

Juliana Greisse Bertoldi

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.**

Araraquara

2012

Juliana Greisse Bertoldi

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Wilson e Gislaine, pelo apoio, paciência e incentivo durante todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo carinho e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela orientação, paciência, compreensão, conselhos, dedicação e amizade durante o período em que convivemos.

À Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab pela orientação, sugestões e fornecimento do extrato vegetal utilizado neste estudo.

Aos alunos de pós-graduação Leonardo e Mariana do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Leonardo e Mariana pela ajuda com os testes de atividade antibacteriana.

Às alunas de pós-graduação do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Elaíse e Josiane pelo auxílio com as técnicas cromatográficas. Agradeço também ao José Ricardo pela ajuda com as análises em espectrofotômetro.

Aos estagiários do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, especialmente Elaine e Victor pela colaboração.

Ao técnico do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Luiz Eduardo por toda ajuda durante a execução dos experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Básica da FCF - UNESP Edinéia, Marisa e Silvia pelo auxílio durante a realização dos testes de atividade antibacteriana.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, especialmente Maximiliano (Maxi) por toda ajuda durante a graduação e Ana Cristina pela correção das referências bibliográficas do TCC.

Aos funcionários da seção de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, especialmente Alexandre pela paciência e disposição em ajudar.

A todos os professores pela contribuição na minha formação acadêmica.

Às colegas de graduação Sandi, Mayara, Juliana e Elaine (Dami) pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Às amigas Bernadete (Bete) e Amanda pelas conversas e ajuda.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de tabelas

1. Introdução	13
1.1. Plantas Medicinais.....	13
1.2. Plantas Medicinais do Cerrado.....	13
1.3. <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss.....	14
1.4. Investigação fitoquímica	18
1.4.1. Preparo do extrato.....	18
1.4.2. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias.....	21
1.5. Análise Biológica	23
2. Objetivos	23
3. Metodologia.....	24
3.1. Coleta, preparo do material vegetal e extração	24
3.2. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias	24
3.2.1. Fracionamento do extrato metanólico de <i>Byrsonima pachyphylla</i> por partição líquido-líquido.....	24
3.2.2. Análise do extrato metanólico e das frações acetato de etila / n-butanol por cromatografia em camada delgada (CCD).....	26
3.2.2.1. Preparação das amostras.....	26
3.2.2.2. Placas cromatográficas	27

3.2.2.3. Ativação das placas cromatográficas	27
3.2.2.4. Fase móvel.....	27
3.2.2.5. Preparação da cuba cromatográfica.....	27
3.2.2.6. Desenvolvimento	27
3.2.2.7. Revelação das cromatoplasas.....	27
3.2.2.8. Cálculo do Rf	28
3.2.3. Fracionamento da fração acetato de etila de <i>Byrsonima pachyphylla</i> por cromatografia em coluna (CC)	28
3.2.3.1. Seleção da fração acetato de etila	28
3.2.3.2. Condições para análise em CC estabelecidas por CCD	29
3.2.3.3. Preparo da coluna cromatográfica.....	29
3.2.3.4. Preparo da amostra.....	30
3.2.3.5. Desenvolvimento da CC.....	30
3.2.3.6. Análise em CCD	32
3.3. Ensaio de atividade antibacteriana: Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	32
3.3.1. Cepas bacterianas.....	32
3.3.2. Meios de cultura	32
3.3.3. Preparo dos meios de cultura e tampão.....	33
3.3.4. Suspensão bacteriana (inóculo)	33
3.3.5. Preparo das amostras	34
3.3.6. Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	35
3.4. Triagem fitoquímica.....	40

3.4.1. Identificação de taninos.....	40
3.4.2. Identificação de alcaloides	40
3.4.3. Identificação de flavonoides	41
3.4.4. Identificação de saponinas	41
3.5. Identificação de taninos pela técnica de cromatografia em camada delgada.....	41
3.5.1. Fase móvel e reveladores	42
3.5.2. Análise de taninos antes da hidrólise ácida.....	42
3.5.3. Análise de taninos após hidrólise ácida.....	42
3.6. Obtenção dos espectros no UV das frações n-butanol e 98	42
4. Resultados	43
4.1. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias	43
4.1.1. Fracionamento do extrato metanólico de <i>Byrsonima pachyphylla</i> por partição líquido-líquido	43
4.1.2. Análise do extrato metanólico e das frações acetato de etila / n-butanol por cromatografia em camada delgada (CCD)	44
4.1.3. Fracionamento da fração acetato de etila de <i>Byrsonima pachyphylla</i> por cromatografia em coluna (CC)	47
4.2. Ensaio de atividade antibacteriana: Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	51
4.3. Triagem fitoquímica.....	54
4.4. Identificação de taninos pela técnica de cromatografia em camada delgada	54
4.4.1. Análise taninos antes da hidrólise ácida.....	54
4.4.2. Análise de taninos após hidrólise ácida.....	55

4.5. Obtenção dos espectros no UV das frações n-butanol e 98.....	56
5. Discussão.....	58
6. Conclusão	65
7. Referências bibliográficas	65

RESUMO

Muitas plantas pertencentes à região do Cerrado têm sido empregadas no tratamento de diversas doenças, como é o caso da *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. Esta espécie é uma árvore conhecida popularmente como murici e que faz parte da família Malpighiaceae. As folhas, raízes e cascas de espécies de *Byrsonima* são utilizadas pela medicina popular contra infecções intestinais, em feridas crônicas, afecções de boca e garganta e como adstringente. A literatura científica apresenta trabalhos que revelam atividade antibacteriana do gênero *Byrsonima* contra *Staphylococcus aureus*. Investigações fitoquímicas do gênero *Byrsonima* apontam a presença de taninos, flavonoides e catequinas. No estudo realizado, o extrato metanólico de folhas de *B. pachyphylla* foi fracionado por partição líquido-líquido utilizando água, acetato de etila e n-butanol. O extrato e as frações foram solubilizados em diluentes adequados e testados contra *S. aureus*, *E. coli* e *H.pylori* através da técnica de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Uma das frações ativas (acetato de etila) foi fracionada através de cromatografia em coluna (CC). As frações obtidas foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). Seis dessas frações foram testadas contra *S. aureus* pela mesma metodologia citada. O extrato e as frações acetato de etila, n-butanol e 98 foram submetidos à triagem fitoquímica e análises em CCD empregando fase móvel e reveladores seletivos para taninos. As frações n-butanol e acetato de etila apresentaram atividade antibacteriana contra *S.aureus*. O fracionamento da fração acetato de etila resultou em 98 frações, agrupadas em 15 pela semelhança em CCD. Das 6 frações testadas, 4 apresentaram atividade contra *S. aureus*, destacando-se a 98 que apresentou valor de CIM de 125 µg/mL, igual a das frações acetato de etila e n-

butanol. A triagem fitoquímica e as análises em CCD demonstraram a presença de saponinas, flavonoides e taninos hidrolisáveis nas frações testadas e no extrato, sendo possível identificar taninos hidrolisáveis neste último. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a presença de metabólitos secundários, principalmente taninos hidrolisáveis, na espécie *B. pachyphylla* com ação contra *S. aureus*.

Palavras-chave: *Byrsonima pachyphylla* A. Juss., estudo fitoquímico, diluição em microplacas, atividade antibacteriana.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i>	25
Figura 2: Esquema de coluna cromatográfica.....	30
Figura 3: Esquema de organização das microplacas.....	37
Figura 4: Análises por CCD do extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i> e de suas frações.....	45
Figuras 5 e 6 : Placas cromatográficas das frações da CC	49;50
Figura 7 : Testes de atividade antibacteriana em <i>S. aureus</i> utilizando a técnica de diluição em microplaca com determinação da CIM	52
Figuras 8 : Viabilidade de <i>S. aureus</i> tratado com algumas frações do extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i> em diferentes concentrações.....	53
Figura 9: Análise do extrato metanólico e de suas frações em CCD utilizando fase móvel para identificação de taninos.....	55
Figura 10: Análise do extrato metanólico hidrolisado em CCD utilizando fase móvel para identificação de taninos.....	56
Figura 11: Espectros de UV das frações n-butanol e 98.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Solubilização das amostras analisadas por CCD.....	26
Tabela 2: Eluentes utilizados no sistema gradiente empregado na CC.....	31
Tabela 3: Preparo dos meios de cultura e tampão utilizados nos testes de atividade antibacteriana.....	33
Tabela 4: Amostras e diluentes utilizados nos testes de atividade antibacteriana....	35
Tabela 5: Protocolo do ensaio de atividade antibacteriana realizado em microplaca.....	38
Tabela 6: Frações resultantes da partição líquido-líquido do extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i> e suas respectivas massas.....	43
Tabela 7: Fatores de retenção (Rf) das substâncias constituintes do extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i> e de suas frações.....	46
Tabela 8: Massas das frações resultantes do fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna.....	48
Tabela 9: Atividade antibacteriana do extrato e das frações de <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss.	51
Tabela 10: Triagem fitoquímica realizada para o extrato metanólico de <i>B. pachyphylla</i> e para suas frações.....	54
Tabela 11: Bandas de absorvância das frações n-butanol e 98.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais

Desde a antiguidade as pessoas utilizam plantas com a finalidade de tratar e curar enfermidades (SANTOS et al., 2011). As civilizações primitivas perceberam a existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (CUNHA, 2010). Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda apresentam contribuição importante para a saúde atualmente (CALIXTO, 2000).

As plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos e ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Dessa forma, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA; NODARI, 2010). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados, direta ou indiretamente, de plantas medicinais, chegando esse percentual a 60% no caso de antitumorais e antimicrobianos (ROBINSON; ZHANG, 2011).

1.2. Plantas Medicinais do Cerrado

As espécies medicinais estão distribuídas pelo mundo todo, sendo mais abundantes em países tropicais como o Brasil (CALIXTO, 2000). Dentre os biomas brasileiros pode-se destacar o Cerrado pela sua diversidade biológica.

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil em extensão, sendo superado apenas pela floresta Amazônica. Identificar e registrar as espécies medicinais encontradas no Cerrado tornou-se, nos últimos anos, importante tarefa da pesquisa científica, uma vez que com informações da medicina popular e/ou tradicional pode-se verificar a potencialidade de exploração de espécies de forma sustentável, garantindo tanto a conservação do bioma quanto a aquisição de recursos econômicos adicionais para os proprietários no domínio do Cerrado. A identificação de espécies medicinais representa inesgotável fonte de informação para a seleção de espécies vegetais a fim de realizar estudos farmacológicos, químicos e toxicológicos potenciais para a produção de fitoterápicos ou fitofármacos (MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006).

1.3. *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

Muitas plantas pertencentes às mais variadas famílias têm sido empregadas popularmente na região do Cerrado no tratamento de diversas doenças, como é o caso das plantas da família Malpighiaceae (ALMEIDA et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2005; HIGUCHI, 2007). Essa família apresenta aproximadamente 60 gêneros e 1.200 espécies de árvores e lianas (ou cipós), distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais, especialmente no continente americano, onde ocorrem 44 gêneros e 800 espécies (SOUTO; OLIVEIRA, 2005), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 32 gêneros com aproximadamente 300 espécies (ARAUJO, 1994; HIGUCHI, 2007). Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima* (JOLY, 1977; FIGUEIREDO et al., 2005).

Dentre as espécies do gênero *Byrsonima* está a *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. que foi alvo desse estudo. A espécie citada apresenta como sinónimas

botânicas *B. pachyphylla* Griseb., *B. pachyphylla* var. *lanceolata* Nied., *B. pachyphylla* var. *latifolia* Nied., *B. pachyphylla* var. *obovata* Nied., *B. pachyphylla* f. *parvifolia* Nied. e *B. crassa* Nied. (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2011; THE PLANT LIST, 2011). *B. pachyphylla* A. Juss é uma espécie nativa do Brasil encontrada na Amazônia e Cerrado, distribuindo-se pelo Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2011).

B. pachyphylla é uma árvore hermafrodita sempre verde, e que floresce de maio a outubro e frutifica de junho a julho. A copa tem ramos terminais de crescimento modular, pilosos, ferrugíneos e pulverulentos. O tronco tem diâmetro de até 27 cm e o ritidoma é castanho-avermelhado, áspero e pulverulento. As folhas são coriáceas, discolores, brilhantes na face superior e pilosas na inferior, simples, opostas cruzadas, estreito-obovadas a lanceoladas com 8 a 21 cm de comprimento e 3 a 10 cm de largura, margens inteiras e onduladas. Suas nervuras são bronquidódromas, sendo a central amarelada e saliente em ambas as faces e as demais, impressas na face superior e salientes na inferior. As flores são amarelas, tornando-se alaranjadas quando velhas, com cinco pétalas livres dispostas em racemos eretos terminais, e têm até 1,5 cm de diâmetro. Os frutos são amarelos, globosos, com aproximadamente 1 cm de diâmetro, do tipo drupa e guardam até três sementes de 0,5 cm de diâmetro (SILVA JÚNIOR et al., 2005; MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006; COSTA, 2010). *B. pachyphylla* apresenta ocorrência em cerrado típico e em cerradão (DURIGAN et al., 2004).

As espécies do gênero *Byrsonima* são popularmente conhecidas como muricizeiro, murici, murici-do-campo, baga-de-tucano e canjica e diferentes partes das plantas desse gênero são utilizadas pela população com propósitos alimentares e medicinais (LORENZI; MATOS, 2002; MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006).

Segundo Lorenzi & Matos (2002) os frutos de espécies de *Byrsonima* possuem sabor agridoce, sendo consumidos na forma de geléias, doces e sucos. As folhas, raízes e cascas são empregadas pela população no tratamento de várias moléstias: contra diarreias, infecções intestinais, como protetor da mucosa intestinal, em feridas crônicas, afecções da boca e da garganta, para corrimento vaginal, como laxativo, adstringente e febrífugo.

Trabalhos científicos relatam a atividade antimicrobiana de extratos de espécies de *Byrsonima*. Testes antimicrobianos realizados mostraram que o extrato de *B. verbascifolia* inibiu o crescimento de *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001). O extrato de *B. crassifolia* demonstrou atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus* (MARTÍNEZ-VÁSQUEZ et al., 1999). Os extratos das espécies *Byrsonima fagifolia*, *B. basiloba* e *B. intermedia* exibiram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella* e *Candida albicans* (FIGUEIREDO et al., 2005; SANNOMIYA et al., 2005).

Existem diversas propriedades medicinais atribuídas a espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima*. Foram verificadas atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antiviral, antiespasmódica, anti-inflamatória e antiulcerogênica (FELÍCIO et al., 1995; LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001; HEINRICH, 2003; FIGUEIREDO et al., 2005; SANNOMIYA et al., 2005; HIGUCHI, 2007; BONACORSI et al., 2009; MOREIRA et al., 2011; BONACORSI et al., 2012). O extrato metanólico de *B. crassa* demonstrou efeito antiulcerogênico conferido pelos seus compostos

fenólicos, com atividade antioxidante, capazes de atenuar os danos na mucosa gástrica causados por espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos estimulados por *Helicobacter pylori* (BONACORSI et al., 2009; BONACORSI et al., 2012). Frações de *B. crassifolia* ricas em flavonoides exibiram atividade antiespasmódica (HEINRICH, 2003). Testes realizados em ratos mostraram atividade anti-inflamatória do extrato e das frações de *B. intermedia* (MOREIRA et al., 2011).

Estudos fitoquímicos das espécies *B. verbascifolia*, *B. microphylla*, *B. crassifolia* revelaram a presença de triterpenos, glicolipídios, saponinas, taninos, catequinas, flavonoides e ésteres aromáticos nas espécies citadas (GOTTLIEB; MENDES; MAGALHÃES, 1975; DOSSECH et al., 1980; AMARQUAYE et al., 1994; FELÍCIO et al., 1995; GEISS et al., 1995; RASTRELLI et al., 1997; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ et al. 1999; MENDES et al., 1999). Investigações fitoquímicas realizadas com os extratos metanólicos de *B. cinera* e *B. crassa* isolaram e identificaram compostos químicos como catequina, quercetina, amentoflavona e galato de metila (FIGUEIREDO et al., 2005; SANNOMIYA et al., 2005; SANNOMIYA et al., 2004).

Costa (2010) sugeriu a presença no extrato metanólico bruto das folhas de *B. pachyphylla* de derivados do ácido gálico, catequinas e flavonoides. Além disso, esse trabalho demonstrou a atividade bacteriostática do extrato metanólico bruto contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, da fração aquosa contra *P. aeruginosa*, da fração acetato de etila frente a *B. subtilis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e da fração butanólica contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade bactericida, sendo a primeira contra *B. subtilis* e *S. aureus* e a segunda contra *S. aureus*.

1.4. Investigação fitoquímica

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. A investigação de plantas medicinais pode combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos químico/farmacológicos. Após esse processo podem-se seguir algumas etapas para identificação de substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela atividade da planta selecionada (MACIEL et al., 2002). Algumas dessas etapas de investigação fitoquímica foram utilizadas neste estudo e serão descritas a seguir.

1.4.1. Preparo do extrato

As etapas de preparação do extrato vegetal são coleta, secagem, moagem, extração, concentração e secagem do líquido extrator.

