31
Tabela 8: Atividade antimicrobiana obtida através da concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos triterpenos quinonametídeos isolados de raízes de <i>Peritassa campestris</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	32
Tabela 9: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas no município de Altinópolis (SP) frente a <i>Candida albicans</i>	43
Tabela 10: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas no município de Rifaina (SP) frente a <i>Candida albicans</i> ..	43

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 11: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas no município de Sacramento (MG) frente a <i>Candida albicans</i>	44
Tabela 12: Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas no município de Altinópolis (SP) frente a <i>Candida albicans</i>	47
Tabela 13: Efeito da localização geográfica na atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas nos municípios de Rifaina (SP), Altinópolis (SP), Sacramento (MG), Campo Alegre do Goiás (GO) e Tereno (MS) frente a <i>Candida albicans</i>	49
Tabela 14: Dados meteorológicos referentes aos meses e locais de coleta de plantas de <i>Cochlospermum regium</i> obtidos das estações automáticas do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (http://www.inmet.gov.br). Médias mensais de temperatura (° C), umidade relativa (UR%) e precipitação (mm).....	49
Tabela 15: Atividade antimicrobiana da droga vegetal de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> coletadas em diferentes localizações geográficas mostrando a atividade fungistática de alguns indivíduos e partes de raízes.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Planta de <i>Cochlospermum regium</i> . (A) No habitat natural. (B) Detalhes da flor. (C) Florescimento ao nível do solo após queimada.....	07
Figura 2: Etapas do método STAMP: (A) Preparo da ponteira de plástico para armazenar as drogas vegetais e extratos aquosos (pastoso) e hidroalcóolicos liofilizados. (B) introdução da amostra no interior da ponteira. (C) Fechamento da ponteira com papel alumínio. (D) inoculação do microrganismo utilizando <i>swab</i> estéril. (E e F) abertura de poços de 6 mm, utilizando ponteiras de plástico. (G e H) introdução da amostra no poço.....	25
Figura 3: Atividade antifúngica de diferentes preparações de <i>Cochlospermum regium</i> contra <i>Candida albicans</i> em meio de cultura Mueller Hinton com pH 7,6.....	30
Figura 4: Proporção de espécies de plantas com atividade antimicrobiana, entre todas as espécies avaliadas, de acordo com diferentes microrganismos e origem da amostra.....	31
Figura 5: Cromatograma do extrato hidroalcóolico de raiz de <i>Peritassa campestris</i> obtido por CLAE-DAD. Identificação dos picos: maitenina (1) e netzalcoieno (2).....	32
Figura 6: Raiz de <i>Cochlospermum regium</i> coletada em habitat natural (A) e partes da raiz: casca, entrecasca e cerne (B).....	42
Figura 7: Atividade antimicrobiana de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> frente a <i>Candida albicans</i> cultivadas em areia e solo+esterco coletadas com diferentes idades.....	53
Figura 8: Valor médio da atividade fungistática (mm) de raízes de <i>Cochlospermum regium</i> (A) cultivadas em solo+esterco com 9 meses, (B) cultivadas em areia por 4 meses e (C) atividade fungicida de plantas de <i>Cochlospermum regium</i> cultivadas em areia por 12 meses.....	54
Figura 9: (A) Florescimento de plântulas de <i>Cochlospermum regium</i> mantidas areia com 4 meses; (B) Plantas de <i>Cochlospermum regium</i> cultivadas em areia com sintomas de deficiência nutricional e senescência; (C) Florescimento de plantas de <i>Cochlospermum regium</i> mantidas em solo+esterco com 9 meses e (D) plantas cultivadas em solo+esterco com razão raiz: parte aérea menor.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 10: Correlação entre a atividade biológica e análise de solo nas populações de <i>Cochlospermum regium</i>	56
Figura 11: Análise de componentes principais (ACP) de cinco populações de <i>Cochlospermum regium</i>	57
Figura 12: Partição do extrato hidroalcoólico bruto de raízes de <i>Cochlospermum regium</i>	60
Figura 13: Bioautografia, frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 1023, das 12 frações obtidas a partir do extrato acetato de etila (EAE) submetido a cromatografia em coluna.....	63
Figura 14: Partição da fração F1 (8:2 acetato de etila: metanol) oriunda do extrato acetato de etila (EAE) de raízes de <i>Cochlospermum regium</i>	66
Figura 15: Valor médio da atividade antimicrobiana medidas em halo de inibição (mm): (A) da droga vegetal da raiz de <i>Cochlospermum regium</i> coletada em Altinópolis (A6), (B) do extrato hidroalcoólico liofilizado (EtOH:H ₂ O), (C) da partição hexano (Hex), (D) diclorometano (DCM), (E) acetato de etila (EAE) e (F) aquosa (FAQ).....	69
Figura 16: Atividade antimicrobiana medidas em halo de inibição (mm) da droga vegetal da raiz de <i>Cochlospermum regium</i> coletada em Altinópolis (A6), do extrato hidroalcoólico liofilizado (EtOH:H ₂ O) e das frações hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOET), aquosa (H ₂ O) e do antibiótico fluconazol a 1 mg g ⁻¹	69
Figura 17: Bioautografia da partição acetato de etila (EAE - partição 1) na concentração de 10 mg mL ⁻¹ aplicadas nos volumes de 2, 4, 6 e 8 µL e eluídas em (A) BAW, (B) metanol:acetato de etila (1:1) e (C) clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8), frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	70
Figura 18: Bioautografia da partição acetato de etila (EAE - partição 1) na concentração de 30, 20, 15 e 12 mg mL ⁻¹ aplicadas no volume 6 µL e eluídas em (A) metanol:acetato de etila (6:4) e (B) BAW, frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	71
Figura 19: Atividade antimicrobiana obtida da fração F1 (1 mg mL ⁻¹ , 10 µL) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 através da bioautografia.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 20: Cromatograma obtido pela análise em CG-EM da fração F1.....	73
Figura 21: Expansão do cromatograma e espectro de massas do pico em t=16,27 minutos, obtidos após análise em CG-EM da fração F1.....	73
Figura 22: Espectro de massas da substância eluída (fração F1) no t=16,27 minutos, comparado com o banco de dados.....	74
Figura 23: Estrutura química do ácido gálico.....	74
Figura 24: Estrutura química do Diidrokaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo.....	76
Figura 25: Estrutura química da Diidroquercetina-3-O-β-glicopiranosídeo.....	77

**FATORES AMBIENTAIS E FENOLÓGICOS NA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E PRODUÇÃO DE ATIVOS EM *Cochlospermum regium*
(SCHRANK) PILG.**

Autora: Eng^a. Agr^a. Marielle Cascaes Inácio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni

RESUMO

A espécie *Cochlospermum regium* foi selecionada por apresentar importantes propriedades terapêuticas relacionadas a infecções do sistema reprodutivo feminino, relatadas em levantamentos etnofarmacológicos. Entretanto, alguns estudos realizados com microorganismos *in vitro* são contraditórios. Este fato pode estar relacionado a fatores ambientais e fenológicos referentes ao cultivo da planta, a forma de preparação dos extratos e/ou também ao microrganismo alvo. No presente trabalho foram avaliadas a atividade antimicrobiana em raízes de plantas de *C. regium* coletadas em diversas localidades, estádios fenológicos, idade da planta e condições de sazonalidade. Para realização destes testes antimicrobianos foi desenvolvida uma metodologia a qual utiliza diretamente a droga vegetal sem a necessidade prévia de preparação de extratos (STAMP). Além disso, foram realizados estudos fitoquímicos biomonitorados através da bioautografia. Quanto ao STAMP, constatou-se que este é eficiente para avaliar drogas vegetais principalmente com atividade antifúngica. Com relação aos testes que avaliaram o efeito ambiental e fenológico sobre a atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*, foi verificado que, apesar de a planta apresentar atividade antimicrobiana em todas as condições avaliadas, foi possível observar que as raízes coletadas no outono e inverno apresentaram maior inibição frente a *C. albicans*, além disso, a idade da planta e substrato de cultivo, também interferem nesta resposta biológica. Desta maneira, para utilização de extratos desta planta contra essa doença infecciosa causada por *C. albicans*, recomenda-se a coleta de plantas no outono e inverno. Também foi possível observar que a entrecasca e cerne da raiz são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana. Os estudos fitoquímicos, realizados a partir do extrato hidroalcoólico (80%), mostraram que os compostos ativos são de média polaridade, pois a maior atividade foi obtida nas frações de

partições de acetato de etila. O ácido gálico foi o composto encontrado como sendo o majoritário nesta fração em CG-MS. Em CLAE foram isolados dois flavonoides: diidrokaempferol-3-O- β -D-glicopiranosideo e diidroquercetina-3-O- β -D-glicopiranosideo, entretanto, foi verificado que o diidrokaempferol-3-O- β -D-glicopiranosideo não é ativo frente a *C. albicans*. Os dados obtidos neste trabalho permitem inferir que os ativos da raiz de *C. regium* são constitutivos e somente a concentração destes é afetada pelas condições ambientais. Estes resultados são condizentes com os estudos etnofarmacológicos e as divergências existentes na literatura sobre a sua atividade antimicrobiana *in vitro* se devem, possivelmente, à utilização de microorganismos não específicos para infecções vaginais. O presente trabalho é o primeiro que avalia a ação antimicrobiana de extratos de *C. regium* frente à levedura *C. albicans*, que é o microrganismo que mais causa infecções vaginais em mulheres de todo o mundo.

PALAVRAS-CHAVE: STAMP, atividade antimicrobiana, algodãozinho-do-campo, bioautografia, Bixaceae.

ENVIROMENTAL AND PHENOLOGICAL FACTORS ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PRODUCTION ACTIVES IN *Cochlospermum regium* (SCHRANK) PILG. Botucatu, 2013. 107p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Marielle Cascaes Inácio

Adviser: Ana Maria Soares Pereira

Co-advisor: Bianca Waléria Bertoni

SUMMARY

Cochlospermum regium was selected because it has important therapeutic properties related to infections of female reproductive system, which is reported in ethnopharmacological studies. However, some studies with microorganisms *in vitro* using this plant are contradictory. This fact could be related to environmental or phenological factors relating to the cultivation of the plant, how to prepare the extracts and/or also the target organism. In this study has been evaluated the antimicrobial activity of *C. regium* roots collected in different localities, growth stages, plant age and seasonal conditions. To conduct these antimicrobials tests, a methodology has developed which uses the powered plant directly without prior preparation of extracts (STAMP). In addition, biomonitored phytochemical analysis were performed by bioautography assays. Regarding STAMP method, it was efficient for evaluating powered plant mainly with antifungal activity. The tests that evaluated the environmental and phenological effects on the antimicrobial activity of *C. regium* roots showed that despite the plant antimicrobial activity occur in all conditions evaluated, it has observed that the roots collected in autumn and winter showed greater inhibition against *C. albicans*. Furthermore, the age of the plant and the substrate of culture also affect the biological response. Thus, we recommend collecting plants in autumn and winter to use against infectious disease caused by *C. albicans*. It has also observed that both inner bark and root cern are the main responsible for the antimicrobial activity. The phytochemical studies, carried out from the hydroalcoholic extract (80%), showed that the active compounds are of medium polarity, since the highest activity has obtained in the ethyl acetate fraction. Gallic acid was found to be the majority compound

in this fraction from GC-MS. Two flavonoids have isolated in HPLC: diidrokaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside and diidroquercetin-3-O- β -D-glucopyranoside. However, the diidrokaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside is not active against *C. albicans*. The data obtained in this study allow us to conclude that the active compounds of *C. regium* roots are constitutive, and just the concentration of these is affected by environmental conditions. These results are consistent with the ethnopharmacological studies, and the differences found in studies on their *in vitro* antimicrobial activity are possibly due the use of non-specific microorganisms to vaginal infections. This is the first study to evaluate the antimicrobial activity of *C. regium* extracts against the yeast *C. albicans*, which causes more vaginal infections in women of world wide.

Keywords: STAMP, antimicrobial activity, algodãozinho-do-campo, bioautography, Bixaceae.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cochlospermum regium* é uma espécie medicinal nativa do Cerrado muito utilizada pela população para tratamento de infecções, principalmente do sistema reprodutor feminino.

Estudos farmacológicos, químicos e agrônômicos desta espécie estão aumentando a cada ano, mas ainda são escassos. Dentre esses estudos, os de ensaio antimicrobiano são inconclusivos e contraditórios. Esta falta de reprodutibilidade da atividade pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles, os ambientais, que poderiam alterar quantitativamente ou qualitativamente a composição química das plantas e também o microrganismo alvo, uma vez que esta espécie é utilizada para o tratamento de infecções do sistema reprodutor feminino e até o momento não foi avaliado nenhum microrganismo específico para este tipo de infecção.

Desta forma, é importante que se averigüe as possíveis causas das incoerências, considerando que a espécie *Cochlospermum regium* está submetida a erosão genética, uma vez que, as áreas de Cerrado têm sido reduzidas a cada ano.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar diversos efeitos ambientais e fenológicos que podem estar interferindo na atividade antimicrobiana da espécie, bem como identificar os princípios ativos responsáveis pela mesma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie *Cochlospermum regium*

2.2.1 Taxonomia e *habitat*

Domínio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Ordem: Malvales Juss.

Família: Bixaceae Kunth

Gênero: *Cochlospermum* Kunth

Nome botânico: *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2013).

Cochlospermum regium é uma espécie nativa do Cerrado conhecida popularmente por algodãozinho-do-campo ou algodãozinho-do-Cerrado (Figura 1). Geralmente é encontrada em locais que sofreram influências antrópicas, como beira de estradas, ferrovias, entre outras. Uma característica única da espécie *C. regium*, dentre as espécies do gênero, é a sua plasticidade em relação à floração. As flores aparecem na parte apical do ramo do ano, o qual, geralmente, está desfolhado na época. Quando o ramo do ano é destruído, pelos incêndios, por exemplo, que são bastante frequentes no Cerrado, as

flores surgem ao nível do solo a partir do xilopódio (Figura 1C), de onde também saem os ramos. Esta característica colabora para que a espécie se adapte às intempéries da natureza e às ações antrópicas (POPPENDIECK, 1981).



Figura 1: Planta de *Cochlospermum regium*. (A) No *habitat* natural. (B) Detalhes da flor. (C) Florescimento ao nível do solo após queimada.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Etnobotânica e etnofarmacologia

Cochlospermum regium é bastante utilizada na medicina popular e suas raízes são comercializadas por raizeiros em todo bioma do Cerrado. Nunes et al. (2003) realizaram levantamento de espécies comercializadas por raizeiros nos anos de 1992 e 2002 e dentre estas espécies (32), verificaram que o *C. regium* foi a 5^a e 6^a mais citada pelos comerciantes. Dentre suas inúmeras utilizações pela medicina popular, dá-se importância, principalmente, à utilização contra infecções do sistema reprodutor feminino (Tabela 1).

Tabela 1: Modo de uso e indicação terapêutica de *C. regium* por estados brasileiros.

Estados	Órgão utilizado	Formas de uso	Indicação terapêutica	Referências
Tocantins	*	*	Dores de cabeça	Rodrigues e Carlini (2005)
Mato Grosso	Raiz	Chá, garrafada	Inflamação em geral, problema de próstata e pneumonia	Moreira e Guarim-Neto (2009)
Goiás	Xilopódio	Chá, garrafada ou pó	Infecções ginecológicas, gastrite e úlcera gástrica	Tresvenzol et al. (2006)
Goiás	*	*	Infecção gástrica	Carvalho (2004)
Mato Grosso do Sul	Raiz	*	Colesterol, feridas internas e externas, laxante, depurativo do sangue, inflamação da pele, útero, ovário e próstata	Nunes et al. (2003)
Mato Grosso	Casca (*)	Chá	Depurativo do sangue	Guarim-Neto (2006)
Goiás	*	*	Inflamações uterinas, vias urinárias, diarreia	Souza e Felfili (2006)
Mato Grosso	Rizóforo	Decocto, chá	Infecções, inflamações, corrimentos, depurativo	Souza e Felfili (2006)
Mato Grosso	Folha	Chá	Cálculo renal, úlcera	Sangalli et al. (2002)
Mato Grosso	Raiz	Chá	Inflamação do útero e dos ovários	Pasa (2011)
Minas Gerais	Raiz	Vinho medicinal	Afecções uterinas	Alves e Povh (2013)
Mato Grosso	Raiz	Chá	Inflamação do útero e ovários	Souza et al. (2010)
Mato Grosso	Raiz	Chá	Inflamação do útero e ovários	Pasa et al. (2011)
Mato Grosso	Raiz e folha	Banho	Leucorréia	Macedo et al. (2011)

* Não há especificações

2.2.3 Estudos Agronômicos

Sementes de *C. regium* apresentam tegumento duro o que dificulta a permeabilidade da água conferindo-lhe a condição de dormência. Segundo Kirizawa (1981), a semente desta espécie é constituída também, por uma camada paliçádica resistente na parte mais externa do tegumento revestida por uma camada delgada, que se removida através de escarificação permite a embebição normalmente.

A superação da dormência de sementes de *C. regium* já foi avaliada por Sales et al. (2002), Camillo (2008) e Inácio et al. (2010). Esta foi conseguida através da escarificação química com ácido sulfúrico por períodos de 90, 150 e 140 minutos resultando em até 80% de germinação em papel umedecido ou *in vitro*. Além disso, Inácio et al. (2010) realizaram uma classificação quanto ao tamanho das sementes e as proporções entre a parte aérea e o sistema radicular de *C. regium*. Em se tratando de armazenamento das sementes de *C. regium*, Camillo (2008) verificou que sementes com 7,9% de umidade e mantidas em temperatura sub-zero (-20 °C) pode ser uma alternativa para conservação *ex situ* da espécie, garantindo característica ortodoxa para estas sementes.

O melhor substrato para germinação e desenvolvimento das plântulas de *C. regium* foi avaliado por Viu et al. (2007) e Coelho et al. (2008). O substrato comercial vermiculita foi o mais eficiente em promover a germinação e maior altura de plântulas. Segundo estes autores, isso ocorreu devido às propriedades físicas do mesmo, que proporciona grande porosidade, aeração e boa capacidade de retenção de água. O maior número de folhas foi conseguido em substratos contendo solo de Cerrado+esterco (7:3) e solo de Cerrado+esterco+areia (1:1:1) com uma média de até 5 folhas por plântula ao final de 28 dias. Além de condições a campo, Coelho et al. (2008) verificaram em laboratório que a resposta de germinação foi semelhante, não diferindo estatisticamente, nos substratos papel toalha, papel mata borrão, vermiculita, palha de arroz carbonizada, terra preta, areia, solo de Cerrado e a mistura de todos os substratos.

A luminosidade e a temperatura exercem influência sobre a germinação das sementes de *C. regium* e os melhores resultados são obtidos no escuro, vermelho e vermelho-extremo (81,2%, 90,7% e 74,7% respectivamente) e em temperatura de 25 °C, obtendo-se até 90% de sementes germinadas com Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de 2,6 (SALES, 2001).

Um protocolo de micropropagação foi desenvolvido para esta espécie por Inácio et al. (2011). Os autores relatam que a multiplicação desta espécie *in vitro* ocorre mais eficientemente utilizando-se gemas apicais como fonte de explante em um meio de cultivo MS sem a utilização de reguladores vegetais. Além disso, o enraizamento das microestacas é mais eficiente quando estas são transferidas para condições *ex vitro*. Em se tratando de conservação, sob condição *in vitro*, Camillo et al. (2009) estabeleceram crescimento mínimo de explantes de *C. regium* em meio de cultura

WPM (½) a uma temperatura de 20 °C e Inácio et al. (2011) demonstraram que a temperatura de 15 °C também é eficiente quando se utilizam reguladores osmóticos.

2.2.4 Fitoquímica

Pouco se sabe sobre a composição química da espécie *Cochlospermum regium*. Em 1996, Lima e colaboradores isolaram uma flavonona glicosilada denominada Dihidrokaenferol 3-O-glucopiranoside (C₂₁H₂₂O₁₁). Segundo Ritto (1996) foram isolados da raiz dessa espécie, flavonóides e o ácido graxo 1-hidroxitetradecanona-3. Sólón et al. (2012) verificaram que a fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico de raízes de *C. regium* continha ácido elágico, ácido gálico, dihidrokaenferol, dihidrokaenferol 3-O-glucopiranoside, dihidrokaenferol-3-O-β-(6''-galloil)-glucopiranoside, pinoresinol, excelsina e os triacilbenzenos cochlospermina A e B.

Honda et al. (1997), analisando o óleo essencial de raízes de *C. regium*, por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, encontraram as seguintes substâncias: 34,1% β-selineno, sendo o mais frequente, 5,4% de elemeno, 4,8% de trans-cariofileno, 3,4% de α-pineno, 2,8% de α-humuleno, 2,1% de aromadandreno, 1,2% de α-selineno, 0,8% de δ-cadineno, além de outros compostos não identificados que resultaram em 45,4% do rendimento total do óleo. Segundo estes autores, as raízes de *C. regium* produzem 0,24% de óleo essencial.

2.2.5 Farmacologia

Do ponto de vista farmacológico, os extratos liofilizados de raízes de *C. regium* não apresentam toxicidade aguda quando administrados via oral (RITTO, 1996).

O teste de Ames realizado em *Salmonella typhimurium* com extrato de *C. regium* mediu a mutagênese bacteriana pelo número de células revertentes para a prototrofia de histidina e os resultados mostraram que o extrato liofilizado de raiz, nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 g.mL⁻¹, não exibiu atividade mutagênica (LIMA, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Nunes e Carvalho (2003), os quais verificaram que extrato aquoso de raiz liofilizado nas concentrações 13, 19 e 25 g.L⁻¹ não mostraram atividade mutagênica nem direta nem indiretamente sobre larvas de

Drosophila melanogaster pelo teste RXL (ring-X loss) que detecta a perda total do cromossomo X e a perda parcial do cromossomo Y.

Outro estudo realizado a partir de teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos, com extrato aquoso liofilizado de raiz de *C. regium*, mostrou que não ocorreu modificação do DNA celular, não apresentando assim, efeito antimutagênico (ANDRADE et al., 2008). Em contrapartida, trabalho realizado por Castro et al. (2004) mostrou que o extrato aquoso de raiz de *C. regium* liofilizado apresentou atividade mutagênica e citotóxica em eritrócitos de medula óssea de camundongos. Segundo os autores, esses efeitos são devidos à presença de flavonóides e taninos.

Castro (2000) estudou o efeito antinociceptivo do 3-O-glicosildihidrocanferol extraído de raízes de *C. regium* e postulou que esta ação não ocorre por bloqueio da pirenzepina e L-arginina e também, não interfere na síntese de óxido nítrico, mostrando que o mecanismo de ação da droga ocorre de modo diferente dos mecanismos clássicos, sendo desta forma, relevante o desenvolvimento de estudos mais aprofundados sobre essa substância para o desenvolvimento de drogas analgésicas.

Segundo Ritto (1996), o extrato liofilizado de raízes de *C. regium* inibe lesão gástrica induzida por indometacina e não apresenta atividade antiedematogênica.

O efeito do extrato hidroalcoólico de raízes de *C. regium* também foi avaliado quanto ao seu efeito tóxico em embriões de ratas grávidas por Cunha-Laura et al. (2013). Os autores verificaram que, numa dose de 11,5 mg/kg/dia, administrado em ratas com 6 a 15 dias de gestação, o extrato hidroalcoólico não é tóxico para a rata grávida, mas, pode eventualmente interferir no progresso do desenvolvimento embriofetal.

2.2.6 Atividade antimicrobiana

Dentre os poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana da espécie *Cochlospermum regium*, estes são somente sobre atividade antibacteriana.

