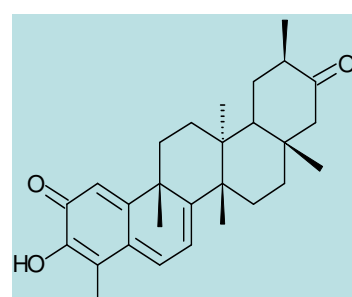
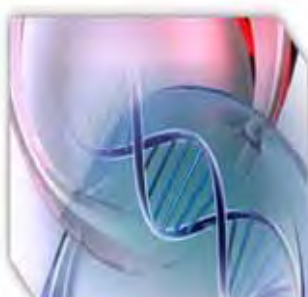
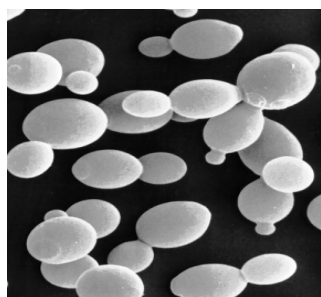


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Determinação do potencial biológico e antioxidante de
extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia*
(Celastraceae)**

Leonardo Gorla Nogueira



Araraquara - SP
2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Determinação do potencial biológico e antioxidante de
extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**

Leonardo Gorla Nogueira

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Nogueira, Leonardo Gorla

N778d Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). / Leonardo Gorla Nogueira. – Araraquara, 2009.
88 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Tais Maria Bauab

. 1. Atividade antibacteriana. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade estrogênica. 4. Espinheira-santa. I. Bauab, Tais Maria, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Leonardo Gorla Nogueira

**Determinação do potencial biológico e antioxidante de
extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**

Presidente: _____
Nome: Professora Dra. Taís Maria Bauab
Instituição: UNESP- Araraquara

Titular 1: _____
Nome: Professora Dra. Eliana Aparecida Varanda
Instituição: UNESP- Araraquara

Titular 2: _____
Nome: Dra. Daisy Nakamura Sato
Instituição: Instituto Adolf Lutz

Araraquara, 17/12/2009

*Dedico este trabalho aos meus avós Alberto e Maria da
Glória Gorla, João Roberto e Ivoní Nogueira, por
enfrentarem a vida como "Mestres"...*

"AQUELE que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa. Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás; a sua verdade será o teu escudo e broquel.

Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia, Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio-dia.

Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti. Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos ímpios.

Porque tu, ó SENHOR, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste a tua habitação.

Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda. Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.

Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.

Pisarás o leão e a cobra; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente. Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei em retiro alto, porque conheceu o meu nome.

Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; dela o retirarei, e o glorificarei.

Fartá-lo-ei com longura de dias, e lhe mostrarei a minha salvação."

Oscar Wilde resumiu como eram seus amigos, mais de 100 anos depois de sua morte faço uso de suas palavras para dizer o mesmo...

Loucos e Santos

*Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas
pela pupila.*

Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.

A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos.

Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo.

Deles não quero resposta, quero meu avesso.

*Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em
mim.*

*Quero os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão
pelas injustiças.*

Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta.

Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria.

Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto.

Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.

Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos.

*Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de
aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça.*

Não quero amigos adultos nem chatos.

Quero-os metade infância e outra metade velhice!

*Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos,
para que nunca tenham pressa.*

Tenho amigos para saber quem eu sou.

*Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me
esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril.*

Mas para isso, só sendo louco.

OSCAR WILDE

Agradecimentos

A Deus na pessoa de Jesus Cristo, este que é o Mestre dos Mestres, por me carregar nos braços e trocar o fardo comigo...

Ao meu Pai, João Roberto Bettoni Nogueira, por ter me apresentado Jesus e por ter me ensinado que sonhar é bom e vale a pena... Amo você!

A minha Mãe, Ângela Maria Gorla Nogueira, por acreditar em mim e por nunca deixar a “peteca cair” em nossa casa, sempre sorrindo... Amo você!

Aos meus irmãos Caio e Camila, por cuidarem de mim de uma maneira única e especial e por serem tão importante em minha vida... Amo vocês!

Ao meu primo-irmão, Rafael (Piru) por desde o início da minha vida estar ao meu lado, sendo um companheiro fiel... Amo você!

A minha família (Gorla e Nogueira) por me amarem...

A minha orientadora Prof. Dra. Tais Maria Bauab, que nesse período me agüentou, me ensinou e também se tornou uma grande amiga. O carinho e a admiração são muito grandes e que Deus continue abençoando sua vida!

Em um mundo onde amigos verdadeiros estão escassos, agradeço a 4 que Deus me deu:

Antonio Távora, que foi meu professor e depois se tornou um grande amigo, sempre disposto a ajudar em tudo... Obrigado!

Danilo Fuin Dignani, pelos anos de companheirismo, pelas discussões mais produtivas e por estar sempre do meu lado, me apoiando em todas as decisões... Obrigado!

Marcelo Hiene, já são 7 anos juntos, e a amizade só aumentou, seu jeito irreverente de ser faz com que nossas tardes sejam alegres e cheias de risos.... Obrigado!

Marcelo Gonzaga (Mineiro), por aparecer tão de repente e sempre com o ar questionador assim se tornando um grande amigo... Obrigado!

Ao Prf. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, por há 7 anos ter acreditado em mim... Obrigado!

Ao laboratório de Fisiologia do Micro-organismo, a Jaque e Sílvia por sempre torcerem por mim e acreditar que tudo daria certo... Obrigado!

A professora Dra. Maysa Furlan e sua aluna de doutorado Vânia, do Instituto de química da Unesp, por terem cedidos as amostras vegetais para a realização dos testes.

Ao laboratório de Bioquímica Clínica, aos funcionários e alunos deste laboratório por me acolherem tão bem!

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela paciência, disponibilidade em sempre ensinar e pelas muitas risadas...

Ao laboratório de Mutagênese coordenado pela Prof. Dra. Eliana Ap. Varanda, por ter aberto as portas para mim, e a todos os alunos pelo bom acolhimento.

As técnicas Marisa, Néia e Silvia por estarem sempre dispostas a me auxiliar em que fosse necessário... Obrigado!

As meninas da Pós- Graduação (Claudia, Sonia e Laura) por sempre me atenderem, pela dedicação e é claro pela simpatia dedicada a mim... Obrigado!

As secretárias do departamento de Ciências biológicas, Bernadete e Margarete, por estarem sempre dispostas a ajudar... Obrigado!

A biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas correções.

A todos os funcionários da Unesp.

A Unesp como instituição de ensino.

A pessoa que me ajudou mais do que eu poderia imaginar, que me acalmou e me fez descansar, que apareceu de repente na minha vida e que hoje é muito importante para mim. Uma pessoa que me fez sorrir novamente e com quem eu quero passar muitos anos da minha vida junto. Que foi conquistando seu espaço no meu coração com o seu jeito mineiro de ser. A Pós graduanda Flávia Aparecida Resende... Muito Obrigado!

A CAPES pela bolsa concedida.

No final SEMPRE da certo!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Família Celastraceae.....	4
1.2- Gênero <i>Maytenus</i>	5
1.3- <i>Maytenus ilicifolia</i>	7
1.4- Atividade antibacteriana.....	9
1.5- Metabólitos secundários.....	10
1.6- Estrogenicidade.....	10
17- Antioxidantes.....	13
2- OBJETIVOS.....	19
2.1- Objetivo Geral.....	19
2.2- Objetivos Específicos.....	19
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1- Extratos vegetais.....	21
3.2- Amostras bacterianas.....	22
3.3- Espectros de absorção dos extratos vegetais, frações e substâncias puras.....	23
3.4- Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo.....	23
3.5- Padronização da suspensão bacteriana.....	24
3.6- Avaliação da atividade antibacteriana.....	24
3.6.1- Método de difusão em ágar.....	24
3.6.2- Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima.....	25
3.6.2.1- Realização da leitura espectrofotométrica.....	27

3.6.2.2- Realização da leitura utilizando resazurina como revelador.....	27
3.7- Teste RYA com leveduras recombinantes.....	27
3.7.1- Substância e Padrão utilizados.....	27
3.7.2- Linhagem e Plasmídeos utilizados.....	28
3.7.3- Ação da atividade estrogênica.....	28
3.8- Determinação da atividade antioxidante.....	30
3.8.1- Preparo dos padrões.....	31
3.8.2- Preparo das soluções dos extratos vegetais.....	31
3.8.3- Ensaio de captura do radical cátion ABTS ⁺	32
3.8.4- Ensaio da captura do OCl ⁻	32
3.8.5- Ensaio da captura de taurina-cloramina.....	33
4- RESULTADOS	35
4.1- Método de difusão em ágar.....	35
4.2- Teste de diluição em microplacas.....	40
4.3- Comparação dos resultados obtidos pela técnica de difusão em ágar e microplacas.....	42
4.4- Determinação Bacteriostática Mínima (CBM).....	43
4.5- Determinação da atividade estrogênica.....	43
4.6- Determinação da atividade antioxidante.....	44
5- DISCUSSÃO	51
6- CONCLUSÕES	57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS⁺ - 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (*2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*)

AIDS/ SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

ATCC - *American Type Culture Collection*

CIM - concentração inibitória mínima

(Cl⁻) – íon cloreto

CBM – concentração bacteriostática mínima

CMH - caldo Müller-Hinton

DCM – diclorometano

DNA - ácido desoxirribonucléico

D.O. – densidade óptica

EtOH – etanol

EEQ - equivalentes de estradiol

EPA - *Environmental Protection Association*

EROs - espécies oxidativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

GSH - glutationa reduzida

GSH-Px - glutationa-peroxidase

GSH-Rd - glutationa-redutase

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl – ácido hipocloroso

IC₅₀ – concentração inibitória para 50%

LC-ESI-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MeOH – metanol

MuGal - 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NaOH - hidróxido de sódio

NH₂Cl – monocloramina

NuBBE - Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais

NT - não testado

PBS - tampão fosfato (*phosphate buffer saline*)

(O₂⁻) - radical superóxido

OCl⁻ - íon hipoclorito

RYA - *Recombinant Yeast Assay*

SOD - superóxido dismutase

Tau - taurina

TauCl - taurina-cloramina

TMB - 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina

UFC – unidade formadora de colônia

UV – ultra-violeta

Y-PER - tampão de lise

WIPO - Organização Mundial de Propriedade Intelectual (*World Intellectual Propertie Organization*)

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1 -	<i>Maytenus ilicifolia</i> ou Espinheira-Santa.....	7
2 -	Obtenção dos extratos e frações de <i>Maytenus ilicifolia</i> , empregados nos experimentos de avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante.....	21
3 -	Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos, frações, subfrações e substâncias puras, frente aos micro-organismos.....	26
4 -	Forma estrutural da maitenina e do 17 β -Estradiol.....	28
5 -	Quercetina e Cisteína.....	30
6 -	Formação do cátion radical ABTS ⁺	32
7 -	Reação de oxidação do 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	33
8 -	Teste de difusão em ágar da maitenina frente a bactéria <i>Bacillus subtilis</i>	40
9 -	Teste de atividade antibacteriana pela técnica de diluição em microplaca (maitenina frente à <i>Staphylococcus aureus</i>).....	42
10 -	Média das unidades de fluorescência obtidas através do tratamento com diferentes concentrações de maitenina, e seus respectivos controles.....	44
11 -	Extrato etanólico para as espécies ABTS ⁺ , OCl ⁻ e Taurina-cloramina.....	45
12 -	Extrato diclorometano para as espécies ABTS ⁺ e Taurina-cloramina.....	45
13 -	Catequina para as espécies ABTS ⁺ , OCl ⁻ e Taurina-cloramina.....	46
14 -	Maitenina para as espécies ABTS ⁺ , OCl ⁻ e Taurina-cloramina.....	47

15 -	Cisteína para as espécies, OCl^- e Taurina-cloramina.....	47
16 -	Quercetina para as espécies ABTS^+ , OCl^- e Taurina-cloramina.....	48
17 -	Estruturas moleculares de substâncias isoladas de <i>M. ilicifolia</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 – Amostras de <i>Maytenus ilicifolia</i> , divididas em categorias.....	22
2 – Protocolo dos tratamentos para avaliação da atividade estrogênica.....	30
3 – Atividade antibacteriana do extrato etanólico de <i>Maytenus ilicifolia</i> pelo método de difusão em Agar.....	35
4 – Atividade antibacteriana em difusão em ágar do extrato diclorometano de <i>Maytenus ilicifolia</i>	36
5 – Atividade antibacteriana do extrato diclorometano de <i>Maytenus ilicifolia</i> com adição de 20% de Tween 80 em difusão em agar.....	37
6 – Atividade antibacteriana em difusão em ágar da substância pura Maitenina com adição de 20% de Tween 80.....	38
7 – Atividade antibacteriana das amostras vegetais de <i>Maytenus ilicifolia</i> pela metodologia de difusão em agar.....	39
8 – Atividade antibacteriana com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, pela técnica de diluição em microplaca.....	41
9 – Atividade antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, pelas técnicas de diluição em microplaca e difusão em agar.....	42
10 – Determinação da concentração bacteriostática e bactericida mínima em µg/mL, das 2 substâncias com atividade.....	43
11 - Valores de IC ₅₀ (µg/mL) obtidos nos ensaios da atividade antioxidante dos extratos e compostos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	49

RESUMO

NOGUEIRA, Leonardo Gorla. Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, câmpus Araraquara, SP.

O gênero *Maytenus* (Celastraceae), atualmente compreende cerca de 80 espécies distribuídas por todo território brasileiro. A espécie *Maytenus ilicifolia* é conhecida popularmente pelos nomes de espinheira-santa, espinheira-diva, salva-vidas, sombra de touro, cancerosa e coromilho do campo, e utilizada contra hiperacidez e ulcerações do estômago. Com o objetivo de caracterizar o potencial biológico desta planta, foi estudada a atividade antibacteriana e antioxidante do extrato diclorometânico (DCM), frações, subfrações e duas substâncias puras (maitenina e catequina) isoladas das cascas de raízes de *M.ilicifolia*, obtidas por maceração a frio. Foi utilizada a técnica de diluição em microplacas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato e as substâncias testadas, expresso como a menor concentração capaz de inibir crescimento bacteriano foi avaliada em microplacas contendo meio líquido aos quais foram adicionados extratos, frações, substâncias puras e antibióticos, sendo estes últimos usados como controles positivos. Para a atividade antioxidante foram realizados ensaios espectrofotométricos do 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico (ABTS⁺); do íon hipoclorito (OCI⁻) e da taurina-cloramina (via oxidação do 3,3',5,5', tetrametilbenzidina), utilizando como padrões quercetina e cisteína. Foi demonstrada forte atividade da maitenina com CIM de 0,48 µg/mL para as bactérias Gram positivas, e a catequina não apresentou atividades contra as bactérias testadas. Na avaliação da atividade antioxidante o extrato DCM e a maitenina não foram tão eficazes quanto a atividade da catequina que apresentou IC₅₀ para ABTS⁺ (2,76 µg/mL); OCI⁻ (14,65 µg/mL) e taurina-cloramina (23,20 µg/mL). Estes resultados sugerem que *M.ilicifolia* apresenta constituintes bioativos, sendo relevante a continuidade destes ensaios.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Leonardo Gorla. Determination of biological and antioxidant potential of extracts of root bark of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, câmpus Araraquara, SP.

The genus *Maytenus* (Celastraceae) currently includes 80 species distributed throughout the Brazilian territory. The species *Maytenus ilicifolia* popularly known by the names of “espinheira-santa”, “espinheira-diva”, “salva-vidas”, “sombra de touro”, “cancerosa” and “coromilho do campo”, with activity against hyperacidity and gastric ulcers. In order to characterize the biological potential of this plant, was studied the antibacterial activity of the dichloromethane extract (DCM), fractions, subfractions and two substances (maitenin and catechin) isolated from the roots of *M. ilicifolia* obtained by cold maceration. To evaluation of the antimicrobial potential was used the microplates dilution technique using the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Minimum inhibitory concentration (MIC) for the extract and the substances tested, expressed as the lowest concentration able to inhibit bacterial growth, was evaluated in microplates containing liquid medium to which were added extracts, fractions, subfractions, pures substances and antibiotics, the latter being used as positive controls. For the antioxidant activity tests were performed spectrophotometric: 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS.⁺); of OCl⁻ and taurinechloramine (via oxidation of 3,3', 5,5' , tetramethylbenzidine), using quercetin and cysteine as standards. It was demonstrated a strong activity to maitenin, with MIC of 0,48 µg/mL for Gram positive bacteria and catechin did not show activity against the bacteria tested. In the evaluation of antioxidant activity the extract DCM and maitenin were not as effective as the activity of catechin that had IC₅₀ for ABTS⁺ (2,76 µg/mL); OCl⁻ (14,65 µg/mL) and taurinechloramine (23,20 µg/µL). These results suggest that *M. ilicifolia* presents bioactive constituents, being important the continuity of these tests.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O uso de plantas superiores com o propósito de detectar biocidas em seus tecidos é de origem recente. Já o uso de plantas aromáticas (inteiras ou suas partes como folhas, cascas, sementes e seus produtos extrativos como as resinas), é tão antigo quanto à história da humanidade, sendo empregadas na medicina, na cosmética e em cerimônias religiosas (DE LA CRUZ, 1997).