Coleta

A primeira etapa da investigação fitoquímica é a coleta do material vegetal. Esta pode ser dividida em duas partes: coleta prévia para identificação botânica da espécie vegetal e coleta para estudos fitoquímicos. Na primeira parte realiza-se a identificação científica da espécie com a confecção de uma exsicata e seu depósito em um herbário, sendo catalogados itens como o número de registro da exsicata, timbre da instituição, amostra vegetal, nome científico e família botânica, nome de

quem identificou a espécie, local do herbário, local e data da coleta, nome popular da planta, a parte da planta utilizada na medicina popular e suas indicações terapêuticas e o tipo de solo onde a planta foi coletada, tipo de vegetação local e tipo da planta. Na segunda etapa determina-se, com base na literatura científica e no uso popular da espécie, a parte da planta que será alvo das investigações fitoquímicas e o material vegetal é coletado em quantidades suficientes para obtenção do extrato. Em ambas as etapas citadas é preciso que a seleção do material coletado seja feita com cuidado, evitando coletar partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para investigação (MACIEL et al., 2002; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Secagem

O material vegetal seco apresenta maior estabilidade. Dessa forma, a secagem tem por finalidade a retirada de água, impedindo reações de hidrólise e o crescimento microbiano. A operação caracteriza-se pela exposição do material vegetal a temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores a 60°C, por um longo período (cerca de 7 dias). Para secagem de folhas é recomendada temperatura em torno de 38°C, sendo que temperaturas acima desse limite aceleram o processo de secagem, promovendo a degradação de muitos princípios ativos. A secagem pode ser realizada ao sol, à sombra ou em estufa equipada com termostato e opcionalmente com sistema de circulação de ar. Esta última opção garante a manutenção de uma temperatura constante durante o tempo desejado (MACIEL et al., 2002; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Moagem

A fragmentação do material vegetal apresenta importância para o processo de extração, uma vez que quanto maior a divisão do material, mais expostos estarão os princípios ativos. Assim, a moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando o material para extração. Quanto mais rígidos forem os tecidos, maior será o grau de divisão necessário. Para moagem de folhas costuma-se empregar moinhos de facas (COSTA et al., 2005; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Percolação

A percolação é um tipo de extração exaustiva indicada para substâncias ativas que estão presentes em pequenas quantidades ou são pouco solúveis. Nessa operação a droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator. O produto obtido denomina-se percolado. Essa técnica de extração apresenta como vantagem o menor risco de reações químicas entre o solvente empregado e os constituintes químicos da planta, uma vez que tal operação é realizada a frio e assim, a temperatura utilizada não favorece reações químicas. Ressalta-se a extrema importância do solvente escolhido, assim como os fatores vinculados ao material vegetal (quantidade, natureza, teor de umidade, tamanho de partícula e capacidade de intumescimento) (MACIEL et al., 2002; SONAGLIO et al., 2010).

Concentração e Secagem

A concentração apresenta como objetivo a eliminação parcial do líquido extrator. Já a secagem pressupõe a eliminação da fase líquida até valores residuais,

o que depende das características do líquido extrator e do princípio da técnica utilizada. Ambas as operações citadas exigem uma demanda energética e apresentam dificuldades relacionadas com o ponto de ebulição, massa do líquido extrator a ser eliminada, conteúdo de sólidos dissolvidos ou suspensos e eventual formação de azeótropos. Dessa forma, são utilizados sistemas que operam sob pressão reduzida, como rotaevaporadores, que são capazes de diminuir a temperatura de ebulição do líquido a ser eliminado, facilitando a sua remoção (SONAGLIO et al., 2010).

1.4.2. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias

Partição líquido-líquido

O fracionamento por partição é um método de extração líquido/líquido realizado geralmente em um funil de separação. A partição implica em uma dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis. Esse fenômeno pode ser aplicado com vistas à separação de componentes de uma mistura. A concentração de cada um dos componentes em cada fase está relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição (K_p) apresentado por cada substância. Dessa forma, a eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da razão das fases e do número de extrações, sendo melhores os rendimentos quando o volume total de solvente a ser utilizado na partição é dividido em alíquotas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Cromatografia

Um sistema cromatográfico é constituído pela fase estacionária e pela fase móvel, ambas relacionadas com a natureza das substâncias a separar. As separações cromatográficas são efetuadas mediante a distribuição diferencial dos componentes da mistura entre a fase estacionária e a fase móvel. A separação inicia-se quando um dos componentes apresentando maior afinidade pela fase estacionária desloca-se menos que o outro que tem tendência a deslocar-se com a fase móvel (ZUANON NETTO; CAZETTA, 2005). Existem diversas modalidades de cromatografia, dentre as quais a cromatografia em camada delgada e a cromatografia em coluna.

Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Para essa técnica são necessários adsorvente (ex. sílica), suporte para o adsorvente (ex. placas de vidro), aplicadores (ex. capilares) cubas cromatográficas e revelador (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A CCD é uma técnica utilizada para fins de análise tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar um processo de separação (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna (CC) utiliza uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida. A coluna cromatográfica é constituída por um tubo geralmente de vidro, em posição vertical, que apresenta a extremidade

superior aberta e a inferior afilada, terminando em uma torneira que permite o controle da vazão da fase móvel. Esta arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. Assim, a velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, ou seja, quanto mais fracamente o componente for adsorvido, mais rápida será sua passagem pela coluna, e vice-versa. As fases estacionárias mais utilizadas são a sílica e a alumina (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A CC é uma das técnicas mais utilizadas para a separação ou isolamento de constituintes de extratos vegetais (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

1.5. Análise Biológica

No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico da espécie medicinal testada (MACIEL et al., 2002), como por exemplo, o ensaio de atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplacas que permite determinar a concentração mínima de uma substância necessária para inibir ou matar um micro-organismo. Essa técnica é amplamente empregada em ensaios de atividade antibacteriana utilizando extratos vegetais, sendo uma metodologia bastante reprodutível e sensível para pequenas quantidades de extratos, além de possibilitar o uso de mais de uma substância teste no ensaio (ELLOF, 1998; OSTROSKY et al., 2008; ALVES et al., 2008).

2. OBJETIVOS

Considerando as diversas utilizações na medicina popular de espécies do gênero *Byrsonima*, especialmente o uso em diarreias, feridas crônicas, afecções da

boca e da garganta, e estudos que demonstram a atividade antimicrobiana de *B. pachyphylla* e de outras espécies do gênero, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico de folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. e de suas frações. Para isso foram utilizadas técnicas cromatográficas e o método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta, preparo do material vegetal e extração

O extrato metanólico de folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. utilizado nesse estudo foi fornecido pelo Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. A metodologia de obtenção do extrato está descrita no estudo “Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb” (COSTA, 2010). Brevemente, as folhas foram coletadas de um exemplar do campus universitário da UNESP em Araraquara, secas, moídas e extraídas por percolação com metanol.

3.2. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias

3.2.1. Fracionamento do extrato metanólico de *Byrsonima pachyphylla* por partição líquido-líquido

O extrato metanol de *B. pachyphylla* foi fracionado através de partição líquido-líquido utilizando os solventes acetato de etila, água e n-butanol.

Inicialmente o extrato vegetal (10,006 g) foi solubilizado em 70 mL de metanol, acrescentando-se posteriormente 500 mL de água deionizada. A suspensão resultante foi transferida para um funil de separação e prosseguiu-se com a partição líquido-líquido de acordo com o fluxograma abaixo.