Os extratos hexânico, hidroalcoólico, acetato de etila, N-butanol, decoctos da raiz preparados conforme utilizado na medicina popular (12, 24 e 60 g L⁻¹) e também a flavanona 3-O-glicosildihidrocanferol foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana por Oliveira et al. (1996). Estes autores concluíram que o extrato hexânico e acetato de etila apresentaram atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia*

coli; o extrato butanólico mostrou efeito somente contra *S. aureus* e a flavanona 3-O-glicosildihidrocanferol e o decocto não apresentaram atividade frente as linhagens avaliadas. Segundo Inácio (2010), o decocto também não apresentou efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sólón et al. (2012) constataram que o extrato hidroalcoólico da raiz e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica, derivadas deste extrato, apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Segundo Honda et al. (1997), o óleo essencial de raízes de *C. regium* também apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus* (MIC= 1,5mg mL⁻¹) e *Salmonella typhimurium* (MIC= 5mg mL⁻¹).

2.3 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais

Os microorganismos patogênicos estão cada vez mais resistentes a medicamentos convencionais devido a inúmeros fatores, tais como: a má alimentação da população em geral, o aumento da poluição ambiental nos últimos anos, o incontrolado uso de antibióticos sintéticos e a automedicação (TAVARES, 2000; SOUZA et al., 2005; SOUZA, 2009). Dessa forma, a comunidade científica vem buscando o auxílio das plantas medicinais como fonte de substâncias, isoladas ou em complexos, que seja capaz de controlar infecções.

No Brasil, estudos com a mesma finalidade são de grande importância, considerando que é um país com imensa desigualdade social, onde poucas pessoas têm acesso a medicamentos sintéticos de alto custo. Além disso, as plantas medicinais já são utilizadas em diversas áreas da saúde como forma complementar para tratamentos de doenças infecciosas causadas por fungos, leveduras e bactérias (DUARTE et al., 2004).

Especificamente plantas de Cerrado, atualmente, são muito estudadas e estão apresentando respostas surpreendentes quanto à atividade antimicrobiana devido ao enorme arsenal químico existente, bem como pelas substâncias únicas e exclusivas presentes nas mesmas (AYRES et al., 2008; SILVA JUNIOR et al., 2009; ZATTA et al., 2009; DUTRA et al., 2009; DEUS et al., 2009; INÁCIO, 2010).

2.4 Caracterização química de plantas medicinais

Ao se estudar planta com propriedades terapêuticas é imprescindível que se conheça a composição química das mesmas e trabalhos relacionados à fitoquímica estão sendo intensificados com plantas de diversos biomas do Brasil (FONSECA e LIBRANDI, 2008; REGASINI et al., 2008; SOUZA et al., 2008; COSTA et al., 2009)

Devido à alta demanda pelo conhecimento da composição química das plantas, inúmeras técnicas para obtenção de *fingerprintings* estão sendo desenvolvidas. Além disso, métodos modernos e refinados de purificação de compostos estão surgindo muito rapidamente, utilizando quantidades mínimas de amostra, o que tem permitido, num curto espaço de tempo, identificar grande quantidade de moléculas (SCHORR e DA COSTA, 2003; CARVALHO et al., 2008; JUSTO e SCARMINIO, 2008). Mais recentemente, surgiu o termo chamado desreplicação, o qual vem sendo muito utilizado para estudos de metaboloma. Este objetiva fazer uma triagem dos metabólitos secundários de uma planta a partir de seu extrato bruto, sem que haja a necessidade de fracionamento e isolamento de substâncias. Os estudos que utilizam a desreplicação envolvem a utilização de técnicas cromatográficas hífenadas, geralmente, com espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear e tem trazido grandes resultados para os estudos fitoquímicos de plantas (ADHAMI et al., 2013; JOHANSEN et al., 2013; MUSHARRAF et al., 2013; PILON et al., 2013).

Entretanto, mais frequentemente, na realização de um estudo fitoquímico, basicamente, quatro passos estão envolvidos (BANDEIRA, 2004): 1) A coleta do vegetal, que está relacionada a fatores tais quais, parte da planta que produz o ativo, o estágio vegetativo, a hora da coleta, entre outros; 2) A preparação do material vegetal, envolvendo fatores como secagem (materiais frescos podem ter componentes específicos e secos apresentam estabilidade química) e a moagem; 3) A preparação da amostra que implica na extração (leva-se em consideração a granulometria do material, polaridade do solvente, tempo de extração, etc), a concentração (destilação de solventes) e a remoção dos interferentes (lignina, celulose, pectina, etc) e 4) A análise instrumental por fim, que engloba a análise qualitativa (podem ser realizadas pelas cromatografias), o fracionamento (por partições, por exemplo), a purificação (pela cromatografia preparativa) e enfim a análise quantitativa das substâncias ativas de interesse.

Muitas pesquisas baseadas nas caracterizações químicas de plantas utilizam estes passos com grande sucesso na descoberta de novas substâncias ou

complexos ativos e também para conhecimento do metabolismo secundário da espécie em estudo quando não se tem dados desta natureza na literatura (ZUCOLOTTO et al., 2006; HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; MANIGAUHA et al., 2009; LAGO e ROQUE, 2009; CANUTO et al., 2010).

2.5 Fatores que interferem na pesquisa com plantas medicinais nativas não domesticadas

Muitas são as barreiras existentes quando trabalha-se com plantas medicinais nativas ou não domesticadas. As diferentes condições em que a planta se encontra, por exemplo, são comumente fatores que interferem na composição dos metabólitos secundários da mesma. O estágio vegetativo, a sazonalidade, a forma e hora de colheita são fatores agrônômicos que estão diretamente ligados na qualidade e quantidade de substâncias bioativas presente nas plantas medicinais, e, conseqüentemente, no efeito biológico que estas apresentam. Além disso, existem os genótipos os quais também podem apresentar atividades farmacológicas diversas (SCHLAG e MCINTOSH, 2006; FACHINETTO e TEDESCO, 2009; MORAIS, 2009; MACK et al., 2009).

Além dos fatores agrônômicos existem aspectos físicos que também interferem na qualidade da produção do fitoterápico como, por exemplo, a forma de secagem e moagem do material vegetal. Outro aspecto importante está relacionado à extração dos princípios ativos, que envolvem a escolha do solvente, a forma de preparação do extrato (infusos, maceração estática, etc) e a solubilidade dos compostos de interesse. Solventes com polaridades diferentes têm afinidade com moléculas ativas diferentes. Da mesma maneira, um extrato aquoso preparado em forma de decocção ou em infusão, pode responder diferentemente aos ensaios biológicos (PEITZ et al., 2003; BANDEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2008; LI e VEDERAS, 2009; MORAIS, 2009).

A variabilidade genética encontrada em plantas medicinais não domesticadas também é uma dificuldade quando considera-se a produção de metabólitos secundários de interesse. O ambiente irá interferir na biossíntese de substâncias dos diferentes genótipos e a composição química de um extrato poderá não ser a mesma dependendo das condições em que a planta se encontrava no momento da coleta. Assim, a não domesticação destas espécies resultará em matérias-prima não uniformes e de baixa

qualidade (PICHERSKY e GANG, 2000; BOURGAUD et al., 2001; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; BOTREL et al., 2009).

Quanto ao desenvolvimento industrial de um fitoterápico, considerando o *screening* de compostos ativos em plantas medicinais a ser explorado pela indústria de medicamento, três situações devem ser evitadas: o isolamento de substâncias puras a partir de misturas complexas, o que é dispendioso e requer muito tempo de trabalho, a produção de extratos brutos que apresentem dificuldade de solubilização e o trabalho com espécies cujo suprimento vegetal é escasso (LI e VEDERAS, 2009). Além disso, é preciso considerar que extratos de plantas e compostos isolados não são patenteáveis e a obtenção de um produto que gere patente para a indústria e/ou para a universidade se torna mais viável quando são realizadas associações de compostos advindos de diferentes espécies, com incremento de determinados ativos, que ampliam o espectro e intensidade da atividade biológica alvo.

3. JUSTIFICATIVA

O acúmulo de conhecimento etnofarmacológico sobre *C. regium* consagrou a espécie como um fitoterápico, de uso popular, com ação antimicrobiana. No entanto, existem evidências que extratos desta planta, na forma como são utilizados pela população, nem sempre apresentam este efeito *in vitro*. Vários fatores podem explicar a variação na atividade biológica de uma planta destacando-se a presença de diferentes genótipos, a sazonalidade, as condições de estresse na qual a espécie está submetida, o estágio fenológico, a forma de preparo do extrato, entre outros.

O estabelecimento de condições de cultivo adequadas, a busca por genótipos potencialmente ativos nos locais de ocorrência natural da espécie e a determinação dos compostos ativos de *C. regium* serão de grande importância para estabelecer uma padronização da matéria prima vegetal o que garantirá a obtenção de fitoterápicos com qualidade e eficácia. Portanto, este trabalho visou buscar as possíveis explicações para a ausência da atividade *in vitro*, analisados através da influência ambiental e fenológica na atividade antimicrobiana da espécie, uma vez que a segurança e eficácia do fitoterápico dependerá da variação metabólica de ativos perante as diversas interações ambientais.

4. HIPÓTESE

Os fatores ambientais interferem na presença ou ausência da atividade antimicrobiana da espécie *Cochlospermum regium*.

Capítulo I. TESTE DE TRIAGEM PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM PLANTAS MEDICINAIS: UTILIZAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS

1. INTRODUÇÃO

Infecções por microrganismos multi-resistentes (MDR) é cada vez mais frequente (CARMONA et al., 2012) e o número de opções de antibióticos ativos atualmente disponível para tratar essas infecções é limitado (MIYASAKI et al., 2010). Além disso, as infecções associadas aos microrganismos formadores de biofilme aumentam exponencialmente (HARDING et al, 2009; DUNNE, 2002), ainda representando desafios para novas classes de compostos antifúngicos, como as echinocandinas, formulações lipídicas de anfotericina B (AMB) e os novos triazóis. De acordo com Coates et al, (2002), hoje em dia o problema principal é que não importa o quão potente é um novo composto antimicrobiano, a sua eficácia terapêutica será relativamente curta, devido à inevitável resistência desenvolvida pelos microrganismos.

É evidente que o desenvolvimento de antibióticos novos e eficazes com atividade contra organismos MDR é um desafio (BOUCHER et al., 2009). Em breve, pode-se não ter medicamentos disponíveis em nosso arsenal terapêutico para tratar estes microorganismos altamente resistentes. O estado atual de urgência tem motivado alguns pesquisadores a investigar uma abordagem inovadora para a inibição de microrganismos MDR a exemplo de extratos de plantas (MIYASAKI et al., 2010). Na verdade, muitas plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de infecções em todo o mundo (MARTIN e ERNST, 2003; ZAIDAN et al, 2005). Uma série de estudos *in vitro* relatam a

atividade antimicrobiana de extratos e vários ensaios clínicos foram realizados até à data (MARTIN e ERNST, 2003).

Há cerca de 350 mil espécies de plantas no mundo (PATON et al., 2008) e os métodos atuais de investigação fitoquímica e farmacológica não são suficientemente rápidos e eficientes para triar extratos com propriedades terapêuticas que possam atuar sobre as principais enfermidades que acometem a humanidade. Enquanto tudo isso está sendo discutido, muitas áreas estão sendo degradadas e muitas espécies estão sendo extintas, antes da triagem para averiguação das suas propriedades ativas. Assim, o desenvolvimento de novos métodos, acessíveis, de baixo custo, rápidos e simples para utilização em triagens para efeitos farmacológicos é altamente desejável, pois permitiria que todos os países do mundo, até mesmo os mais pobres, investigassem sua própria flora na busca de novos medicamentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método de triagem para atividade antimicrobiana de plantas medicinais utilizando diretamente a droga vegetal ao invés de extratos.

2.2 Objetivos específicos

1. Obter droga vegetal de diferentes espécies e órgãos de plantas;
2. Padronizar a densidade de cada droga vegetal a ser utilizada no ensaio;
3. Comparar a atividade antimicrobiana de drogas vegetais autoclavadas e não autoclavadas;
4. Produzir extratos das espécies alvo;
5. Comparar os resultados da atividade antimicrobiana obtida das drogas vegetais e dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e de substâncias isoladas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Dados Gerais

Reagentes e solventes: NaCl (Cloreto de sódio), etanol e diclorometano (todos de grau analítico) foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil), metanol (grau HPLC) JT Baker (EUA), ampicilina, anfotericina B, fluconazol, dimetil sulfóxido (grau HPLC), clorofórmio deuterado (CDCl_3 - 99,96% D) e RPMI-1640 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), sulfato de gentamicina foi obtido da Ourofino® (Ribeirão Preto, SP, Brasil), ágar bacteriológico, Sabouraud dextrose e Mueller-Hinton foram adquiridos da Himedia (Curitiba, PR, Brasil). Os microorganismos (todos ATCC) foram adquiridos da Fundação André Tosello (Campinas-SP, Brasil). Espectrofotômetro: Unico (EUA). Cromatógrafo: CLAE Shimadzu (Kyoto, Japão), LC-10-AVP equipado com um auto-injector SIL-10AF, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e uma coluna Phenomenex (Torrance, CA, EUA) Luna C18® coluna (250 x 4,6 mm i.d., com tamanho de partícula de 5 μm).

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas as seguintes espécies: *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae), *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. (Boraginaceae), *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae), *Physalis angulata* L. (Solanaceae), *Tinospora cordifolia* (Thunb.) Miers (Menispermaceae), *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), *Rapanea leuconeura* (Mart.) Mez. (Primulaceae, cinco genótipos diferentes: 5R1, 5R2, 5R3, 5R4 e SA10), *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. (Bixaceae), *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. (Myrtaceae) e *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C. Sm. (Celastraceae). Todas as plantas foram cultivadas em sistema orgânico a campo sem pesticidas ou fertilizantes químicos.

Estas espécies foram escolhidas com o intuito de representar diferentes famílias e gêneros, além de já terem atividade antimicrobiana confirmadas em serviço clínico na Farmácia da Natureza (www.terradeismael.com.br). Foram utilizadas raízes, entrecasca, parte aérea e casca de caule das diferentes plantas estudadas. Para a espécie *R. leuconeura* foram avaliados cinco diferentes genótipos (Tabela 2). Todas as espécies foram coletadas no município de Jardinópolis (São Paulo, Brasil - Latitude: 21°01'04", Longitude: 47°45'50", altitude: 590 m) em fevereiro de 2011. A espécie *P.*

campestris foi coletada de plantas mantidas em vasos, na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), no município de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil - Latitude: 21°10'40", Longitude: 47°48'36", altitude: 544 m).

Exsicatas dessas plantas foram depositadas no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) com os seguintes Vouchers: *O. gratissimum* (HPMU 1329), *O. basilicum* (HPMU 1455), *O. selloi* (HPMU 1456), *C. curassavica* (HPMU 1457), *P. angulata* (HPMU 1458), *T. cordifolia* (HPMU 1459), *B. dracunculifolia* (HPMU 1460), *B. trimera* (HPMU 1426), *L. sidoides* (HPMU 1461), *R. leuconeura* (HPMU 1462), *C. regium* (HPMU 1463), *E. puniceifolia* (HPMU 1464) e *P. campestris* (HPMU 1414).

Para confirmar a eficácia do método que utiliza a droga vegetal, os dados obtidos foram comparados com o extrato aquoso e hidroalcoólico de cada espécie e, também, com os triterpenos quinonametídeos maitenina (tingenona) e netzalcoieno isolados a partir de raízes de *P. campestris*, marcadores quimiotaxonômicos da família com atividades biológicas conhecidas.

3.3 Preparo das drogas vegetais

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a 45 °C, moído em um moinho de facas e peneirados para uniformizar o tamanho da partícula (48 mesh). Logo após foi calculada a densidade de cada um e conforme o volume do poço foi determinada a massa de material a ser depositada no mesmo (Tabela 2). Foram utilizadas drogas vegetais autoclavadas (121 °C por 15 minutos; 1 atm de pressão) e não autoclavadas.

Tabela 2: Lista de espécies vegetais, órgãos de plantas e massa de droga vegetal utilizadas nos poços.

Espécies	Órgão utilizado	Massa de droga vegetal por poço (mg)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Folhas	19
<i>Cordia curassavica</i>	Folhas	22
<i>Alternanthera brasiliana</i>	Folhas	22
<i>Ocimum basilicum</i>	Folhas	15
<i>Physalis angulata</i>	Folhas	23
<i>Tinospora cordifolia</i>	Folhas	16
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Folhas	17
<i>Baccharis trimera</i>	Folhas	19
<i>Lippia sidoides</i>	Folhas	17
<i>Cochlospermum regium</i>	Raiz	20
<i>Ocimum selloi</i>	Folhas	22
<i>Eugenia punicifolia</i>	Folhas	30
<i>Peritassa campestris</i>	Raiz	33
<i>Rapanea leuconeura</i> 5R1	Casca de caule	28
<i>Rapanea leuconeura</i> 5R2	Casca de caule	28
<i>Rapanea leuconeura</i> 5R3	Casca de caule	28
<i>Rapanea leuconeura</i> 5R4	Casca de caule	28
<i>Rapanea leuconeura</i> SA10	Casca de caule	28

3.4 Preparo dos extratos aquosos

À droga vegetal, a qual estava em ponteiras de plástico (Figura 2), foi adicionada água destilada (1:5 m/v). As ponteiras contendo a droga com a água foram fechadas com papel alumínio e autoclavadas durante 15 minutos, a 1 atm e 121 °C. A proporção de pó e água resultou numa mistura pastosa e não líquida. Apesar de, neste trabalho, estes extratos serem chamados de aquosos, devemos levar em consideração que os mesmos não foram filtrados. O preparo do material foi realizado 24 horas antes dos ensaios, para evitar a evaporação da água. Toda a massa obtida neste passo foi utilizada nos poços.

3.5 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos (etanol: água, 1:5 v/v) foram obtidos a partir da droga vegetal por sonicação (3x de 20 minutos). Em seguida, a solução foi filtrada e foi adicionado mais solvente à torta (torta:solvente, 1:2 m/v). Após a maceração e filtragem, os extratos foram evaporados e liofilizados. Os extratos liofilizados foram

adicionados às ponteiros de plástico para permitir a inserção dentro dos poços. A quantidade de extrato hidroalcoólico liofilizado utilizada foi a suficiente para encher o poço completamente.

3.6 Isolamento da maitenina e netzalcoieno

Os triterpenos maitenina e netzalcoieno foram isolados a partir de cascas das raízes de *P. campestris* como descrito por Corsino et al. (2000). A confirmação das substâncias isoladas se deu por comparação dos dados espectroscópicos (UV, MS, RMN de ^1H e ^{13}C e RMN 2D) com os valores da literatura (JELLER et al., 2004; NGASSAPA et al., 1994).

O extrato hidroalcoólico da raiz de *P. campestris*, bem como os padrões maitenina e netzalcoieno, foram dissolvidos em metanol ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente), filtrados através de uma membrana de $0,22 \mu\text{m}$ e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A fase móvel foi 85:15 (v/v) de metanol: água (com 0,1% de ácido fórmico) em modo isocrático a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} . O volume de injeção da amostra e padrões foi $20 \mu\text{L}$ e o tempo total de corrida foi 30 minutos. Os dados espectrais foram recolhidos ao longo de 30 minutos no intervalo de 200 a 800 nm e os cromatogramas foram analisados em 420 nm. Os compostos presentes na amostra foram identificados por comparação dos tempos de retenção (R_t) dos padrões.

3.7 Triagem para atividade antimicrobiana (STAMP: *Screening test for antibiotics in medicinal plants*)

O método foi denominado de STAMP (*Screening test for antibiotics in medicinal plants*). Este método foi desenvolvido baseado na difusão em ágar (poços de 6 mm) em placas de Petri de 14 cm, contendo 60 mL de meio de cultura Mueller Hinton (pH 7,6). Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O ajuste do inóculo foi feito em solução salina 0,85% em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 550 nm (0,10 a 0,15 de absorbância) para bactérias e 530 nm (72 a 75% de

transmitância) para leveduras. Todos os testes foram baseados nas normas CLSI M2-A9 (2006) e M44-A (2003), para as bactérias e leveduras, respectivamente.

As drogas vegetais que exibiram atividade antibacteriana também foram ensaiadas frente à mesma linhagem em meio Mueller Hinton com pH 9,0.

Os microrganismos foram inoculados nas placas utilizando *swab* estéril, que foi inserido na solução salina contendo o microrganismo já ajustado, e girado várias vezes. Em seguida, foi pressionado contra a parede do tubo para remover a solução em excesso. Os microrganismos foram então plaqueados em três posições diferentes, de modo que toda a extensão da placa fosse totalmente coberta.

Após a inoculação dos microrganismos, os poços de 6 mm foram abertos (Figuras 2E e 2F). A seguir, a droga vegetal (autoclavada e não autoclavada), o extrato aquoso pastoso e o extrato hidroalcoólico liofilizado foram adicionados aos poços, como mostrado na Figura 2.

As placas foram então mantidas em estufa a 37 °C durante 24 (bactérias) ou 48 horas (leveduras) antes da leitura. As leituras foram realizadas medindo o halo de inibição em milímetros, incluindo os poços.

Os antibióticos padrões utilizados (controles positivos) foram fluconazol e ampicilina, ambos misturados com o amido de milho autoclavado (excipiente) na concentração de 1 mg g⁻¹. Um total de 28 mg da mistura foi adicionado aos poços de controle positivo, de acordo com a sua densidade calculada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

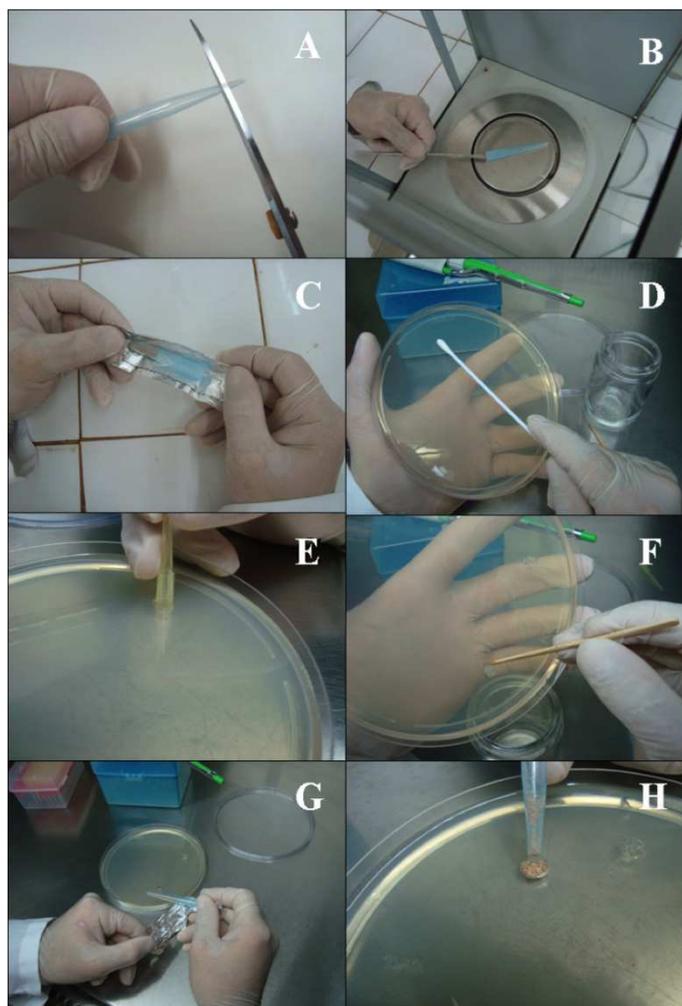


Figura 2: Etapas do método STAMP: (A) Preparo da ponteira de plástico para armazenar as drogas vegetais e extratos aquosos (pastoso) e hidroalcoólicos liofilizados. (B) Introdução da amostra no interior da ponteira. (C) Fechamento da ponteira com papel alumínio. (D) Inoculação do microrganismo utilizando *swab* estéril. (E e F) Abertura de poços de 6 mm, utilizando ponteiras de plástico. (G e H) Introdução da amostra no poço.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.8 Concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito da atividade antimicrobiana foi avaliado pelo método de microdiluição em meio Mueller Hinton líquido, para bactérias, ou RPMI, para leveduras, em placas contendo 96 poços, seguindo as normas CLSI M7-A6 (2003) - bactérias, ou CLSI M27-A2 (2002) – leveduras.

A concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro utilizando, para bactérias, comprimento de onda de 550 nm, numa faixa de absorbância de 0,10 a 0,15 e para leveduras, comprimento de onda de 530 nm, e a faixa de transmitância entre 72 a 75%. Em seguida, o inóculo padrão, da linhagem da bactéria utilizada, foi

diluído 50 vezes em meio de cultivo respectivo e para as leveduras foi realizada uma diluição de 50 vezes seguida de uma diluição de 20 vezes. Após, 100µL deste foi utilizado por poço para cada de microrganismo ensaiada.

Controles de esterilidade do meio de cultura e das substâncias foram realizados conjuntamente. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) correspondeu à menor concentração inibitória da substância onde não houve crescimento macroscópico das linhagens microbianas avaliadas comparadas com o crescimento do controle positivo.

Para a montagem da placa 200µL da amostra foram colocados em 3 poços da fileira 1, sendo que as três últimas colunas foram reservadas para o controle de meio, das substâncias e do microrganismo. Nas colunas 2 a 12 foram adicionados 100µL de meio de cultura com auxílio de pipetador automático. Em seguida, a partir da coluna um, iniciou-se a diluição seriada até a coluna 9.

A concentração máxima utilizada de maitenina e netzalcoieno foi de 100 µg mL⁻¹. Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os controles positivos foram anfotericina B e sulfato de gentamicina.

3.9 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em médias e desvios padrão. Nenhum teste de hipótese foi realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As drogas vegetais eficazes contra *S. aureus* foram: *P. angulata*, *R. leuconeura* (5R2, 5R3 e 5R4), *P. campestris* e *E. puniceifolia*. Estes efeitos também foram observados para os correspondentes extratos hidroalcoólicos, com exceção de *P. angulata* (Tabela 3). Nenhum dos extratos aquosos foi eficaz contra *S. aureus*, exceto o extrato de *P. campestris*.

Tabela 3: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a *Staphylococcus aureus*. Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).

Espécies	Droga vegetal	Droga vegetal autoclavada	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
<i>Ocimum gratissimum</i>	-	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i>	-	-	-	-
<i>Ocimum selloi</i>	-	-	-	16,0±1,0
<i>Cordia curassavica</i>	-	-	-	-
<i>Alternanthera brasiliana</i>	-	-	-	14,0±0,0 ^a
<i>Physalis angulata</i>	13,7±0,6 ^a	-	-	-
<i>Tinospora cordifolia</i>	-	-	-	-
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	-	-	-	11,0±1,0 ^a
<i>Baccharis trimera</i>	-	-	-	-
<i>Lippia sidoides</i>	-	-	-	13,3±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R1)	-	-	-	17,67±1,1
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R2)	12,7±0,6 ^a	10,7±0,6 ^a	-	16,7±2,1
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R3)	9,0±0,0 ^a	8,3±0,6 ^a	-	23,7±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R4)	8,7±0,6	9,3±0,6	-	17,3±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (SA10)	-	-	-	24,7±0,6
<i>Cochlospermum regium</i>	-	9,3±0,6	-	15,0±1,0
<i>Eugenia punicifolia</i>	9,0±1,0	-	-	16,7±0,6
<i>Peritassa campestris</i>	9,7±0,6	9,7±0,6	9,7±0,6	15,3±0,6
Ampicilina 1 mg.g ⁻¹	22,7±2,1	-	-	-

^a efeito bacteriostático.

Para *C. albicans*, as drogas vegetais ativas foram: *C. Regium* (Figura 3), *L. sidoides*, *R. leuconeura* (5R1, 5R2, 5R3, 5R4 e SA10), *P. campestris*, e *E. punicifolia*. A atividade antifúngica foi igualmente observada para os correspondentes extratos aquosos e hidroalcoólicos, com exceção do extrato de *L. sidoides* (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a *Candida albicans*. Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).

Espécies	Droga vegetal	Droga vegetal autoclavada	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
<i>Ocimum gratissimum</i>	-	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i>	-	-	-	25,5±0,7 ^a
<i>Ocimum selloi</i>	-	9,3±0,6	13,7±0,6	-
<i>Cordia curassavica</i>	-	-	-	-
<i>Alternanthera brasiliana</i>	-	-	-	-
<i>Physalis angulata</i>	-	-	-	-
<i>Tinospora cordifolia</i>	-	-	-	-
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	-	-	18,3±2,1 ^a	-
<i>Baccharis trimera</i>	-	-	-	10,3±0,6
<i>Lippia sidoides</i>	16,0±1,0 ^a	20,0±0,0 ^a	13,3±0,6 ^a	-
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R1)	11,0±2,0	13,0±1,0	16,7±0,6	28,7±0,6 ^a
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R2)	15,3±0,6 ^a	13,3±1,2 ^a	20,3±0,6 ^a	27,0±1,0
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R3)	22,7±0,6	15,3±0,6	22,3±0,6	15,0±1,0
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R4)	16,3±0,6	15,3±2,9	20,3±1,1	31,7±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (SA10)	18,7±0,6 ^a	19,3±0,6 ^a	16,7±0,6 ^a	24,7±0,6
<i>Cochlospermum regium</i>	23,7±0,6	22,7±0,6	23,7±0,6	20,3±0,6
<i>Eugenia punicifolia</i>	22,7±1,1	23,0±1,0	20,3±0,6	32,0±1,0
<i>Peritassa campestris</i>	17,3±0,6 ^a	17,7±0,6 ^a	16,3±0,6 ^a	28,7±0,6
Fluconazol 1 mg.g ⁻¹	27,7±2,5	-	-	-

^a efeito fungistático.

Da mesma forma, para *C. parapsilosis*, diversas drogas vegetais também mostraram atividade: *C. regium*, *O. selloi*, *R. leuconeura* (5R1, 5R2, 5R3, 5R4 e SA10), *P. campestris* e *E. punicifolia*. A atividade antifúngica foi igualmente observada para os correspondentes extratos aquosos e hidroalcoólicos (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito antimicrobiano das drogas vegetais e respectivos extratos frente a *Candida parapsilosis*. Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).

Espécies	Droga vegetal	Droga vegetal autoclavada	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico
<i>Ocimum gratissimum</i>	-	-	11,3±0,6 ^a	-
<i>Ocimum basilicum</i>	-	-	-	-
<i>Ocimum selloi</i>	19,7±0,6 ^a	21,3±0,6 ^a	15,7±0,6 ^a	-
<i>Cordia curassavica</i>	-	-	-	-
<i>Alternanthera brasiliana</i>	-	-	-	-
<i>Physalis angulata</i>	-	-	-	-
<i>Tinospora cordifolia</i>	-	-	-	-
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	-	-	17,3±0,6 ^a	-
<i>Baccharis trimera</i>	-	-	-	-
<i>Lippia sidoides</i>	-	16, ±0,6 ^a	14,3±0,6 ^a	15,7±0,6 ^a
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R1)	15,7±0,6 ^a	20,3±0,6 ^a	20,0±0,6 ^a	30,3±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R2)	18,7±0,6	16,0±0,0 ^a	19,7±0,6 ^a	29,3±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R3)	21,3±0,6	15,3±0,6	21,7±0,6	32,7±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R4)	16,7±0,6 ^a	16, 3±0,6 ^a	18,7±0,6	26,7±0,6
<i>Rapanea leuconeura</i> (SA10)	21,0±0,0 ^a	20,3±0,6 ^a	17,7±0,6 ^a	16,7±0,6
<i>Cochlospermum regium</i>	24,0±1,0 ^a	26, 7±0,6	23,5±0,7	34,7±0,6
<i>Eugenia punicifolia</i>	22,7±0,6	21,3±0,6	23,3±0,6	31,0±0,0
<i>Peritassa campestris</i>	21,3±0,6 ^a	23,3±0,6 ^a	19,3±0,6 ^a	28,3±0,6 ^a
Fluconazol 1 mg.g ⁻¹	33,2±1,3	-	-	-

^a efeito fungistático.

O baixo desempenho do método para a atividade antibacteriana poderia ser explicado pela baixa solubilidade dos compostos em pH 7,6. Então, o experimento com *S. aureus* foi repetido utilizando meio Mueller Hinton, com pH ajustado para 9,0. O pH alcalino aumentou a atividade da droga vegetal de *E. punicifolia* e permitiu verificar o efeito antibacteriano da droga vegetal de *R. leuconeura* (SA10) (Tabela 6). As espécies com atividade antimicrobiana identificadas para cada um dos microrganismos encontram-se resumidas na Tabela 7 e na Figura 4.

Tabela 6: Atividade das drogas vegetais frente a *Staphylococcus aureus* em meio de cultura Mueller Hinton com pH ajustado para 9,0. Os resultados são expressos como o diâmetro médio do halo (mm).

Espécies	Atividade antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i>
<i>Ocimum selloi</i>	-
<i>Alternanthera brasiliana</i>	-
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	-
<i>Lippia sidoides</i>	-
<i>Rapanea leuconeura</i> (SA10)	10,0±0,0 ^a
<i>Cochlospermum regium</i>	-
<i>Eugenia punicifolia</i>	12,0±1,0 ^a
Ampicilina 1 mg.g ⁻¹	11,2±1,9

^a efeito bacteriostático.

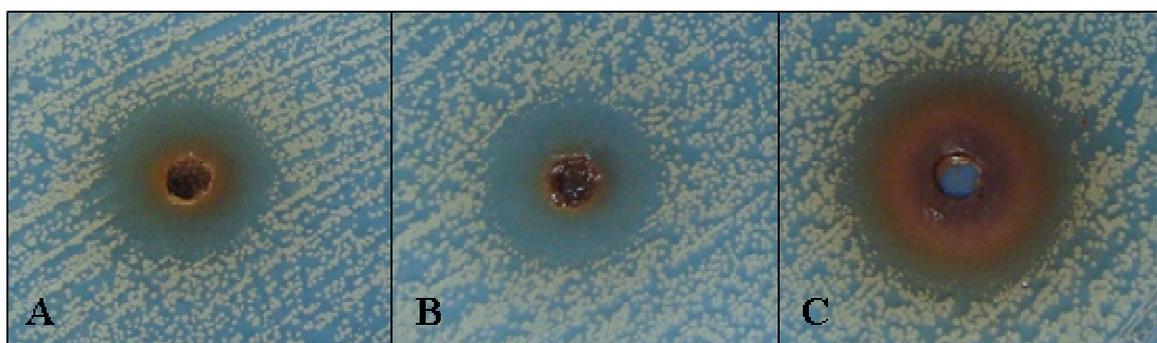


Figura 3: Atividade antifúngica de diferentes preparações de *Cochlospermum regium* contra *Candida albicans* em meio de cultura Mueller Hinton com pH 7,6.

(A) Droga vegetal; (B) Extrato aquoso; (C) Extrato hidroalcoólico.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 7: Espécies identificadas como tendo atividade antimicrobiana de acordo com a droga vegetal e extrato hidroalcoólico utilizado.

Espécie	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>	
	DV	EH	DV	EH	DV	EH
<i>Ocimum gratissimum</i>				+	+	
<i>Ocimum selloi</i>		+	+		+	
<i>Alternanthera brasiliana</i>		+				
<i>Physalis angulata</i>	+					
<i>Baccharis dracunculifolia</i>		+	+	+	+	
<i>Lippia sidoides</i>		+	+	+	+	+
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R1)		+	+	+	+	+
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R2)	+	+	+	+	+	+
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R3)	+	+	+	+	+	+
<i>Rapanea leuconeura</i> (5R4)	+	+	+	+	+	+
<i>Rapanea leuconeura</i> (SA10)	+*	+	+	+	+	+
<i>Cochlospermum regium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Peritassa campestris</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Eugenia punicifolia</i>	+**	+	+	+	+	+

DV) Droga vegetal; EH) Extrato hidroalcoólico; (+) mostrou atividade antimicrobiana; (*) atividade antimicrobiana observada em meio de cultivo com pH 9,0; (**) atividade antimicrobiana potencializada em meio de cultivo com pH 9,0.

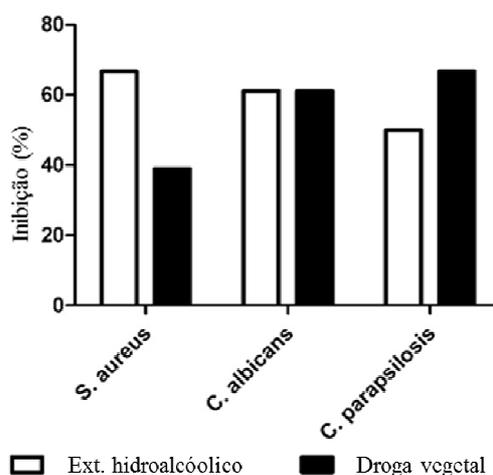


Figura 4: Proporção de espécies de plantas com atividade antimicrobiana, entre todas as espécies avaliadas, de acordo com diferentes microrganismos e origem da amostra.

O cromatograma do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. campestris*, obtido por CLAE-DAD mostrou dois picos principais (Figura 5) em tempos de retenção (Rt) de 8,7 e 10,1 minutos, os quais foram identificados como sendo maitenina e netzalcoieno, respectivamente, o que foi equivalente com o Rt dos padrões correspondentes. Estas substâncias mostraram atividade antimicrobiana principalmente

contra *S. aureus* (CIM de 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido de *C. parapsilosis* e *C. albicans* e (Tabela 8).

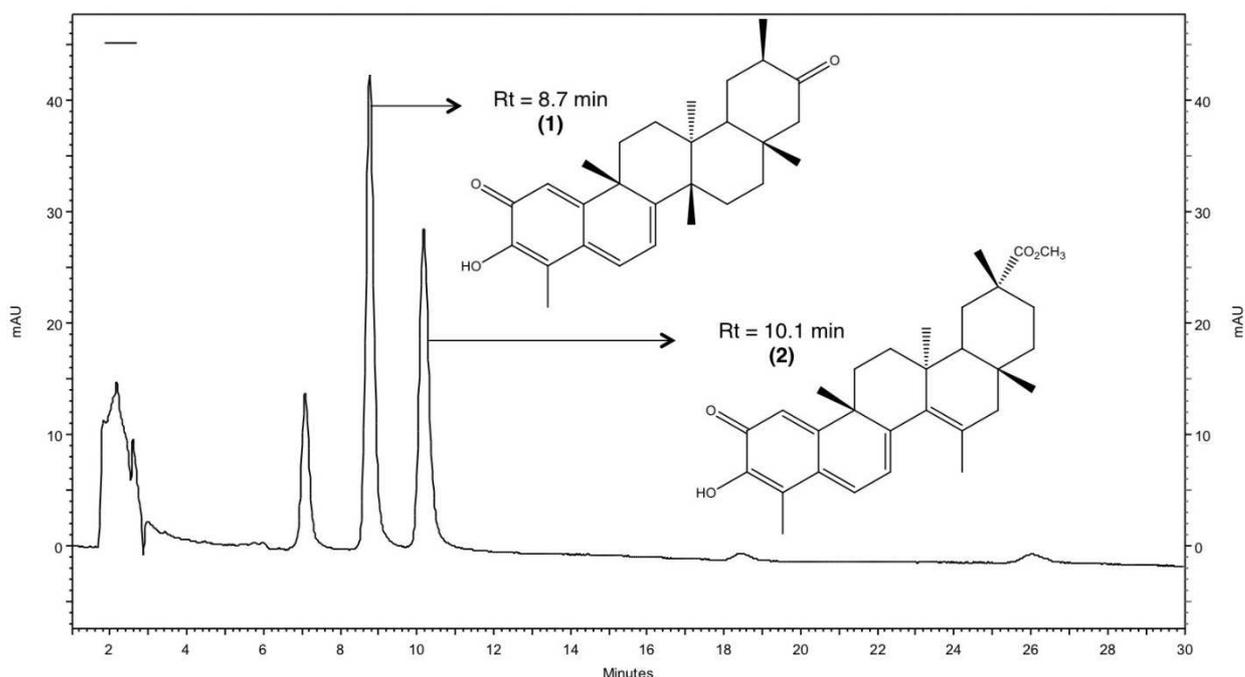


Figura 5: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de raiz de *Peritassa campestris* obtido por CLAE-DAD. Identificação dos picos: maitenina (1) e netzalcoieno (2).

Tabela 8: Atividade antimicrobiana obtida através da concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos triterpenos quinonametídeos isolados de raízes de *Peritassa campestris* frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

Microrganismo	Maitenina	Netzalcoieno	Gentamicina	Anfotericina B
<i>S. aureus</i>	0,78	0,78	4,00	*
<i>C. albicans</i>	50,00	50,00	*	2,00
<i>C. parapsilosis</i>	25,00	25,00	*	2,00

* não avaliado

Este é o primeiro relato sobre a utilização de drogas vegetais em ensaios de *screening* para atividade antimicrobiana. Com este trabalho conclui-se que o método STAMP foi mais adequado para o *screening* de plantas com propriedades antifúngicas, uma vez que, tem maior sensibilidade e especificidade quando comparados com a utilização dos respectivos extratos hidroalcoólicos. Além disso, o método também pode ser uma alternativa para a triagem de plantas com atividade antibacteriana, quando o pH é ajustado para 9,0.

Curiosamente, o pH alcalino reduziu totalmente a atividade da ampicilina contra *S. aureus*. O pH intracelular de microrganismos não varia

significativamente em resposta a variações do pH extracelular. No entanto, o pH extracelular pode alterar o transporte de certos compostos através da membrana celular (CARELS e SHEPHERD, 1978). Portanto, é evidente que qualquer alteração no pH pode alterar a passagem de metabólitos secundários solúveis em água através da membrana celular, tais como os flavonóides, antocianinas e alcaloides. De acordo com outros autores, qualquer aumento de pH pode potencializar as interações entre compostos polifenóis e as superfícies da membrana por meio da desprotonação dos grupos hidroxila (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

A atividade antimicrobiana dos compostos isolados de *P. campestris* confirmou os resultados obtidos pelo método STAMP. A espécie *P. campestris* foi escolhida para a realização do CIM, pois contém triterpenos quinonametídicos, como a maitenina e o netzalcoieno, que são marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae e exibem uma gama de atividades biológicas (ORAMAS-ROYO et al., 2010; AKASE et al., 2011). Os resultados obtidos com a droga vegetal de *P. campestris* utilizando o método STAMP e os resultados obtidos com a maitenina e netzalcoieno utilizando o método CIM foram semelhantes. Ambos apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, seguido por *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Elhag et al. (1999), com as mesmas substâncias os quais obtiveram um CIM baixo frente a *S. aureus* ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Com relação as leveduras, um estudo realizado por Gullo et al. (2012) apresentou resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, com um CIM inferior da maitenina frente a *C. parapsilosis* e superior para *C. albicans* ($15,62$ e $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Todos estes resultados corroboram com o trabalho realizado por Moujir et al. (1991), mostrando que triterpenos exibem atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-positivas e leveduras.

Os resultados obtidos pelo método STAMP são promissores, pois, segundo Raskin e Ripoll (2004) a tecnologia necessária para o êxito da descoberta e produção de medicamentos a base de plantas ainda não está suficientemente bem definida, e deve haver uma atenção maior referente a este aspecto. O método atual para a descoberta de medicamentos, o chamado *high throughput screening* (HTS), não é facilmente adaptável às misturas complexas (extratos) produzidas a partir de fontes naturais. Isto se dá principalmente devido ao elevado custo, por exemplo, a complexidade de reabastecimento da matéria-prima, a dificuldade de isolamento e caracterização dos agentes ativos, a falta

de reprodutibilidade e a interferência que ocorre pelas misturas complexas (SCHMIDT et al., 2008). Além disso, o isolamento e purificação dos princípios ativos a partir de uma matriz extremamente complexa, é uma das barreiras na descoberta de um produto natural, e esta abordagem, relativamente simplista e redutora, pode levar a resultados inconclusivos em ensaios clínicos (WILLIAMSON, 2001; RASKIN e RIPOLL, 2004).

Mais recentemente, a indústria farmacêutica tem evitado três situações relativas ao uso de compostos de plantas medicinais na formulação de bioprodutos: (a) o isolamento de substâncias puras a partir de misturas complexas, o que é caro e requer trabalho de longo prazo, (b) a produção de extratos, que apresentam baixa solubilidade e (c) o uso de espécies com oferta reduzida (LI e VEDERAS, 2009).

Muitas moléculas naturais, quando isoladas, não são solúveis em água e, conseqüentemente, têm fraca biodisponibilidade, ou seja, baixa difusão das moléculas no meio. Mas, se esta estiver no fitocomplexo, a interação entre todos os compostos presentes no interior da planta pode aumentar a solubilidade em água e a biodisponibilidade. Em nosso experimento, o efeito antimicrobiano observado só pode ser atribuído a compostos solúveis em água, uma vez que não foi utilizada qualquer técnica de extração e o meio de cultivo é aquoso. Portanto, usando este novo método de triagem, é aumentada a possibilidade de que os principais compostos responsáveis pela propriedade farmacológica potencialmente tenham uma boa biodisponibilidade.

Dada a urgência da descoberta de novos antibióticos, é altamente desejável analisar tantas espécies quanto forem possível, mas isso pode levar um tempo muito longo. Além disso, vários fatores bióticos e abióticos inerentes à planta podem aumentar o tempo necessário para a seleção de extratos ativos. Finalmente, diferentes extratos de plantas extraídos com diversos solventes necessitam ser obtidos e avaliados. A preparação de extratos de plantas medicinais consome tempo, recursos humanos e financeiros. Com isso, acredita-se que o novo método desenvolvido pode efetivamente contribuir para a área, pois requer menos tempo e menor custo já que nenhum método de extração é necessário, aumentando a possibilidade de descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana.

5. CONCLUSÃO

Com este trabalho, conclui-se que o método STAMP, o qual utiliza drogas vegetais ao invés de extratos de plantas, é de baixo custo, sensível, reprodutível, tecnicamente fácil de ser executado e rápido. O método proposto revelou algumas espécies com potencial antimicrobiano para investigações fitoquímicas futuras. Este método também é adequado para a triagem de diferentes genótipos de uma única espécie e diferentes órgãos de uma mesma planta.

Capítulo II: INFLUÊNCIAS DA SAZONALIDADE, ESTÁDIO FENOLÓGICO, LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, SUBSTRATO DE CULTIVO E IDADE DE PLANTAS DE *Cochlospermum regium* NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE RAÍZES E INTERAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO SOLO COM A ATIVIDADE OBTIDA

1. INTRODUÇÃO

Cochlospermum regium (Schrank) Pilg., Bixaceae, é uma espécie medicinal que ocorre no Cerrado, a savana brasileira, cujas raízes são utilizadas na medicina popular para tratamento de infecções do sistema reprodutivo feminino (NUNES et al., 2003; SOUZA e FELFILI, 2006; MOREIRA e GUARIM-NETO, 2009). É uma espécie amplamente pesquisada, devido ao grande potencial como medicinal e também por habitar o Cerrado, bioma considerado *hotspots*, com uma área que ocupa 21% do território brasileiro e com 4400 espécies de plantas endêmicas (ZACHOS e HABEL, 2011).