O emprego de plantas medicinais na recuperação de saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem. Mas, em ambos os casos o homem percebeu, nas plantas a presença de algo que, administrado sob misturas complexas (como chás, garrafadas, tinturas, pós, entre outros) ou como substância pura isolada (transformada em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas) a propriedade de provocar reações benéficas no organismo capazes de resultar na recuperação da saúde. Este é o princípio ativo, seja ele constituído de uma única substância existente na planta ou de um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente, chamada de complexo fitoterápico. Por isso a planta medicinal, quando bem escolhida e utilizada corretamente, só difere do medicamento industrial produzido com substância isolada, pela embalagem e pelas substâncias corantes, aromatizantes, flavorizantes, encorpantes e conservantes que acompanham o princípio ativo, nesse tipo de medicamento (LORENZI *et al.*, 2002).

Ainda segundo Lorenzi *et al* (2002), a Organização Mundial de Saúde (OMS), visando diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde, recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde pública de cada país, que:

- Procedam levantamentos regionais das plantas usadas na medicina popular tradicional e identifique-as.
- Estimulem e recomendem o uso daquelas que tiveram comprovadas sua eficácia e segurança terapêuticas.
- Desaconselhem o emprego das práticas da medicina popular consideradas inúteis ou prejudiciais.

- Desenvolvam programas que permitam cultivar e utilizar as plantas selecionadas na forma de preparações dotadas de eficácia, segurança e qualidade.

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isto acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A identificação correta destas espécies, sua forma de uso, posologia e controle de qualidade também constituem questões a serem resolvidas (BALLVÉ *et al.*, 1995). Os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos, e até carcinogênico (KUSAMURAM *et al.*, 1998). A realização de estudos etnobotânicos possibilita o resgate e a preservação dos conhecimentos populares, entretanto existe pouca informação quanto ao seu potencial de risco a saúde (SIMÕES, 1999).

O potencial risco de intoxicações justifica cuidados especiais na preparação e consumo de plantas medicinais. O conceito errôneo de que as plantas são remédios naturais e, portanto livre de riscos e efeitos colaterais deve ser reavaliado. Assim como as plantas podem representar medicamentos poderosos e eficazes, o risco de intoxicação causada pelo uso indevido deve ser sempre levado em consideração. A obediência às dosagens prescritas e o cuidado na identificação precisa do material utilizado pode evitar uma série de acidentes (LORENZI *et al.*, 2002). Se todo medicamento é veneno, é verdade também que todo veneno é medicamento, dependendo da dose.

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Chama a atenção dos pesquisadores da área de produtos naturais a grande diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos naturais. (GUERRA e NODARI, 2004).

Partes destas substâncias naturais possuem potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos,

sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que agem como antioxidante e coenzimas, além de muitas outras (COWAN, 1999; WILLIAMS, 2001).

As bactérias demonstram grande facilidade de ludibriar a ação dos agentes antibacterianos, ou seja, possuem ou desenvolvem resistência aos mesmos. Entretanto, desde a descoberta dos primeiros antimicrobianos, vêm sendo estudados inúmeros e novos agentes que tenham a capacidade de inibir o crescimento ou mesmo de matar estes micro-organismos.

As substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progresso sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. O referido grupo de medicamentos condiciona, de forma efetiva, o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas responsáveis pelas mais variadas patologias que tanto provocaram e ainda provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos, sem restrição de faixa etária, situação financeira ou estado da saúde do indivíduo atingido. Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, ausência de efeito indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem (COWAN, 1999; LIMA, 2001).

Há estudos indicando que as plantas produzem substâncias inibitórias específicas para certos micro-organismos, com propriedades análogas as dos antibióticos. Algumas substâncias originárias de plantas com propriedades antibacterianas, muitas vezes mostram estas atividades apenas quando presentes nos seus extratos. Porém, muitas outras já foram isoladas e identificadas pelos ensaios microbiológicos (COSTA, 1994; CORSINO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em amplo estudo sobre plantas medicinais fizeram uma avaliação concreta sobre atividade antimicrobiana de extratos, óleos

essenciais e substâncias isoladas contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e espécies fúngicas. Quanto ao potencial antibiótico destacam-se os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol, ácido caurênico, entre outros que, em baixas concentrações exercem inibição sobre o crescimento de bactérias Gram positivas, Gram negativas, micobactérias, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que tais produtos possuem como perspectiva para produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na medicina para terapêutica de processos infecciosos. De modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alteração das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, e inibição da síntese de ácidos nucleicos (LIMA, 2001).

1.1- A FAMÍLIA CELASTRACEAE

As plantas da família Celastraceae são amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e algumas partes do leste da Ásia, particularmente na China. A família se constitui de aproximadamente 88 gêneros e 1300 espécies. Estas plantas geralmente crescem como pequenas árvores e possuem cascas e folhas resinosas. São utilizadas desde a antiguidade devido a seus extratos apresentarem diversas propriedades medicinais (SPIVEY *et al.*, 2002). No Brasil, estudos taxonômicos sobre as Celastraceae foram desenvolvidos por Reissek (1861), abrangendo todo território nacional e floras regionais. Os gêneros *Maytenus*, *Eonymus*, *Cassine* e *Celastrus* são os mais abundantes (CORSINO, 2000; FERREIRA *et al.* 2003).

Estudos químicos realizados com espécies de Celastraceae revelaram a ocorrência de compostos fenólicos, tais como taninos condensados (GONZALEZ *et al.*, 1982), flavonóides (CORSINO *et al.*, 2003) e triterpenos quinonametídeos (CORSINO *et al.*, 2000; BUFFA FILHO *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005). Estes últimos apresentam uma variedade de atividades biológicas, tais como antimicrobiana (FERREIRA DE SANTANA *et al.*, 1971), antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2005) e antimalárica (FIGUEIREDO *et al.*, 1998). Também já foram isolados de Celastraceae

derivados agarofurânicos, catequinas, proantocianidinas, glicosídeos, flavonóides glicosilados e alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (FONSECA *et al.*, 2007).

Há uma variedade de propriedades atribuídas a extratos de representantes da família Celastraceae na medicina tradicional, dentre elas destaca-se a estimulante, a supressora do apetite, sedativa, emética, purgativa, antitumoral, antibacteriana, inseticida e repelente de insetos. A propriedade estimulante de folhas de *Catha edulis*, espécie que ocorre no leste da África e Arábia Saudita, foi descrita na literatura primeiramente em 1237, pelo médico Naguib Ad Din, que propôs o uso desta espécie no tratamento da depressão (KALIX e BRAENDEN, 1985). Extratos de *Tripterygium wilfordii* foram utilizados na medicina chinesa por séculos no combate a diversas doenças, atualmente vem sendo aplicadas no tratamento de leucemia e artrite reumatóide (DUAN *et al.*, 2001).

A atividade antiúlcera já foi reportada em diferentes espécies desta família, como *Maytenus ilicifolia* (JORGE *et al.*, 2004), *Maytenus aquifolium* (GONZALEZ *et al.*, 2001), *Maytenus truncata* (SILVA *et al.*, 2005) e *Austroplenckia populnea* (ANDRADE *et al.*, 2006).

1.2- O GÊNERO *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é o maior da família Celastraceae e está inserido na subfamília Celastroideae. São reconhecidas cerca de 80 espécies distribuídas por todo território brasileiro (CARVALHO-OKANO, 1998). Espécies de *Maytenus* são encontradas em diferentes formações vegetais, como a Mata Atlântica (*M. distichophylla* Mart. ex Reissek, *M. macrophylla* Mart.), Mata de Altitude (*M. erythroxylon* Reiss.), e Campos Rupestres (*M. opaca* Reiss.). Entretanto foi registrado um número maior de espécies em ambientes com vegetação de Caatinga (*M. truncata* Reiss., *M. imbricata* Mart. ex Reiss., *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss., *M. catingarum* Reiss., *M. impressa* Reiss., *M. obtusifolia* Mart.), distribuídas predominantemente entre a Bahia e o Ceará. Tradicionalmente utilizadas pelos indígenas, em infusões, as folhas, de diversas espécies de *Maytenus* existentes no Brasil, são utilizadas contra afecções gástricas (hiperacidez, úlceras gástricas, duodenais e gastrite crônica) (ROCHA *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2007).

Em estudos fitoquímicos, alguns flavonóides foram identificados em espécies do gênero *Maytenus*, incluindo a quercetina e catequinas, sendo determinada uma atividade antiulcerogênica e/ou inibidora da secreção ácida *in vivo* ou *in vitro* destes compostos (BAGGIO *et al.*, 2007).

Triterpenos isolados de *Maytenus chuchuhuasca* apresentaram efeito antimitótico, mostrando potencial inibitório sobre a polimerização de tubulina (MORITA *et al.*, 2008).

Diversos metabólitos com propriedades biológicas potenciais são isolados em folhas de *Maytenus* spp, incluindo flavonóides, triterpenos e sesquiterpenos. Investigações recentes mostram a presença de alguns representantes de flavonol-3-*O*-glicosídeos, tais como rutina, quercetina, hiperosídeo, isoquercetina, kaempferol e quercetina mono- di- tri- e tetra-glicosídeos (VILEGAS *et al.*, 1999; LEITE *et al.*, 2001; TIBERTI *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2008) mostraram que extrato clorofórmico de *Maytenus obtusifolia* Mart possui propriedades neurolépticas, e isolaram alcalóides, flavonóides e triterpenóides pentacíclicos desta espécie.

Triterpenos fenólicos foram isolados de *Maytenus blepharodes* e mostraram potencial atividade antimicrobiana e citotóxica (RODRÍGUEZ *et al.*, 2005). Sesquiterpenos isolados de *Maytenus apurimacensis* apresentaram atividade contra o parasita *Leishmania tropica* (DELGADO-MENDEZ *et al.* 2008). O decoto obtido de casca de *Maytenus rigida* é usado popularmente no nordeste do Brasil para o tratamento de distúrbios gastrintestinais como diarreia, desinteria, úlceras também como antiinflamatório (ROCHA *et al.*, 2004).

Ressalta-se ainda que os estudos taxonômicos em *Maytenus* basearam-se até agora, principalmente, em espécimes herborizados, em que muitos caracteres se perdem ou são danificados. Este fato acentua ainda mais a sobreposição das características utilizadas na definição das espécies, dificultando a identificação das mesmas e muitas vezes mostrando-se insatisfatório para a identificação do material fresco.

Os tradicionais métodos de estudo de plantas herborizadas, cuja morfologia externa é utilizada como principal ferramenta para a delimitação dos táxons, são muitas vezes responsáveis por inúmeros problemas taxonômicos não solucionados (METCALFE e CHALK, 1979), principalmente porque estes caracteres são mais

acessíveis, tornando-se fonte de dados para o reconhecimento das espécies e para a análise de suas relações evolutivas.

Outras fontes de análise têm-se mostrado de extrema importância nessas relações, tais como a anatomia, os marcadores moleculares, a ecologia, a biologia reprodutiva e a de polinização, assim como a biogeografia e outras (JUDD *et al.*, 1999).

A comparação anatômica tem provado ser útil em alguns dos mais difíceis estudos taxonômicos, porém é necessário entender a variação dos caracteres dentro de um indivíduo, espécie ou grupo de táxons relacionados, que podem ser qualitativos ou quantitativos. As folhas são órgãos altamente variáveis e a variação pode ser específica para espécies, gênero ou famílias. Numerosos caracteres anatômicos dentro da folha, como características da epiderme, inclusões minerais e estruturas secretoras têm provado ser de valor sistemático em diferentes linhagens (DICKISON, 2000).

1.3- *Maytenus ilicifolia*

Popularmente, a espécie *Maytenus ilicifolia* é conhecida pelos nomes de espinheira-santa, espinheira-díva, salva-vidas, sombra de touro, cancerosa e coromilho do campo. (CARVALHO-OKANO, 1998).



Figura 1: *Maytenus ilicifolia* ou Espinheira-Santa

No contexto brasileiro, as espécies *M. ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* são largamente usadas na medicina popular. As plantas nativas de ambas as espécies

crecem naturalmente no sul do Brasil onde são usadas na forma de chás para dor de estômago e no tratamento de úlceras (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991). As folhas de plantas da família Celastraceae são amplamente usadas na medicina popular no Brasil como analgésico, antiinflamatórios e anti-ulcerogênicos, sendo a eficácia e segurança confirmadas por estudos farmacológicos e clínicos (SOARES *et al.*, 2004). Souza-Formigoni *et al.* (1991) comprovaram a ação protetora do chá de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* contra o desenvolvimento de úlceras em animais, com ação comparada à da cimetidina.

A maneira de utilizá-la no combate a hiperacidez e úlceras gástricas é com uma infusão, obtida pela adição de água fervente sobre certa quantidade de folhas moídas. Foi demonstrado que o infuso desta planta exerce marcante efeito antiúlcera gástrica em ratos submetidos a vários processos experimentais de indução de úlceras (CARVALHO-OKANO, 1998). Tal hábito parte do pressuposto de que plantas utilizadas, além de possuírem atividade terapêutica, são desprovidas de efeitos tóxicos. Em outros estudos, executados no Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais da CEME (1988), foi demonstrado que infusões obtidas das espécies, *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, tinham marcante efeito protetor, comparável aos da cimetidina e ranitidina, contra úlceras gástricas induzidas em ratos por indometacina e estresse de imobilização em baixa temperatura (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A *World Intellectual Propertie Organization* – WIPO (Organização Mundial de Propriedade Intelectual), em seu banco de dados, revela o registro de sete patentes que envolvem *M. ilicifolia*. Além dos trabalhos relacionados à elucidação da importância farmacológica das espécies de espinheira-santa, estudos vêm sendo realizados para elucidar quais metabólitos secundários estão envolvidos na ação terapêutica (MARIOT e BARBIERI, 2007). Compostos da planta podem agir como agentes protetores à carcinogênese humana, agindo contra os estágios de iniciação, promoção e progressão do processo (DE FLORA *et al.*, 2001) ou, talvez, destruindo ou bloqueando fora das células os agentes mutagênicos que promovem danos no DNA, deste modo evitando a mutação celular (KNASMÜLLER *et al.*, 2002).

São atribuídas diferentes atividades biológicas a essas plantas por apresentarem componentes químicos associados a diferentes atividades biológicas como: citotóxicas (ITOKAWA *et al.*, 1991), inseticida, controlador de apetite e antitumoral (CORSINO *et*

al., 1998) e antioxidante (CORSINO *et al.*, 2003; JELLER *et al.*, 2004, CARVALHO *et al.*, 2005).

1.4- ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Diversos métodos laboratoriais são empregados na determinação da atividade antimicrobiana “*in vitro*”, sendo aplicados como triagem de novas substâncias bioativas.

A técnica de difusão em ágar é bastante utilizada, com pequenas variações na metodologia, sendo considerada de fácil execução, reprodutível e permite a experimentação de diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa (NCCLS – M2 A8, 2003; COWAN, 1999; NETO *et al.*, 2002; MORAIS, 2006).

Métodos de diluição em meio líquido também são comumente utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. A prova de sensibilidade por este método foi uma das primeiras a serem desenvolvidas, servindo ainda hoje como método de referência (NCCLS – M7 A6, 2003; LANGFIELD, 2004).

Ambas as técnicas de difusão em ágar e diluição em tubos, requerem grande quantidade de substâncias-teste, o que restringe grandemente a sua utilização em bioensaio para compostos antimicrobianos uma vez que os produtos naturais na grande maioria das vezes são extraídos em pequenas quantidades.

Segundo diversos autores a técnica alternativa mais amplamente utilizada em ensaios microbiológicos é a diluição seriada de extratos em microplacas que permite a utilização de pequenas quantidades e/ou volumes.

Outro aspecto vantajoso desta metodologia é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Possibilita ainda demonstrar qual a mínima concentração da substância a ser testada necessária para inibir o crescimento bacteriano (COWAN, 1999; PALOMINO *et al.*, 2002; ELOFF, 2000; LANGFIELD, 2004; ALVES, 2006).

1.5- METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas medicinais possuem uma grande habilidade para a síntese de metabólitos secundários, constituindo inúmeras fontes de fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados produtos de excreção vegetal, cujas estruturas químicas apresentam, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao seu meio. Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra micro-organismos, insetos e herbívoros, proteção contra raios ultra violeta (UV) e a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, dentre outros. (SIMÕES, 2004).

O metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores que apresentam correlações entre si, não atuando isoladamente, como por exemplo, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura e altitude, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Em geral os extratos de plantas contêm baixas concentrações de compostos ativos e um alto número de compostos promissores, requerendo o uso de bioensaios sensíveis para uma ampla variedade química e baixas quantidades de amostras testadas. Sendo que estes ensaios devem ser simples, reprodutíveis, rápidos e de baixo custo (SOUZA BRITO, 1996).

1.6- ESTROGENICIDADE

Recentemente, surgiu um grande interesse no estudo de substâncias conhecidas como interferentes endócrinos, que foi motivado a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais no ambiente. Os alteradores ou interferentes endócrinos são substâncias que, mesmo em concentração extremamente baixa, são capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino causando câncer de testículo, mama e próstata, diminuição da taxa de espermatozoides, deformidades dos órgãos reprodutivos, disfunção da tireóide e alterações relacionadas com o sistema neurológico (GHISELLI e JARDIM, 2007). Estas substâncias não compreendem apenas os produtos químicos sintetizados nos

últimos anos, mas também uma série de compostos cuja presença no ambiente somente agora vem sendo elucidada (SUMPTER e JOHNSON, 2005).