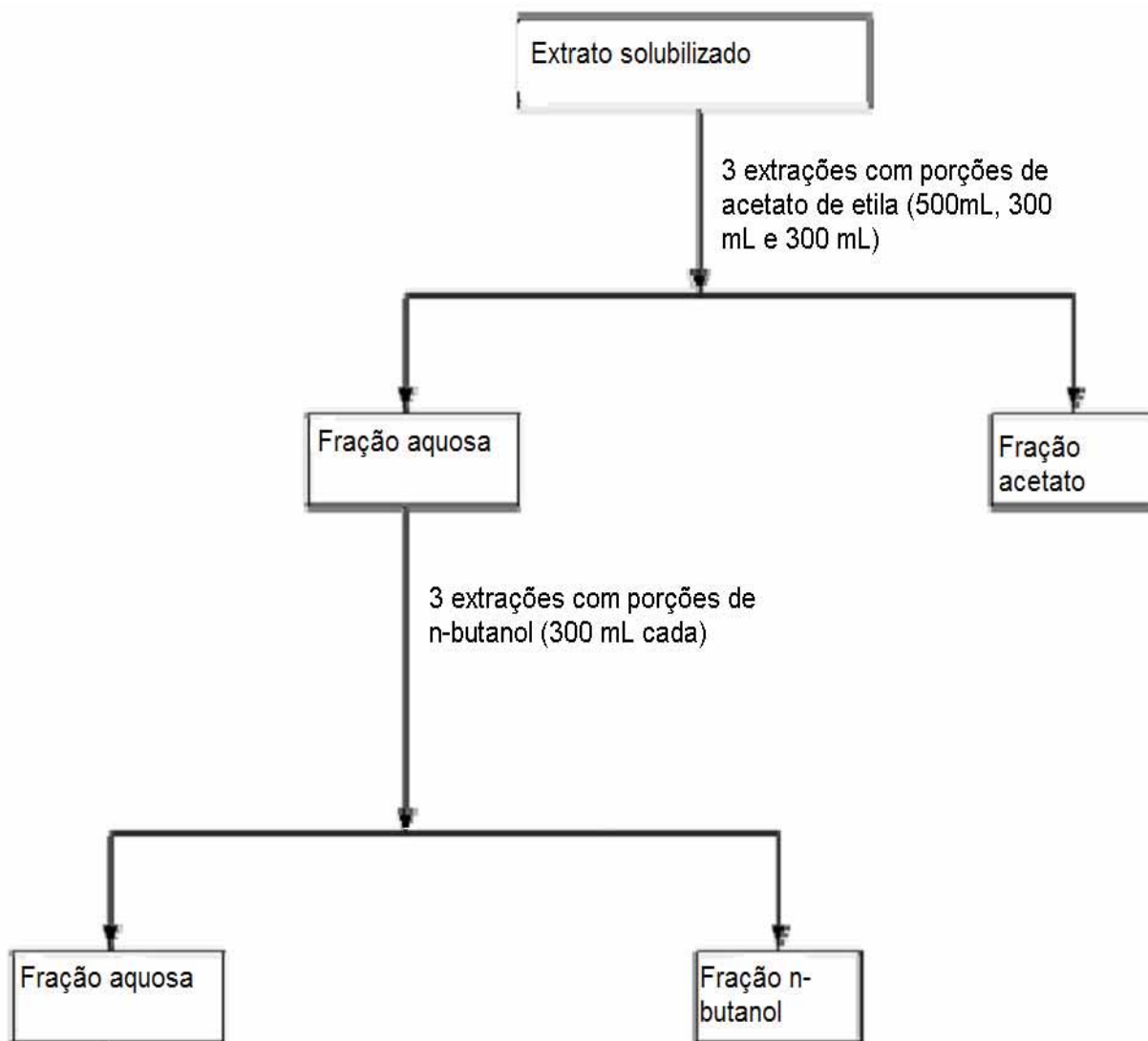


Figura 1: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico de *B. pachyphylla*.

A partição líquido- líquido do extrato metanólico resultou nas frações acetato de etila, n-butanol e aquosa. A fração acetato de etila foi concentrada com auxílio de rotaevaporador a aproximadamente 48° C. Posteriormente, todas as frações foram deixadas em capela à temperatura ambiente e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida para secagem. Após esse procedimento, as frações foram pesadas.

3.2.2. Análise do extrato metanólico e das frações acetato de etila / n-butanol por cromatografia em camada delgada (CCD) (COLLINS; BRAGA; BONATO,2006; COSTA, 2000; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Foi realizada uma análise através de cromatografia em camada delgada do extrato metanólico e de suas frações (acetato de etila e n-butanol).

3.2.2.1. Preparo das amostras

Em frasco ampola foram pesados 10 mg de amostra e esta foi solubilizada em 1 mL de solvente de acordo a tabela a seguir.

Tabela 1: Solubilização das amostras analisadas por CCD.

Amostras	Solubilização
Extrato metanólico	1 mL de metanol
Fração acetato de etila	0,9 mL de acetato de etila + 0,1 mL de metanol
Fração n-butanol	1 mL de metanol

3.2.2.2. Placas cromatográficas

Nas avaliações dos perfis cromatográficos do extrato metanólico e das frações foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel G preparadas manualmente em suporte de vidro.

3.2.2.3. Ativação das placas cromatográficas

As placas foram ativadas em estufa à 110°C por 1 hora.

3.2.2.4. Fase móvel

As fases móveis utilizadas foram hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 e 75:23:02 (v/v).

3.2.2.5. Preparo da cuba cromatográfica

A fase móvel foi depositada na cuba cromatográfica de maneira a cobrir o fundo da cuba e até uma altura inferior àquela da linha de aplicação das amostras na placa. A seguir, foi colocado papel de filtro nas paredes da cuba e esta foi tampada até a saturação (mínimo 30 min).

3.2.2.6. Desenvolvimento

Após a saturação da cuba cromatográfica, a placa foi colocada na cuba e retirada quando o solvente atingiu a parte superior da placa. Esta foi seca à temperatura ambiente e revelada em seguida.

3.2.2.7. Revelação das cromatoplasmas

A revelação permite tornar visíveis substâncias incolores presentes na amostra analisada. Para revelação das placas cromatográficas foram utilizados métodos físicos (luz ultravioleta) e métodos químicos (reveladores que necessitam de aquecimento após a revelação) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Nos testes realizados as placas foram visualizadas inicialmente sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm). A luz ultravioleta permite observar compostos que se tornam fluorescentes quando excitados pela radiação. A seguir, foi borrifado o revelador químico (anisaldeído sulfúrico) e a placa foi aquecida a 110° C por aproximadamente 10 minutos para que ocorresse a reação cromogênica.

3.2.2.8. Cálculo do R_f

O fator de retenção ou de retardamento (R_f) pode ser calculado pela razão entre a distância percorrida pela substância (d_r) e a distância percorrida pela fase móvel (d_m) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Após a revelação das placas cromatográficas com anisalaldeído sulfúrico foram medidas a distância percorrida pelo soluto (desde o ponto de aplicação da amostra até o centro da mancha) e a distância percorrida pela fase móvel (desde o ponto de partida até o ponto extremo atingido por ela). Posteriormente, foi calculado o fator de retenção através da fórmula: $R_f = d_r/d_m$.

3.2.3. Fracionamento da fração acetato de etila de *Byrsonima pachyphylla* por cromatografia em coluna (CC) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010)

3.2.3.1. Seleção da fração acetato de etila

Com base nos testes de atividade antibacteriana e nas análises em CCD, a fração acetato foi a que apresentou atividade e também, teve seus compostos separados pelas fases móveis utilizadas e dessa forma, foi escolhida para o fracionamento por cromatografia em coluna. Apesar da atividade antibacteriana apresentada pela fração n-butanol, seus componentes não foram bem separados pelas fases móveis empregadas na CCD.

3.2.3.2. Condições para análise em CC estabelecidas por CCD

A partir das informações obtidas pela análise do extrato metanólico e das frações por CCD, observou-se que os constituintes da fração acetato de etila poderiam ser separados pela mistura de hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 (v/v). Esta proporção foi alterada até que os valores dos fatores de retenção da maioria das substâncias ficassem abaixo de 0,5, o que foi conseguido com a fase móvel hexano: acetato de etila: isopropanol na proporção 80:19:01 (v/v). Estas fases móveis foram utilizadas em um sistema gradiente para fracionar a fração acetato de etila através de cromatografia em coluna.

3.2.3.3. Preparo da coluna cromatográfica

Na CC foi empregada uma coluna de vidro com 5 cm de diâmetro interno. Na parte inferior da coluna adicionou-se algodão e, em seguida, realizou-se o “empacotamento”, ou seja, a coluna foi preenchida de maneira uniforme com sílica previamente ativada (aproximadamente 138 g) até uma altura de 15 cm. Sobre a sílica foi colocada outra porção de algodão. A seguir, a coluna foi condicionada com a fase móvel hexano: acetato de etila: isopropanol 80:19:01. O “volume morto” foi medido experimentalmente, considerando o volume de fase móvel necessário para

preencher completamente o espaço ocupado na coluna pela sílica. Paralelamente foi calculado o “volume morto” teórico.

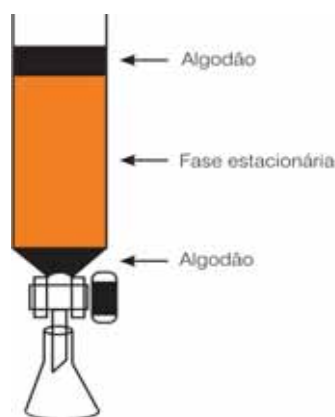


Figura 2 : Esquema de coluna cromatográfica.

Fonte: DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998.

3.2.3.4. Preparo da amostra

Para que uma amostra sólida, como a fração analisada, seja aplicada na coluna ela deve ser solubilizada em um volume mínimo de solvente, preferencialmente na fase móvel utilizada no sistema cromatográfico.

A fração acetato de etila (1,5g) foi solubilizada na fase móvel hexano:acetato de etila:isopropanol 80:19:1. No entanto, a solubilização não foi completa, sendo necessário a adição de sílica e posterior evaporação do excesso de solvente até a formação de uma pasta.