Algumas substâncias já foram isoladas e identificadas em raízes desta espécie, tais como dihidrokanferol-3-O- β -glucopiranosida (LIMA et al., 1996; SÓLON et al. 2012), β -selineno, encontrado no óleo essencial do sistema radicular (HONDA et al., 1997), ácido elágico, ácido gálico, dihidrokanferol, dihidrokanferol-3-O- β -(6"-galloyl)-glucopiranosida, pinosinol, excelsina, os triacilbenzenos cochlospermina A e B (SÓLON et al., 2012). Entretanto, apesar de vários compostos terem sido isolados, ainda não foi determinado qual ou quais compostos que apresentam atividade antimicrobiana, preconizada em levantamentos etnofarmacológicos. Além disso, trabalhos

científicos divergem quando se trata da eficiência antimicrobiana desta espécie *in vitro*, no qual, alguns demonstraram que há atividade *in vitro*, enquanto outros não encontraram o efeito antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 1996; SÓLON et al., 2012). Essa divergência pode estar relacionada à influência de fatores ambientais e fenológicos presentes no momento da coleta para a sua utilização.

Os fatores ambientais e fenológicos, tais como, clima local, estações do ano, estágio fenológico, carga genética, temperatura, altitude, condições de cultivo, umidade, dentre inúmeros outros, podem afetar substancialmente a qualidade e/ou quantidade de compostos bioativos (SZAKIEL et al., 2011; PAVARINI et al., 2012; GOUVEA et al., 2012). Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar as influências da sazonalidade, estágio fenológico, localização geográfica, substrato de cultivo e idade de plantas de *C. regium* na atividade antimicrobiana de raízes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de fatores ambientais e fenológicos na atividade farmacológica de raízes de *Cochlospermum regium*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Coletar raízes de *C. regium* em dois estádios fenológicos (vegetativo e reprodutivo) e em diferentes períodos sazonais, verificando a influência destes fatores na atividade antimicrobiana;
- 2) Avaliar o efeito da localização geográfica dos indivíduos de *C. regium* na atividade antimicrobiana da raiz;
- 3) Avaliar o efeito da idade da planta e do substrato de cultivo na atividade antimicrobiana;
- 4) Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana da casca, entrecasca, cerne e raiz inteira de *C. regium*;
- 5) Analisar a interação dos constituintes do solo com a atividade antimicrobiana das raízes de *C. regium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições gerais

Para a realização dos ensaios antimicrobianos foram utilizadas as raízes de 58 indivíduos de *Cochlospermum regium* coletadas em 5 populações em fragmentos de Cerrado nos estados de São Paulo, nos municípios de Altinópolis – Latitude: 21°03'26,8"; Longitude: 47°29'27,4"; Altitude: 607 m (24 indivíduos) e Rifaina – Latitude: 20°04'49,8"; Longitude: 47°25'48,8"; Altitude: 612 m (12 indivíduos); no estado de Minas Gerais, no município de Sacramento – Latitude: 19°58'53,6"; Longitude: 47°24'20,7"; Altitude: 645 m (12 indivíduos); no estado de Goiás, no município de Campo Alegre de Goiás – Latitude: 17°49'14,7"; Longitude: 47°46'13,4"; Altitude: 953 m (6 indivíduos) e no estado do Mato Grosso do Sul, no município de Terenos – Latitude: 20°25'31,2"; Longitude: 55°02'44,6"; Altitude: 170 m (4 indivíduos). As coletas em locais de ocorrência natural foram realizadas com a autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN – Processo nº 02001.05103/2011-42). Amostras de solo foram coletadas para cada indivíduo e submetidas a análise química no Laboratório de Química Agrícola da Universidade de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade do Engº Químico Danilo Moraes Baratto.

No laboratório, as raízes foram limpas e parte destas separadas em casca, entrecasca e cerne. Após esse procedimento, foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45 °C por 48 horas, seguido de pulverização em moinho de facas e peneiradas (48 mesh). Raízes sem prévia separação também foram utilizadas. O efeito do substrato e idade das raízes na atividade antimicrobiana foi avaliado utilizando-se somente raízes inteiras. Também foram avaliadas amostras das drogas vegetais autoclavadas.

A comparação da atividade antimicrobiana da casca, entrecasca, cerne e raiz inteira de *C. regium* foi realizada em cada experimento.

O método utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana foi o STAMP (INÁCIO et al., 2013) e o microrganismo *Candida albicans* ATCC 10231. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 5 populações e 6 indivíduos por população. As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste de médias Tukey a 0,5% de probabilidade com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005).

3.2 Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*

O estágio fenológico foi avaliado em raízes de indivíduos coletados nos municípios de Altinópolis (São Paulo), Rifaina (São Paulo) e Sacramento (Minas Gerais) em fase vegetativa/pré-floração e plena floração, no período da manhã. Deve-se ressaltar para o estágio vegetativo que, apesar de o intuito inicial ser a coleta de raízes de plantas que estavam nesse estágio, alguns indivíduos estavam em fase de pré-floração. Para cada estágio fenológico e população foram avaliados 6 indivíduos.

3.3 Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*

O efeito da sazonalidade foi avaliado em raízes de indivíduos coletados sempre ao final do verão, primavera, outono e inverno pelo período da manhã no município de Altinópolis (São Paulo). Foram coletados 6 indivíduos para cada estação do ano.

3.4 Efeito da localização geográfica dos indivíduos de *C. regium* na atividade antimicrobiana

Para a avaliação do efeito antimicrobiano da espécie em relação à sua localização geográfica, todos os indivíduos foram coletados no estágio vegetativo nos municípios de Altinópolis (São Paulo), Rifaina (São Paulo), Sacramento (Minas Gerais), Campo Alegre de Goiás (Goiás) e Terenos (Mato Grosso do Sul). Nestas avaliações foram utilizados 4 indivíduos por população.

3.5 Efeito da idade e substrato de cultivo de plantas de *C. regium* na atividade antimicrobiana

Para avaliar a idade da planta e o substrato de cultivo no efeito antimicrobiano das raízes de *C. regium*, plantas desta espécie foram cultivadas em casa de vegetação em solo de Cerrado:esterco bovino (1:1) ou areia (representando os extremos), a partir de sementes coletadas nos municípios citados no item 3.1. As sementes foram agrupadas e formaram um único lote, o qual foi utilizado no cultivo. A irrigação foi feita manualmente duas vezes ao dia. As análises foram realizadas em plantas com 2, 4, 6, 9 e

12 meses. Para a realização dos experimentos, raízes de plantas colhidas em cada período foram reunidas formando um único lote, de 10 raízes, e os testes antimicrobianos foram realizados em triplicata.

3.6 Interação dos constituintes do solo x atividade biológica de raízes de *C. regium*

A influência dos constituintes do solo sobre a atividade antimicrobiana das raízes de *C. regium* foram avaliadas através de correlação simples. Foi realizado também uma análise sobre os componentes principais utilizando-se o programa Genes VS 2009.7.0 (CRUZ, 2006). Os resultados da atividade antimicrobiana utilizados para esta análise foram os obtidos no experimento que avaliou a influência da localização geográfica. A análise de componentes principais foi realizada com 17 variáveis (atividade biológica, matéria orgânica -MO, pH, fósforo - P, potássio - K, cálcio - Ca, magnésio - Mg, enxofre - S-SO₄, soma de bases - S.B, acidez potencial - H + Al, capacidade de troca catiônica - C.T.C., saturação de bases - V, boro - B, cobre - Cu, ferro - Fe, manganês - Mn e zinco - Zn).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O microrganismo alvo escolhido para este estudo partiu de trabalhos etnofarmacológicos que afirmam que a espécie *C. regium* apresenta efeito antiféccioso no aparelho reprodutivo feminino (NUNES et al., 2003; SOUZA e FELFILI, 2006; TRESVENZOL et al., 2006; MOREIRA e GUARIM-NETO, 2009). Diversos são os microrganismos responsáveis por estas infecções, dentre eles *Neisseria gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*, causadores da gonorréia e sífilis, respectivamente. Mas, a levedura *Candida albicans* está presente na maioria das infecções vaginais ocorrentes em mulheres de todo o mundo (ASTICCIOLI et al., 2009; JI et al., 2009; ONO e YASUMOTO, 2009; BABIĆ e HUKIĆ, 2010; WEI et al., 2010; RAD et al., 2011; SANTI e RIZZI, 2011).

4.1 Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*

A atividade antimicrobiana não apresentou um padrão de resposta quanto ao estágio fenológico. As raízes dos indivíduos de Altinópolis coletadas na fase

vegetativa-botão floral apresentaram maior atividade antimicrobiana do que as coletadas na fase de florescimento (Tabela 9). Em relação aos indivíduos coletados em Rifaina, não houve diferença significativa na atividade antimicrobiana obtida entre as raízes coletadas nos dois diferentes estádios (Tabela 10). Quanto às raízes coletadas em Sacramento, a resposta foi oposta à obtida com as plantas de Altinópolis, ou seja, as raízes coletadas na fase de florescimento apresentaram maior atividade antimicrobiana do que as coletadas na fase vegetativa (Tabela 11).

A variação de metabólitos bioativos em plantas, nas diferentes fases fenológicas é amplamente conhecida (ÇIRAK et al., 2007; SARTORELLI et al., 2007; EBRAHIMI et al., 2008). Em raízes de *C. regium*, sejam as partes separadas ou a raiz inteira (Figura 6A e 6B), a fase fenológica não apresentou um padrão de resposta para os indivíduos analisados. Portanto, este fator pode interferir mas, não deve ser considerado como o principal responsável pelas variações obtidas no ensaio biológico.

Além disso, não foram verificadas diferenças entre as atividades biológicas das amostras autoclavadas e não autoclavadas e quando houve esta diferença, a amostra não autoclavada teve maior halo de inibição. Sabe-se que a alta temperatura e pressão podem afetar a estabilidade das substâncias. Muitas vezes, alterações ínfimas nessas condições podem causar a degradação de moléculas (GUIMARÃES et al., 2008; PIMENTEL et al., 2008). Em trabalho realizado por Mori et al. (2007), por exemplo, os autores mostraram que antocianinas presentes em *Vitis vinifera* (uva), podem ter sua concentração reduzida com um aumento da temperatura em 10 °C somente (de 25 para 35 °C). Para *Vaccinium myrtillus* (mirtilo), a alta temperatura e pressão, também reduziram o teor de antocianinas nos frutos (BUCKOW et al., 2010). Assim, recomenda-se que as amostras não sejam autoclavadas, no entanto, todo material utilizado, para a realização do teste STAMP deve ser previamente esterilizado com álcool 70%.

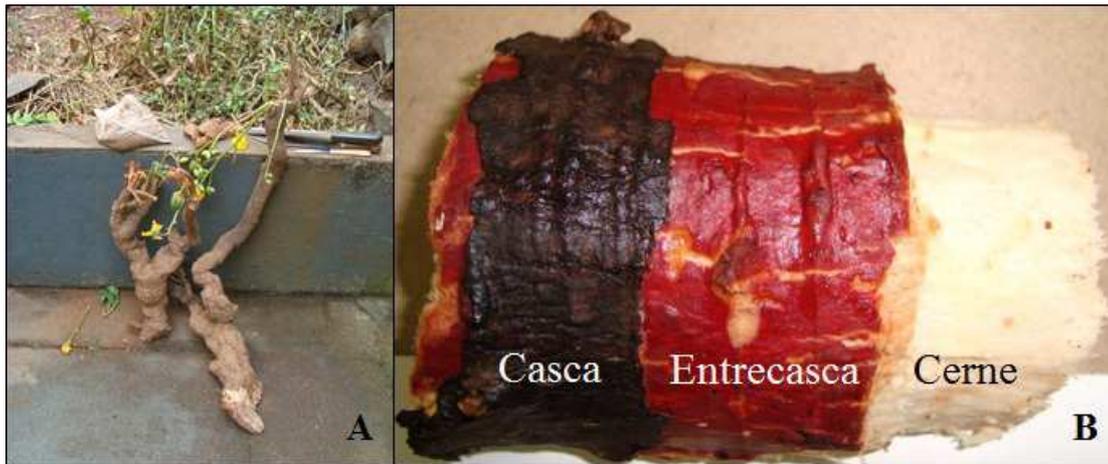


Figura 6: Raiz de *Cochlospermum regium* coletada em *habitat* natural (A) e partes da raiz: casca, entrecasca e cerne (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 9: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas no município de Altinópolis (SP) frente a *Candida albicans*.

Altinópolis – São Paulo								
Estádio fenológico	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto
Veg/Pré-floração	4,28aA	9,94aA	26,06aA	26,50aA	22,72aA	22,22aA	24,06aA	23,34aA
Florescimento	0,00aA	0,00aA	18,66bA	18,44bA	19,22aA	15,22bA	19,00bA	16,28bB

*n.a: não autoclavada; auto: autoclavada. Letras minúsculas comparam os resultados na coluna (entre estágio fenológico) e letras maiúsculas comparam os resultados na linha (a mesma amostra não autoclavada e autoclavada). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Tabela 10: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas no município de Rifaina (SP) frente a *Candida albicans*.

Rifaina – São Paulo								
Estádio fenológico	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto
Veg/Pré-floração	0,00bA	0,00aA	19,28aA	17,25aB	18,39aA	12,16aB	19,00aA	13,56aB
Florescimento	10,61aA	7,67aA	19,33aA	19,72aA	14,44aA	17,17aA	16,83aA	16,83aA

*n.a: não autoclavada; auto: autoclavada. Letras minúsculas comparam os resultados na coluna (entre estágio fenológico) e letras maiúsculas comparam os resultados na linha (a mesma amostra não autoclavada e autoclavada). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Tabela 11: Efeito do estágio fenológico na atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas no município de Sacramento (MG) frente a *Candida albicans*.

Sacramento – Minas Gerais								
Estádio fenológico	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto
Veg/Pré-floração	7,00bA	6,17bA	17,50bA	16,83bA	14,89bA	13,00bA	16,89bA	14,55bA
Florescimento	24,00aA	23,72aA	27,56aA	27,72aA	20,55aA	20,83aA	23,89aA	22,94aA

*n.a: não autoclavada; auto: autoclavada. Letras minúsculas comparam os resultados na coluna (entre estágio fenológico) e letras maiúsculas comparam os resultados na linha (a mesma amostra não autoclavada e autoclavada). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

4.2 Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*

As diferentes estações do ano interferiram na resposta antimicrobiana de raízes de *C. regium*, sendo o outono e inverno as estações do ano que mais favoreceram a atividade antimicrobiana em todas as estruturas da raiz, com exceção da casca. Durante o inverno a casca da raiz apresentou maior atividade antimicrobiana (Tabela 12), quando comparada com a atividade biológica obtida deste mesmo material coletado nas outras estações.

Na savana brasileira as estações do ano são basicamente caracterizadas por estações secas (outono e inverno) e chuvosas (primavera e verão), e as temperaturas não variam muito. Além disso, a partir do outono, as folhas de *C. regium* iniciaram o processo de senescência e no inverno quase 100% das plantas estavam caducas. Sendo assim, é possível inferir que como na estação do outono/inverno a planta está sob maior nível de estresse, pela baixa umidade e ausência de folhas, as substâncias antimicrobianas devem se translocar para a casca da raiz com a finalidade de maior proteção da mesma. Não obstante, o aumento da atividade antimicrobiana obtido pelas demais partes da raiz no outono e inverno (estações secas), demonstra que houve acúmulo de metabólitos secundários nestas estações mais secas. Em um trabalho de revisão, Selmar e Kleinwächter (2013) mostram que vários metabólitos secundários estão em maior teor quando as plantas estão sob estresse hídrico. Isso porque, como os estômatos são fechados, em resposta a esse estresse, não há absorção de CO₂ e muito do NADPH⁺H⁺, que seriam utilizados no ciclo de Calvin, ficam em excesso. Logo, como uma maneira de dissipar essa energia, os NADPH⁺H⁺ são utilizados para a síntese de compostos altamente reduzidos como os isoprenóides, fenóis simples e complexos ou alcaloides.

Quanto à espécie *C. regium*, no período de seca, a planta está sem as folhas, ou seja, a absorção de CO₂ é praticamente nula. Possivelmente, isso explica o aumento na concentração dos ativos na raiz. Além disso, apesar de a substância ativa das raízes desta espécie não ter sido identificada, sabe-se que esta espécie, bem como outras do gênero, são ricas em flavonóides, ou seja, compostos fenólicos complexos (SÓLON et al., 2009; SÓLON et al., 2012) que por sua vez, pode ter a função de proteção da planta durante a seca (RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011).

Neste trabalho foi verificado que em todas as estações do ano, a raiz inteira, pode ser considerada a mais adequada quanto à atividade antimicrobiana,

quando comparada às diferentes partes isoladas, assim, não se justifica o trabalho de separá-las.

Da mesma maneira que para os resultados obtidos no estágio fenológico, não houve diferença para a atividade antimicrobiana entre a maioria das amostras autoclavadas e não autoclavadas e quando houve, amostras não autoclavadas foram mais eficientes. A autoclavagem do material vegetal pode, possivelmente, propiciar a degradação de substâncias ativas, ou então, o auxílio na extração destas substâncias, uma vez que, a alta pressão da autoclave pode romper as membranas das organelas da célula e facilitar a saída das mesmas. Desta maneira, a resposta entre uma mesma amostra autoclavada ou não poderá variar muito. Isto porque, irá depender da estrutura e da concentração dos ativos no momento da coleta de raízes.

Tabela 12: Efeito da sazonalidade na atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas no município de Altinópolis (SP) frente a *Candida albicans*.

Estação do ano	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto
Primavera	0,00bA	0,00bA	18,66bA	18,44bcA	19,22abA	15,20abA	19,00bcA	16,28bB
Verão	1,83abA	2,17abA	16,00bA	15,72cA	15,05bA	13,72bA	16,33cA	13,72bA
Outono	4,28abA	9,94abA	26,06aA	26,50aA	22,72aA	22,22aA	24,06aA	23,34aA
Inverno	14,32aA	14,61aA	24,50aA	21,67bA	19,11abA	20,72aA	21,95abA	22,05aA

*n.a: não autoclavada; auto: autoclavada. Letras minúsculas comparam os resultados na coluna (entre as estações do ano) e letras maiúsculas comparam os resultados na linha (a mesma amostra não autoclavada e autoclavada). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

4.3 Efeito da localização geográfica dos indivíduos de *C. regium* na atividade antimicrobiana

Todas as populações localizadas em diferentes posições geográficas apresentaram atividade antimicrobiana, não havendo diferença estatística na atividade biológica obtida dos indivíduos entre as populações (Tabela 13). Com isso, pode-se inferir que os compostos ativos da espécie *C. regium* são constitutivos e os efeitos ambientais considerados neste trabalho, aos quais estas populações estão submetidas, não interferiram na atividade antimicrobiana.

Com os dados meteorológicos das épocas de coleta das plantas, obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), foi possível verificar que houve uma certa variação de temperatura e umidade relativa, com maior diferença na temperatura média mensal em Tereno e umidade relativa em Campo Alegre do Goiás (Tabela 14). Contudo, todas as raízes coletadas nesses locais apresentaram atividade antimicrobiana, reforçando, desta maneira, que as substâncias ativas são constitutivas.

É importante ressaltar que em termos de porcentagem de massa seca das diferentes partes da raiz, o cerne representa 57,11% ($\pm 7,23$), a entrecasca 26,82% ($\pm 4,64$) e a casca 16,07% ($\pm 6,87$) e que, em função dos dados obtidos no presente trabalho, recomenda-se que a raiz inteira seja utilizada na preparação do fitoterápico de *C. regium*.

Tabela 13: Efeito da localização geográfica na atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas nos municípios de Rifaina (SP), Altinópolis (SP), Sacramento (MG), Campo Alegre do Goiás (GO) e Tereno (MS) frente a *Candida albicans*.

Localização (populações)	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto	n.a	auto
Rifaina	0,00aA	0,00aA	19,50aA	17,08aA	18,42aA	12,92aB	18,83aA	13,91aB
Altinópolis	6,42aA	10,50aA	26,25aA	26,83aA	22,83aA	22,42aA	24,58aA	23,67aA
Sacramento	10,50aA	9,25aA	18,08aA	17,25aA	14,33aA	10,08aA	16,33aA	14,66aA
Campo Alegre do Goiás	10,71aA	12,25aA	18,42aA	16,83aA	15,08aA	15,42aA	17,75aA	16,08aA
Tereno	17,25aA	16,92aA	19,08aA	20,08aA	11,58aA	11,92aA	18,08aA	18,84aA

*n.a: não autoclavada; auto: autoclavada. Letras minúsculas comparam os resultados na coluna (entre as populações) e letras maiúsculas comparam os resultados na linha (a mesma amostra não autoclavada e autoclavada). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Tabela 14: Dados meteorológicos referentes aos meses e locais de coleta de plantas de *Cochlospermum regium* obtidos das estações automáticas do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (<http://www.inmet.gov.br>). Médias mensais de temperatura (° C), umidade relativa (UR%) e precipitação (mm).

População	Coleta	Temperatura	UR%	Precipitação	Estação Meteorológica
Rifaina	Junho/2011	17,87	65,63	0,93	A525 - Sacramento
Sacramento	Junho/2011	17,87	65,63	0,93	A525 - Sacramento
Altinópolis	Junho/2011	17,60	65,73	1,20	A708 - Franca
Campo Alegre do Goiás	Mai/2011	20,93	74,77	0,00	A033 – Pires do Rio
Tereno	Novembro/2010	24,27	61,30	3,30	A702 – Campo Grande

A tabela 15 mostra os resultados das atividades antimicrobiana de todos os indivíduos coletados em todas as condições do estudo. O objetivo é mostrar a sensibilidade do teste desenvolvido (STAMP) e a atividade fungistática obtida em várias partes das raízes de inúmeros indivíduos.

Tabela 15: Atividade antimicrobiana da droga vegetal de raízes de *Cochlospermum regium* coletadas em diferentes localizações geográficas mostrando a atividade fungistática de alguns indivíduos e partes de raízes.