A ação de um determinado hormônio inicia-se com sua ligação a um receptor específico, no interior da célula. O complexo resultante liga-se a regiões específicas do DNA presente no núcleo da célula, o que determina a ação dos genes. Certas substâncias químicas podem também ligar ao receptor hormonal e, conseqüentemente, mimetizar ou bloquear a ação do próprio hormônio (SANTAMARTA, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007).

A alteração do sistema endócrino ocorre quando o interferente interage com os receptores hormonais, modificando a resposta natural. Os interferentes endócrinos podem interferir no funcionamento do sistema endócrino por, pelo menos, três maneiras, sendo que a primeira seria imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo e, dessa forma, desencadear reações químicas no corpo. Ainda, podem agir bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios e, assim, impedir a ação dos hormônios naturais. Finalmente, podem afetar a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando as concentrações dos hormônios naturais (SANTAMARTA, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007). Os interferentes endócrinos comumente são denominados de estrógenos ambientais (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Dentre os vários produtos com atividade estrogênica destacam-se os hormônios presentes em cosméticos, anabolizantes utilizados em rações animais, fitoestrógenos e poluentes orgânicos persistentes (ALVES *et al.*, 2007).

Os fitoestrógenos são compostos produzidos naturalmente pelas plantas, capazes de mimetizar o hormônio humano 17- β estradiol (SETCHELL, 2001). Esses compostos podem interferir com a ação do hormônio interagindo com receptores estrogênicos ou modulando concentrações de estrógeno endógeno (MATSUMURA, 2005).

Estudos vêm sendo realizados na tentativa de identificá-los, pois evidências indicam que dietas à base de vegetais podem explicar a variação epidemiológica de muitas doenças dependentes de hormônio, além de serem responsáveis por casos de infertilidade em animais (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1997).

M. ilicifolia é usada como contraceptivo, abortivo e emenagogo por mulheres no Paraguai, norte da Argentina e sul do Brasil (ARENAS *et al.*, 1977; MARTÍNEZ CROVETTO, 1987). Montanari e Bevilacqua (2002) verificaram as propriedades

abortivas do extrato hidroalcoólico liofilizado de *M. ilicifolia*, onde a atividade estrogênica do extrato foi avaliada através do peso úmido do útero, cornificação vaginal e abertura vaginal prematura em ratos sexualmente imaturos. Os resultados indicaram que o extrato hidroalcoólico liofilizado de *M. ilicifolia* deve ser considerado como um alerta para o uso indiscriminado da planta, *in natura* ou em derivados fitoterápicos, como um anti-ulcerogênico em casos de mulheres grávidas.

Além disso, Montanari *et al.* (1998) testaram os efeitos do extrato etanólico (EtOH) de folhas de *M. ilicifolia* em ratos do sexo masculino. Entretanto, apesar das alterações ultra-estruturais encontradas, como células germinativas esfoliadas imaturas, morte ocasional de células germinativas (reconhecido como núcleos picnóticos) e alguns túbulos seminíferos vacuolizados, o uso popular de *M. ilicifolia* como uma planta medicinal não causa uma perturbação da espermatogênese.

Tem sido sugerido que ensaios *in vitro* provêm uma boa maneira para investigar o potencial estrogênico de um grande número de substâncias, e vários tipos desses ensaios vêm sendo propostos incluindo ligantes de receptores de estrógenos (SHELBY *et al.*, 1996), proliferação de células MCF-7, ou outras células positivas para receptores de estrógenos (WELSHONS *et al.*, 1990; SOTO *et al.*, 1992) e sistemas de transcrição dependentes de receptores de estrógenos em células de mamíferos ou leveduras transfectadas (ARNOLD *et al.*, 1996; KLOTZ *et al.*, 1996; ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996; SHELBY *et al.*, 1996).

O ensaio utilizando leveduras recombinantes (RYA - *Recombinant Yeast Assay*) é um dos mais empregados para avaliar o potencial estrogênico de substâncias ou amostras ambientais (GARCIA-REYERO e PINA, 2005).

Esse ensaio inclui a utilização de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificadas expressando um sensor, o receptor de estrógeno humano, e um repórter, contendo o elemento responsivo de estrógeno do gene da vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da β -galactosidase pela ativação do gene lacZ. Esta enzima hidrolisa lactose, glicose e galactose. Quando as células modificadas de leveduras são expostas ao estrógeno, este liga-se ao receptor de estrógeno e, então, o gene lacZ é induzido e produz β -galactosidase. Isso permite que a levedura utilize lactose como substrato (GARCIA-REYERO e PINA, 2005).

Neste teste é utilizado como substrato 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). A hidrólise desse substrato promove a formação de um

produto fluorescente 4-metilumbeliferona, o qual é medido em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima β -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente.

Existe uma variedade de possíveis efeitos de uma determinada substância, entretanto, nenhum teste isolado é suficiente para a avaliação de novos compostos e por isso, em geral, recorre-se a uma bateria de testes. Dessa maneira, tornou-se relevante a avaliação da atividade estrogênica neste estudo devido à semelhança da estrutura molecular da maitenina, substância isolada do extrato diclorometânico (DCM) de *M. ilicifolia*, com o 17- β estradiol, por meio do Teste RYA. Estes estudos devem contribuir para o melhor entendimento da ação dessa substância no organismo humano, e conseqüentemente proporcionar a utilização mais efetiva e segura em futuras aplicações clínicas.

1.7- ANTIOXIDANTES

Os radicais livres e algumas espécies não radicalares, são moléculas muito reativas, derivados de oxigênio e nitrogênio, e são formados fisiologicamente no corpo humano. Esta formação envolve, por exemplo, o combate a micro-organismos invasores e a modulação celular de certos processos. (BHOOLA *et al.*, 2003)

A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente, ou seja, sua homeostase, pela existência de compostos conhecidos como antioxidantes, os quais indicam - metabólitos, enzimas, vitaminas etc. (PERCIVAL, 1988).

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, em pequenas quantidades, é capaz de inibir ou retardar processos oxidativos, tais como a lipoperoxidação (ATOUI *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2005).

Alternativamente, a formação de radicais livres e outras espécies reativas, podem resultar do desacoplamento da cadeia respiratória, do descontrole dos mecanismos de combate a micro-organismos ou do metabolismo de poluentes e medicamentos ou outros xenobióticos (BOSCOLO *et al.*, 2007). Na Síndrome Respiratória Aguda, a lesão do endotélio dos capilares dos pulmões deve-se em parte à geração e liberação de espécies oxidativas do oxigênio (EROs) por neutrófilos ativados,

o que tem sido demonstrado por estudos com antioxidantes (BABIOR, 2000). Outro exemplo é o câncer, o qual é provocado por uma série de mutações em genes reguladores da mitose. Sabe-se que processos oxidativos provocam mutações, como naquelas promovidas por Raios-X, que geram radicais hidroxil, ou ainda, na geração de ERO por neutrófilos ativados (BABIOR, 2000). Assim, postula-se que processos inflamatórios crônicos podem levar ao desenvolvimento de doenças malignas através da produção de espécies oxidantes por fagócitos ativados.

A Doença de Parkinson, o Acidente Vascular Cerebral, a Doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e a catarata são doenças freqüentes na velhice e já consagradas como conseqüentes do estresse oxidativo. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre a geração e/ou exposição à agentes óxido-redutores e os sistemas de proteção. As ERO, como exposto anteriormente, são geradas endogenamente como conseqüência direta do metabolismo do O_2 , ou também podem ser geradas em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, o que provoca a redução incompleta de O_2 (ROSS E MOLDEUS, 1991). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: **i)** uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, e é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E entre outras; **ii)** a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E (tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maioria dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986; ROSS E MOLDEUS, 1991).

Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo. Assim a pesquisa de produtos naturais pode proporcionar a descoberta de novos fármacos que agem sobre as diferentes espécies oxidantes geradas em nosso organismo, possibilitando alternativas ao seu combate e conseqüentemente à doenças em que haja uma produção exacerbada destas espécies (SWANSON, 1998).

Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas para esclarecer o papel das espécies reativas radicalares e não radicalares em processos fisiológicos,

como o envelhecimento, e patológicos, tais como fibrose cística, doença respiratória aguda, asma, enfisema, câncer, aterosclerose, inflamação, injúria por reperfusão, artrite reumatóide, e danos pelo tabagismo (FERREIRA E MATSUBARA, 1997; VENGLARIK *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2004).

Aproximadamente 98% de todo o oxigênio consumido pelas células entram nas mitocôndrias, onde ocorre redução tetravalente pela citocromo C oxidase. Entretanto, o oxigênio pode receber menos de quatro elétrons e formar as ERO, como parte dos processos fisiológicos (RODRIGUES *et al.*, 2002).

O envelhecimento é um evento que pode estar relacionado com as ERO. A teoria das ERO, desenvolvida por Harman em 1956, propõe que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, o qual levaria às oxidações lipídica, protéica, e do material DNA, a qual desencadearia alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético. Doenças freqüentes na velhice e relacionadas com o estresse oxidativo. (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Fagócitos, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, quando estimulados, elevam sensivelmente sua velocidade de consumo de oxigênio no surto oxidativo.

A geração de espécies químicas com alto potencial de reatividade como resultado do surto oxidativo em neutrófilos é essencial para a defesa contra micro-organismos na fagocitose (BRIHEIM *et al.*, 1984).

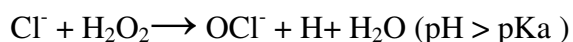
A ativação de neutrófilos por estímulos endógenos (frações do complemento, citocinas, etc.), ou por micro-organismos, é seguida da ativação de uma enzima transmembrana que promove aumento do consumo do oxigênio para a produção do ânion radical superóxido (O_2^-), o precursor para uma série de ERO (MATHY-HARTERT *et al.*, 1998).

Os neutrófilos como células especializadas, contêm grandes quantidades de componentes da NADPH oxidase e produzem O_2^- em abundância. Outros tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais e células do músculo liso, também são capazes de produzirem ânion radical superóxido, mas elas o fazem em baixas quantidades (FRIDOVICH, 2001)

Durante o surto oxidativo varias ERO são produzidas, tais como:

Ácido hipocloroso (HOCl)

O íon hipoclorito (OCl^-) é formado pela oxidação de íons cloreto (Cl^-), catalisada pela mieloperoxidase, uma enzima também presente em neutrófilos, em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LAPENNA E CUCCURULLO, 1996).



O OCl^- pode ser considerado como o mais abundante oxidante gerado pelos neutrófilos (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). Além disso, é um oxidante extremamente forte que além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato (WEISS, 1989; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990; EATON, 1993), é capaz de gerar outras ERO, tais como, oxigênio e radical hidroxil via sua reação com H_2O_2 e ânion radical superóxido, respectivamente (WEISS, 1989; LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

O OCl^- apresenta ações adversas como: **A)** protetora ao nosso organismo, à medida que participa do processo de destruição de micro-organismos, mas, ao mesmo tempo, **B)** agressora aos tecidos, pois nem células de mamíferos nem de bactérias podem detoxicar o OCl^- por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

A mieloperoxidase neutrofílica é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolipídeos de membranas celulares, além de catalisar a geração de OCl^- e assim favorecer injúria celular (WEISS, 1989). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY *et al.*, 1994), sugerindo sua participação na função de oxidantes clorados nos processos aterogênicos. Neste contexto, o OCl^- pode modificar lipoproteínas de baixa densidade para uma forma aterogênica, aparentemente como resultado da oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

O desenvolvimento de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o OCI^- , como sugerem alguns autores para drogas antiinflamatórias (WASIL *et al.*, 1987), rifampicina e tetraciclina (WASIL *et al.*, 1988) e captopril (ARUOMA *et al.*, 1991), podem ajudar no combate à injúria tecidual (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996). O seqüestro farmacológico do OCI^- será terapêuticamente significativo se, na concentração do fármaco *in vivo*, a reação com o HOCl for rápida o bastante para proteger as biomoléculas-alvo de seus ataques (HALLIWELL, 1993; LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

Cloraminas

O OCI^- forma grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias, prontamente disponíveis em sistemas biológicos (THOMAS *et al.*, 1986; WEISS, 1989).



A monocloramina (NH_2Cl), formada pela reação entre OCI^- e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio OCI^- (BABIOR, 2000). O aminoácido taurina (Tau), de maior abundância em neutrófilos (ZGLICZYNSKI, 1971) e principal alvo nestas células, reage com o OCI^- formando taurina-cloramina (TauCl).

As cloraminas, particularmente a NH_2Cl , estão relacionadas à injúria gástrica observada na presença de *Helicobacter pylori*, que produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que produzem HOCl (LAPENNA e CUCCURULLO, 1996).

As plantas medicinais desempenham um papel muito importante em saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (MOSSI *et al.*, 2004). Assim, devido às possibilidades de aplicação de extratos de plantas na terapêutica e o envolvimento de espécies oxidantes em diferentes doenças, foi importante avaliar o potencial da *M. ilicifolia* como agentes antibacterianos bem como é importante, também, avaliar a possibilidade de extratos desta planta conter agentes antioxidantes.

2- OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo explorar as propriedades biológicas de componentes obtidos de plantas da espécie *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae).

2.2 - Objetivos Específicos

Portanto foram avaliados extratos brutos (EtOH e DCM), frações, subfrações além de substâncias puras isoladas, quanto:

- 1- A atividade antibacteriana pelas técnicas de difusão em ágar e diluição em microplaca.
- 2- A atividade antioxidante.
- 3- A atividade estrogênica- Teste RYA.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Extratos vegetais

Foram analisados 2 extratos brutos (EtOH e DMC), 2 frações (hexano-acetato e hidroalcoólico), 9 subfrações, 5 substâncias puras (alcalóides, catequina e terpeno), totalizando 18 amostras obtidas da planta *M. ilicifolia*, fornecidas pela Profa. Dra. Maysa Furlan, coordenadora do laboratório Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

A Figura 2 mostra como foram obtidos os extratos brutos e as frações de *M. ilicifolia*, neste caso.

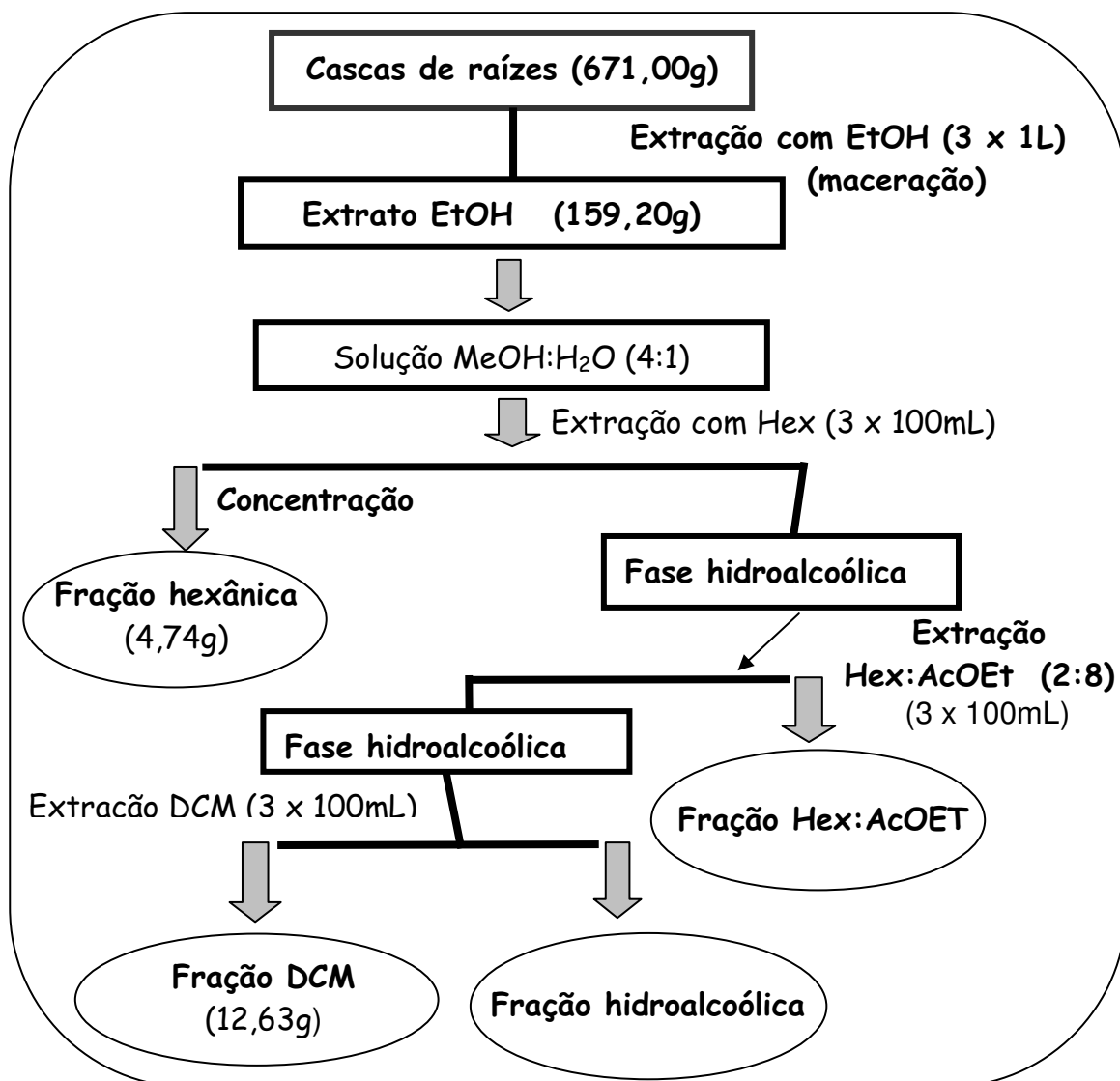


Figura 2: Obtenção dos extratos e frações de *Maytenus ilicifolia*, empregados nos experimentos de avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante

Tabela 1: Amostras de *Maytenus ilicifolia*, divididas em categorias

Composto	Nome	Bruto	Fração	Subfração	Pura	Massa (mg)
1	Extrato EtOH	X				12,5
2	Extrato DCM	X				10,0
3	Partição hexano/acetato		X			19,7
4	Partição hidroalcóolica		X			14,0
5	Subfração 1			X		10,0
6	Subfração 2			X		2,0
7	Subfração 3			X		2,3
8	Subfração 4			X		2,5
9	Subfração 5			X		2,8
10	Subfração 6			X		2,4
11	Subfração 7			X		2,5
12	Subfração 9			X		2,2
13	Subfração 10			X		2,0
14	Alcalóide 1				X	2,6
15	Alcalóide 2				X	1,6
16	Alcalóide 3				X	5,8
17	Catequina				X	12,5
18	Maitenina				X	10,0

DCM – diclorometânico; EtOH – etanólico

3.2 - Amostras bacterianas

Foram utilizadas as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659, e as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

As amostras bacterianas foram conservadas a -20°C em caldo Müller-Hinton (CMH) acrescido de 50% de glicerol até o uso.