3.2.3.5. Desenvolvimento da CC

A pasta (fração acetato de etila + sílica+fase móvel) foi aplicada sobre o topo da coluna. Em seguida, foi realizada a eluição da amostra, sob vácuo, utilizando um sistema gradiente, no qual a fase móvel selecionada por CCD foi utilizada em

diversas proporções, seguindo inicialmente uma progressão geométrica de acordo com a tabela abaixo. O volume de cada eluente usado foi de 1000 mL.

Tabela 2: Eluentes utilizados no sistema gradiente empregado na CC.

Eluentes	Proporções (v/v)
hexano : acetato de etila : isopropanol	80:19:1
	79:19:2
	77:21:2
	75:23:2
	60:37:3
acetato de etila	
metanol	

Foram recolhidos 200 mL de eluato inicial e, em seguida, as frações foram recolhidas a cada 50 mL em frascos previamente identificados e pesados. Após essa etapa, foram utilizados os eluentes acetato de etila (500 mL) e, posteriormente, metanol (500 mL) que foram coletados em frascos separados devidamente identificados e pesados. As frações da CC foram secas em capela e pesadas.

3.2.3.6. Análise em CCD

As frações resultantes da CC foram analisadas em CCD, pelo mesmo procedimento descrito anteriormente, e reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico considerando os fatores de retenção das substâncias e as cores das manchas.

As fases móveis utilizadas na CCD foram hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02; acetato de etila: clorofórmio 60:40 e acetato de etila: clorofórmio 60:40 + 2% de ácido acético. Como reveladores foram usados luz ultravioleta (254 nm e 365 nm), anisaldeído sulfúrico e solução de ácido sulfúrico 10%. O ácido sulfúrico é capaz de revelar substâncias orgânicas pela carbonização das mesmas quando essas são submetidas ao aquecimento, revelando manchas escuras.

3.3. Ensaio de atividade antibacteriana: Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ELLOF, 1998; NOGUEIRA, 2009; RESENDE, 2011; CLSI, 2012)

3.3.1. Cepas bacterianas

Nos ensaios realizados foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

3.3.2. Meios de cultura e soluções

Nos testes executados foram empregados caldo Müeller Hinton (CMH), tampão fosfato (PBS - phosphate buffer saline), e os meios de cultura BAB (Blood Agar Base) e ágar de sangue (AS).

3.3.3. Preparo dos meios de cultura e tampão

O tampão fosfato e os meios de cultura foram preparados de acordo com a proporção recomendada pelo fabricante (tabela 3) e autoclavados a 121 °C durante 15 minutos, realizando-se posteriormente teste de esterilidade em estufa a 37°C/24horas.

Tabela 3 : Preparo dos meios de cultura e tampão utilizados nos testes de atividade antibacteriana.

Meio de cultura/tampão	Preparo
CMH	21 g de meio para cada 1000 mL de água destilada
Tampão fosfato	Para 50 mL de solução de PBS: 50 mL de água Mili-Q, 0,410 g de cloreto de sódio, 0,018 g de fosfato de sódio monobásico, 0,133 g de fosfato de sódio dibásico e hidróxido de sódio 0,1 N para acertar o pH da solução obtida para 7,0.
BAB	40 g de meio BAB (ágar sangue base) para 1000 mL de água destilada
AS	Meio BAB + 5% de sangue de carneiro

3.3.4. Suspensão bacteriana (inóculo)

As suspensões bacterianas de *S. aureus* e de *E. coli* foram preparadas a partir de crescimento bacteriano em CMH (24horas/37°C). Cada bactéria foi adicionada em tampão fosfato até que a suspensão atingisse a escala 0,5 Mac

Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A seguir, a suspensão foi levada ao espectrofotômetro (comprimento de onda 620 nm), no qual foi lida a absorbância que deveria encontrar-se no intervalo de referência 0,10 – 0,15. Após a leitura, a suspensão bacteriana foi diluída 1:10 em PBS, obtendo-se a concentração 10^7 UFC/mL que foi empregada nos ensaios.

A suspensão bacteriana de *H. pylori* foi preparada a partir de cultura em ágar sangue (37°C, 10 % de CO₂, 72 horas). *H. pylori* foi adicionada em uma mistura de CMH e soro bovino fetal (1:1) até atingir a escala 2 Mac Farland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Posteriormente foi realizada uma diluição 1:10 em mistura de soro bovino fetal e CMH (1:1), obtendo-se a concentração 10^7 UFC/mL que foi utilizada nos testes.

3.3.5. Preparo das amostras

Nos ensaios de atividade antibacteriana foram testados o extrato metanólico e frações que apresentaram massas suficientes para os ensaios e com perfis em CCD diferentes.

Alíquotas dessas amostras foram pesadas e solubilizadas em diluente adequado, soluções de água deionizada e metanol ou água deionizada, metanol e tween 80. As amostras foram inicialmente solubilizadas em metanol, com auxílio de ultrassom, e a seguir foi adicionada água até que o volume do balão volumétrico fosse completado. Nas situações em que a solubilização das frações não foi possível apenas com água e metanol foi utilizado o tween 80 (2 ou 3%).

A disposição das frações nas microplacas, as suas concentrações na solução estoque e no primeiro poço da coluna teste da microplaca, os seus respectivos diluentes e as bactérias testadas estão indicados na tabela 4.

Tabela 4: Amostras e diluentes utilizados nos testes de atividade antibacteriana.

Microplaca	Extrato (E) / Fração (F)	[] SE*** (µg/mL)	[] MP**** (µg/mL)	Colunas da microplaca	Diluyente	Bactérias testadas
A*	E. MeOH**	1000	370	4-6	1	<i>H. pylori</i>
	F. aquosa	1000	370	7-9		
B*	F. n-butanol	2000	740	4-6	2	<i>H. pylori</i>
	F. acetato	2000	740	7-9		
C*	F. n-butanol	2000	1000	4-6	2	<i>E. coli</i>
	F. acetato	2000	1000	7-9		
D*	F. n-butanol	2000	1000	4-6	2	<i>S. aureus</i>
	F. acetato	2000	1000	7-9		
E	F. 9-10	2000	1000	4-6	3	<i>S. aureus</i>
	F. 29-52/61-90	2000	1000	7-9		
F	F. 93-97	2000	1000	4-6	3	<i>S. aureus</i>
	F. 98	2000	1000	7-9	1	
G	F. 11-12	1000	500	4-6	4	<i>S. aureus</i>
	F. 14-18	1000	500	7-9		

*Testes realizados em duplicatas (dias diferentes).

** E. MeOH = extrato metanólico

*** [] SE = concentração do extrato/fração na solução estoque.

**** [] MP = concentração do extrato/fração no primeiro poço de cada coluna teste da microplaca.

Diluyente 1: solução metanol 15%;

Diluyente 2: solução metanol 18%;

Diluyente 3: solução metanol 18% + Tween 2%

Diluyente 4: solução metanol 18% + Tween 3%

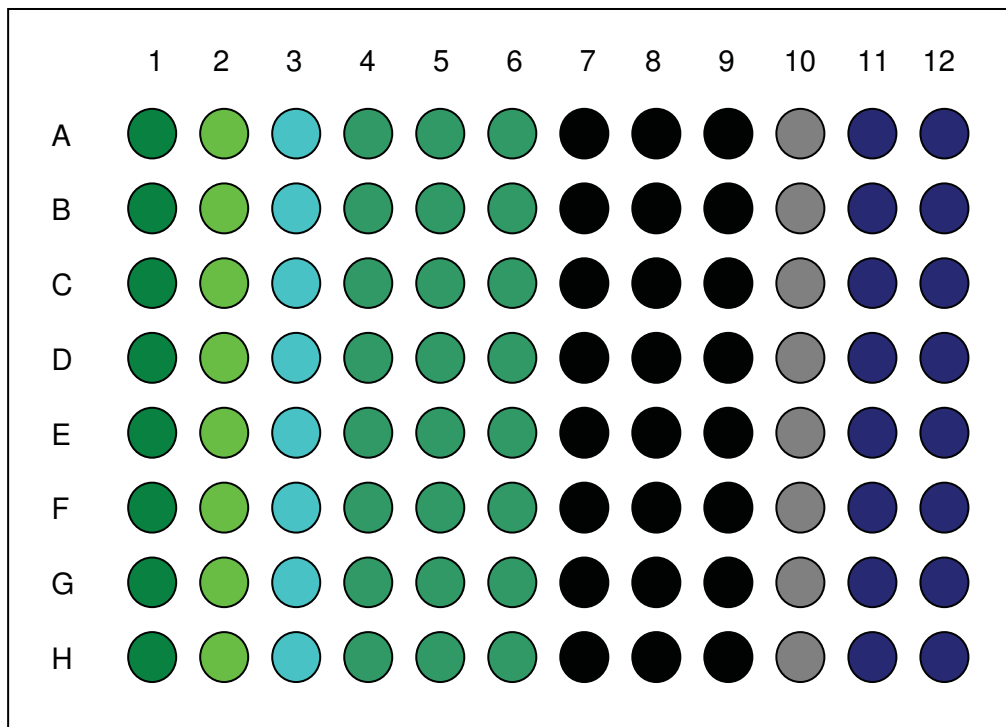
3.3.6. Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para os ensaios de atividade antibacteriana foram utilizadas microplacas de fundo plano com 96 orifícios.