Amostra	Casca		Entrecasca		Cerne		Raiz inteira	
	n.a	Auto	n.a	Auto	n.a	Auto	n.a	Auto
Sacramento 1	24,67±2,08	21,67±0,58	34,67±0,58	33,67±2,08	24,33±0,58	23,67±0,58	24,67±0,58	19,67±1,53
Sacramento 2	31,67±1,15	32,00±2,65	26,67±1,15	27,00±1,00	22,33±1,53	21,00±1,00	22,33±0,58	22,33±1,53
Sacramento 3	16,67±1,53	19,00±2,00	29,00±1,00	28,67±0,58	23,00±1,00	24,67±0,58	24,67±0,58	25,33±0,58
Sacramento 4	24,00±1,00	24,00±1,00	25,67±0,58	25,67±0,58	17,33±0,58	17,67±0,58	24,00±1,73	23,67±0,58
Sacramento 5	20,33±1,53	20,67±0,58	25,33±0,58	24,33±0,58	13,33±2,52	16,00±1,00	22,67±0,58	22,33±1,15
Sacramento 6	26,67±0,58	25,00±1,00	28,00±1,00	27,00±1,00	24,33±0,58	23,33±0,58	25,00±1,00	24,33±0,58
Fluconazol	24,43±2,74	-	-	-	-	-	-	-
Rifaina 1	16,33±1,53*	14,67±1,53	26,33±0,58	25,00±1,00	24,33±0,58	24,67±0,58	25,33±1,53	22,33±0,58
Rifaina 2	14,67±0,58	13,33±1,53*	24,00±1,00	23,33±1,53	21,00±0,00	20,33±0,58	20,00±1,00	21,33±1,15
Rifaina 3	13,67±2,89	15,67±0,58	22,67±2,08	20,67±0,58	12,33±0,58*	12,67±0,58	15,00±0,00	15,67±1,53
Rifaina 4	18,33±1,53	15,67±1,15	22,33±1,53	26,67±0,58	24,00±1,00	25,67±0,58	21,00±1,00	23,33±0,58
Rifaina 5	17,00±1,00	11,67±1,53*	20,67±0,58	22,67±0,58	17,33±0,58	19,67±0,58	19,67±0,58	18,33±0,58
Rifaina 6	18,33±1,15*	12,00±0,00*	17,67±1,15*	19,33±1,15*	13,33±0,58*	10,67±0,58*	13,00±2,00*	13,00±1,00*
Fluconazol	24,43±2,74	-	-	-	-	-	-	-
Altinópolis 1	0,00±0,00	0,00±0,00	16,33±1,15	15,67±1,15	13,67±1,53	10,50±0,71	20,67±1,15	17,00±1,41
Altinópolis 2	0,00±0,00	0,00±0,00	18,67±1,15	19,00±1,00	16,00±1,00	10,67±0,58	17,00±1,00	16,00±1,00
Altinópolis 3	0,00±0,00	0,00±0,00	13,33±0,58	17,00±3,00	17,00±0,00	15,67±1,15	18,67±1,15	16,33±0,58
Altinópolis 4	0,00±0,00	0,00±0,00	20,33±1,15	16,67±1,15	21,33±1,15	15,33±0,58	19,33±0,58	15,00±0,00
Altinópolis 5	0,00±0,00	0,00±0,00	21,33±0,58	21,00±0,00	21,67±1,53	19,00±0,00	19,00±1,73	17,00±1,00
Altinópolis 6	0,00±0,00	0,00±0,00	22,00±1,00	21,33±0,58	25,67±0,58	20,00±2,00	19,33±1,53	16,33±0,58

Fluconazol	22,17±4,92	-	-	-	-	-	-	-
Altinópolis 7	0,00±0,00	0,00±0,00	14,67±0,58	15,00±0,00	17,33±0,58	11,67±0,58	11,67±0,58	11,67±0,58
Altinópolis 8	0,00±0,00	0,00±0,00	18,33±0,58	18,67±1,15	15,33±0,58	17,33±0,58	17,33±2,08	18,67±0,58
Altinópolis 9	0,00±0,00	0,00±0,00	17,67±0,58	17,00±1,00	16,33±0,58	15,33±0,58	18,33±0,58	11,67±0,58
Altinópolis 10	11,00±1,41	13,00±0,00	15,33±0,58	15,00±1,00	9,33±0,58	14,00±1,00	11,67±0,58	16,00±2,65
Altinópolis 11	0,00±0,00	0,00±0,00	11,33±0,58	12,00±1,00	14,33±0,58	11,00±1,00	18,67±0,58	13,00±1,00
Altinópolis 12	0,00±0,00	0,00±0,00	18,67±0,58	16,67±0,58	17,67±0,58	13,00±0,00	20,33±0,58	11,33±0,58
Fluconazol	17,83±6,55	-	-	-	-	-	-	-
Campo Alegre do Goiás 1	0,00±0,00	0,00±0,00	14,67±0,58	13,67±1,53	15,67±0,58*	13,33±0,58*	0,00±0,00	0,00±0,00
Campo Alegre do Goiás 2	13,50±2,12	16,50±0,71	20,33±1,15	19,67±0,58	16,33±0,58	14,67±0,58	17,67±2,08	14,33±0,58
Campo Alegre do Goiás 3	0,00±0,00	0,00±0,00	17,33±0,58	14,67±1,53	16,67±0,58	13,33±1,15	15,00±1,00	11,00±1,00
Campo Alegre do Goiás 4	17,33±1,15	18,50±0,71	18,67±1,15	18,33±0,58	18,33±1,53	16,67±1,53	18,67±0,58	17,33±0,58
Campo Alegre do Goiás 5	12,00±2,65	14,00±1,00	18,33±0,58	15,33±0,58	13,67±0,58	15,00±0,00	15,67±0,58	16,33±0,58
Campo Alegre do Goiás 6	0,00±0,00	0,00±0,00	16,33±1,53	15,00±0,00	12,00±1,00	15,33±0,58	19,00±1,00	16,33±0,58
Fluconazol	37,67±7,02	-	-	-	-	-	-	-
Rifaina 7	0,00±0,00	0,00±0,00	19,00±1,00	17,67±0,58	19,33±0,58	10,00±1,00	19,33±1,15	12,33±0,58
Rifaina 8	0,00±0,00	0,00±0,00	20,67±0,58	14,67±0,58	20,67±2,89	11,33±1,15	18,67±0,58	12,67±0,58
Rifaina 9	0,00±0,00	0,00±0,00	18,67±0,58	17,50±0,71	17,33±0,58	11,33±0,58	19,33±1,15	13,33±0,58
Rifaina 10	0,00±0,00	0,00±0,00	20,00±1,00	16,00±1,00	17,67±0,58	12,00±0,00	18,00±0,00	13,33±0,58
Rifaina 11	0,00±0,00	0,00±0,00	18,67±0,58	20,00±1,00	21,33±0,58	15,00±1,73	20,67±0,58	15,33±0,58
Rifaina 12	11,67±0,58*	11,33±0,58*	18,67±0,58	17,67±0,58	14,00±0,00	13,33±1,15	18,00±1,00	14,33±0,58
Fluconazol	15,83±1,72	-	-	-	-	-	-	-
Sacramento 7	0,00±0,00	0,00±0,00	16,33±1,53	17,33±0,58	14,33±1,15	12,33±0,58	15,00±1,00	15,33±0,58
Sacramento 8	19,00±0,00	15,50±0,71	16,67±0,58	15,00±1,00	14,33±0,58	13,33±0,58	15,67±0,58	15,67±0,58
Sacramento 9	0,00±0,00	0,00±0,00	16,33±0,58	14,67±0,58	17,67±0,58	13,67±0,58	21,00±1,00	13,33±0,58
Sacramento 10	23,00±0,00	21,50±0,71	20,33±0,58	21,33±0,58	12,33±1,53	15,33±0,58	16,33±0,58	13,33±0,58
Sacramento 11	0,00±0,00	0,00±0,00	15,67±0,58	16,33±0,58	14,33±0,58	11,67±0,58*	15,33±1,53	13,33±0,58
Sacramento 12	0,00±0,00	0,00±0,00	19,67±0,58	16,33±0,58	16,33±0,58	11,67±0,58	18,00±0,00	16,33±0,58
Fluconazol	22,60±2,41	-	-	-	-	-	-	-

Altinópolis 13	16,00±1,00*	15,00±0,00*	25,33±0,58	26,00±0,00	21,67±0,58	22,33±0,58	22,33±0,58	23,33±0,58
Altinópolis 14	16,00±0,00*	15,33±0,58	25,00±0,00	25,67±0,58	19,33±0,58	17,67±0,58	22,33±0,58	17,67±0,58
Altinópolis 15	18,50±2,12*	17,67±0,58	26,00±0,00	25,67±0,58	23,33±0,58	21,33±0,58	23,67±0,58	22,00±0,00
Altinópolis 16	16,33±0,58*	15,67±1,15*	26,33±0,58	27,00±1,00	24,00±1,00	24,67±0,58	26,00±0,00	26,67±0,58
Altinópolis 17	18,33±0,58*	19,33±0,58*	26,00±0,00	26,33±0,58	22,67±0,58	23,33±0,58	24,67±0,58	24,67±0,58
Altinópolis 18	25,67±0,58	26,67±0,58	27,67±0,58	28,33±0,58	25,33±0,58	24,00±1,00	25,33±0,58	25,67±0,58
Fluconazol	17,50±2,81	-	-	-	-	-	-	-
Altinópolis 19	20,67±0,58	23,00±1,00	27,00±1,00	15,67±0,58	20,00±1,00	18,33±0,58	21,67±0,58	21,33±0,58
Altinópolis 20	17,67±1,15*	15,67±0,58*	20,00±0,00	20,00±1,00	18,67±0,58	20,33±0,58	21,67±0,58	22,67±0,58
Altinópolis 21	26,33±0,58	26,00±0,00	25,33±0,58	20,33±0,58	16,33±0,58	19,67±0,58	21,67±0,58	22,33±0,58
Altinópolis 22	15,67±0,58*	16,33±0,58*	24,00±1,00	25,33±0,58	16,00±0,00	18,33±0,58	20,67±0,58	20,00±0,00
Altinópolis 23	16,67±0,58	18,00±1,00	21,33±0,58	21,67±0,58	19,33±0,58	22,00±0,00	20,33±0,58	19,67±0,58
Altinópolis 24	22,23±0,58	20,67±0,58	29,33±0,58	27,00±0,00	24,33±0,58	25,67±0,58	25,67±0,58	26,33±0,58
Fluconazol	24,75±1,71	-	-	-	-	-	-	-
Tereno 1	-	-	-	-	-	-	19,67±0,58*	19,67±0,58*
Tereno 7	21,67±0,58	21,33±0,58	26,33±0,58	27,67±0,58	26,00±0,00	26,67±0,58	25,33±0,58	27,00±0,00
Tereno 8	-	-	-	-	-	-	22,00±0,00*	21,33±0,58*
Tereno 10	20,00±0,00*	19,00±1,00*	21,33±0,58*	20,00±0,00*	21,33±0,58*	21,33±0,58*	20,00±0,00*	18,67±0,58*
Tereno 19	24,33±0,58	24,33±0,58	24,33±0,58	25,33±0,58	20,33±0,58	21,00±0,00	21,67±0,58	21,67±0,58
Tereno 21	23,00±0,00	22,00±1,00	25,67±0,58	27,33±0,58	23,00±0,00*	23,00±0,00*	25,33±0,58	26,67±0,58
Fluconazol	34,60±1,52	-	-	-	-	-	-	-

* atividade fungistática; (-) não foi realizado; Sacramento 1 a 6: coletadas na fase de florescimento; Rifaina 1 a 6: coletadas na fase de florescimento; Altinópolis 1 a 6: coletadas na fase de florescimento e primavera; Altinópolis 7 a 12: coletadas no verão; Campo Alegre do Goiás 1 a 6: Coletadas na fase vegetativa; Rifaina 7 a 12: Coletadas na fase vegetativa/pré-floração; Sacramento 7 a 12: Coletadas na fase vegetativa/pré-floração; Altinópolis 13 a 18: Coletadas na fase vegetativa/pré-floração e outono; Altinópolis 19 a 24: Coletadas no inverno; Tereno 1, 7, 8, 10, 19, 21: Coletadas na fase vegetativa.

4.4 Influência da idade da planta e substrato na atividade farmacológica de *C. regium*

Neste experimento foram consideradas as atividades fungistáticas. Ao analisá-la, foi possível constatar que plantas cultivadas tanto na areia quanto no solo+esterco apresentaram o efeito medicinal preconizado. No entanto, em todas as idades, com exceção de 2 e 4 meses, cuja atividade foi nula, as plantas cultivadas em solo+esterco apresentaram somente atividade fungistática (Figuras 7 e 8). Na areia, a atividade biológica teve início em plantas com 4 meses (Figuras 7 e 8), ou seja, os ativos estavam presentes nas raízes cultivadas em solo+esterco, porém, em concentrações mais baixas do que nas cultivadas na areia, não sendo possível detectar seu efeito fungicida. Atividade fungistática significa basicamente, que há inibição do crescimento do microrganismo, enquanto que a fungicida, mata o microrganismo (GRAYBILL et al., 1997). A importância da atividade fungistática no tratamento de infecções tem ganhado cada vez mais espaço entre os pesquisadores, pois, geralmente, apresenta menor toxicidade (GRAYBILL et al., 1997) e estimulam a atuação do sistema imunológico do hospedeiro sobre a infecção. Entretanto, apesar de muitos estudos incluírem resultados sobre atividade fungistática de extratos ou substâncias isoladas, pouco se sabe sobre o comportamento desta no microrganismo e no ser humano.

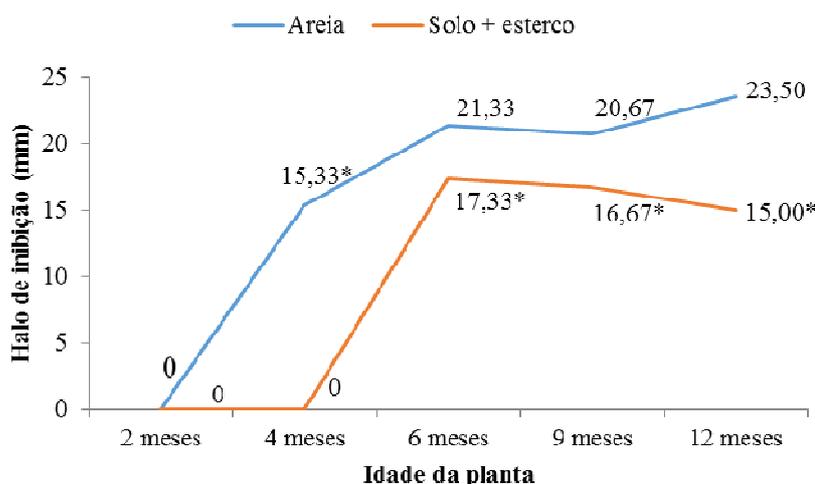


Figura 7: Atividade antimicrobiana de raízes de *Cochlospermum regium* frente a *Candida albicans* cultivadas em areia e solo+esterco coletadas com diferentes idades.

* atividade fungistática.

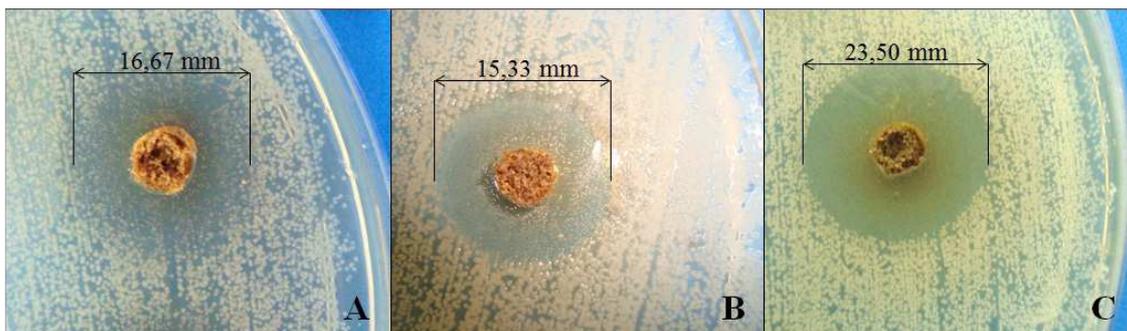


Figura 8: Valor médio da atividade fungistática (mm) de raízes de *Cochlospermum regium* (A) cultivadas em solo+esterco com 9 meses, (B) cultivadas em areia por 4 meses e (C) atividade fungicida de plantas de *Cochlospermum regium* cultivadas em areia por 12 meses.

Fonte: Arquivo pessoal.

Vale ressaltar que, inicialmente, o objetivo era avaliar, também, parâmetros agrônômicos de cultivo entre os substratos propostos. Entretanto, a germinação de sementes em solo+esterco foi dificultada e resultou em um número muito baixo de indivíduos para que as análises fossem realizadas. Mas, foi possível fazer algumas observações: o florescimento ocorreu nas plantas cultivadas em casa de vegetação. Plântulas mantidas tanto na areia, como no solo+esterco floresceram com 4 meses (mês de outubro) (Figura 9A), o que equivaleu com a época de florescimento da espécie em habitat natural, considerando que a coleta das plantas, para o estudo do efeito antimicrobiano, foi realizada no mês de setembro. A partir de 9 meses, plantas mantidas na areia apresentaram sintomas de deficiência nutricional e iniciaram processo de senescência (Figura 9B), o que não ocorreu com as plantas mantidas no solo+esterco. E, com 12 meses (mês de junho) as folhas das plantas mantidas em ambos substratos estavam senescentes, com coloração avermelhada/amarronzada (com menos intensidade nas plantas cultivadas no solo+esterco) também equivalendo ao que ocorre com essas plantas em habitat natural, uma vez que, nessa época, as folhas de *C. regium* entram em senescência, e em seguida, as plantas ficam caducas antecedendo o florescimento. Nesta época também, algumas plantas mantidas em solo+esterco floresceram (Figura 9C). Não obstante, as plantas cultivadas no solo+esterco apresentaram a parte aérea muito mais desenvolvida e maior do que a raiz, ocorrendo o contrário com as plantas cultivadas na areia (Figura 9D).



Figura 9: (A) Florescimento de plântulas de *Cochlospermum regium* mantidas areia com 4 meses; (B) Plantas de *Cochlospermum regium* cultivadas em areia com sintomas de deficiência nutricional e senescência; (C) Florescimento de plantas de *Cochlospermum regium* mantidas em solo+esterco com 9 meses e (D) plantas cultivadas em solo+esterco com razão raiz: parte aérea menor.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 Interação dos constituintes do solo x atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*

A correlação simples realizada entre os componentes do solo e a atividade antimicrobiana das raízes de *C. regium* demonstrou que, com exceção da casca, quanto mais pobre o solo, mais ativa é a raiz (Figura 10). Esses dados corroboram com os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho em casa de vegetação, o qual mostrou que raízes de plantas cultivadas em areia apresentam maior atividade antimicrobiana que as cultivadas em solo misturado com esterco. Esse fato poderia ser explicado pela adaptação que ocorre com as plantas ao longo dos milhares de anos e o Cerrado, de maneira geral, é um bioma característico por apresentar solo com baixo teor de matéria orgânica, baixa C.T.C. e saturação de bases, elevada acidez e baixa disponibilidade de nutrientes (FALEIRO e NETO, 2008) e *C. regium* é uma espécie que ocorre somente em áreas de Cerrado, ou seja, está adaptada as condições deste bioma.

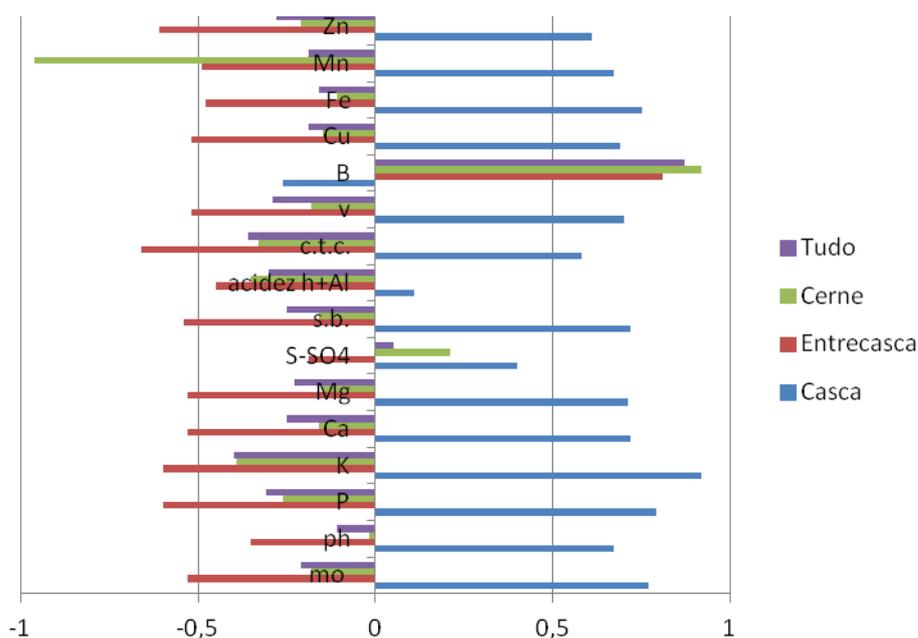


Figura 10: Correlação entre a atividade antimicrobiana e análise de solo nas populações de *Cochlospermum regium*.

Com relação aos componentes principais, os dois primeiros componentes encerram 91,82% da variação total. As maiores cargas foram detectadas para a variável atividade biológica no primeiro componente e potássio (K) no segundo componente, que portanto, foram as variáveis de maior contribuição para a variabilidade observada. Na figura 11 é apresentada uma dispersão gráfica das cinco populações de *C. regium* em relação aos dois primeiros componentes principais. Verifica-se uma tendência de agrupamento por localização geográfica.

Esse resultado ainda indica que, caso seja realizado um estudo de produção em campo com adubação, o macronutriente potássio é o que deverá ser avaliado no intuito de verificar dose *versus* efeito biológico. O baixo teor de potássio em uma planta, dentre inúmeras alterações metabólicas, também altera a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Em uma revisão, Shin (2011) demonstra que a baixa concentração de potássio aumenta a produção de EROs, que é um importante sinalizador para o etileno e ácido jasmônico. O etileno, por sua vez, tem papel importante na síntese de compostos fenólicos, inclusive nas raízes (LEWIS et al., 2011; MUDAY et al., 2012; KRAMER et al., 2013). Este fato poderia justificar a influência do baixo teor de potássio na atividade antimicrobiana de raízes de *C. regium*, pois, estas apresentam compostos

fenólicos como constituintes majoritários (SÓLON et al., 2012), os quais, conhecidamente, apresentam uma gama de atividades biológicas.

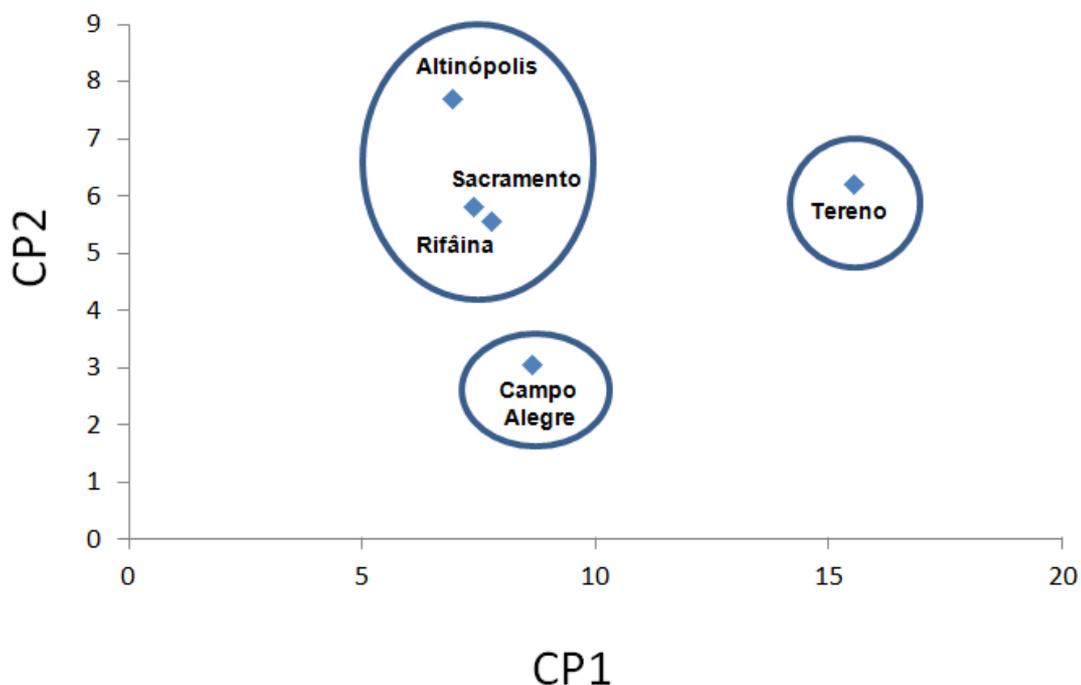


Figura 11: Análise de componentes principais (ACP) de cinco populações de *Cochlospermum regium*.

5. CONCLUSÕES

A concentração de ativos presentes em raízes de *Cochlospermum regium*, avaliadas através da atividade antimicrobiana, são influenciadas diretamente pelas estações do ano, sendo o outono e inverno as estações que propiciaram a maior atividade antimicrobiana, possivelmente, devido ao estresse hídrico aos quais as plantas estão submetidas nestes períodos. Além disso, plantas adultas e cultivadas em solos pobres apresentaram maior atividade antimicrobiana. Sendo assim, para obtenção de maior efeito terapêutico desta espécie, recomenda-se a coleta de plantas adultas no outono ou inverno e a utilização de toda raiz sem autoclavar.