Estes estoques foram repicados em CMH, incubados por 24 horas a 37°C, que foram utilizados na padronização do inóculo.

3.3 – Espectro de absorção dos extratos vegetais, frações e substâncias puras.

Os extratos vegetais, frações e substâncias puras foram submetidos a estudo espectrofotométrico em equipamento próprio num intervalo de 400 a 655 nm, para a determinação do comprimento de onda que ocorre a absorção de cada amostra.

Foi realizado um espectro de varredura dos extratos vegetais, frações e substâncias puras destes extratos na concentração de 1000µg/mL, utilizando-se como branco água Milli-Q. Para determinação da avaliação de absorção de cada amostra foi observada também a absorbância do meio de cultura CMH, por apresentar coloração amarelada.

As análises permitiram avaliar o comprimento de onda que corresponde a absorção das amostras vegetais que nos asseguraram a não interferência no comprimento de onda que foi realizado os ensaios de atividade antibacteriana.

3.4 - Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo (SANCHES, 2004)

Foi utilizada como controle positivo a ampicilina para *Staphylococcus aureus*, vancomicina para *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Foram preparadas soluções de 5 mg/mL (solução A: 1 mg em 200 µL de água destilada), em seguida estas soluções foram diluídas 1/100 em água destilada (solução B: 0,05 mg/mL), e por fim as solução B foi diluída 1/10 em CMH, obtendo-se uma concentração final de 5 µg/mL.

A solução de tetraciclina foi utilizada para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi diluído 5 mg em 200 µL de água destilada e diluída 1/100. Esta solução foi diluída em CMH (1/10), obtendo uma concentração final de 25µg/mL.

A kanamicina foi preparada da mesma maneira que os outros antibióticos, com uma concentração final de 10 µg/mL.

Uma solução de cloridrato de ciprofloxacino foi preparada a concentração final de 35 µg/mL, este antibiótico foi utilizado para as 5 bactérias padrão.

3.5 - Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24 horas, em tampão fosfato (PBS, *phosphate buffer saline*) estéril até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Já para o teste de microdiluição essa suspensão foi diluída em tampão PBS estéril a 1/10, correspondendo assim a 10^7 UFC/mL (SANCHES, 2004).

A concentração final de bactérias foi obtida com leitura espectrofotométrica de 0,10 a 0,15 a 620 nm que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

3.6 - Avaliação da atividade antibacteriana

3.6.1- Método de difusão em ágar (MURRAY *et al.*, 2003).

100 µL da suspensão bacteriana com $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foram semeadas em ágar Müller- Hinton com auxílio de alça de Drigalski. Discos de papel (Whatman nº1) com 6 mm de diâmetro foram embebidos com 25 µL das soluções dos extratos, frações, subfrações e substâncias puras nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL, bem como foram embebidos com 25 µL os discos para controle positivo (preparado conforme o item 3.4) e para o controle negativo (mistura metanol, MeOH + Tween 80). Os discos de papel foram colocados na superfície das placas de Petri, contendo o inóculo. As placas foram incubadas por duas horas em refrigerador para garantir a

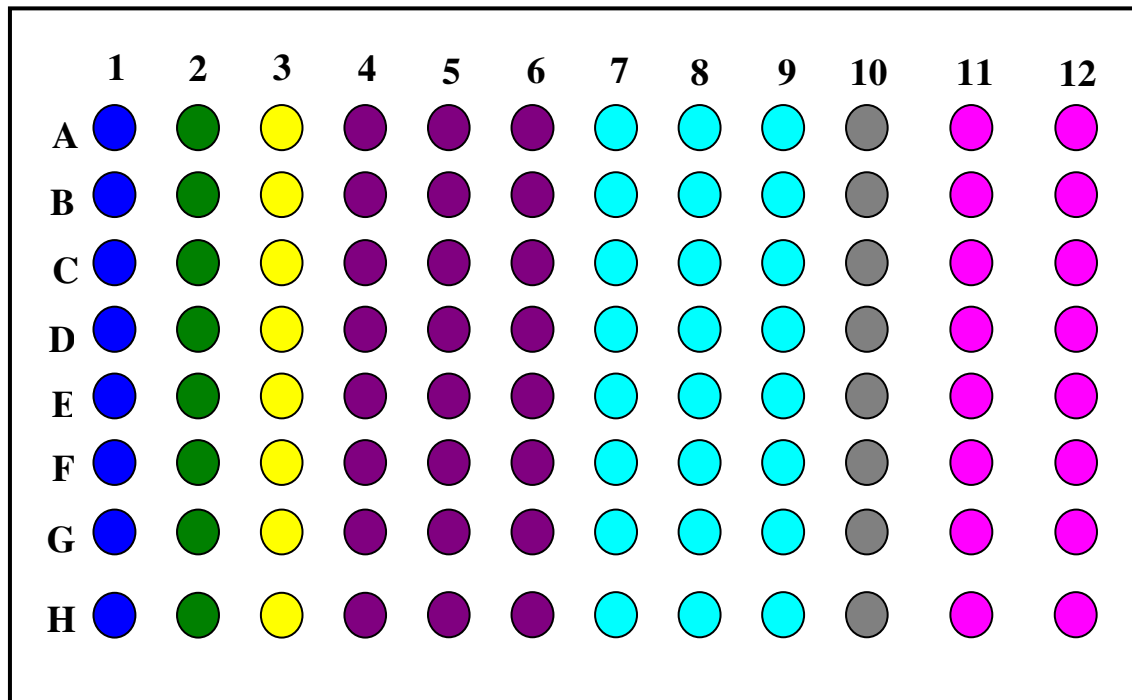
difusão das amostras vegetais e na sequência foram incubados em aerobiose em estufa a 37°C durante 24 horas. Após incubação foram feitas as leituras dos halos de inibição de crescimento formados ao redor do disco, medidos em milímetros.

3.6.2- Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ELLOF, 1998; NCCLS, 2003)

As amostras vegetais foram preparadas em solução estoque de 2000 µg/mL em CMH e adicionados de MeOH. O teste foi realizado utilizando as colunas das microplacas (colunas de 1 a 12). Aos orifícios das linhas de A até H das colunas de 1 a 12 foram adicionados 80 µL de CMH. Aos orifícios da coluna 3 da linha de A a H foram adicionados 100 µL da solução-estoque do controle positivo (item 3.4), Aos orifícios das colunas de 4 a 9 apenas na linha A foram adicionados 100 µL dos extratos vegetais, ou frações, ou substâncias puras, sendo que das colunas de 4 a 6 uma substância em triplicata e nas colunas de 7 a 9 outra substância também em triplicata. Da linha A até H foi realizada uma diluição sucessiva transferindo 100 µL de cada orifício para o subsequente, assim obteve-se um volume final de 80 µL nesses orifícios da microplaca com as concentrações finais das amostras vegetais de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL. Aos orifícios da coluna 10 entre as linhas A até H foram adicionados 100 µL da mistura MeOH + Tween 80 (controle negativo), e aos orifícios das colunas 11 e 12, linha A foram adicionados 100 µL das amostras vegetais sendo a homogeneização idêntica aos das colunas 4 a 9.

Subseqüentemente foi adicionado 20 µL da suspensão bacteriana de 10⁷ UFC/mL (item 3.5) em cada orifício, exceto nos orifícios da coluna 1 (branco) e nos orifícios de controle do extrato (colunas 11 e 12). As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas.

A Figura 3 esquematiza a realização do teste em microplacas



-  **Coluna 1:** Meio de cultura Muller- Hinton
-  **Coluna 2:** Meio de cultura + bactérias
-  **Coluna 3:** Controle positivo, meio de cultura + antibiótico + bactérias
-  **Colunas 4 a 6:** Testes, meio de cultura + extratos de *Maytenus* + bactérias
-  **Colunas 7 a 9:** Testes, meio de cultura + extratos de *Maytenus* + bactérias
-  **Coluna 10:** Controle negativo, meio de cultura + 25% da mistura MeOH com Tween 80 + bactérias
-  **Colunas 11 e 12:** Controle dos extratos

Figura 3: Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos, frações, subfrações e substâncias puras, frente aos micro-organismos

Foi avaliada também a atividade bactericida (CBM, concentração bactericida mínima) com o repique da mistura dos orifícios das microplacas em placas de ágar Mueller-Hinton.

3.6.2.1- Realização da leitura espectrofotométrica

Após incubação as placas foram submetidas a leitura no leitor de microplacas. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas.

3.6.2.2- Realização da leitura utilizando resazurina como revelador.

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Foram pipetados 50 µL de solução de resazurina a concentração de 0,0005 mg/5mL nos orifícios das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas ou até que ocorra mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra vegetal sem a mudança de coloração para rosa (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; PALOMINO *et al.* 2002; MONTEJANO, 2005).

3.7- Teste RYA com leveduras recombinantes (Laboratório de Mutagênese- FCF)

3.7.1- Substância e padrão utilizados

Para a realização do teste de estrogenicidade foi utilizada a substância pura maitenina. Esta substância foi escolhida para a realização do teste, pois sua forma estrutural se assemelha a do estrógeno, como mostra a Figura 4.

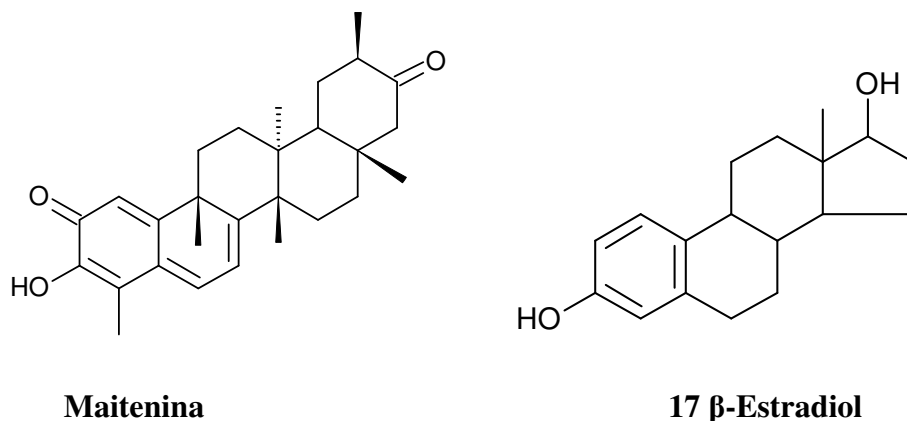


Figura 4: Forma estrutural da maitenina e do 17 β -Estradiol

3.7.2- Linhagem e plasmídeos utilizados

Para este ensaio foi utilizada a linhagem BY4741 (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*) obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha. Os plasmídeos que foram utilizados são pH5HEO (GREEN e CHAMBON, 1991) contendo o receptor de estrógeno humano (HEO) clonado no vetor de expressão constituído em levedura pAAH5 e pVITB2x e pGAL, derivados do pSFL Δ -178k, contendo o promotor CYC1 que regula o gene da β -galactosidase em *E. coli*. O plasmídeo pVITB2x contém o elemento responsivo a estrógeno (ERE2) do gene vitelogenina B1 de *X. laevis*. O plasmídeo pGAL possui uma sequência de reconhecimento para Gal-4p.

3.7.3- Avaliação da atividade estrogênica

O teste RYA utiliza substâncias diluídas em 10% de MeOH e foi realizado essencialmente como descrito em Garcia-Reyero e Pina, (2005).

A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HEO e pVITB2x foi descongelada do estoque à 70°C e crescida a 30°C, por 2-3 dias em meio mínimo SD (base nitrogenada sem aminoácidos 6,0 g/L, glicose 20 g/L) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1 g/L de histidina e metionina). A seguir, as leveduras foram crescidas em meio rico YPD (extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L e glicose 20 g/L) por mais 2 dias. Então, 10

μL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30°C até atingir densidade óptica (D.O.)_{600nm} = 0,1.

As amostras foram dissolvidas em MeOH e colocadas em microplacas de 96 orifícios. As concentrações foram determinadas em ensaios preliminares, além do controle negativo (solvente da amostra), positivo (10 nM de 17 β-estradiol/well) e dos controles de toxicidade. As concentrações utilizadas foram de 0,11 a 0,0013 mg/mL. Em cada orifício foram adicionados 50 μL da cultura de leveduras descritas anteriormente. Após isso, a microplaca foi incubada por 6 horas a 30°C com agitação. Decorrido esse período, 50 μL de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados 50 μL de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de MuGal. Após breve centrifugação a 1000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). A fluorescência foi medida durante 15-20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β-galactosidase foi avaliado pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão.

Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ), ou seja, a quantidade necessária de estradiol necessária para produzir uma resposta semelhante a da amostra avaliada. Os valores de fluorescência obtidos foram ajustados através da equação HILL pelo método não linear como descrito por Quirós *et al.* (2005) e Noguerol *et al.* (2006), utilizando a seguinte fórmula:

$$EEQ: \sum x_i e_i$$

Onde x_i representa a concentração da substância avaliada calculada a partir de dados do cromatograma LC-ESI-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) e e_i são fatores relativos de estrogenicidade correspondentes.

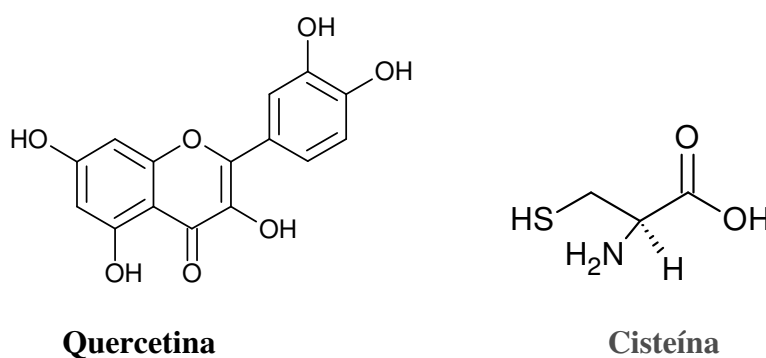
Tabela 2: Protocolo dos tratamentos para avaliação da atividade estrogênica

Tratamentos	Grupo	Dose
Controle negativo (MeOH)	1	10 %
MAI I	2	110 µg/mL
MAI II	3	36 µg/mL
MAI III	4	12 µg/mL
MAI IV	5	4 µg/mL
MAI V	6	0,13 µg/mL
17-β estradiol	7	10 nM

MAI – maitenina; MeOH - metanol

3.8- Determinação da Atividade Antioxidante (Laboratório de Bioquímica Clínica-FCF)

Para os ensaios da atividade antioxidante foram utilizados as espécies reativas: o cátion radical $ABTS^+$, OCI^- e Taurina-cloramina, e como padrões foram utilizadas substâncias com poder antioxidante conhecido como a Quercetina e Cisteína (Figura 5).

**Figura 5:** Quercetina e Cisteína

Para os cálculos das porcentagens de inibição foi utilizada a seguinte equação abaixo sendo que as absorbâncias foram obtidas nos comprimentos de onda (nm) específicos para cada cromóforo dos sistemas utilizados:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{1 - \frac{A_b}{A_a}}{1} \right] \times 100$$

Equação para cálculo das porcentagens de inibição.

Onde:

- A_b é a absorbância na ausência de amostra e
- A_a é a absorbância na presença de amostra.