Inicialmente foi adicionado meio de cultura em todos os orifícios da microplaca. A seguir, foi pipetado no primeiro poço de cada coluna seu respectivo componente (figura 3): o controle positivo (coluna 3), os extratos ou frações a serem testados (colunas 4-9; 11-12) e o controle negativo (coluna 10). Após esse procedimento realizou-se diluição seriada das linhas A até H (colunas controles positivos e negativos e amostras), transferindo-se 100 µL do primeiro poço para o poço seguinte e assim, sucessivamente até o último orifício da coluna, descartando os 100 µL restantes.

Nos ensaios realizados com *S. aureus* e *E. coli* o fator de diluição utilizado foi 0,5; já nos testes realizados com *H. pylori* o fator de diluição empregado foi 0,37. Dessa forma, foram obtidas as concentrações finais de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,905 µg/mL para amostras vegetais testadas contra *S. aureus* e *E. coli* e que apresentavam concentração inicial de 1000 µg/mL (solução estoque) ou concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL para amostras vegetais testadas contra as duas bactérias anteriores e com concentração inicial de 2000 µg/mL (solução estoque). Nos ensaios realizados com *H. pylori*, as amostras com concentração inicial de 1000 µg/mL (solução estoque) apresentaram concentrações finais de 370; 136,9; 50,653; 18,742; 6,934; 2,565; 0,949; 0,351 µg/mL nos orifícios da coluna teste da microplaca; já amostras com concentração inicial de 2000 µg/mL (solução estoque) revelaram concentrações finais de 740; 273,8; 101,306; 37,483; 13,868; 5,131; 1,898; 0,702 µg/mL nos orifícios da microplaca.

Os volumes adicionados de cada componente citado acima estão indicados na tabela 5.










-  Coluna 1: meio de cultura
-  Coluna 2 : meio de cultura + bactéria
-  Coluna 3 : controle positivo – meio de cultura + bactéria + antibiótico
-  Coluna 4-6 : meio de cultura + bactéria + extrato/fração 1
-  Coluna 7-9 : meio de cultura + bactéria + extrato/fração 2
-  Coluna 10 : controle negativo - meio de cultura + diluente + bactéria
-  Coluna 11 e 12 : controle extrato/fração - meio de cultura + extrato/fração

Figura 3 : Esquema de organização das microplacas.

Tabela 5 : Protocolo do ensaio de atividade antibacteriana realizado em microplaca.

Microplaca	Componente adicionado	Bactérias		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. pylori</i>
Todos os poços	Meio	80µL CMH	80 µL CMH	90 µL soro bovino fetal + CMH (1:1)
Coluna 3 (linhas A-H)	Controle positivo	100 µL ampicilina (1250 µg/mL)	100 µL ampicilina (1250 µg/mL)	100 µL amoxicilina (1000 µg/mL)
Colunas 4-6; 11 (linhas A-H)	Extrato ou Fração 1	100 µL	100 µL	100 µL
Colunas 7-9; 12 (linhas A-H)	Extrato ou Fração 2	100 µL	100 µL	100 µL
Coluna 10* (linhas A-H)	Controle negativo	100 µL	100 µL	100 µL

* Na placa F foram testados dois diluentes e assim, a coluna 10 foi dividida em: linhas A-D foi adicionado o diluente 3; linhas E-H foi adicionado o diluente 1.

Na sequência foram acrescentados 20 µL (*S. aureus* / *E. coli*) ou 80µL (*H. pylori*) da suspensão bacteriana em cada orifício, exceto nos orifícios da coluna 1 (branco) e nos orifícios de controle da amostra (colunas 11 e 12). Portanto, a

concentração de bactérias em cada poço da microplaca corresponde à aproximadamente 10^6 UFC/mL.

Nos testes realizados com *S. aureus* / *E. coli* as microplacas foram incubadas à 37° C por 24 horas; já nos ensaios feitos com *H. pylori* a incubação foi a 37°C/48-72 horas em condições de microaerofilia com 10% de CO₂.

Posteriormente, foi realizada a leitura espectrofotométrica da microplaca (620 nm para *S. aureus* / *E. coli*; 595 nm para *H. pylori*) e a revelação química através da adição de 50 µL de resazurina (0,1 mg/mL) em cada orifício da microplaca, incubando em estufa à 37°C até a mudança de coloração do meio de azul para rosa. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de amostra sem a mudança de coloração para rosa.

A partir das absorvâncias apresentadas pelas substâncias testadas (na presença e ausência do inóculo) e pelo controle do crescimento bacteriano, calculou-se a viabilidade de *S. aureus* (bactéria sensível a algumas frações do extrato metanólico) de acordo com a equação abaixo. A seguir, construiu-se um gráfico relacionando viabilidade bacteriana e concentrações das frações testadas.

$$\text{Crescimento bacteriano (\%)} = \frac{\text{Abs T} - \text{Abs ST}}{\text{Abs Cb}} \times 100$$

Abs T = absorvância do teste (média de três determinações por concentração de substância testada – na presença do inóculo). Nos testes realizados para as frações n-butanol e acetato de etila contra *S. aureus*, calculou-se a média entre as absorvâncias obtidas nas microplacas D1 e D2;

Abs ST = absorvância da substância testada (sem inóculo);

Abs Cb = absorvância do controle de crescimento bacteriano.

3.4. Triagem fitoquímica (COSTA, 2000)

Na triagem fitoquímica foram realizados testes qualitativos para identificação de taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas. Os ensaios foram feitos para o extrato metanólico, frações n-butanol, acetato de etila e 98.

As amostras testadas foram solubilizadas em metanol (5 mg/mL) para os ensaios de identificação de taninos e flavonoides.

3.4.1. Identificação de taninos

A identificação de taninos foi realizada a partir da reação com sais de ferro. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL da amostra solubilizada, 10 mL de água deionizada e 1 gota de solução de cloreto férrico a 1%. O ensaio é positivo quando há o aparecimento de coloração azul para taninos hidrolisáveis ou verde para taninos condensados.

O ensaio de precipitação com gelatina foi realizado em um tubo de ensaio adicionando-se a 2 mL da solução do extrato metanólico 2 gotas de ácido clorídrico diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. O resultado positivo consiste na formação de precipitado.

3.4.2. Identificação de alcaloides

A caracterização de alcaloides foi feita através de teste preliminar com o reagente de Dragendorff. Foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico diluído em cerca de 200 mg de amostra, com posterior aquecimento até a fervura. A mistura foi filtrada a quente e em tubo de ensaio foram adicionados aproximadamente 3 mL do filtrado obtido, acrescentando-se 3 gotas do reagente de Dragendorff. O teste é positivo quando há a formação de precipitado ou turvação da solução.

3.4.3. Identificação de flavonoides

A identificação de flavonoides foi realizada através da reação com cloreto férrico. Cerca de 3 mL da amostra solubilizada em metanol foram adicionados em tubo de ensaio e em seguida, acrescentou-se 1 gota de solução aquosa de cloreto férrico a 4,5%. O teste é positivo quando há o aparecimento da coloração verde, amarela, castanha ou violeta.

3.4.4. Identificação de saponinas

Para identificação de saponinas foi preparada uma solução extrativa 1% (m/v), aquecendo-se a amostra juntamente com água durante 30 minutos (decoção). Posteriormente, a mistura foi filtrada e o filtrado foi transferido para um tubo de ensaio, e foi agitado vigorosamente. Após esse procedimento, o tubo permaneceu em repouso durante 15 minutos. O teste é positivo quando há a formação de anel de espuma (1 a 2 cm de altura) e essa espuma permanece após transcorrer o tempo de repouso.

3.5. Identificação de taninos pela técnica de cromatografia em camada delgada (COSTA, 2000)

A triagem fitoquímica apontou a presença de taninos no extrato metanólico e nas frações. Dessa forma, foi proposta uma análise do perfil fitoquímico do extrato e das frações em cromatografia em camada delgada antes e após a hidrólise ácida, utilizando uma fase móvel adequada para análise de ácido gálico (produto da hidrólise de taninos).

As amostras analisadas em CCD foram solubilizadas em metanol (5mg/mL).

3.5.1. Fase móvel e reveladores

Para a análise em CCD foi empregada a fase móvel benzeno: metanol: ácido acético 79:14:07.