Capítulo III. ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE RAÍZES DE *Cochlospermum regium*

1. INTRODUÇÃO

Muitas são as dificuldades quando se trabalha com plantas medicinais. As diferentes condições em que a planta se encontra, interferem na composição dos metabólitos secundários da mesma. O estágio de desenvolvimento, a sazonalidade, a variabilidade genética, a forma e hora de colheita são fatores agronômicos que interferem diretamente na qualidade e quantidade de substâncias bioativas presente nas plantas medicinais e, conseqüentemente, no efeito biológico que estas apresentam. Além disso, existem os genótipos os quais também podem apresentar atividades farmacológicas diversas (SCHLAG e MCINTOSH, 2006; MORAIS, 2009; FACHINETTO e TEDESCO, 2009).

Além dos fatores agronômicos, existem os aspectos físicos que também interferem na qualidade da produção do fitoterápico, como, por exemplo, a forma de secagem e moagem do material vegetal. Outro aspecto importante está relacionado à extração dos princípios ativos que envolvem a escolha do solvente, a forma de preparação do extrato (infusos, maceração estática, etc) e a solubilidade dos compostos de interesse. Da mesma maneira, um extrato aquoso preparado em forma de decocção ou em infusão, pode responder diferentemente aos ensaios biológicos (PEITZ et al., 2003; BANDEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2008; LI e VEDERAS, 2009). Além disso, muitos estudos

fitoquímicos não são realizados em conjunto com ensaios biológicos, o que muitas vezes, resulta no isolamento de moléculas não ativas.

A fim de suprir tal dificuldade, o teste de bioautografia pode ser uma solução. Este teste avalia a atividade biológica de compostos já eluidos em placas cromatográficas (MARSTON, 2011), sem que para isso haja necessidade de controlar o uso de solventes na solubilização das amostras, tornando o isolamento de compostos ativos cada vez mais preciso, pois trata-se de um estudo fitoquímico biomonitorado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar a substância ativa de raízes de *Cochlospermum regium* contra *Candida albicans*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar ensaios fitoquímicos biomonitorados de extratos de raízes de *C. regium*;
2. Purificar extratos e frações bioativas;
3. Identificar por métodos espectroscópicos a estrutura dos compostos ativos;
4. Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo da amostra e do extrato

Considerando que todos os indivíduos das análises anteriores apresentaram atividade contra *C. albicans*, foi selecionado para realização dos ensaios fitoquímicos um indivíduo de Altinópolis (A6) em função da maior biomassa para a obtenção de extratos. Este, foi coletado na primavera de 2010, na fase de florescimento. A raiz deste indivíduo foi limpa, seca em estufa de ar circulante a 45 °C por 48 h. Logo após, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas rendendo 1,285 kg e, em seguida, peneirado (48 mesh). A droga vegetal foi submetida a maceração por dois dias, com etanol:água (8:2, v:v), sendo o procedimento repetido duas vezes. A proporção de

material vegetal e o solvente foi 2:8 (m:v). Em seguida, o extrato foi rotaevaporado e liofilizado.

Parte do material liofilizado (48 g) foi diluído em 600 mL de metanol:água (1:1, v:v) e submetido a uma partição líquido/líquido (partição 1) utilizando-se os seguintes solventes, nesta ordem: hexano – HEX (3x de 600 mL), acetato de etila – EAE (3x de 600 mL) e diclorometano – DCM (3x de 600 mL). Os extratos resultantes desta partição foram rotaevaporados e, em seguida, este material foi submetido ao teste STAMP (metodologia desenvolvida neste trabalho – INÁCIO et al., 2013) para verificar a atividade antimicrobiana (Figura 12).

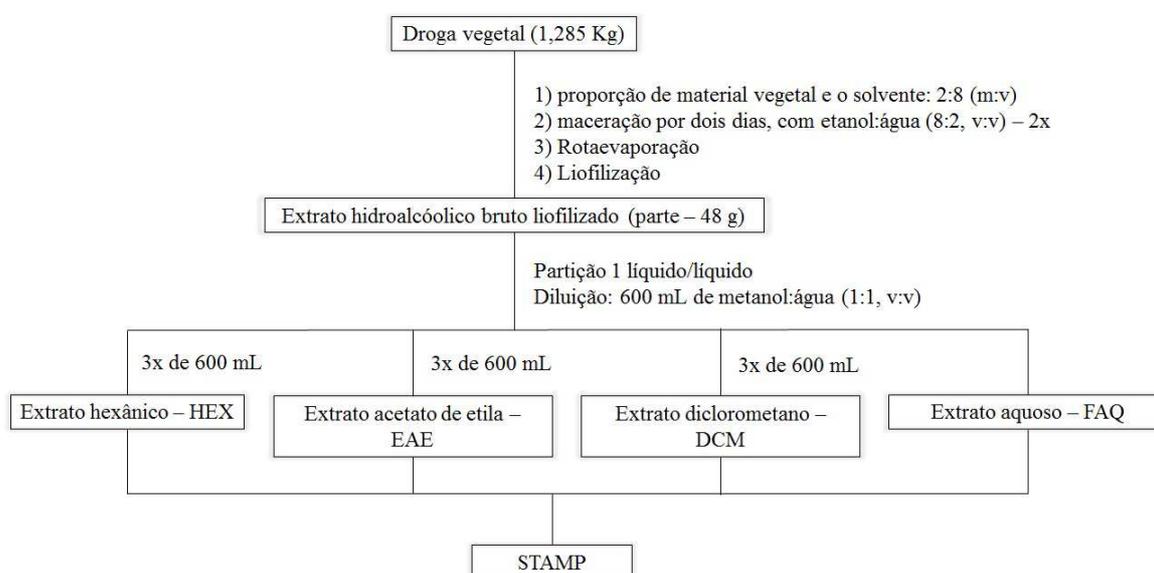


Figura 12: Partição do extrato hidroalcoólico bruto de raízes de *Cochlospermum regium*.

3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato acetato de etila (EAE)

Várias análises cromatográficas, em camada delgada, foram realizadas com o extrato acetato de etila, oriundo da partição 1.

As cromatoplasas utilizadas nos experimentos foram de sílica gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL/UV₂₅₄ – MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Kg - Germany). Primeiramente foram avaliadas algumas condições de fase móvel como segue:

- BAW (n-butanol: ácido acético: água 4:1:5, v/v/v)
- Metanol: acetato de etila (1:1, v/v)
- Acetato de etila (100%)
- Clorofórmio: metanol (2:3, v/v)

- Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8, v/v/v/v)
- Clorofórmio: metanol (8:2, v/v)
- Clorofórmio: metanol (6:4, v/v)

Como reveladores foram utilizados: ácido sulfúrico, vanilina clorídrica e NP PEG, além da visualização em UV (comprimentos 254 e 320 nm).

3.3 Bioautografia

A bioautografia foi realizada conforme Rahalison et al. (1991) com algumas modificações. O microrganismo utilizado em todos os testes foi *Candida albicans* ATCC 10231. Inicialmente, o microrganismo estocado em temperatura de -80 °C foi reativado em meio ágar Sabouraud e mantido por 24 horas em estufa a 37 °C. Posteriormente, este microrganismo foi repicado no mesmo meio e mantido por mais 24 horas nas mesmas condições de crescimento. Após este período, a concentração de microrganismo foi ajustada, utilizando-se solução salina 0,85%, em espectrofotômetro a 530 nm e transmitância de 72 a 75%. Desta solução de microrganismo ajustada, foram removidos 500 µL e adicionados a 50 mL de meio ágar Mueller Hinton, o qual permanecia em banho-maria a aproximadamente 50 °C, o que equivaleu a uma quantidade de 10^5 células mL⁻¹ de inóculo. Em seguida, aproximadamente 10 mL de meio ágar Mueller Hinton com microrganismo foi distribuído sobre a placa cromatográfica (10 x 10 cm). Nesta placa cromatográfica o extrato já havia sido eluído pelo solvente orgânico e permanecido 24 horas em capela para evaporação total dos solventes.

As cromatoplasmas foram mantidas em uma placa de Petri (15 cm) sobre papel de filtro umedecido com água destilada, sendo estes dois últimos autoclavados. Após a distribuição do meio de cultura contendo microrganismo, na placa, estas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas. Decorrido este período, as placas cromatográficas com o microrganismo foi pulverizada com uma solução de MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio (2,5 mg mL⁻¹) e incubada a 37 °C por 3-4 horas. Na região em que houve inibição, o meio de cultura não foi colorido de roxo pelo MTT.

3.4 Bioautografia do extrato acetato de etila (EAE) obtido da partição

Para avaliação da atividade antimicrobiana através da bioautografia, o extrato acetato de etila obtido da partição (partição 1) foi submetido a CCD com 3 sistemas de solvente: BAW; metanol:acetato de etila 1:1 e clorofórmio: ácido acético:metanol:água (64:32:12:8). As placas obtidas nestes sistemas foram submetidas a bioautografia.

Primeiramente, foram avaliadas a massa de amostra aplicada na placa partindo de uma concentração de 10 mg mL⁻¹ da partição acetato de etila (EAE). Desta, foram aplicadas na placa: 2, 4, 6 e 8 µL o que corresponde a 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08 mg de massa na placa. Este material foi, então, avaliado através da bioautografia.

Após determinar o volume ideal a ser aplicado (6 µL), foram modificadas as concentrações de extrato: 12, 15, 20 e 30 mg mL⁻¹. Nestas condições, as placas foram eluídas em metanol: acetato de etila (6:4 e 1:1) e BAW. Logo em seguida foi realizada a bioautografia.

3.5 Fracionamento em coluna do extrato acetato de etila (EAE) obtido da partição

O extrato acetato de etila - EAE (10,8 g) foi submetido a um fracionamento em coluna de sílica gel G60 (25 e 5 cm de altura e diâmetro, respectivamente) utilizando como eluente as seguintes misturas de solventes:

- Acetato de etila:metanol (8:2, v:v) - F1;
- Acetato de etila:metanol (7:3, v:v) - F2;
- Acetato de etila:metanol (6,5:3,5, v:v) – F3;
- Acetato de etila:metanol (6:4, v:v) – F4;
- Acetato de etila:metanol (5,5:4,5, v:v) – F5;
- Acetato de etila:metanol (5:5, v:v) – F6;
- Acetato de etila:metanol (4,5:5,5, v:v) – F7;
- Acetato de etila:metanol (4:6, v:v) – F8;
- Acetato de etila:metanol (3:7, v:v) – F9;
- Acetato de etila:metanol (2:8, v:v) – F10;
- Metanol – F11;
- Água – F12.

As 12 frações obtidas foram, isoladamente, solubilizadas em metanol (1 mg mL^{-1}) e aplicadas em placa para a realização de um novo ensaio de bioautografia, sem que estas frações fossem eluídas com solvente (Figura 13). Na placa foram aplicados $10 \mu\text{L}$ de cada fração.

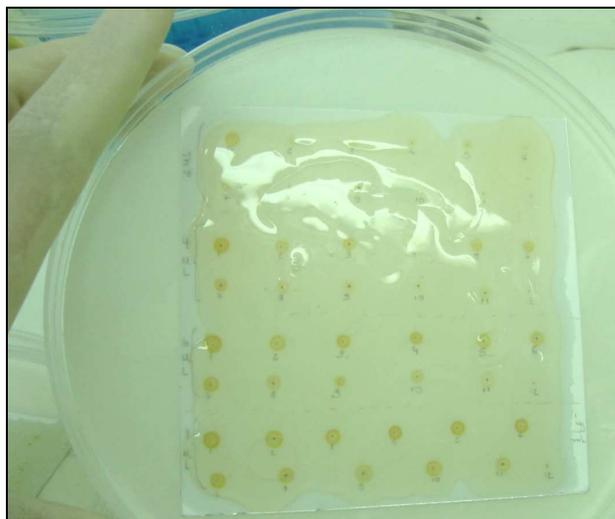


Figura 13: Bioautografia, frente a *Candida albicans* ATCC 1023, das 12 frações obtidas a partir do extrato acetato de etila (EAE) submetido à cromatografia em coluna.

Fonte: Arquivo pessoal.

3.6 Análise da fração ativa F1 (8:2 acetato de etila: metanol) em CG-EM

Para análise dos constituintes químicos presentes na fração acetato de etila:metanol (8:2), esta foi analisada por CG-EM antes e após ser silanizada. As condições de análise foram: Coluna capilar: DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) Agilent J&W; Temperatura do injetor: 260 $^{\circ}\text{C}$; Temperatura do detector: 250 $^{\circ}\text{C}$; Impacto de elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: $1,1 \text{ mL min}^{-1}$; Split: 1/40; Programa de Temperatura: 100 –290 $^{\circ}\text{C}$, 3 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Volume de injeção: 1 μL de solução (1 μL da amostra/1 mL AcOEt). O equipamento CG-EM utilizado foi da marca Shimadzu-QP-2010.

A identificação da substância foi realizada por comparação do espectro de massas da amostra analisada com as bibliotecas Wiley7 e Nist08.

Reação de silanização

Para silanização da fração F1 foram pesados 5 mg da amostra hidrolisada, a qual foi diluída em 100 μ L de piridina. Adicionou-se 200 μ L do reagente BSTFA [bis (trimethylsilyl) tri-fluoroacetamide (SUPELCO) e 20,5 μ L de TMCS (Clorometiltrimetilsilano 98% - ALDRICH). Após este procedimento, a amostra foi mantida em banho-maria à 80 °C por 1,5 horas sendo resfriada logo em seguida, em temperatura ambiente em frasco fechado.

Para a hidrólise foram adicionados 100 mL de HCl (2 M) em 100 mg de amostra. Após esse procedimento, a solução foi mantida em banho-maria à 80 °C por 1,5 horas. A extração da fase orgânica foi concluída com 50 mL do solvente acetato de etila.

3.7 Otimização das condições cromatográficas em camada delgada da fração ativa F1

Para a separação dos compostos em CCD foi utilizada a fração F1 oriunda da coluna cromatográfica realizada com a partição acetato de etila (EAE). As cromatoplasmas utilizadas nos experimentos foram de sílica gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL/UV₂₅₄ – MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. Kg - Germany). Foram avaliadas algumas fases móvel como segue:

1. Metanol: acetato de etila (6:4, v/v)
2. Metanol: acetato de etila (1:1, v/v)
3. Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:10, v/v/v/v)
4. Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8, v/v/v/v)
5. Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:6, v/v/v/v)
6. Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:4, v/v/v/v)
7. Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:2 v/v/v/v)
8. BAW – n-butanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v)
9. Acetato de etila: metanol: isopropanol: água: ácido acético (7:1:2:5:0,2, v/v/v/v/v)
10. Clorofórmio: metanol: n-propanol: água (5:6:1:4, v/v/v/v)
11. Acetato de etila: n-propanol: água (140:8:80, v/v/v)
12. Acetato de etila: n-butanol: água (4:1:5, v/v/v)

Como revelador foi utilizado NP PEG, além da visualização em UV (comprimentos 254 e 320 nm).

As placas utilizadas para a realização da bioautografia foram as eluídas nas condições 6, 7, 9 e 11. A concentração da fração F1 foi de 1 mg mL^{-1} e foram aplicados $6 \text{ }\mu\text{L}$ correspondendo a $0,006 \text{ mg}$ de massa.

3.8 Otimização da quantidade de massa aplicada na CCD para bioautografia da fração ativa F1

Para determinar a quantidade de massa a ser aplicada na placa cromatográfica e encontrar o efeito antimicrobiano foram aplicados volumes de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e $48 \text{ }\mu\text{L}$ da fração F1 de uma solução com concentração de 12 mg mL^{-1} , correspondendo a 0,024, 0,048, 0,072, 0,096, 0,12, 0,144, 0,288 e $0,576 \text{ mg}$ de massa na placa. A combinação de solventes utilizada como eluente foi: clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:2, v/v/v/v).

3.9 Partição da fração ativa F1

A fração F1 ($3,7574 \text{ g}$) foi diluída em 200 mL de metanol:água (1:1) e submetida a uma partição (partição 2) com os seguintes solventes: hexano – HEX2 (3x de 100 mL), acetato de etila - EAE2 (3x de 100 mL) e diclorometano – DCM2 (3x de 100 mL). Uma emulsão foi formada no momento da separação com diclorometano e também foi separada (Figura 14). Os extratos resultantes desta partição foram concentrados em rotaevaporador e secos em capela, em seguida, submetidos a bioautografia (sem eluir a placa) para verificar a atividade antimicrobiana, todas na concentração de 12 mg mL^{-1} e sendo aplicados na placa $10 \text{ }\mu\text{L}$, o que equivale a $0,12$ de massa.

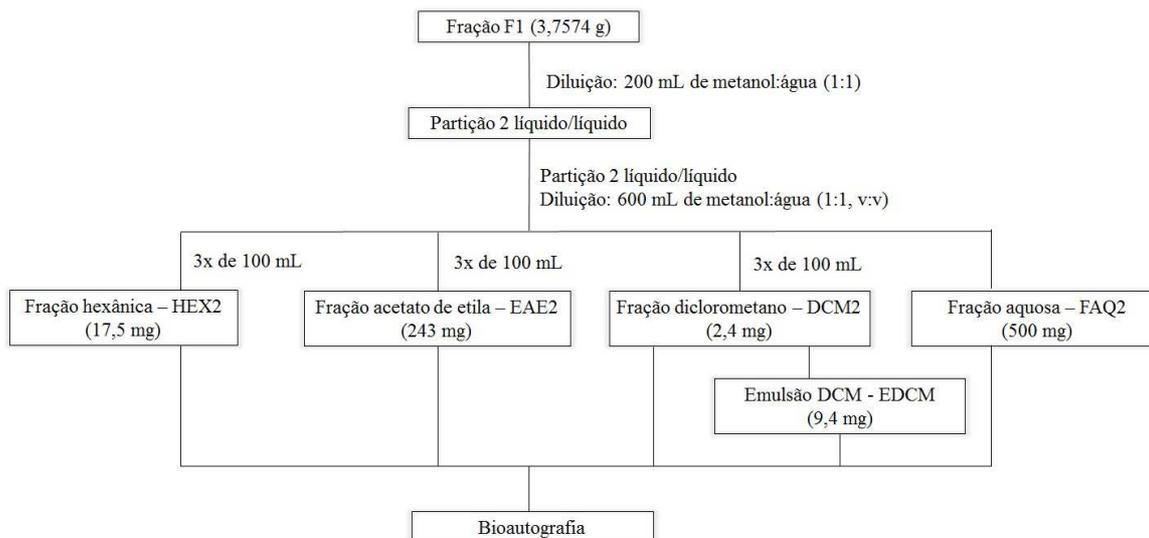


Figura 14: Partição da fração F1 (8:2 acetato de etila: metanol) oriunda do extrato acetato de etila (EAE) de raízes de *Cochlospermum regium*.

3.10 Purificação da fração aquosa ativa obtida da fração F1 por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Para fins de purificação a fração aquosa ativa, obtida da fração F1, foi submetida a purificação em CLAE preparativa (cromatógrafo SHIMADZU), coluna SHIMADZU PREP-ODS (50 x 250 mm, 15 μm), fase móvel H_2O (A) e MeOH (B) e fluxo de 20 mL/min. O volume de injeção foi de 4 mL e o monitoramento foi realizado a 350 nm (detector UV/Visível - SPD 20A). A condição inicial de corrida cromatográfica foi de 30% (B), passando para 50% (B) com 23 minutos, voltando a 30% (B) em 20 minutos e finalizando com 26 minutos. No CLAE preparativo foram geradas 22 frações, as quais foram monitoradas por CLAE analítico. Algumas frações foram selecionadas para refracionamento em CLAE preparativo.

As frações denominadas MA8, MA9 e MA11 foram submetidas a nova purificação em CLAE preparativo, sendo as frações aplicadas separadamente no mesmo (cromatógrafo SHIMADZU, coluna Phenomenex Luna C-18 (10 x 250 mm, 5 μm), fase móvel H_2O (A) e MeOH (B) e fluxo de 2 mL min^{-1}). O volume de injeção foi de 2 mL e o monitoramento foi a 350 nm (detector UV/Visível - SPD 20A). A condição inicial foi de 10% (B), passando para 55% (B) com 60 minutos, voltando a 10% (B) e finalizando com 80 minutos. A condição inicial da fase móvel para purificação da fração MA11 foi de 20% (B), passando para 60% (B) com 60 minutos, voltando a 20% (B) e finalizando com

80 minutos. As frações foram monitoradas por CCD e CLAE analítico. Posteriormente, reagrupadas de acordo com o perfil químico. O rendimento das substâncias purificadas foi o seguinte: **(1)** 21 mg (10,3 minutos), **(2)** 12 mg (7,9 minutos) e **(3)** 65 mg (10,0 minutos).

As amostras selecionadas foram analisadas em CLAE analítico: coluna Supelcosil LC-18 (25,0 cm x 4,6 mm, 5 μ m), fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e como fase móvel, ácido acético 0,1% (A) e metanol (B). A condição inicial foi de 30% em B, passando para 50% (B) com 20 minutos, voltando a condição inicial aos 22 minutos e parando com 25 minutos. Cromatógrafo SHIMADZU acoplado a um detector de arranjo de diodo (SPD M10A) foi utilizado como CLAE analítico.

3.11 Identificação dos flavonóides isolados por CLAE preparativo

As substâncias 1, 2 e 3 isoladas em CLAE preparativo foram submetidas a Ressonância Magnética Nuclear na Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto) e a identificação dos compostos foi feita em colaboração com a Prof^a Dr^a Silvia Helena Taleb Contini da Universidade de Ribeirão Preto.

3.12 Concentração inibitória mínima (CIM) da substância Diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo

O efeito da atividade antimicrobiana foi avaliado pelo método de microdiluição em meio RPMI em placas contendo 96 poços, seguindo as normas CLSI M27-A2 (2002).

A concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 530 nm e a faixa de transmitância entre 72 a 75%. Em seguida, o inóculo padrão foi diluído 50 vezes seguida de uma nova diluição de 20 vezes. Após, 100 μ L deste foi utilizado por poço para cada de microrganismo ensaiada.

Controles de esterilidade do meio de cultura e das substâncias foram realizados conjuntamente. A CIM correspondeu à menor concentração inibitória da substância onde não houve crescimento macroscópico das linhagens microbianas avaliadas comparadas com o crescimento do controle positivo.

Para a montagem da placa 200 μ L da amostra foram colocados em 3 poços da fileira 1, sendo que as três últimas colunas foram reservadas para o controle de

meio, das substâncias e do microrganismo. Nas colunas 2 a 12 foram adicionados 100µL de meio de cultura com auxílio de pipetador automático. Em seguida, a partir da coluna um, iniciou-se a diluição seriada até a coluna 9.

A concentração máxima utilizada de diidrokaempferol-3-O-β-glicopiranosídeo foi de 200 µg mL⁻¹. O microrganismo utilizado foi *Candida albicans* ATCC 10231. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O controle positivo foi anfotericina B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 STAMP da partição 1

Todas as partições, obtidas do extrato hidroalcoólico da raiz de *C. regium*, apresentaram atividade frente a *C. albicans*, inclusive próprio o extrato hidroalcoólico liofilizado e a droga vegetal da raiz toda, os quais foram utilizados como controles positivos (Figura 15). Entretanto, o extrato acetato de etila (EAE) foi o mais ativo, com halo de inibição de 37,33 mm (Figura 16). Apesar da utilização de microrganismos diferentes, Sólón et al. (2012) também verificaram que a partição acetato de etila obtida de extrato hidroalcoólico de raízes de *C. regium* foi a mais ativa frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A partir destes resultados, os ensaios fitoquímicos subsequentes foram realizados com o extrato acetato de etila (EAE), cuja atividade farmacológica foi superior às demais.