3.8.1- Preparo dos padrões

A solução padrão de quercetina foi preparada na concentração de 0,5 g/L (1,48 mM). Esta solução foi diluída na proporção de 1/30 em MeOH (0,049 mM), sendo que no volume final do experimento a concentração de MeOH foi de 25% e as concentrações das amostras variaram para determinação da inibição. A ação antioxidante foi determinada pela variação da absorbância.

A solução padrão de cisteína foi preparada em MeOH e na concentração de 17,5 g/L (0,1M). E após diluição 1/100 (0,001 M).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média + desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação.

3.8.2- Preparo das soluções dos extratos vegetais

Para realização dos ensaios de atividade antioxidante, foram utilizados os extratos brutos EtOH e DCM, e duas substâncias puras (catequina e maitenina). Os

extratos vegetais foram preparados inicialmente na concentração de 500µg/mL em MeOH e diluídos para os ensaios em solução aquosa com 25% de MeOH.

3.8.3- Ensaio de captura do radical cátion ABTS^{•+}

O radical catiônico do ABTS^{•+} [2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] é utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como *scavengers* de radicais (PELLEGRINI *et al.*, 1998).

O ABTS^{•+} é gerado em solução tamponada PBS pH 7,2, em substituição do etanol, apresenta picos de absorbância em 630 nm, 734 nm e 812 nm. Nos ensaios avaliou-se a ação antioxidante das amostras pelo decréscimo da absorbância em 734 nm, após 30 minutos de incubação. Os resultados foram expressos em média + desvio padrão das porcentagens de inibição.

O ABTS^{•+} foi pela reação de oxidação do ABTS[•] (7 mM) pelo K₂S₂O₈ (51 mM) em tampão PBS 10 mM, pH7,4. Após 12-16 horas no escuro e a temperatura ambiente

Para os ensaios diluiu-se o ABTS^{•+} 1/20, foi feita uma solução de trabalho em PBS 10 mM pH 7.4. A absorbância desta solução foi aproximadamente 0.700 à 734 nm, contra o branco de tampão.

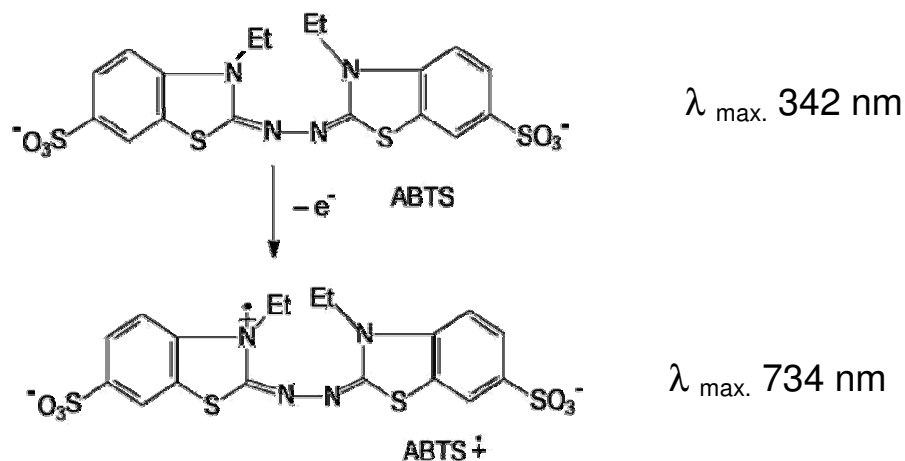


Figura 6: Formação do cátion radical ABTS^{•+}

3.8.4- Ensaio da captura do OCl⁻

Para este ensaio foi utilizado PBS 50 mM, pH 7,4. Foram utilizados 4 µL de HOCl na concentração de 4,57 mM previamente diluído (1:6) em hidróxido de sódio (NaOH) pH 12,0, e concentrações variadas dos extratos vegetais, mantendo-se a proporção de 25 % de MeOH no volume final do ensaio e incubação por 5 minutos. Após incubação foram adicionados 60 µL de 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB), 7 mM preparado no momento do uso e nova incubação por 5 minutos. A leitura das absorbâncias foi à 655 nm. A concentração solução estoque de HOCl foi determinada espectrofotometricamente, através de seu coeficiente de extinção molar em 295 nm ($350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ZGLICZYNSKI *et al.*, 1971).

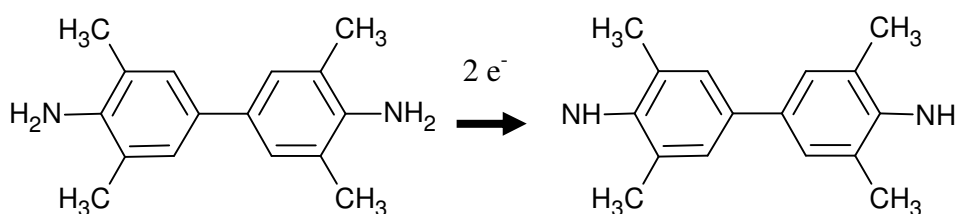


Figura 7: Reação de oxidação do 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB)

3.8.5- Ensaio da captura da Taurina- cloramina

As reações são realizadas segundo Costa *et al.* (2004), com adaptações para o sistema “químico” no qual a TauCl (30 µM) é obtida através da reação do OCl⁻ (30 µM) com Tau (5 mM) por 5 minutos em PBS pH 7,4.

Neste ensaio utilizou-se a reação do HOCl 4,57 mM, previamente diluído em NaOH pH 12,0 (1:6), com Tau (1464 mM) em PBS 50 mM, pH 7,4 (HARRINSON & SCHULTZ, 1976). As amostras vegetais foram adicionadas à mistura, mantendo a proporção de 25% de MeOH no volume final da reação na microplaca, seguindo-se incubação de 5 minutos, a formação de TAUCl foi revelada pela adição de TMB, e as leituras realizadas a 655 nm.

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1 - Método de difusão em ágar

Os testes foram realizados e os resultados constam nas Tabelas 3 e 4. Os extratos foram testados nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL, frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhuma das amostras vegetais apresentaram atividade antibacteriana.

Tabela 3: Halos de inibição de crescimento (mm) da atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* pelo método de difusão em ágar

Bactérias	Extrato EtOH µg/mL				Antibióticos					MeOH
	1000	500	250	125	Amp	Cipro	Kana.	Tetra.	Vanco.	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	NT	15	-	13	16	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	NT	22	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	NT	20	-	-	13	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	NT	18	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	NT	26	14	14	17	-

- (não houve formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco); NT= Não testado; Halos de inibição de crescimento medidos em mm.

Etanólico = EtOH; Ampicilina= Amp.; Ciprofloxacino= Cipro.; Kanamicina= Kana.; Tetraciclina= Tetra.; Vancomicina= Vanco; Metanol = MeOH.

Tabela 4: Halos de inibição de crescimento (mm) da atividade antibacteriana em difusão em ágar do extrato diclorometano de *Maytenus ilicifolia*

Bactérias	Extrato DCM µg/mL				Antibióticos					MeOH
	1000	500	250	125	Amp	Cipro.	Kana.	Tetra.	Vanco.	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	13	18	NT	NT	17	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	24	NT	NT	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	20	NT	NT	15	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	22	NT	NT	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	-	18	24	NT	NT	20	-

- (não houve formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco); NT= Não testado; Halos de inibição de crescimento medidos em mm.

Diclorometano = DCM; Ampicilina= Amp.; Ciprofloxacino= Cipro.; Kanamicina= Kana.; Tetraciclina= Tetra.; Vancomicina= Vanco.; Metanol = MeOH.

Os resultados negativos dos extratos EtOH e DCM com todas as bactérias utilizadas, sugerem que os extratos não se difundiram no meio de cultura, já que os extratos são de natureza hidrofóbica, e o meio de cultura é de natureza aquosa, possuindo grande parte de água, e portanto os ensaios foram então realizados com a adição de 20% de um tensoativo já conhecido e preconizado pela Farmacopéia Brasileira, o Tween 80.

Os resultados obtidos foram então:

Extrato DCM com halo de inibição de crescimento de 10 e 8 mm de diâmetro para *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL respectivamente, para *Enterococcus faecalis* um halo de inibição de crescimento de 11 e 9 mm de diâmetro nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL respectivamente e para *Bacillus subtilis* um halo de inibição de crescimento de 12 e 8 mm de diâmetro também nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL. Já para as bactérias Gram negativas o extrato DCM não apresentou atividade nas concentrações testadas (tabela 5).

Todos os extratos vegetais que foram testados estão representados na tabela 7.

Tabela 5: Halos de inibição de crescimento (mm) da atividade antibacteriana do extrato diclorometano de *Maytenus ilicifolia* com adição de 20% de Tween 80 em difusão em ágar

Bactérias	Extrato DCM µg/mL				Antibióticos					MeOH
	1000	500	250	125	Amp	Cipro.	Kana.	Tetra.	Vanco.	
<i>S. aureus</i>	10	8	-	-	13	18	NT	NT	17	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	24	NT	NT	-	-
<i>E. faecalis</i>	11	9	-	-	-	20	NT	NT	15	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	22	NT	NT	-	-
<i>B.subtilis</i>	12	8	-	-	18	24	NT	NT	20	-

- (não houve formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco); NT= Não testado; Halos de inibição de crescimento medidos em mm.

Diclorometano = DCM; Ampicilina= Amp.; Ciprofloxacino= Cipro.; Kanamicina= Kana.; Tetraciclina= Tetra.; Vancomicina= Vanco.; Metanol = MeOH.

A maitenina apresentou atividade antibacteriana com halo de inibição de crescimento de 13, 13 12 e 10 mm de diâmetro para *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL respectivamente. Para *Enterococcus faecalis* um halo de inibição de crescimento de 13, 14, 13 e 12 mm de diâmetro nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL respectivamente e para *Bacillus subtilis* um halo de inibição de crescimento de 12, 11, 11, e 11 mm de diâmetro também nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. E para as bactérias Gram negativas a maitenina não apresentou atividade nas concentrações testadas (tabela 6).

Tabela 6: Halos de inibição de crescimento (mm) da atividade antibacteriana em difusão em ágar da substância pura Maitenina com adição de 20% de Tween 80

Bactérias	Maitenina µg/mL				Antibióticos					MeOH + Tween 80
	1000	500	250	125	Amp	Tetra.	Kana.	Cipro.	Vanco.	
<i>S. aureus</i>	13	13	12	10	20	18	NT	23	NT	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	NT	28	NT	-
<i>E. faecalis</i>	13	14	13	12	-	20	NT	26	NT	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	NT	24	NT	-
<i>B. subtilis</i>	12	11	11	11	21	24	NT	24	NT	-

- (não houve formação de halo de inibição de crescimento ao redor do disco); NT= Não testado;
Halos de inibição de crescimento medidos em mm.

Ampicilina= Amp.; Ciprofloxacino= Cipro.; Kanamicina= Kana.; Tetraciclina= Tetra.; Vancomicina= Vanco.; MeOH = metanol.

Tabela 7: Atividade antibacteriana das amostras vegetais de *Maytenus ilicifolia*, diluídas em 20% de Tween 80, pela metodologia de difusão em ágar

Extrato Classificação	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1- Extrato EtOH	-	-	-	-	-
2- Extrato DCM	+	-	+	-	+
3- Partição hexano/acetato	-	-	-	-	-
4- Partição hidroalcóolica	-	-	-	-	-
5- Subfração 1	-	-	-	-	-
6- Subfração 2	-	-	-	-	-
7- Subfração 3	-	-	-	-	-
8- Subfração 4	-	-	-	-	-
9- Subfração 5	-	-	-	-	-
10- Subfração 6	-	-	-	-	-
11- Subfração 7	-	-	-	-	-
12- Subfração 9	-	-	-	-	-
13- Subfração 10	-	-	-	-	-
14- Alcalóide 1	-	-	-	-	-
15- Alcalóide 2	-	-	-	-	-
16- Alcalóide 3	-	-	-	-	-
17- Catequina	-	-	-	-	-
18- Maitenina	+	-	+	-	+
Controle Positivo (Ciprofloxacino)	+	+	+	+	+
Controle Negativo (MeOH +Tween)	-	-	-	-	-

- (sem atividade, não houve formação de halo ao redor do disco);

+ (com atividade, formação de halo ao redor do disco)

A Figura 8 ilustra o teste de difusão em ágar.

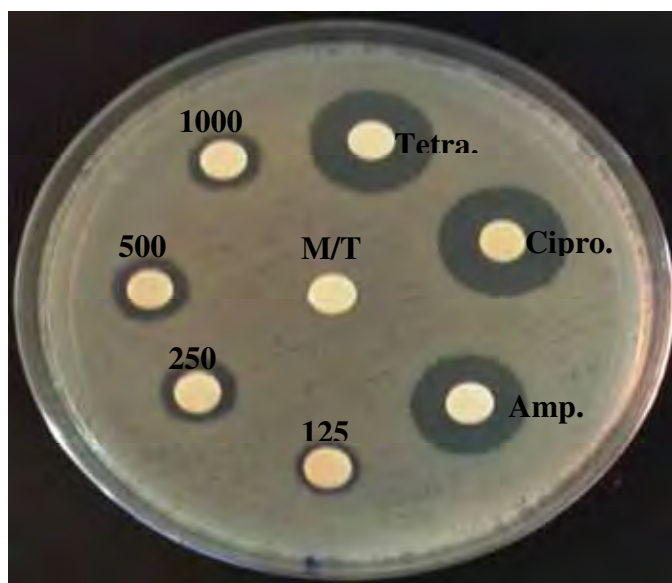


Figura 8: Teste de difusão em ágar da maitenina frente a bactéria *Bacillus subtilis*

4.2- Teste de diluição em microplacas.

Apresentaram atividade antibacteriana, o extrato DCM e a substância pura maitenina, para *Staphylococcus aureus* com CIM= 31,25 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, para *Enterococcus faecalis* com CIM= 3,9 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente e para *Bacillus subtilis* com CIM= 3,9 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente

As demais amostras vegetais não apresentaram atividade antibacteriana quando testadas pelo método de diluição em microplacas.

A Tabela 8 resume os resultados obtidos neste ensaio. Estes resultados foram realizados em triplicatas.

A concentração inicial foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicando que se não houve atividade nesta concentração não significa que a substância não tenha atividade contra as bactérias testadas.

Tabela 8: Atividade antibacteriana com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, pela técnica de diluição em microplaca

Extrato Classificação	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1- Extrato EtOH	-	-	-	-	-
2- Extrato DCM	31,25	-	3,90	-	3,90
3- Partição hexano/acetato	-	-	-	-	-
4- Partição hidroalcóolica	-	-	-	-	-
5- Subfração 1	-	-	-	-	-
6- Subfração 2	-	-	-	-	-
7- Subfração 3	-	-	-	-	-
8- Subfração 4	-	-	-	-	-
9- Subfração 5	-	-	-	-	-
10- Subfração 6	-	-	-	-	-
11- Subfração 7	-	-	-	-	-
12- Subfração 9	-	-	-	-	-
13- Subfração 10	-	-	-	-	-
14- Alcalóide 1	-	-	-	-	-
15- Alcalóide 2	-	-	-	-	-
16- Alcalóide 3	-	-	-	-	-
17- Catequina	-	-	-	-	-
18- Maitenina	0,48	-	0,48	-	0,48
Controle Positivo (Ciprofloxacino)	35	35	35	35	35

A figura 9 ilustra os resultados da atividade antibacteriana pela técnica de diluição em microplaca.

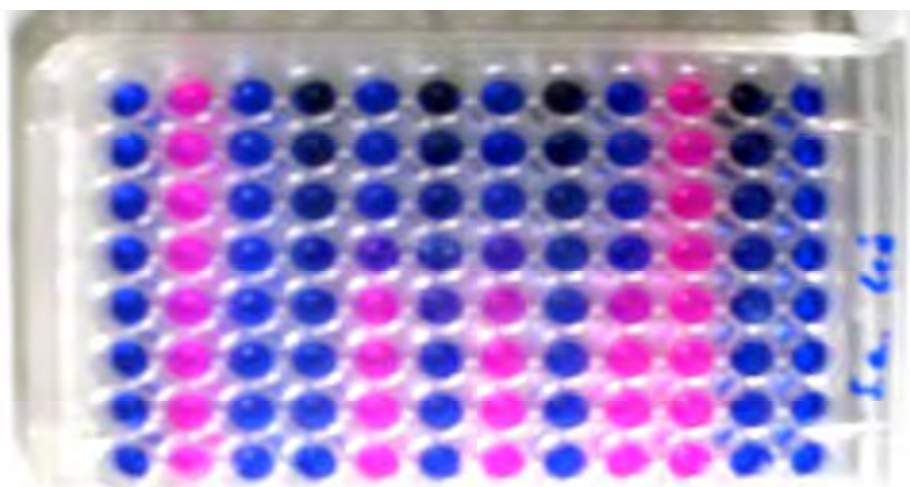


Figura 9: Teste de atividade antibacteriana pela técnica de diluição em microplaca (maitenina frente à *Staphylococcus aureus*)

4.3- Comparação dos resultados obtidos pela técnica de difusão em ágar e microplacas

Foi demonstrado que a microdiluição é a técnica mais sensível que a difusão em ágar. A Tabela 9 mostra essa comparação entre as duas técnicas.