Os reveladores utilizados foram luz ultravioleta (254 nm e 365 nm) e solução metanólica de cloreto férrico a 2%.

3.5.2. Análise de taninos antes da hidrólise ácida

Foram analisados o extrato metanólico e as frações n-butanol, acetato de etila e 98 sem hidrólise em CCD.

3.5.3. Análise de taninos após hidrólise ácida

Apenas o extrato metanólico foi analisado em CCD após a hidrólise.

O extrato metanólico (250mg) foi solubilizado em 25 mL de solução de ácido sulfúrico a 5% (v/v) e a seguir, foi aquecido em banho-maria a 80° C durante 2 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado a quente. O filtrado foi submetido a uma partição líquido-líquido. Nesta foram feitas 3 extrações com porções de 20 mL cada de clorofórmio. A fase orgânica foi seca em capela à temperatura ambiente.

Após a secagem, o resíduo da fase orgânica foi solubilizado em metanol, resultando em uma solução de concentração igual a 5 mg/mL.

Em uma placa cromatográfica foram aplicados o extrato sem hidrólise prévia, o extrato hidrolisado e o ácido gálico (padrão), e em seguida desenvolveu-se a CCD utilizando a fase móvel do item 3.3.5.

3.6. Obtenção dos espectros no UV das frações n-butanol e 98

As frações n-butanol e 98 foram submetidas a análises espectrofotométricas no UV. As amostras foram pesadas e solubilizadas em metanol grau HPLC, obtendo-se soluções com concentrações de 0,1 mg/mL. Essas soluções foram diluídas 1:100 em metanol grau HPLC e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (200-400 nm).

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento do extrato e purificação de substâncias

4.1.1. Fracionamento do extrato metanólico de *Byrsonima pachyphylla* por partição líquido-líquido

As massas resultantes de cada fração da partição líquido-líquido do extrato metanólico de *B. pachyphylla* encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 6: Frações resultantes da partição líquido-líquido do extrato metanólico de *B. pachyphylla* e suas respectivas massas.

Frações	Massa resultante
aquosa	2,472g
acetato de etila	3,309g
n-butanol	3,754g
Total	9,535g

O rendimento do fracionamento do extrato por partição líquido-líquido foi de 95,29%.

Cálculo do rendimento :

$$\begin{array}{r}
 10,006\text{g (massa inicial de extrato metanol)} \text{ -----} 100\% \\
 9,535\text{g(massa resultante da soma das frações)} \text{ -----} x \\
 \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad x = 95,29\%
 \end{array}$$

4.1.2. Análise do extrato metanólico e das frações acetato de etila / n-butanol por cromatografia em camada delgada (CCD)

- Revelação com anisaldeído sulfúrico:

As cromatoplasmas das análises do extrato e das frações (acetato de etila e n-butanol) encontram-se a seguir.

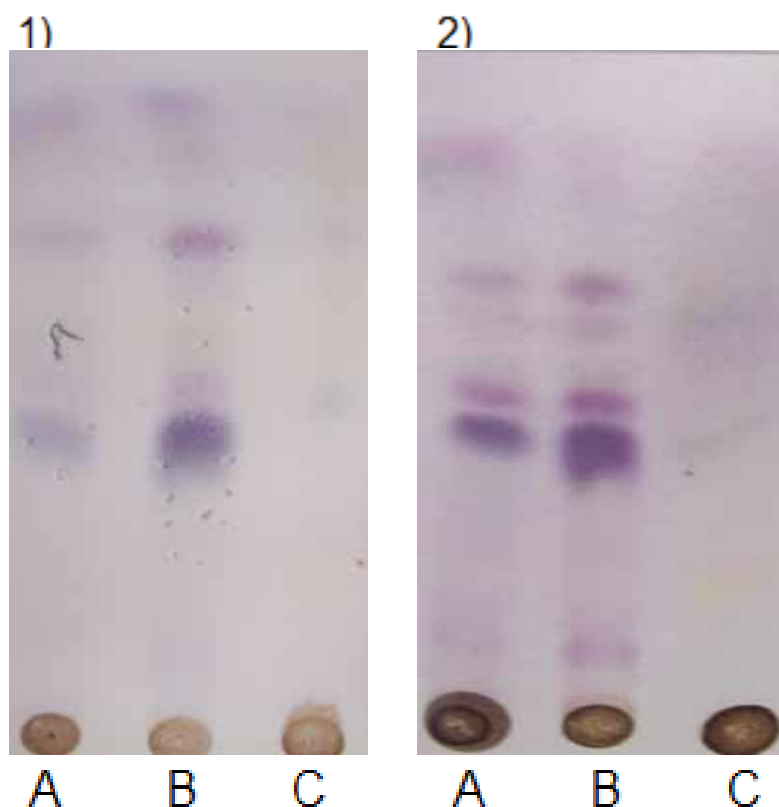


Figura 4 : Análises por CCD do extrato metanólico de *B. pachyphylla* e de suas frações. **Cromatoplaca 1** – Fase móvel hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:2; **Cromatoplaca 2** - Fase móvel hexano: acetato de etila: isopropanol 75:23:2. A – extrato metanólico; B – fração acetato de etila; C – fração n-butanol.

- Revelação sob luz ultravioleta (comprimentos de onda 254 nm e 365 nm):

As cromatoplacas 1 e 2 apresentaram manchas fluorescentes em 365 nm.

- Cálculo do R_f :

Como já mencionado, o R_f pode ser calculado pela fórmula $R_f = dr/dm$, onde dr corresponde à distância percorrida pela substância e dm é a distância percorrida pela frente da fase móvel. Os valores das distâncias percorridas pela substância e

pela fase móvel em cada cromatoplaça e os seus respectivos valores de R_f encontram-se na tabela 7.

Tabela 7: Fatores de retenção (R_f) das substâncias constituintes do extrato metanólico de *B. pachyphylla* e de suas frações.

Cromatograma 1	A	B
dr1	4,5	4,5
dr2	5,5	5,5
dr3	6,0	6,0
dr4	7,5	7,5
dr5	9,5	9,5
dm	10,0	10,0
R_f1	0,45	0,45
R_f2	0,55	0,55
R_f3	0,60	0,6
R_f4	0,75	0,75
R_f5	0,95	0,95
Cromatograma 2	A	B
dr1	1,0	1,0
dr2	4,0	4,0
dr3	4,8	4,8
dr4	6,5	6,5
dr5	8,5	8,5
dm	10	10
R_f1	0,1	0,1
R_f2	0,4	0,4
R_f3	0,48	0,5
R_f4	0,65	0,6
R_f5	0,85	0,65

4.1.3. Fracionamento da fração acetato de etila de *Byrsonima pachyphylla* por cromatografia em coluna (CC)

O valor teórico encontrado para o volume contido na coluna cromatográfica utilizada, ou seja, “volume morto” foi de 191 mL, enquanto que o volume gasto experimentalmente foi de 190 mL, demonstrando que o valor teórico foi o mesmo que o obtido experimentalmente.

Cálculo teórico do “volume morto” da coluna cromatográfica:

$$\text{Volume morto da coluna} = \text{Volume do cilindro} \times \text{fator de correção (0,65)} = \pi \times r^2 \times L \times 0,65 = 3,14 \times 2,5^2 \times 15 \times 0,65 = 191,34 \text{ mL}$$