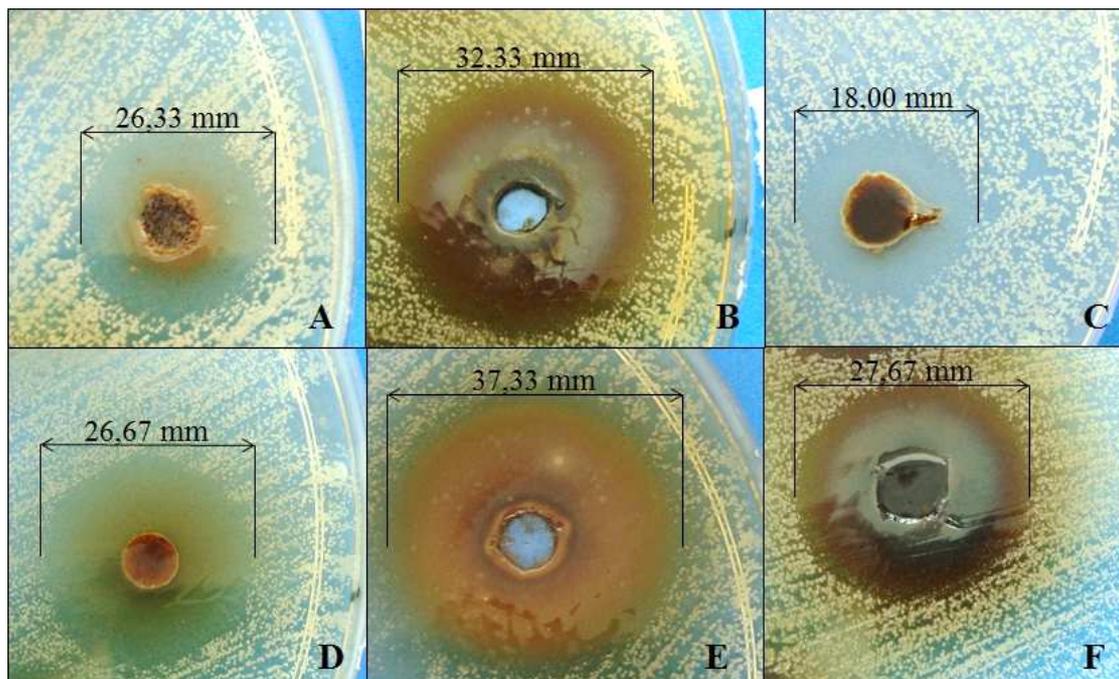


Figura 15: Valor médio da atividade antimicrobiana medidas em halo de inibição (mm): (A) da droga vegetal da raiz de *Cochlospermum regium* coletada em Altinópolis – SP (A6), (B) do extrato hidroalcoólico liofilizado (EtOH:H₂O), (C) da partição hexano (Hex), (D) diclorometano (DCM), (E) acetato de etila (EAE) e (F) aquosa (FAQ).

Fonte: Arquivo pessoal.

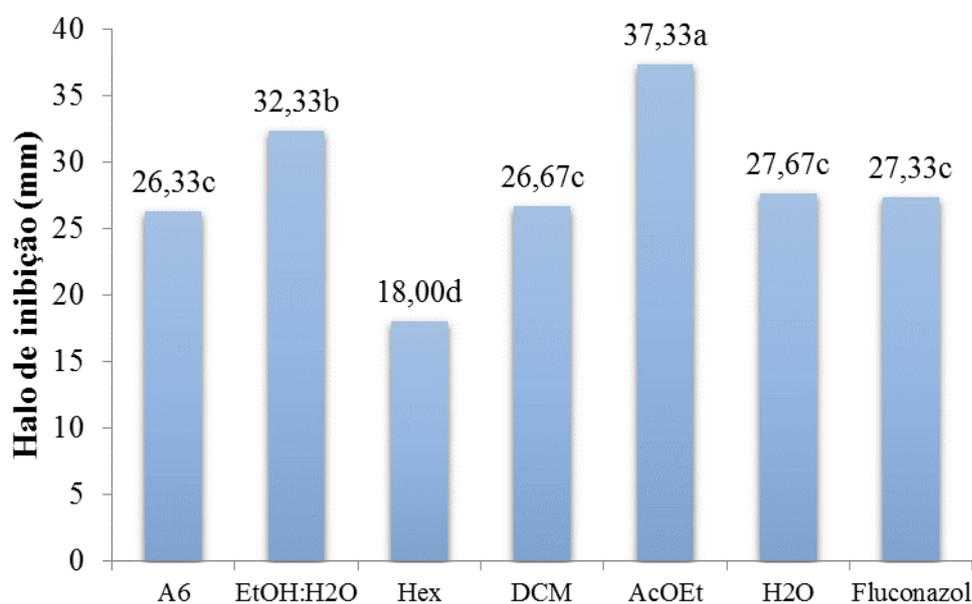


Figura 16: Atividade antimicrobiana medidas em halo de inibição (mm) da droga vegetal da raiz de *Cochlospermum regium* coletada em Altinópolis (A6), do extrato hidroalcoólico liofilizado (EtOH:H₂O) e dos extratos hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOET), aquosa (H₂O) e do antibiótico fluconazol a 1 mg g⁻¹.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

4.2 Bioautografia da partição acetato de etila (EAE)

Os ensaios de bioautografia realizados com a partição acetato de etila (EAE – partição 1) revelaram atividade antimicrobiana com 4, 6 e 8 μL (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando eluídas com sistema solvente BAW e metanol:acetato de etila (1:1) (Figura 17). A mesma amostra eluída com clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8) não apresentou atividade antimicrobiana (Figura 17).

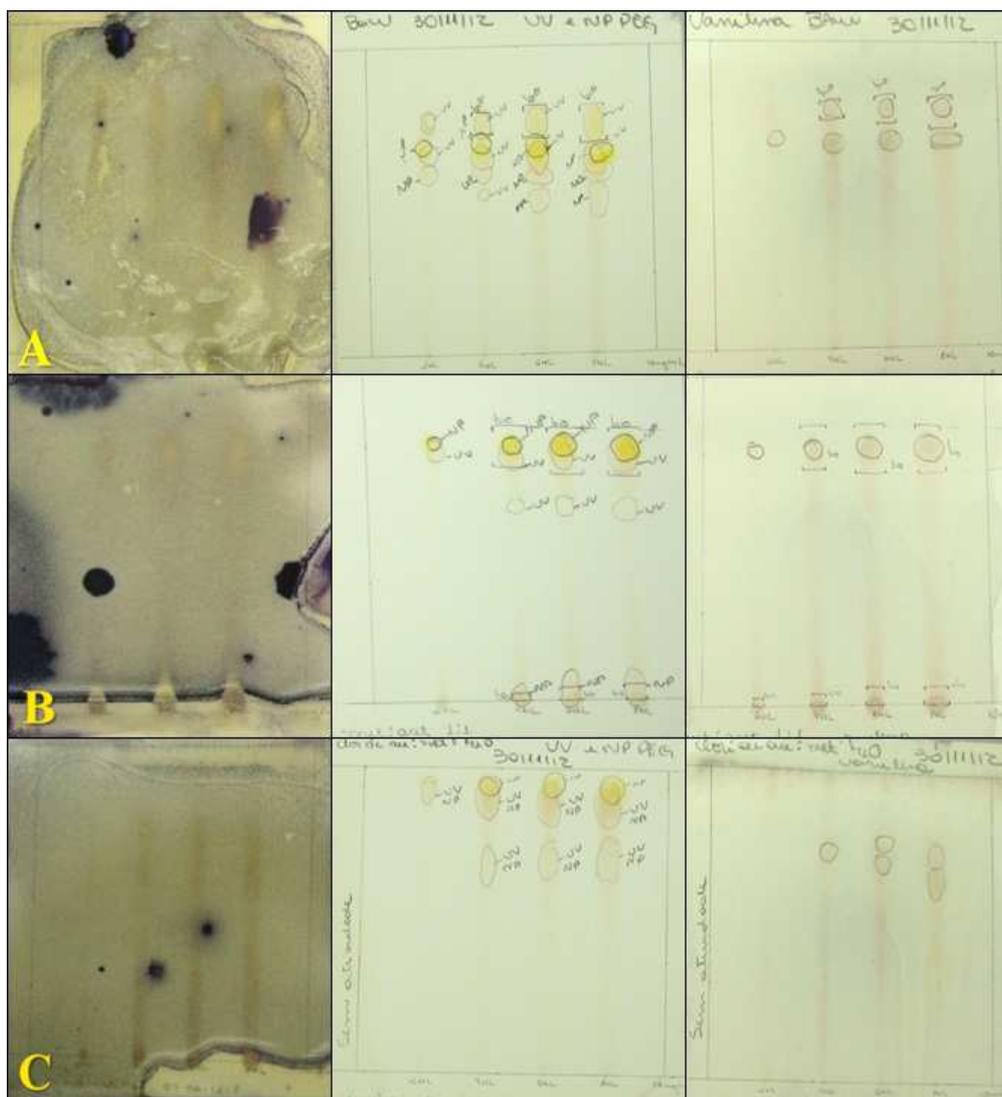


Figura 17: Bioautografia da partição acetato de etila (EAE - partição 1) na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ aplicadas nos volumes de 2, 4, 6 e 8 μL e eluídas em (A) BAW, (B) metanol:acetato de etila (1:1) e (C) clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8), frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após vários experimentos para se determinar o volume e concentração ideais de amostra a serem aplicados na placa cromatográfica foi estabelecido que 6 μL da solução na concentração de 12 mg mL^{-1} foi a mais adequada para a realização dos ensaios de bioautografia (Figura 18).

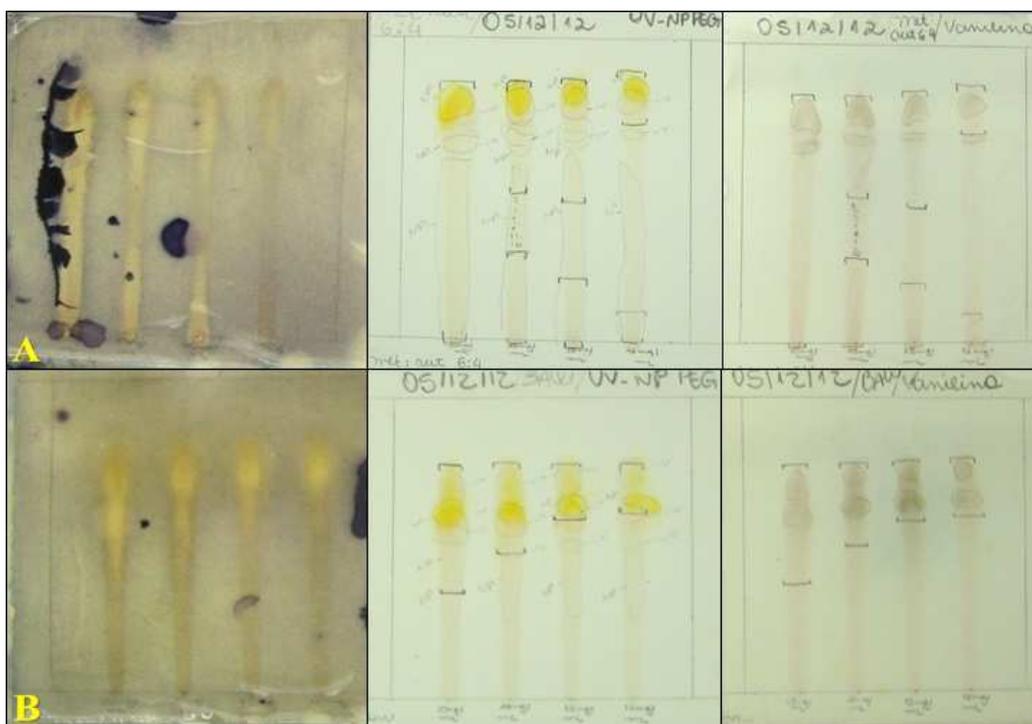


Figura 18: Bioautografia da partição acetato de etila (EAE - partição 1) na concentração de 30, 20, 15 e 12 mg mL^{-1} aplicadas no volume 6 μL e eluídas em (A) metanol:acetato de etila (6:4) e (B) BAW, frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Fonte: Arquivo pessoal.

A atividade antimicrobiana, observada na bioautografia, de placas eluídas nos sistema solvente BAW e metanol:acetato de etila (1:1) foi igualmente eficiente. Entretanto, o eluente metanol:acetato de etila (1:1) foi escolhido como o mais adequado por apresentar menor tempo de corrida cromatográfica e boa resolução cromatográfica. Assim, este sistema foi utilizado para a realização de coluna preparativa objetivando o isolamento do(s) composto(s) ativo(s).

4.3 Fracionamento em coluna da partição acetato de etila (EAE)

Das 12 frações oriundas da coluna cromatográfica, apenas a fração eluída com acetato de etila:metanol (8:2), ou seja a fração F1, apresentou atividade contra *C. albicans* (Figura 19) na concentração de 1 mg mL⁻¹ (10 µL).

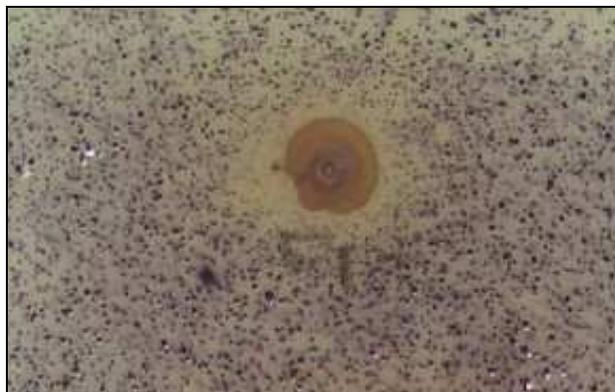


Figura 19: Atividade antimicrobiana obtida da fração F1 (1 mg mL⁻¹, 10 µL) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 através da bioautografia.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos resultados obtidos, as etapas de isolamento do(s) composto(s) ativos(s) foram realizadas utilizando-se a fração F1.

4.4 Análise da fração ativa F1 em CG-EM

A seguir, estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) realizada com a fração F1 silanizada.

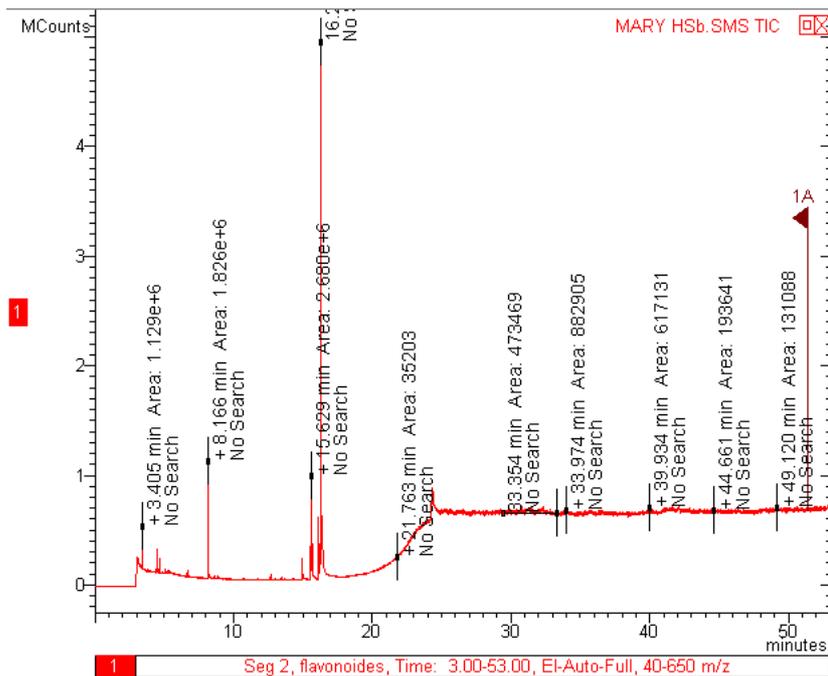


Figura 20: Cromatograma obtido pela análise em CG-EM da fração F1.

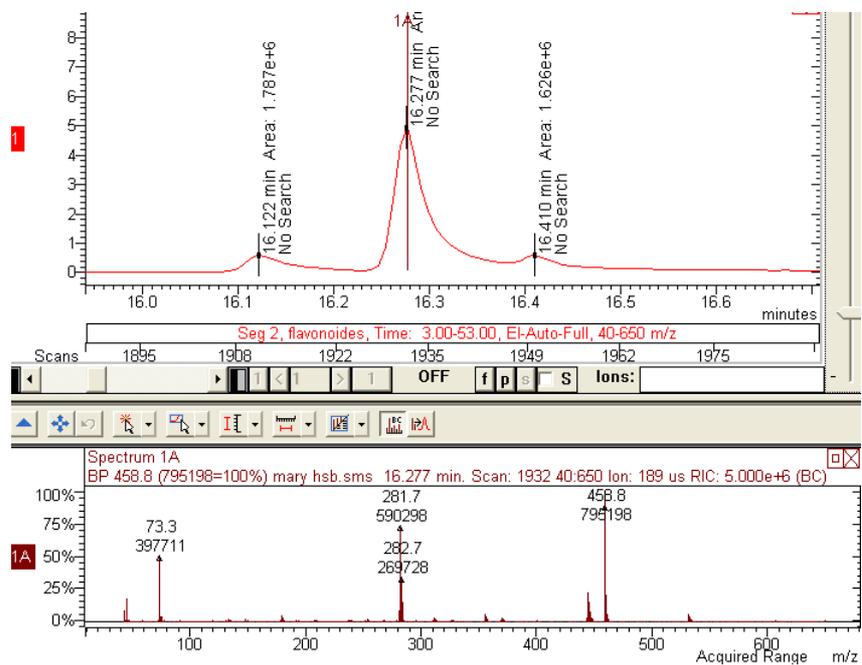


Figura 21: Expansão do cromatograma e espectro de massas do pico em $t=16,27$ minutos, obtidos após análise em CG-EM da fração F1.

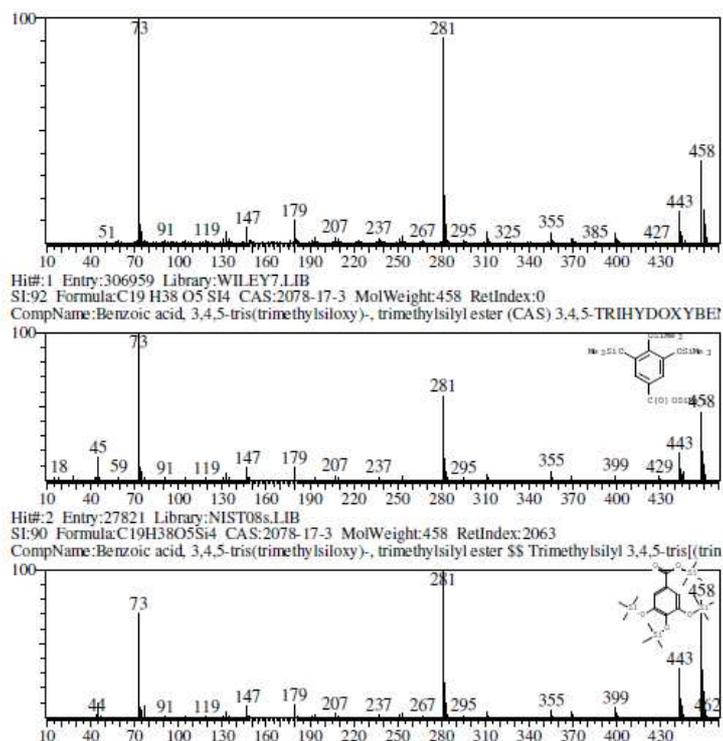


Figura 22: Espectro de massas da substância eluída (fração F1) no t=16,27 minutos, comparado com o banco de dados.

De acordo com o espectro de massas (Figura 18) o composto majoritário da fração ativa foi identificado, por comparação dos dados da biblioteca Wiley7 e Nist08, como sendo o ácido gálico (Figura 23).

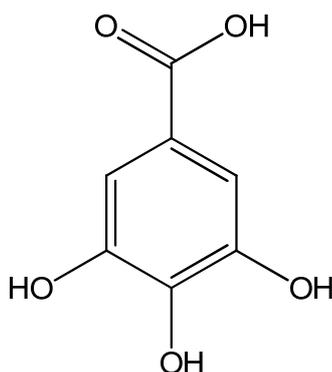


Figura 23: Estrutura química do ácido gálico.

A presença do ácido gálico como composto majoritário poderia explicar, pelo menos em parte, a atividade antimicrobiana da fração ativa frente a *Candida albicans*, uma vez que, alguns estudos comprovam sua atividade. Trabalhos realizados recentemente com a mesma linhagem de *C. albicans* (ATCC 10231), utilizando tanto CIM

quanto difusão em ágar, comprovou que o ácido gálico é ativo (GEHRKE et al., 2013; MANAYI et al., 2013). Frente a outras linhagens do mesmo microrganismo (ATCC 90028, 1435, 1555, 1434, 1818 e 2923) o ácido gálico também apresenta atividade (HONG et al., 2011; RANGKADILOK et al., 2012).

4.5 Identificação dos flavonóides isolados por CLAE preparativo

4.5.1 Identificação estrutural da substância Diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosideo (1)

Os valores dos deslocamentos químicos (δ) encontrados nos espectros de RMN¹H e RMN¹³C do flavonóide 1, indicam a presença de anel aromático e açúcar ligada à molécula.

No espectro de RMN¹H, são observados dois dubletos entre δ 5,93 e δ 5,90, com $J = 2,0$ Hz cada, referentes aos hidrogênios H6 e H8, do anel A. Na região do espectro entre δ 6,86 e δ 7,39 estão presentes dois sinais, integrando para dois hidrogênios cada, com $J = 8,0$ Hz. Estes sinais foram atribuídos aos sinais dos hidrogênios H3'/H5' e H2'/H6', respectivamente, indicando que o flavonóide possui uma substituição na posição C5', do anel B. Também foram observados dois dubletos em δ 5,26 e δ 4,98, com $J = 10,4$ Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H2 e H3, respectivamente, caracterizando assim a presença de um diidroflavonol.

O sinal na região dos hidrogênios anoméricos δ 3,80 ($J = 8,0$ Hz) indica que a unidade de açúcar ligada à molécula é a D-glucopiranosose.

Todas as atribuições dos hidrogênios da molécula foram feitas com base nos dados dos espectros de RMN¹³C (PND), e nas correlações dos espectros bidimensionais HMQC e HMBC.

A comparação entre os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da substância analisada, com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989), permitiram identificar o flavonóide como sendo o Diidrokaempferol-3-O- β -D-glicopiranosideo (Figura 24).

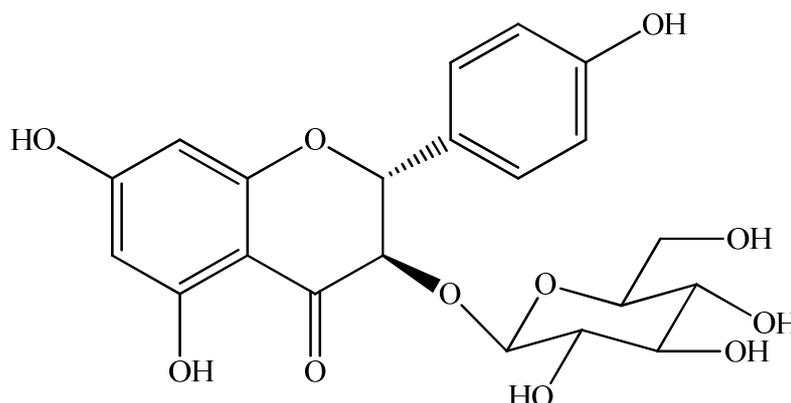


Figura 24: Estrutura química do Diidrokaempferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo

4.5.2 Identificação estrutural da substância Diidroquercetina-3-O- β -glicopiranosídeo (2)

Os valores dos deslocamentos químicos (δ) encontrados nos espectros de RMN¹H e RMN¹³C do flavonóide 2, indicam a presença de anel aromático e açúcar ligada à molécula.