Tabela 9: Atividade antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$, pelas técnicas de diluição em microplaca e difusão em ágar

Extrato Vegetal Bactérias	Microdiluição CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Difusão em ágar		Controle Positivo (Cipro.)
	Extrato bruto DCM	Maitenina	Extrato bruto DCM	Maitenina	
<i>S. aureus</i>	31,25	0,48	500	250	35
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	35
<i>E. faecalis</i>	3,90	0,48	500	250	35
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	35
<i>B. subtilis</i>	3,90	0,48	500	125	35

4.4- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Apenas duas amostras apresentaram atividade antibacteriana o extrato DCM e a substância pura maitenina.

Este teste consiste em verificarem quais concentrações as substâncias que apresentaram atividade antibacteriana são bacteriostáticas ou bactericidas.

Tabela 10: Determinação da concentração bacteriostática e bactericida mínima em µg/mL, das 2 amostras com atividade

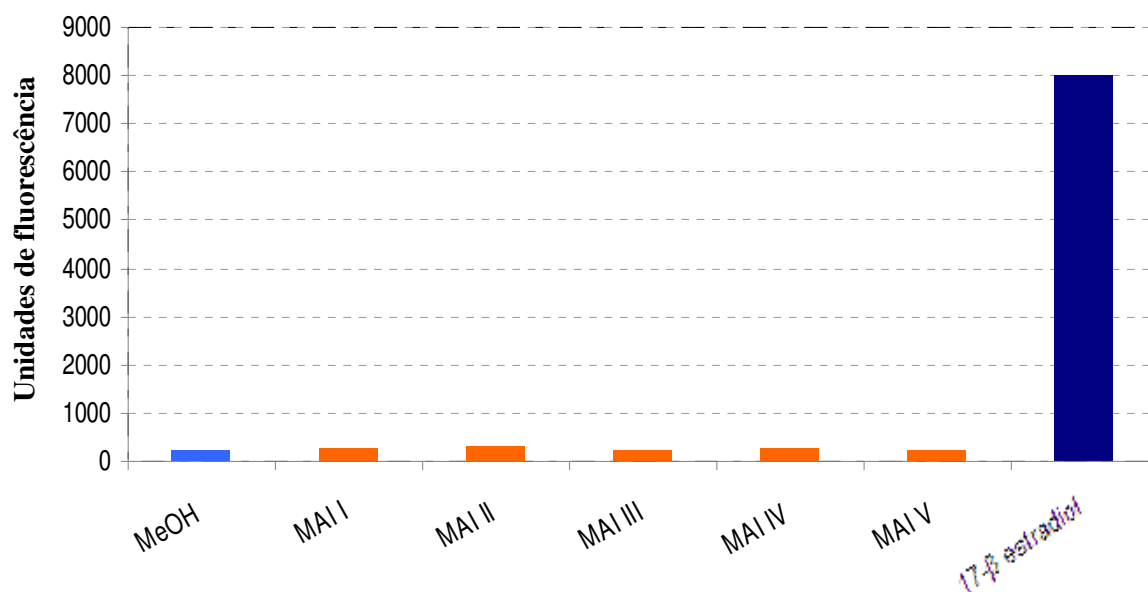
Extrato Vegetal Bactérias	Concentração Bacteriostática Mínima		Concentração Bactericida Mínima	
	Extrato bruto DCM	Maitenina	Extrato bruto DCM	Maitenina
<i>S. aureus</i>	31,25	0,48	125	15,62
<i>E. coli</i>	NT	NT	NT	NT
<i>E. faecalis</i>	3,90	0,48	15,62	0,97
<i>P. aeruginosa</i>	NT	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i>	3,90	0,48	15,62	3,90

NT= Não testado

4.5- Determinação da atividade estrogênica

Os resultados obtidos nos tratamentos com as diferentes concentrações de maitenina, e seus respectivos controles estão apresentados na Figura 10.

Nenhuma diferença significativa nas unidades de fluorescência foi observada entre as diferentes concentrações de maitenina quando comparados com o controle negativo (solvente da amostra, 10 % de MeOH), revelando ausência de efeito estrogênico nas doses usadas. Por outro lado, no tratamento com o estrógeno natural 17-β estradiol (controle positivo) podemos observar um aumento significativo das unidades de fluorescência quando comparadas com o controle ($P < 0,05$), demonstrando a sensibilidade do sistema-teste.



MeOH – metanol; MAI – maitenina (110, 36, 12, 4 e 0,13 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 10 - Média das unidades de fluorescência obtidas através do tratamento com diferentes concentrações de maitenina, e seus respectivos controles.

4.6- Determinação da Atividade antioxidante

Para estes ensaios foram utilizados, dois extratos (EtOH e DCM) e dois compostos puros (catequina, e maitenina), sendo a catequina isolada do extrato EtOH e a maitenina do extrato DCM.

Foram realizados testes para as espécies ABTS^+ , OCl^- e TauCl .

As figuras 11 a 16 mostram gráficos que representam a absorbância para as substâncias em função da concentração em $\mu\text{g/mL}$.