No espectro de RMN¹H, são observados dois dubletos entre δ 5,93 e δ 5,88, com $J = 2,0$ Hz cada, referentes aos hidrogênios H6 e H8. Na região do espectro entre δ 6,81 e δ 6,79, está presente um dubleto ($J = 8,0$ Hz), referente ao hidrogênio H5', que está acoplado em orto com H6'. Na região entre δ 6,87 e δ 6,85 está presente um duplo dubleto ($J = 8,0$ Hz e $2,0$ Hz), referente ao o sinal do H6', o qual acopla em orto com H5' e em meta com H2'. O sinal do H2' está entre δ 6,98 e δ 6,97, acoplando em meta ($J = 2,0$ Hz) com o H6'. Também foram observados dois dubletos em δ 5,26 e δ 4,98, com $J = 10,4$ Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H2 e H3, respectivamente, caracterizando assim a presença de um diidroflavonol.

O sinal na região dos hidrogênios anoméricos δ 3,80 ($J = 8,0$ Hz) indica que a unidade de açúcar ligada à molécula é a D-glucopiranosose.

Todas as atribuições dos hidrogênios da molécula foram feitas com base nos dados dos espectros de RMN¹³C (PND), e nas correlações dos espectros bidimensionais HMQC e HMBC.

A comparação entre os valões dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da substância analisada, com os dados da literatura (AGRAWAL,

1989), permitiram identificar o flavonóide como sendo a Diidroquercetina-3-O- β -D-glicopiranosideo (Figura 25).

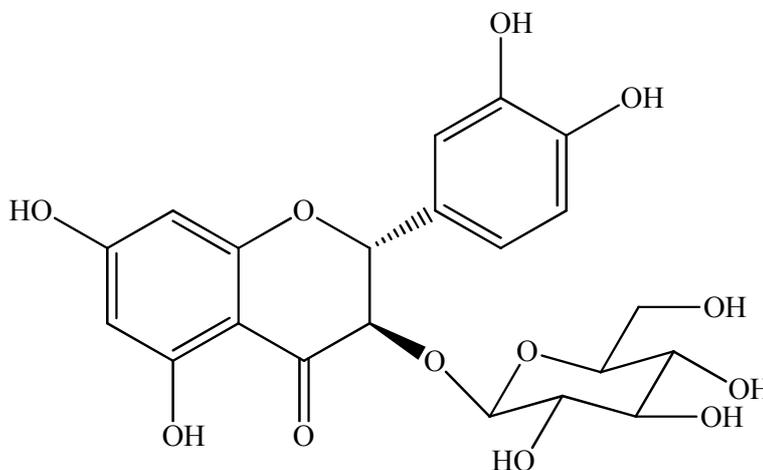


Figura 25: Estrutura química da Diidroquercetina-3-O- β -glicopiranosideo

4.6 Concentração inibitória mínima (CIM) da substância Diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosideo

O teste de CIM realizado com a substância diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosideo não apresentou atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa substância já foi isolada de raízes de *C. regium* por Oliveira et al. (1996) e Sólon et al. (2012), sendo considerada um marcador químico da espécie. Entretanto, Oliveira et al. (1996) verificaram que a mesma não foi ativa frente *S. aureus* e *E. coli*.

5. CONCLUSÃO

O método de bioautografia é eficiente para avaliar a atividade antimicrobiana das frações de raízes de *C. regium* frente a *C. albicans*. A presença de ácido gálico justifica, pelo menos em parte, a atividade anti-candida apresentada pelos extratos de *C. regium*. Além disso, a presença do flavonóide diidroquercetina-3-O- β -glicopiranosideo também pode estar relacionado a esta atividade. Já o composto diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosideo não é ativo e não pode ser considerado como o agente antimicrobiano contra *C. albicans* quando avaliado isoladamente.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Um dos objetivos principais deste trabalho foi tentar explicar porque haviam divergências, entre estudos *in vitro* e levantamentos etnofarmacológicos, sobre o efeito antimicrobiano das raízes de *C. regium*, pois os ensaios realizados em laboratório nem sempre condiziam com o efeito que a planta tem quando utilizada na medicina popular. Desta maneira, a hipótese formulada partiu da premissa que tal contradição poderia ser explicada pelo efeito de fatores ambientais e fenológicos sobre a presença ou ausência da atividade esperada. Contudo, como conclusão geral, podemos afirmar que a hipótese estava incorreta, pois, em todos os testes realizados, as raízes foram ativas. O que alterou foi a maior ou menor atividade obtida, ou seja, os efeitos ambientais e fenológicos influenciam na concentração dos ativos, sendo que no outono e inverno há um maior acúmulo destes. Sendo assim, podemos considerar que as substâncias ativas das raízes de *C. regium* são constitutivas estando presentes em qualquer época do ano e estágio fenológico. À divergência encontrada podemos atribuir ao microrganismo alvo. Nos levantamentos etnofarmacológicos as raízes de *C. regium* são indicadas para infecções do sistema reprodutor feminino e, até o presente trabalho, nenhum ensaio *in vitro* havia avaliado qualquer microrganismo causador direto de infecções vaginais, como *C. albicans*, que é a levedura que mais causa este tipo de infecção no mundo, inclusive no Brasil. Portanto, concluímos que a contradição verificada provavelmente está relacionada ao microrganismo alvo do estudo e à seletividade que as raízes de *C. regium* apresentam para esta linhagem de microrganismo.

Com relação as moléculas isoladas, verificamos que uma delas, o flavonóide diidrokaempferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, não é ativa frente a *C. albicans*. Entretanto, mais estudos sobre a atividade antimicrobiana devem ser realizadas no futuro com outras moléculas isoladas e também avaliando a sinergia das mesmas na atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHAMI, H.-R.; SCHERER, U.; KAEHLIG, H.; HETTICH, T.; SCHLOTTERBECK, G.; REICH, E.; KRENN, L. Combination of Bioautography with HPTLC–MS/NMR: A Fast Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors from Galbanum. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 395-400, 2013.

AKASE, T.; SHIMADA, T.; HARASAWA, Y.; IKEYA, Y.; NAGAI, E.; IIZUKA, S.; NAKAGAMI, G.; IIZAKA, S.; SANADA, H.; ABURADA, M. Preventive effects of *Salacia reticulata* on obesity and metabolic disorders in TSOD mice. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.

ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Biology**, v. 68, n. 1, p. 155-159, 2008.

ASTICCIOLI, S.; SACCO, L.; DATURI, R.; MATTI, C.; NÚCLEO, E.; ZARA, F.; PAGANI, L. Trends in frequency and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from women attending the STD out patients clinic of a tertiary care hospital in Northern Italy during the years 2002-2007. **New Microbiologica**, v. 32, p. 199-204, 2009.

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

BABIC, M; HUKIC, M. *Candida albicans* and non-*albicans* species as etiological agent of vaginitis in pregnant and non-pregnant women. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 89-97, 2010.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. 112 f. Tese (Doutorado). Curso de Química, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara-SP, 2004.

BOTREL, P. P; PINTO, J. E. B. P.; FIGUEIREDO, F. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Essential oil content and chemical composition in *Hyptis marrubioides* Epl. of different genotypes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.164-169, 2009.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1-12, 2009.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BUCKOW, R.; KASTELL, A.; TEREFE, N. S.; VERSTEEG, C. Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 10076-10084, 2010.

CAMILLO, J. **Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.] - Cochlospermaceae**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.-Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. SMITH). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.

CARELS, M.; SHEPHERD, D. The effect of pH and amino acids on conidiation and pigment production of *Monascus major* ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 1346-1357, 1978.

CARMONA, F.; PRADO, S. I.; SILVA, M. F. I.; GASPAR, G. G.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MARTINEZ, R.; MATSUNO, A. K.; CARLOTTI, A. P. C. P. Vancomycin-resistant *Enterococcus* outbreak in a pediatric intensive care unit: report of successful interventions for control and prevention. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 158-162, 2012.

CARVALHO, A. R. Popular use, chemical composition and trade of Cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, v. 6, n. 3, p. 307-316, 2004.

CARVALHO, P. H. V.; AQUINO, A.; DÓREA, H. S.; NAVICKIENE, S. Desenvolvimento de método para determinação de resíduos pesticidas em plantas medicinais por MSPD E GC/MS. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia: SBQ**, 2008. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0169-1.pdf>>. Acesso em: 06 set. 2009.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2004.

CASTRO, M. S. de A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O glicosildihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium***. 2000. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

ÇIRAK, C.; RADUŠIENĖ, J.; JANULIS, V.; IVANAUSKAS, L. Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. **Botanica Helvetica**, v. 117, n. 1, p. 29-36, 2007.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R.; PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 895-910, 2002.

COELHO, M.F. B.; SALES, D. M.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Germinação e emergência de *Cochlospermum regium* (Scharank) Pilg. em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 90-96, 2008.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. D.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.

COSTA, E. S. S.; DOLABELA, M. F.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, D. J.; MULLER, A. H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 4, p. 834-838, 2009.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV: viçosa (MG). 382p. 2006.

CUNHA-LAURA, A. L.; OLIVEIRA, R. J.; BARROS, A. L. C.; SIQUEIRA, J. M.; VIEIRA, M. C.; AUHAREK, S. A. Maternal exposure to *Cochlospermum regium*: a toxicological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 374-378, 2013.

DEUS, R. J. A.; CARVALHO, A. S. C.; BANNA, D. A. D. S.; ARRUDA, M. S. P.; ALVES, C. N.; SANTOS, A. S. Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 347-353, 2009.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 2, p. 429-435, 2009.

EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J.; MIRJALILI, M. H.; SONBOLI, A.; YOUSEFZADI, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 927-931, 2008.

ELHAG, H.; MOSSA, J. S.; EL-OLEMY, M. M. Antimicrobial and cytotoxic activity of the extracts of khat callus cultures. In: JANICK, J.; **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press. Alexandria, p. 463-466, 1999.

FACHINETTO, J.; TEDESCO, S. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) AP De Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.(Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.

FALEIRO, F. G.; NETO, A. L. Savanas: **Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1132p., 2008.

FERREIRA DF. 2005. **SISVAR 5.1** - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Download gratuito. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 271-277, 2008.

GEHRKE, I. T.; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; DA CRUZ, I. B.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Antimicrobial activity of *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

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

GRAYBILL, J. R.; BURGESS, D. S.; HARDIN, T. C. Key issues drugs concerning fungistatic *versus* fungicidal. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 42-50, 1997.

GUARIM-NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 17, 2006. Disponível em: <<http://www.remea.furg.br/edicoes/vol17/art34v17a5.pdf>>. Acesso em: 07 mai. 2008.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008

GULLO, F. P.; SARDI, J. C.; SANTOS, V. A.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGUI, N. S.; ROSSI, S. A.; DE PAULA, E. S. A. C.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L. R.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M. G.; MORAIS, S. A. L.; FERREIRA, S. SANTOS, D. Q.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo fitoquímico e alelopático do extrato de caule de sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 4, n. 25, 2007.

HONDA, N. K.; BRUM, R. L.; HESS, S. C.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E. Antibacterial activity of *Cochlospermum regium* essential oil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 1, p. 79-79, 1997.

HONG, L. S.; IBRAHIM, D.; KASSIM, J.; SULAIMAN, S. Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 6, p. 75-79, 2011.

INÁCIO, M. C. **Estudo agrônômico, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank): uma planta medicinal do Cerrado**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia (Horticultura), Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

INÁCIO, M. C.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 20, p. 4999-5007, 2011.

INÁCIO, M. C.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* seeds germination and *ex vitro* plants development of algodãozinho-do-campo. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2294-2300, 2010.

INÁCIO, M. C.; CARMONA, F.; PAZ, T. A.; FURLAN, M.; SILVA, F. A.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Screening test for antibiotics in medicinal plants (STAMP): using powdered plant materials instead of extracts. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 2340-2350, 2013.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, 2004.

JI, F.; ZHANG, N.; DI, W.; LIAO, Q. P.; WANG, W.; ZHAO, X. M.; SUN, Y.; LIU, Z. H. Investigation of the situation of vaginal microflora in healthy women population. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 44, n. 1, p. 9-12, 2009.

JOHANSEN, K. T.; WUBSHET, S. G.; NYBERG, N. T. HPLC–NMR revisited: using Time-Slice High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance with database-assisted dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 6, p. 3183-3189, 2013.

JUSTO, R.; SCARMINIO, I. S. Influência do solvente extrator no processo de extração de substâncias químicas *Bauhinia variegata* L. por FTIR e métodos quimiométricos. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau. **Anais...** Blumenau: FURB, 2008. Disponível em: <http://www.furb.br/temp_sbqsl/_app/_FILE_RESUMO_CD/705.pdf>. Acesso em: 04 set. 2009.

KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (MART. Ex. SCHR.) PILGER – Cochlospermaceae.** 1981. 437 f. Tese (Doutorado) - IB/USP, São Paulo, 1981.

KRAMER, M.; BUFLER, G.; ULRICH, D.; LEITENBERGER, M.; CONRAD, J.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on bitter compounds in carrots (*Daucus carota* L.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 73, p. 28-36, 2012.

LAGO, J. H.G.; ROQUE, N. F. Estudo fitoquímico da madeira de *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2351-2354, 2009.

LEWIS, D. R.; RAMIREZ, M. V.; MILLER, N. D.; VALLABHANENI, P.; RAY, W. K.; HELM, R. F.; WINKEL, B. S. J; MUDAY, G. K. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. **Plant Physiology**, v. 156, n. 1, p. 144-164, 2011.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LIMA, D. P. de; CASTRO, M. S. de A.; MELLO, J. C. P. de.; SIQUEIRA, J. M.; KASSAB, N. M. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**, Milano, v. 66, n. 6, p. 545-546, 1996.

LIMA, L. L. de. **Detecção da atividade mutagênica e anti-mutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho-do-campo) pelo teste Ames**. 2002. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Salgado de Oliveira, Goiânia, 2002.

MACK, J. M.; WASTOWSKI, A. D.; LINARES, C. E. B.; CEZAROTTI, V. S.; SILVA, U. F.; FLORES, E. M. M.; GIACOMELLI, S. R. Variação sazonal e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis articulata* (Lam) Pers. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: SBQ, 2009. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0943-2.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2010.

MANAYI, A. SAEIDNIA, S.; FARAMARZI, M. A.; SAMADI, N.; JAFARI, S.; VAZIRIAN, M.; GHADERI, A.; MIRNEZAMI, T.; HADJIAKHOONDI, A.; ARDEKANI, M. R.; KHANAVI, M. A comparative study of anti-candida activity and phenolic contents of the calluses from *Lythrum salicaria* L. in different treatments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 176-184, 2013.

MANIGAUHA, A.; PATEL, S.; ALI, H.; CHANDY, A.; MAHESHWARI, M. U. Study the effect of phytochemical constituents of *Piper betel* leaves extracts on liver disorders by *in vivo* model. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 3, p. 353-356, 2009.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2676-2683, 2011.

MARTIN, K. W.; ERNST, E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 241-246, 2003.

MACEDO, M.; PEREIRA, M. L. S.; SILVA, F. H. B. Plantas com provável ação antifúngica utilizadas pelos moradores do bairro Cidade Verde, Cuiabá, Mato Grosso. **Flovet**, v. 1, n. 3, 2011.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN, Saint Louis. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. - **Taxonomy Browser**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/8000024>>. Acesso em: 20 out. 2013.

MIYASAKI, Y.; NICHOLS, W. S.; MORGAN, M. A.; KWAN, J. A.; VAN BENSCHOTEN, M. M.; KITTELL, P. E.; HARDY, W. D. Screening of herbal extracts against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 8, p. 1202-1206, 2010.

MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. Usos múltiplos de plantas do Cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica**, Colonia Santo Tomás, n. 27, p. 159-190, 2009.

MORI, K.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KITAYAMA, M.; HASHIZUME, K. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 1935-1945, 2007.

MOUJIR, L.; GUTIERREZ-NAVARRO, A. M.; GONZALEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G. Mode of action of netzahualcoyone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 211-213, 1991.

MUDAY, G. K.; RAHMAN, A.; BINDER, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends in plant Science**, v. 17, n. 4, p. 181-195, 2012.

- MUSHARRAF, S. G.; GOHER, M.; SHAHNAZ, S.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMAN, A. Structure-fragmentation relationship and rapid dereplication of *Buxus* steroidal alkaloids by electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 1, p. 169-178, 2013.
- NGASSAPA, O.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R. Quinone-methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 1994.
- NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; REZENDE, U. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.
- NUNES, W. B.; CARVALHO, S. de. Evaluation of the potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 545-549, 2003.
- OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M. de; SOUZA, K. C. B. de.; REZENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p. 176-177, 1996.
- OLIVEIRA, I. S. LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008.
- ONO, F.; YASUMOTO, S. Genital candidiasis. **Nihon Rinsho**, v. 67, n. 1, p. 157-161, 2009.
- ORAMAS-ROYO, S. M.; CHAVEZ, H.; MARTIN-RODIGUEZ, P.; FERNANDEZ-PEREZ, L.; RAVELO, A. G.; ESTEVEZ-BRAUN, A. Cytotoxic triterpenoids from *Maytenus retusa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 12, p. 2029-34, 2010.
- PASA, M. C. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 6, n. 1, p. 179-196, 2011.
- PASA, M. C.; GUARIM NETO, G.; OLIVEIRA, W. A. A etnobotânica e as plantas usadas como remédio na Comunidade Bom Jardim, MT, Brasil. **Flovet**, v. 1, n. 3, p. 1-19, 2011.

PATON, A. J.; BRUMMITT, N. A.; GOVAERTS, R.; HARMAN, K.; HINCHCLIFFE, S.; ALLKIN, B.; LUGHADHA, E. N. Towards target 1 of the global strategy for plant conservation: A working list of all known plant species – progress and prospects. **Taxon**, v. 57, n. 2, p. 602-611, 2008.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 5-16, 2012.

PEITZ, C.; CÚNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 13, n. 2, p. 61-65, 2003.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends Plants in Science**, v. 5, n. 10, p. 439-445, 2000.

PILON, A. C.; CARNEIRO, R. L.; CARNEVALE NETO, F.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Interval multivariate curve resolution in the dereplication of HPLC–DAD Data from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 401-406, 2013.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; ANDRADE, M. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; FREIRE, J. M.; MUNIZ, F. R.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. The influence of drying temperature on the yield and the chemical composition of the essential oil from *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum, **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 523-526, 2008.

POPPENDIECK, H. H. **Flora Neotropica Monograph**, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/4393745?&Search=yes&term=cochlospermum&term=flora&term=neotropica&term=regium&list=hide&searchUri=%2Faction%2FdoBasicSearch%3FQuery%3Dflora%2Bneotropica%2Bcochlospermum%2Bregium%26wc%3Don%26x%3D8%26y%3D7&item=1&ttl=4&returnArticleService=showArticle>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

RAD, M. M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAEE, M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, n. 2, p. 199-203, 2011.

RAHALISON, L. HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 199-203, 1991.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

RANGKADILOK, N. TONGCHUSAK, S.; BOONHOK, R.; CHAIYAROJ, S. C.; JUNYAPRASERT, V. B.; BUAJEEB, W.; AKANIMANEE, J.; RAKSASUK, T.; SUDDHASTHIRA, T.; SATAYAVIVAD, J. *In vitro* antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 545-553, 2012

RASKIN, I.; RIPOLL, C. Can an apple a day keep the doctor away? **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 27, p. 3419-3429, 2004.

REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; CARDOSO-LOPES, E. M.; YOUNG, M. C.; TORRES, L. B.; VELLOSA, J. C. R.; OLIVEIRA, O. M. M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank.) Pilger**. 1996. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Ritual of plants with possible action on the central nervous system by the Krahô Indians, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 2, p. 129-135, 2005.

SALES, D. M. **Germinação de sementes de algodão do campo (*Cochlospermum regium* (MART. e SCHR.) PILG.) - Cochlospermaceae em função de ácido sulfúrico, substrato, luz e temperatura**. 2001. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura Tropical, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2001.

SALES, D. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; FERRONATO, A. Superação da dormência por ácido sulfúrico em sementes de algodão-do-campo

[*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.] - Cochlospermaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 65-71, 2002.

SANGALLI, A.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA, N. A. Z. Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos florestais e de Cerrado de Dourados – MS, numa visão etnobotânica. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 163-174, 2002.

SANTI, A.; RIZZI, C. Prevalência de candidíase vulvovaginal em mulheres submetidas ao exame preventivo do câncer de colo uterino. **NewsLab**, v. 107, p. 150-157, 2011.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 231-233, 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHLAG, E. M.; MACINTOSH, M. S. Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) population. **Phytochemistry**, v. 67, n. 14, p. 1510-1519, 2006.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, n. 7 Suppl. 1, p. S3-S9, 2008.

SCHORR, K.; DA COSTA, F. B. A proposal for chemical characterization and quality evaluation of botanical raw materials using glandular trichome microsampling of yacón (*Polymnia sonchifolia*, Asteraceae), an Andean medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 13, n.1, p. 1-3, 2003.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 558-266, 2013.

SHIN, R. Transcriptional regulatory components responding to macronutrient limitation. **Journal of Plant Biology**, v. 54, p. 286-293, 2011.

SILVA JUNIOR, I. E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Triagem antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 1, p. 242-248, 2009.

SZAKIEL, A.; PAÇKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 4, p. 471-491, 2011.

SÓLON, S.; BRANDÃO, L. F. G.; SIQUEIRA, J. M. O gênero *Cochlospermum* Kunth com ênfase nos aspectos etnobotânicos, farmacológicos, toxicológicos e químicos de *Cochlospermum regium* (Mart. Et. Schr.) Pilger. **Revista eletrônica de farmácia**, v.6, n.3, p. 1-22, 2009.

SÓLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G.; MACEDO, C. S.; KLEIN, A.; DIAS-JUNIOR, C. A.; SIQUEIRA, C. M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1169-1172, 2012.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, C. S. **Bactérias criam resistência a medicamentos**. Folha de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.soropositivo.org/arquivo-de-noticias/4040-bacterias-criam-resistencia-a-medicamentos.html>>. Acesso em: 22 out. 2009.

SOUZA, F. A.; SENA, J.; MARANHO, L. T.; OLIVEIRA, C. M. R.; GUIMARÃES, A. T. B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p. 24-27, 2008.

SOUZA, M. D.; FERNANDES, R. R.; PASA, M. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade São Gonçalo Beira Rio, Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, v. 9, n. 1, p. 91-100, 2010.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

VIU, A. F. M.; COSTA, E. A.; VIU, M. A. O.; CAMPOS, L. Z. O.; SANTOS, S. C. Germinação e desenvolvimento de plântulas de [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger] - (algodão-do-campo) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 957-959, 2007.

WEI, Y-P.; FENG, J.; LUO, Z-C. Isolation and genotyping of vaginal non-albicans *Candida* spp. in women from two different ethnic groups in Lanzhou, China. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 110, n. 3, p. 227-230, 2010.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 401-409, 2001.

ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. **Biodiversity Hotspots: Distribution and protection of conservation priority areas**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 565p., 2011.

ZAIDAN, M. R. S.; NOOR RAIN, A.; BADRUL, A. R.; ADLIN, A.; NORAZAH, A.; ZAKIAH, I. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n. 2, p.165-170, 2005.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C.; TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; PUCCI, L. L.; GARROTE, C. F. D.; OLIVEIRA, F. N. M.; PAULA, J. R. Estudo da atividade antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da toxicidade aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 4, p.485-489, 2009.

ZUCOLOTTO, S. M.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma flavicarpa Degener. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 1, n. 25, p. 5-9, 2006.