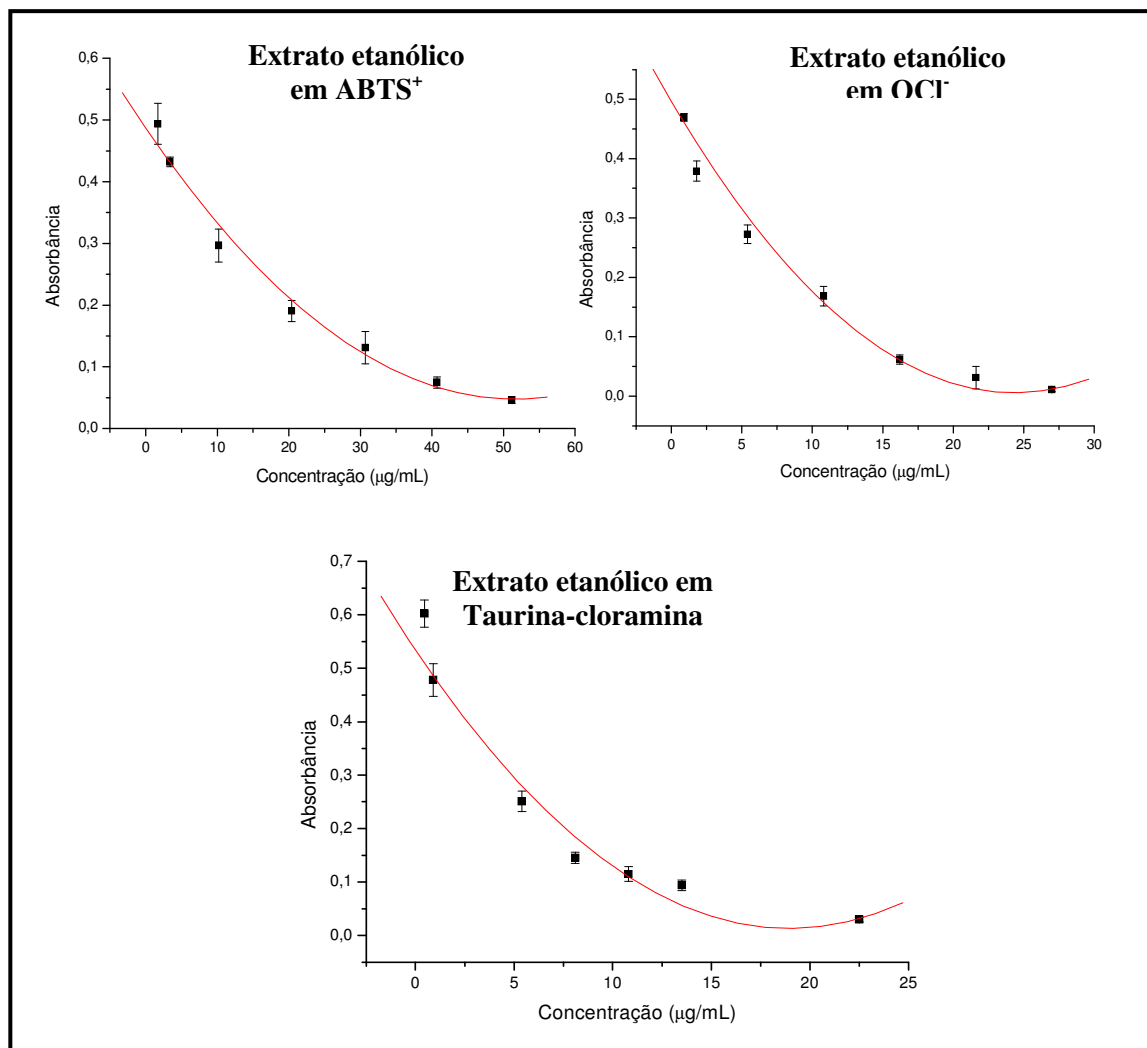


Figura 11: Extrato etanólico para as espécies ABTS⁺, OCl⁻ e Taurina-cloramina

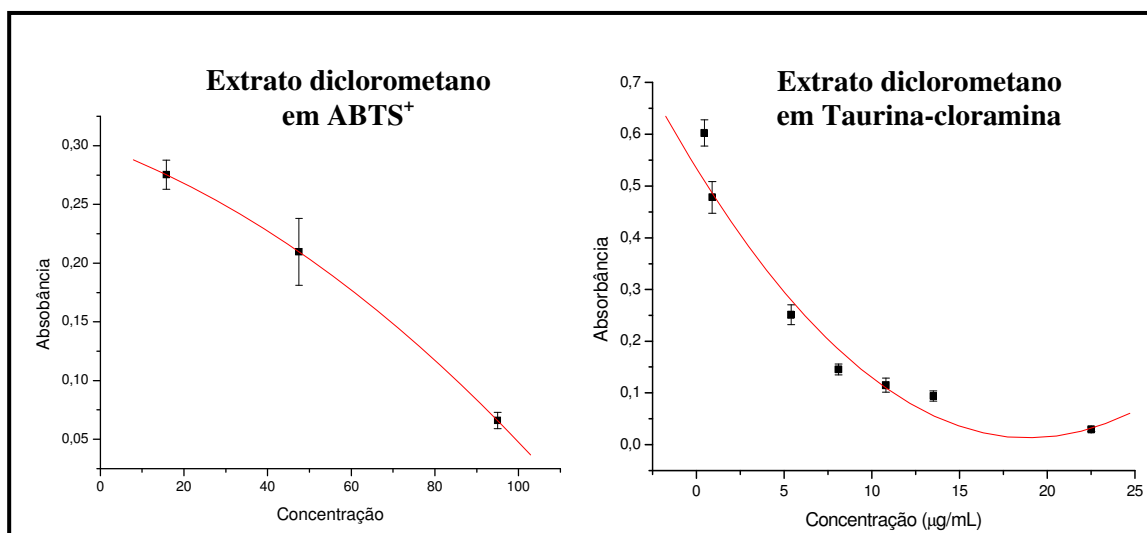


Figura 12: Extrato diclorometano para as espécies ABTS⁺ e Taurina-cloramina

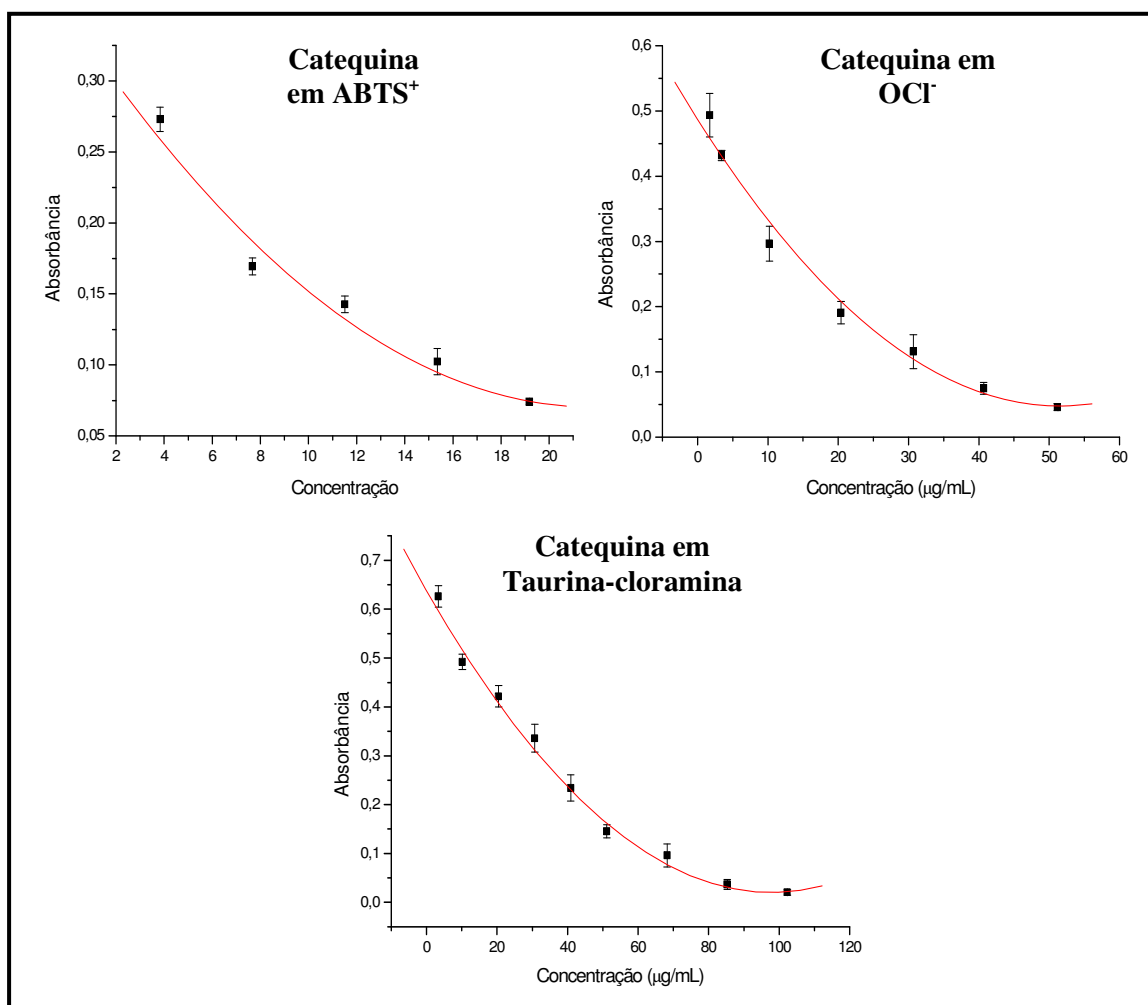


Figura 13: Catequina para as espécies $ABTS^+$, OCI^- e Taurina-cloramina

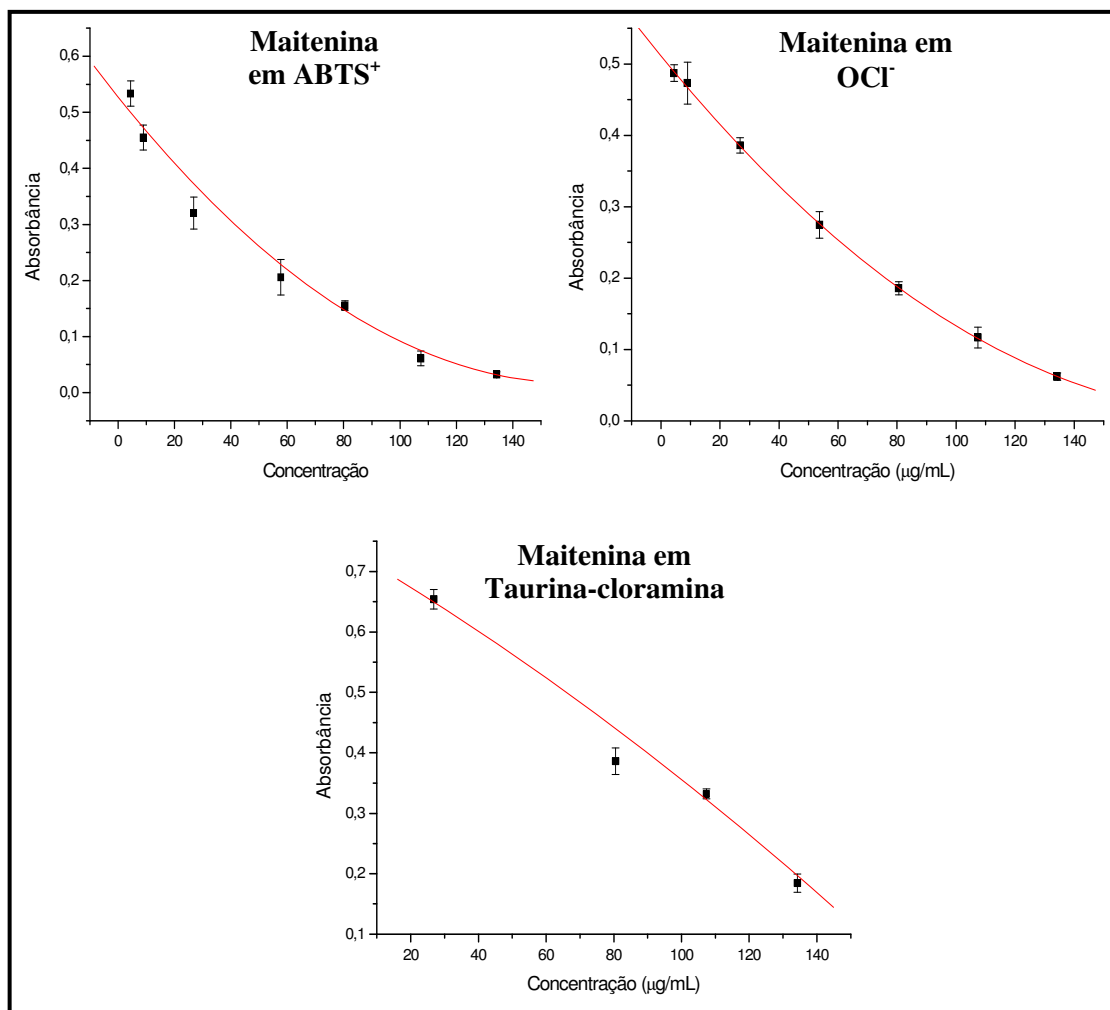


Figura 14: Maitenina para as espécies ABTS⁺, OCI⁻ e Taurina-cloramina

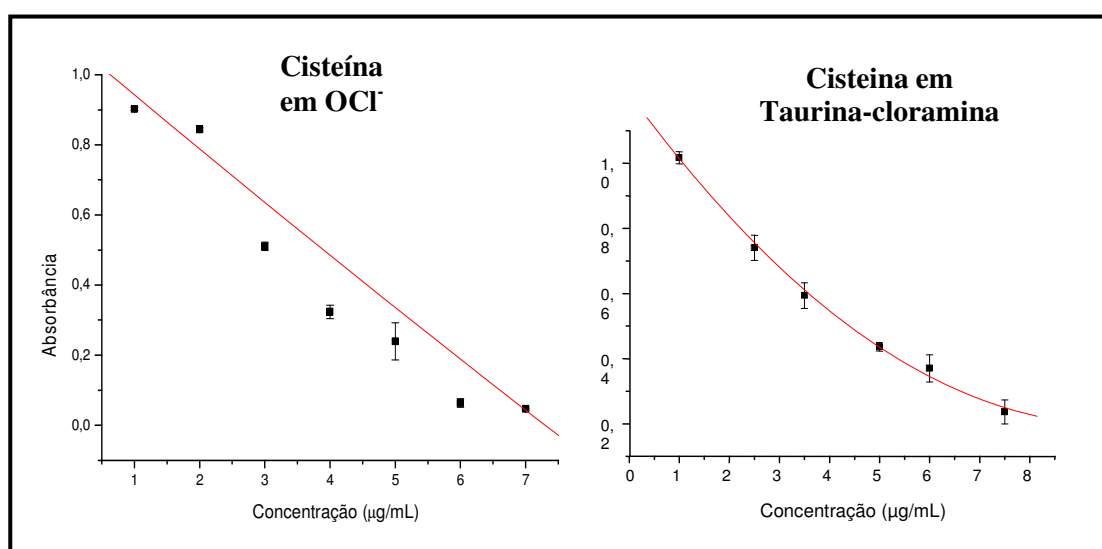


Figura 15: Cisteína para as espécies, OCI⁻ e Taurina-cloramina

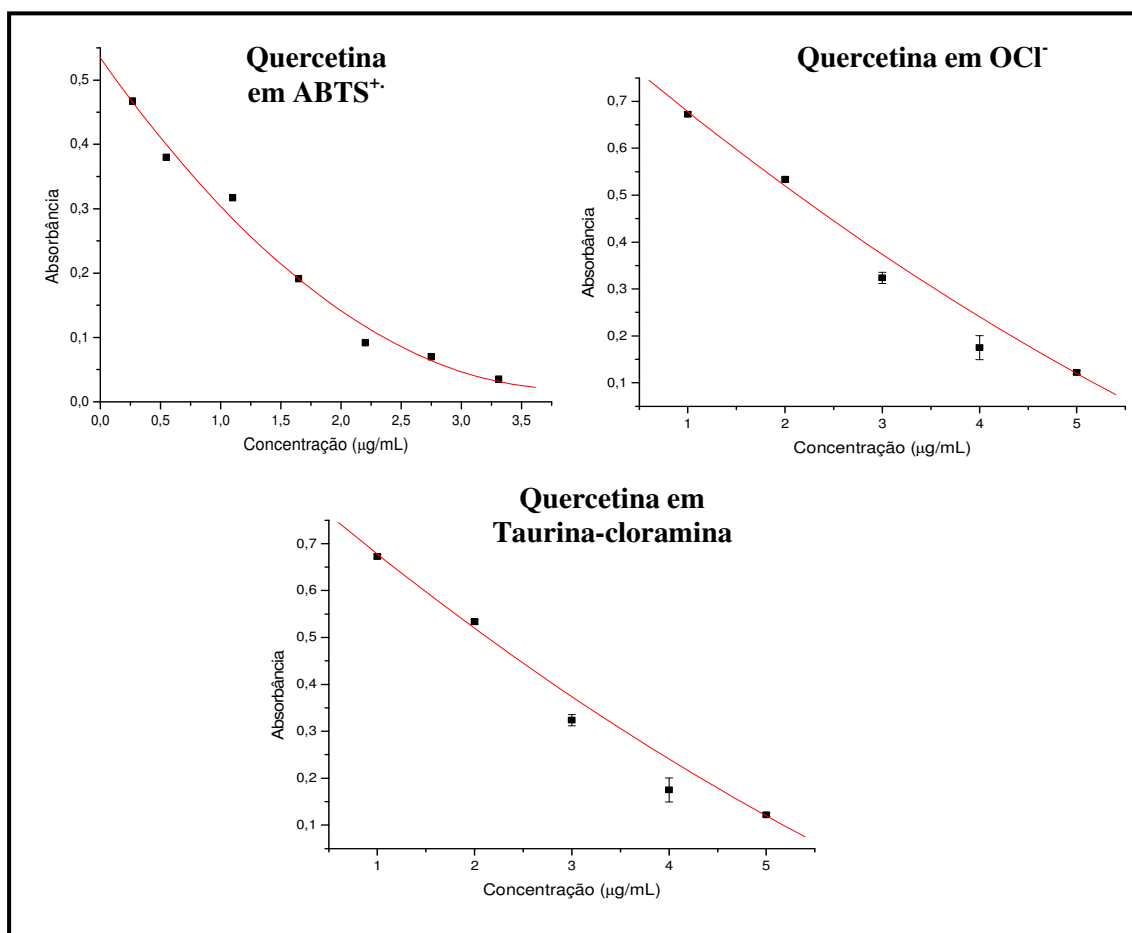


Figura 16: Quercetina para as espécies ABTS⁺, OCl⁻ e Taurina-cloramina

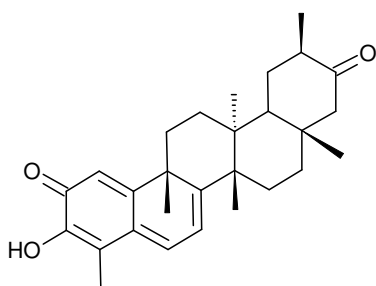
A tabela 11 mostra o IC₅₀ (quantidade de substância capaz de interagir com 50% dos radicais livres) em µg/mL, das substâncias para cada radical testado, comparados com os padrões.

Tabela 11: Valores de IC₅₀ (μg/mL) obtidos nos ensaios da atividade antioxidante dos extratos e compostos de *Maytenus ilicifolia*

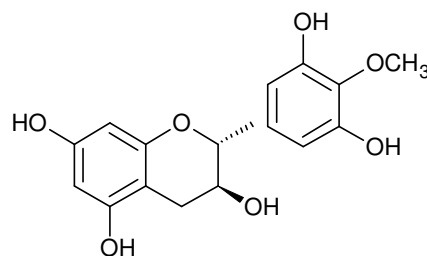
Extrato Classificação	ABTS ⁺	OCI ⁻	TauCl
1- Extrato EtOH	0,93	6,58	2,18
2- Extrato DCM	25,08	-----	80,17
3- Catequina	2,76	14,65	23,20
4- Maitenina	37,35	55,96	95,59
Quercetina	1,14	1,46	1,39
Cisteína	-----	3,10	2,40

Estes resultados mostram que o extrato EtOH é o que possui maior atividade antioxidante, precedido da catequina. A maitenina e o extrato DCM também possuem atividade antioxidante, porém com menor potência. Não foi possível realizar o teste com o radical OCI⁻ para o extrato DCM, devido a turvação do meio impossibilitando a leitura espectrofotométrica.

Estes resultados se confirmam quando observamos a estrutura molecular da catequina e da maitenina, podendo assim observar a quantidade diferente de hidroxilas presentes em cada uma delas, o que sugere maior atividade antioxidante para a catequina, pois apresenta maior numero de hidroxilas (figura 17).



Maitenina



Catequina

Figura 17: Estruturas moleculares de substâncias isoladas de *M. ilicifolia*

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA *et al.*, 2001). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento da área da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (MICHELIN *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2006; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; SAÚDE-GUIMARÃES E FARIA, 2007).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas.

Existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais. Dentre os mais utilizados incluem o método de difusão em ágar, e o método da microdiluição. As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, o preparo dos extratos (plantas frescas ou secas) e a quantidade de extrato testada. Assim, fica difícil padronizar metodologias para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos nestes experimentos mostram que através dos métodos de difusão em ágar e diluição em microplacas foram possíveis observar atividade antibacteriana de algumas substâncias estudadas.

Das 18 amostras analisadas provenientes da espécie *M. ilicifolia*, duas apresentaram atividade antibacteriana porém, esta atividade foi diferente em cada

metodologia, a atividade antibacteriana foi mais potente nos testes de microplacas quando comparadas a atividade dos testes em difusão (tabela 9).

Com os resultados apresentados foi observado que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram resistentes a todos os extratos vegetais estudados, confirmando a grande resistência que estes micro-organismos apresentam frente à ação de substâncias antimicrobianas (MURRAY *et al.*, 2003).

A maitenina apresentou uma boa atividade contra as bactérias Gram positivas confirmando os testes realizados com esta substância. Um dos primeiros mostrou que a maitenina apresenta atividade antibacteriana “*in vitro*” frente às bactérias Gram positivas, tais como: o *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* (TESKE, 1994). Na Argentina também se constatou esses resultados (ALONSO, 1998).

Segundo Ostrosky *et al.* (2008) a atividade antibacteriana realizada em microplacas é até 30 vezes mais sensível que o teste realizado em ágar difusão, fato esse que ao longo do teste se confirmou (tabela 8) pois podemos notar que as substâncias que apresentaram atividade antibacteriana, apresentaram uma atividade muito mais potente quando testadas em microdiluição do que quando testadas em difusão.

A maitenina apresenta atividade inibitória de sarcomas em experimentos realizados. Quando estas provas foram ensaiadas em pacientes com distintas patologias neoplásicas avançadas resistentes à quimioterapia, pode-se observar resultados positivos empregando-se doses de 150 µg/kg diários em carcinomas epidermóides nas amídalas, na base da língua e na faringe. Em todos os casos, a redução das lesões foi entre 40 e 60% durante o período do experimento, não se observando toxicidade gastrointestinal e nem alterações hematológicas (TESKE, 1994; SOARES, 2000).

Experimentos realizados na Escola Paulista de Medicina (Unifesp) demonstraram o efeito antiulcerogênico da infusão de *M. ilicifolia* administrado via intra-peritoneal e oral em ratas com úlcera gástrica induzidas por indometacina e por situações de stress físico. (COIMBRA, 1994; TESKE, 1994; SOARES, 2000).

Embora o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana de *M. ilicifolia* não seja conhecida, esta ação certamente está relacionada a sua composição química. A presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois lhes conferem alto poder anti-séptico.

Segundo Simões *et al.*, 1999 apesar de o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais não seja bem conhecido, evidentemente a potência bactericida e anti-séptica dos mesmos estão diretamente relacionadas à sua composição química, isso ocorre, pois á presença de compostos fenólicos, aldeídos, álcoois e antimaláricos. O uso da espécie Celastraceae na medicina popular deve estar relacionado ao seu conteúdo de flavonóides e triterpenos quinonametídeos (CARVALHO *et al.*, 2005).

Neste trabalho também foi avaliado a estrogenicidade da substância pura maitenina por meio do Teste RYA que utiliza como modelo experimental leveduras recombinantes.

A *Environmental Protection Association* (EPA) considera a identificação dos interferentes endócrinos como uma das cinco principais áreas de pesquisa da organização, havendo ainda muito a ser conhecido sobre efeitos e formas de neutralizá-los (COONEY, 1997).

Tem sido investigado um grande número de substâncias que são indicadas como possíveis contribuintes para a perturbação do sistema endócrino. Algumas demonstraram ter efeitos endócrinos, de potência variada, em testes laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, enquanto outras têm poucos dados confirmando tal atividade (EPA, 1998).

No presente estudo, a substância maitenina foi avaliada devido à semelhante de sua estrutura química com o estrógeno natural 17- β estradiol. No entanto, a substância não exibiu atividade estrogênica.

Está bem estabelecido que os fitoestrógenos pertencem a diferentes classes de compostos, portanto, estruturas químicas por si só não são suficientes para prever a atividade estrogênica. Por esta razão, a investigação química guiada por bioensaios podem acrescentar informações importantes sobre a atividade estrogênica de plantas (RIGGS e HARTMANN, 2003).

Já foi demonstrado que os estrógenos vegetais têm a capacidade de interromper a gravidez precoce em ratos e camundongos através da inibição do aumento de estrogênio necessário para a implantação. Em camundongos e humanos, os estrógenos

também desempenham um papel fundamental na implantação, porque participa do equilíbrio estrogênio/progesterona e, assim, na receptividade do útero para o embrião (DENKER, 1994).

Montanari e Bevilacqua (2002) revelaram em um estudo de estrogenicidade, que a perda embrionária de camundongos pode ter sido causada pela atividade estrogênica do extrato de *M. ilicifolia*. Entretanto, no presente estudo, a maitenina não apresentou a atividade estrogênica nas condições utilizadas. Tal resultado pode estar relacionado com o sistema-teste empregado no presente estudo ou pode ser devido a outros componentes do extrato. A atividade estrogênica de uma substância resulta a partir da sua interação direta com o receptor de estrógeno (ZACHAREWSKI, 1998). O receptor de estrógeno tem capacidade de se ligar a uma série de compostos com diferenças estruturais (KUIPER *et al.*, 1998). Entretanto, o potencial de cada substância pode ser devido à sua afinidade aos receptores. Embora as leveduras apresentem diversas vantagens, muitos fatores podem afetar a atividade estrogênica de uma substância quando testada neste sistema-teste (ZACHAREWSKI, 1998). As desvantagens do sistema pode surgir pela incapacidade de distinguir antiestrógenos que exerçam atividade agonista parcial na levedura (LEGLER *et al.*, 2002), bem como diferenças na permeabilidade dos compostos através da parede celular da levedura (LYTTLE *et al.*, 1992).

A prevenção às doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. Devido ao potencial carcinogênico de antioxidantes sintéticos, os antioxidantes naturais são alvos alternativos para minimizar ou retardar os processos de deterioração oxidativa em alimentos e para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos de plantas deve-se às suas propriedades de oxido redução e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar radicais livres (CHUN *et al.*, 2005). Compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são bons agentes antioxidantes naturais (ATOUI *et al.*, 2005). Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores e o uso de plantas com propriedades farmacológicas também chama a atenção dos pesquisadores. Extratos de frutas, cereais, e de diferentes vegetais, e seus produtos derivados, têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos (SUN E HO, 2005). A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características

estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes. Bolzani *et al.* (1995) identificaram ação anticâncer por parte do extrato metanólico das folhas de *Pterogyne nitens*.

O ensaio de captura contra o ABTS⁺ foi realizado como triagem da atividade antioxidante destes extratos vegetais, os quais apresentaram atividade antioxidante relativamente boa, em comparação ao padrão de quercetina. Justificando assim continuidade dos demais ensaios para determinar o potencial antioxidante frente as ERO de relevância biológica.

Segundo Velloso *et al.* (2007) o extrato bruto EtOH de *Maytenus ilicifolia* é uma possível fonte de antioxidantes, pois este extrato já havia sido testado para os sistemas ABTS⁺ e OCl⁻, fato esse confirmado neste estudo. É possível observar que há potenciais diferentes dos extratos estudados para atuar sobre diferentes espécies reativas.

6- CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

I - O extrato diclorometânico apresentou atividade antibacteriana para as bactérias Gram-positivas *Stapylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, quando o extrato EtOH não apresentou atividade.

II – Para a determinação da atividade antibacteriana, foi possível observar que a técnica de microdiluição mostrou-se mais sensível quando comparada á técnica de disco difusão em ágar.

III- As substâncias testadas apresentaram atividade antioxidante, ressaltando que o extrato EtOH e a catequina foram quem tiveram uma ótima e boa atividade, respectivamente, quando comparado ao padrão quercetina.

IV- Destacou-se a atividade antibacteriana da maitenina que poderia ser empregada para o controle terapêutico de bactérias, que a cada dia tornam-se mais resistentes a ação dos muitos antimicrobianos empregados atualmente.

V- Apesar de a estrutura ser semelhante a do estrógeno a maitenina não apresentou atividade estrogênica pelo teste RYA. Sendo necessários mais testes estrogênicos para poder afirmar se a maitenina realmente não possui atividade estrogênica.

*7- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. **Ann Med.**, v. 29, n. 2, p. 95 - 120, 1997.
- ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**. 1ª edição. Isis Ediciones. Buenos Aires. 1998.
- ALVES, E. G. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia fallax***. Estudo comparativo de quatro técnicas de “screening”. Franca, 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Biológica) Universidade de Franca.
- ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cad Saúde Pública**, v. 23, p. 1005-1014, 2007.
- ANDRADE, S. F.; ANTONIOLLI, D.; COMUNELLO, E.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Antiulcerogenic activity of crude extract, fractions and populonic acid isolated from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). **Z. Naturforsch.**, v. 61, p. 329 - 333, 2006.
- ARENAS, P.; MORENO AZORERO, R. Plants used as means of abortion, contraception, sterilization, and fecundation by Paraguayan indigenous people. **Econ Bot.**, v. 31, p. 302–306, 1977.
- ARNOLD, S. F.; ROBINSON, M. K.; NOTIDES, A. C.; GUILLETE, L. J.; JR, MCLACHLAN, J. A. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. **Environ Health Perspect.**, v. 104, p. 544 - 547, 1996.
- ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R.; HALLIWELL, B. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. **Chem. Biol. Interact.**, v. 77, p. 303 - 314, 1991.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27 - 36, 2005.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33 - 44, 2000.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIAVELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺,K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 433 – 440, 2007.

- BALVÉ, A. C.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. de A. B.; DEUD JOSÉ, K. F. Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico. Canoas: Ed. da ULBRA, 1995. 205p.
- BARBOSA-FILHO J.M., NASCIMENTO-JÚNIOR F.A., TOMAZ A.C.A., ATHAYDE-FILHO P.F, SILVA M.S., CUNHA E.V.L., SOUZA M.F.V., BATISTA L.M., DINIZ M.F.F.M.; Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 141 - 148, 2007.
- BHOOLA, K. D.; ODHAV, B.; REDDY, L. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1 - 13, 2003.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 1683 - 1688, 1995.
- BOSCOLO, O. H.; MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S.; SENNA-VALLE, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.1, p. 8 - 12, 2007.
- BUFFA FILHO, W.; CORSINO, J.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Quantitative Determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 75 - 78, 2002.
- BRIHEIM, G.; STENDAHL, O.; DAHLGREN, C. Intra- and extracellular events in luminoldependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 1 - 5, 1984.
- CARVALHO-OKANO, R. M. Novos sinônimos para espécies de *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae). **Bradea**, v. 14 (8), p. 73 - 76, 1998.
- CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinomethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chem. Biodivers.**, v. 2, n. 3, p. 367 - 372, 2005.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.**, v. 40, p. 809 - 816, 2005.
- COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2ª edição. 1994
- COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 1004 - 1009, 1997.
- CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M. S.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of

- maitenin and 22 β - hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 9, n. 5, p. 245 - 247, 1998.
- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. DAS.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochem.**, v. 55, p. 741 - 748, 2000.
- CORSINO, J.; SILVA, D. H.; ZANONI, M. V.; DA SILVA BOLZANI, V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytother. Res.**, v. 17 (8), p. 913-916, 2003.
- COSTA, A. F. Antibióticos: Farmacognosia. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- COWAN, N. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.
- DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. I.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, acatalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 437 - 444, 1994.
- DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. L.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other related diseases. **Mut. Res.**, v. 480-481, p. 9-22, 2001.
- DE LA CRUZ, M. G. F. Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e doença, Cuiabá, Mato Grosso. Cuiabá, 1997. (Dissertação de Mestrado Saúde e Ambiente/ ISC/UFMT).
- DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYSD, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 1425–1430, 2008.
- DENKER, H.W. Cell biology of endometrial receptivity and of trophoblast-endometrial interactions. In: Glasser SP, Mulholland J, Psychoyos A, editors. Endocrinology of embryo-endometrium interactions. New York: Plenum Press, 1994. p. 17–32.
- DICKISON, W. C. Integrative Plant Anatomy. San Diego, Harcourt Academic Press, 2000.
- DUAN, H. Q.; TAKAISHI, Y.; JIA, Y. F.; LI, D. Sesquiterpene polyol esters from *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 341 - 346, 2001.
- EATON, J. W. Defenses against hypochlorous acid: parrying the neutrophil's rapier thrust. **The J. Lab. Clin. Med.**, v. 121, p. 197 - 198, 1993.

- ELOFF, J. N. A. A. Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, p. 711 - 713, 1998.
- ELOFF, J. N. A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts - a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **S. Afr. J. Sci.**, p. 116 – 118, 2000.
- EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening an Testing Advisory Committee. EDSTAC’S Final Report. 1998. Disponível em: <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/finalrpt.htm>
- FENNEL C.W., LINDSEY K.L., SPARG S.G., STAFFORD G.I., ELGORASHI E.E., GRACE O.M., VAN STADEN J.; **Review:** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 205 - 217, 2004.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, p. 61 - 68, 1997.
- FERREIRA, J. N.; AQUINO, F. G.; CARVALHO-OKANO, R. M.; PROENÇA, C. E. B. Celastraceae. *In:* T.B. Cavalcante & A.E. Ramos (eds.). Flora do Distrito Federal, Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, v. 3, p. 139 - 147, 2003.
- FERREIRA DE SANTANA, C.; CORTIAS, C. T.; PINTO, K. DE V.; SATIRO, M. W.; SATIRO, A. L.; LACERDA, A. L.; MOREIRA, I. C. Primeiras observações sobre o emprego de maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos Recife**, v. 11, p. 37 – 49, 1971.
- FIGUEIREDO, J. N.; RAZ, B.; SEQUIN, U. Novel quinonemethides from *Salacia kraussii* with *in vitro* antimalarial activity. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 718 – 723, 1998.
- FONSECA, A. P. N. D.; SILVA, G. D. F.; CARVALHO, J. J.; SALAZAR, G. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; PERES, V.; VIEIRA-FILHO, S. A. Phytochemical study of the decoct from the leaves of *Maytenus truncata* Reissek and the evaluation of the antinociceptive, antiedematogenic and antiulcerogenic activities of the decoct extracts. **Quim. Nova**, v.30, n.4, p. 842 - 847, 2007.
- FRIDOVICH, I. Oxidative stress. **Encycl. Life Sciences**, 2001.
- GARCIA-REYERO, N.; PIÑA, B.; GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; FONTS, R.; POLVILLO, O.; MARTRAT, B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environmental Science and Technology**, v. 39 (6), p. 1427-1435, 2005.
- GONZALEZ, J. G.; MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D.; MARINI-BETTOLO, G. B. Chuchuasca – a drug used in folk medicine in the

- Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Maytenus leavis*. **J Ethnopharmacol.**, v. 5, p. 73 – 77, 1982.
- GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 41 – 47, 2001.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFGRS, p. 13 – 14, 2004.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**, v. 30, p. 695 - 706, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v. 30, n.2, p. 374 - 381, 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 81 - 85, 1990.
- HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v. 23, p. 118 – 26, 1993.
- HARRINSON, J. E; SCHULTZ, J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. **Biol. Chem.**, v. 251, p. 1371-1374, 1976.
- HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 107 (5), p. 401 - 404, 1986.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.
- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; AKEYA, K. T.; ITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicefolia*. **Photochem.**, v. 30, n. 11, p. 3713- 3716, 2001.
- JELLER, A. H.; SILVA, D. H. S.; LIAO, M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochem.**, v. 65, n. 13, p. 1977 - 1982, 2004.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 93 – 100, 2004.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Massachusetts, Sinauer Associates. 1999.

- KALIX, P.; BRAENDEN, O. Pharmacological aspects of the chewing of khat leaves. **Pharmacol. Rev.**, v. 37, p. 149 - 164, 1985.
- KLOTZ, D. M.; BECKMAN, B. S.; HILL, S. M.; MCLACHLAN, J. A.; WALTERS, M. R.; ARNOLD, S. F. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. **Environ Health Perspect.**, v. 104, p. 1084 - 1089, 1996.
- KNASMÜLLER S.; STEINKELLNER H. B. J.; MAJER E. C.; NOBIS G.; SCHARF G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. **Food Chem. Tox.**, v. 40, p. 1051-1062, 2002.
- KUIPER, G. G., LEMMEN, J. G., CARLSSON, B., CORTON, J. C., SAFE, S. H., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B., GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, p. 4252 – 4263, 1998.
- LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 279 - 281, 2004.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 1145-1147, 1996.
- LEGLER, J., DENNEKAMP, M., VETHAAK, A. D., BROUWER, A., KOEMAN, J. H., VAN DER BURG, B., MURK, A. J. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using *in vitro* reporter gene assays. **Sci. Total Environ.**, v. 293, p. 69 – 83, 2002.
- LEITÃO S.G., CASTRO O., FONSECA E.M., JULIÃO L.S., TAVARES E.S., LEO R.R.T, VIEIRA R.C., OLIVEIRA D.R., LEITÃO G.G., MARTINO V., SULSEN V., BARBOSA Y.A.G., PINHEIRO D.P.G., SILVA P.E.A., TEIXEIRA D.F., LOURENÇO M.C.S.; Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 6 - 11, 2006.
- LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3796 – 3801, 2001.
- LIMA, E. O. Plantas e suas Propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, p. 483 – 501, 2001.
- LIMA I.O., OLIVEIRA R.A.G., LIMA E.O., FARIAS N.M.P., SOUZA E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 197 - 201, 2006.

- LORENZI, F. J. H.; MATOS, A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LYTTLE, C. R.; DAMIAN-MATSUMURA, P.; JUUL, H.; BUTT, T. R. Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 677 – 685, 1992.
- MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Rev. Bras. Plan. Med.**, v.9, n.3, p. 89 - 99, 2007.
- MATHY-HARTERT, M.; BOURGEOIS, E.; GRULKE, S.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. **Can. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 127 - 132, 1998.
- MARTÍNEZ CROVETTO, R. Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino. **Am Ind**, v. 47, p. 279–293, 1987.
- MATSUMURA, A., GHOSH, A., POPE, G. S., DARBRE, P. D. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 94, p. 431 - 443, 2005.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. 2nd ed. Oxford, **Clarendon Press.**, v. 1, p. 276, 1979.
- MICHELIN D.C., MORESCHI P.E., LIMA A.C., NASCIMENTO G.G.F., PAGANELLI M.O., CHAUD M.V.; Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316 – 320, 2005.
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65 (2), p. 171 – 175, 2002.
- MONTANARI, T.; DE CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart.ex. Reiss on spermatogenesis. **Contraception**, v. 57 (5), p. 335 – 339, 1998.
- MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*- benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117 - 124, 2005.
- MORAIS, H. P. Avaliação “in vitro” da atividade antibacteriana de extratos de *Bysonima* spp e *Alchornea* spp: Estudos comparativos entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. Araraquara, 2006. 79f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2006.
- MORITA, H.; HIRASAWA, Y.; MUTO, A.; YOSHIDA, T.; SEKITAB, S.; SHIROTA, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 1050 – 1052, 2008.

- MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I. N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, v. 75, p. 168 - 178, 2004.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLLKEN, R. R. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press, 2003.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por difusão em ágar para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 8^a ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M2-A8, v. 23, No 1, 2003).
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 6^a ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, No 2, 2003).
- NETO, C.C.; OWENS, C.W.; LANGFIELD, R.D.; COMEAU, A.B.; St. ONGE, J.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **J. Ethnopharmacol** v. 79, p. 133–138, 2002.
- NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385 (6), p. 1012-1019, 2006.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; SUZANA, O.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 18 (2), p. 301 - 307, 2008.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720 - 2722, 2002.
- PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Meth. Enzymol.**, v. 299, p. 379 - 389, 1998.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES. M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious

- diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 37 - 40, 2001.
- PERCIVAL, M. Antioxidants. **Clinical Nutrition Inside**, v. 31, p. 1 - 4, 1998.
- QUIRÓS, L.; CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; VIANA, P.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24 (2), p. 389 - 395, 2005.
- REISSEK, S. Celastrineae, Ilicineae, Rhamneae. In: C.F.P. Martius & A.G. Eichler (eds.). *Flora Brasiliensis*, Typographia Regia, Monachii, v. 11, pt. 1, pp. 1-36, 1861.
- RIGGS, B. L., HARTMANN, L. C. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 618 – 629, 2003.
- ROCHA, C. S.; PIMENTEL, R. M. M.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia de Folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae); uma Espécie Utilizada Como Medicinal no Nordeste do Brasil. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 472-6, 2004.
- RODRÍGUEZ, F. M.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; RAVELOA, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron**, v. 61, p. 2513 – 2519, 2005.
- RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 292, p. 869 - 873, 2002.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGOPELFREY, C. (Ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton: **CRC Press**, p.151 – 170, 1991.
- ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry.**, v. 15, p. 241 - 248, 1996.
- SANCHES, A. C. C. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth, atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. Araraquara, 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.
- SANTAMARTA, J. A. Ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol e Desenv Rur Sustent.**, v. 2, n. 3, 2001.
- SAÚDE-GUIMARÃES DA, FARIA AR. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 455 - 465, 2007.

- SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr.**, v. 134, n. 6, p. 1333S - 1343S, 1998.
- SHELBY, M. D.; NEWBOLD, R. R.; TULLY, D. B.; CHAE, K.; DAVIS, V. L. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. **Environl Health Perspect.**, v. 104, p. 1296 - 1300, 1996.
- SILVA, J. L.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; FATIMA SILVA, G. D.; VIEIRA FILHO, S. A.; FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 15, p. 30 – 35, 2005.
- SILVA, M. S.; SOUSA, D. P.; MEDEIROS, V. M.; FOLLY, M. A. B.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochem. System. Ecol.**, v. 36, p. 500-503, 2008.
- SIMÕES C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 2 ed – Porto Alegre –Florianópolis : editora UFSC / Ed. Universidade / UFRGS, p. 417, 1999.
- SIMÕES C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6 ed. rev. ampl. – Porto Alegre /Florianópolis : UFSC / UFRGS, 2004.
- SOARES, A. D. **Dicionário de Medicamentos Homeopáticos**. 1ª edição. Santos Livraria Editora. 2000.
- SOARES, L. A.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 19; 36 (4), p. 787 – 790, 2004.
- SOTO, A. M.; LIN, T. M.; JUSTICIA, H.; SILVA, R. M.; SONNENSCHNEIN, C. An “in culture” assay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-screen). **Advances in Modern Environmental Toxicology**, v. 21, p. 295 - 309, 1992.
- SOUZA BRITO, A. R. M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J. Ethnopharmacol.**, v. 54, p. 131 – 138, 1996.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J Ethnopharmacol.**, v. 34 (1), p. 21 – 27, 1991.

- SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. **Chem. Soc. Rev.**, v. 31, p. 43 – 59, 2002.
- SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. **Environmental Science and Technology**, v. 30 (12), p. 4321-4332, 2005.
- SWANSON, C. Vegetables, fruits, and cancer risk: The role of phytochemicals. In: BIDLACK, W. R.; OMAJE, S. T.; MESKIN, M. S.; JAHMER, D. Phytochemicals: a new paradigm. Lancaster PA: Technomic Publishing, p. 1-12, 1998.
- TESKE, M.; TRENTINI, A. M. Herbarium Compêndio de Fitoterapia. Herbarium. Curitiba. 1994.
- THOMAS, E. L.; GRISHAM, M. B; JEFFERSON, M. M. Preparation and characterization of chloramines. **Meth. Enz.**, v. 132, p. 569-585, 1986.
- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 846 (1-2), p. 378 – 384, 2007.
- TORRES, R.L.; TORRES, I.L.S.; GAMARO, G.D.; FONTELLA, F.U.; SILVEIRA, P.P.; MOREIRA, J.S.R.; LACERDA, M.; AMORETTI, J.R.; RECH, D.; DALMAZ, C.; BELLÓ, A.A.; Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 185 - 192, 2004.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. Plantas medicinais: Cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519 – 528, 2005.
- VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV (2), p. 119 - 130, 2007.
- VENGLARIK, C. J.; GIRON-CALLE, J.; WIGLEY, A. F.; MALLE, E.; WATANABE, N.; FORMAN, H. J. Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione. **J. Appl. Physiol.**, v. 95 (6), p. 2444-2452, 2003.
- VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47 (2), p. 403 – 406, 1999.
- WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; HUTCHINSON, D. C. S.; BAUM, H. Biologically significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharm.**, v. 36, p. 3847-3850, 1987.

- WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. O. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? **Biochem. Pharm.**, v. 37, p. 775 - 778, 1988.
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl. J. Med.**, v. 320, p. 365 - 376, 1989.
- WELSHONS, W. V.; ROTTINGHAUS, G. E.; NONNEMAN, D. J.; DOLAN-TIMPE, M.; ROSS, P. F. A sensitive bioassay for the detection of dietary estrogens in animal feeds. **J Vet Diagn Invest.**, v.2, p.268-73, 1990.
- WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. **Altern. Med. Rev.**, v. 6, n 6, p. 567 - 579, 2001.
- ZACHAREWSKI, T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, p. 577-582, 1998.
- ZGLICZYNSKI, T. J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 235, p. 419 - 24, 1971.