r = raio do cilindro

L = comprimento do cilindro

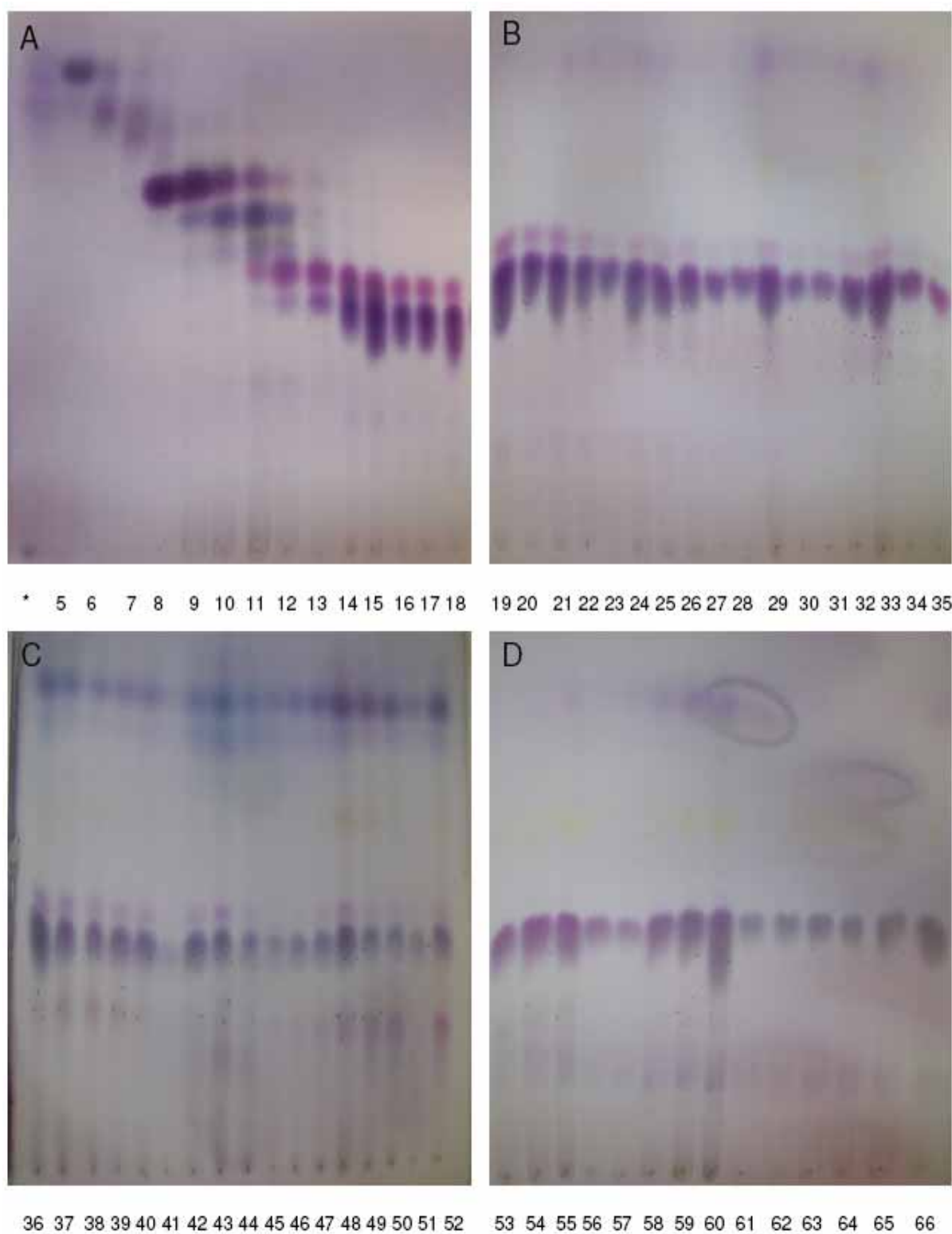
O fracionamento da fração acetato de etila resultou em 98 frações que foram agrupadas em 15 de acordo com a semelhança em cromatografia em camada delgada. As massas dessas frações estão na tabela 8.

Tabela 8: Massa das frações resultantes do fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna.

Fração	Massa (g)
1-4	-----
5	0,0069
6-7	0,0166
8	0,0169
9-10	0,0368
11-12	0,0261
13	0,014
14-18	0,1759
19-28B	0,0167
29-52/61-90	0,1942
53-58	0,0105
59-60	0,0162
91-92	0,0169
93-97	0,0599
98	0,9768

----- = massa desprezível

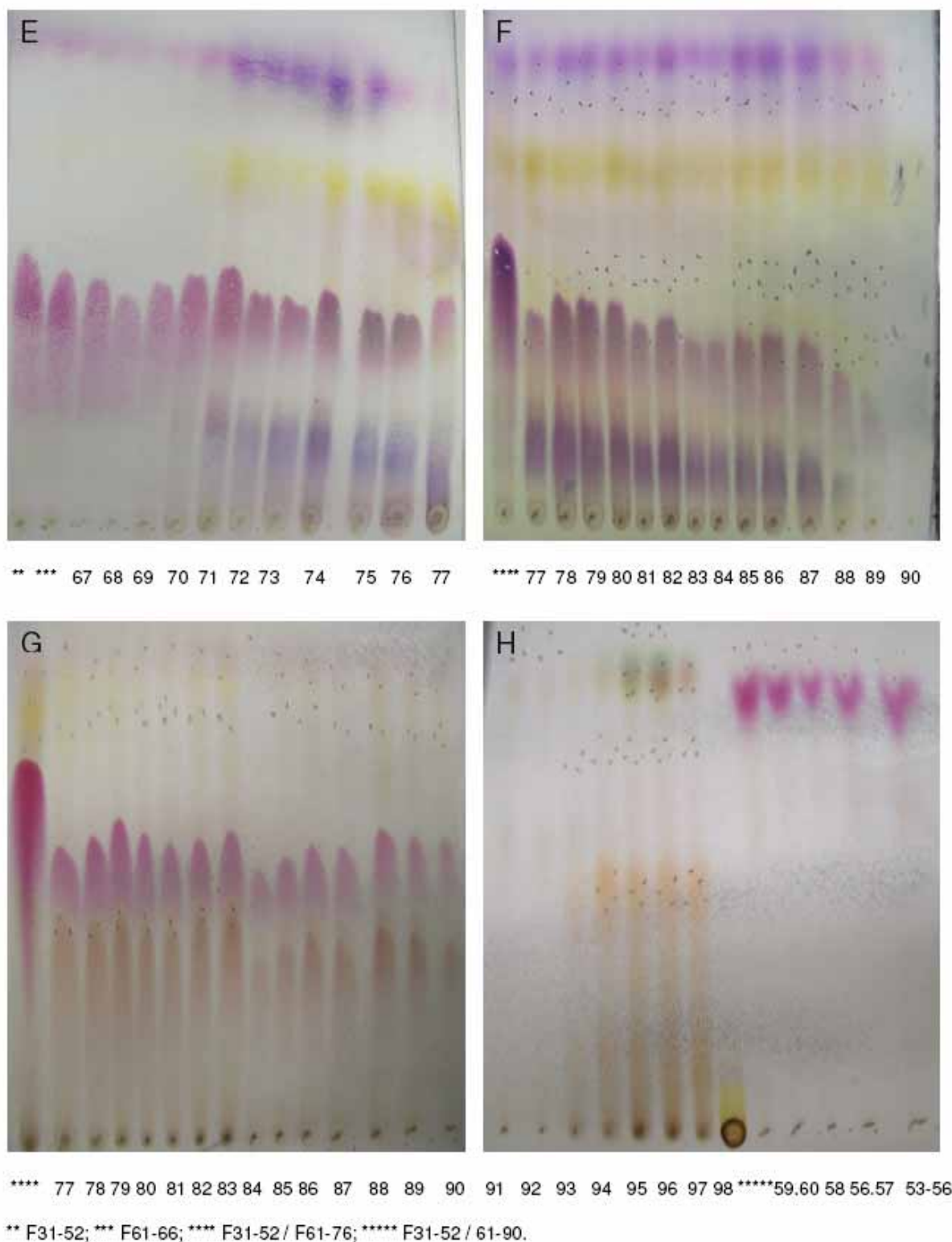
A seguir, encontram-se as fotos das placas de CCD das frações da CC.



*1,2,3,4.

Cromatoplasmas: **A, B, C** e **D**: fase móvel hexano : acetato de etila : isopropanol(70:28:2); reveladores - anisaldeído sulfúrico e UV (254 nm e 365 nm). Os pontilhados indicam manchas em 365nm.

Figura 5: Placas cromatográficas das frações da CC.



Cromatoplaças: **E, F**: fase móvel hexano-acetato de etila-isopropanol (70:28:2); reveladores - UV (254 nm e 365 nm) e anisaldeído sulfúrico. **G**: fase móvel acetato de etila : clorofórmio (60:40); reveladores - UV (254 nm e 365 nm) e solução de ácido sulfúrico a 10%. **H**: acetato:clorofórmio (60:40) + 2% de ácido acético; reveladores - UV (254 nm e 365 nm) e solução de ácido sulfúrico a 10%. Os pontilhados indicam manchas em 365nm.

Figura 6 : Placas cromatográficas das frações da CC.

4.2. Ensaio de atividade antibacteriana: Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados dos testes de atividade antibacteriana realizados com o extrato metanólico de *B. pachyphylla* e suas frações encontram-se na tabela 9 e na figura 7. O gráfico relacionando crescimento de *S. aureus* e a concentração de algumas frações do extrato metanólico que apresentaram atividade contra essa bactéria encontra-se na figura 8.

Tabela 9: Atividade antibacteriana do extrato e das frações de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss..

Amostras	<i>S. aureus</i> (CIM; µg/mL)	<i>E. coli</i>	<i>H. pylori</i>
Extrato metanólico	_____ ¹	_____	> 500
fração acetato	125	>1000	>1000
fração aquosa	_____	_____	> 500
fração butanol	125	> 1000	> 1000
frações 9-10	500	_____	_____
frações 11-12	1000	_____	_____
frações 14-18	> 500	_____	_____
frações 29-52/61-90	> 1000	_____	_____
frações 93-97	500	_____	_____
fração 98	125	_____	_____

¹ ____: não testado

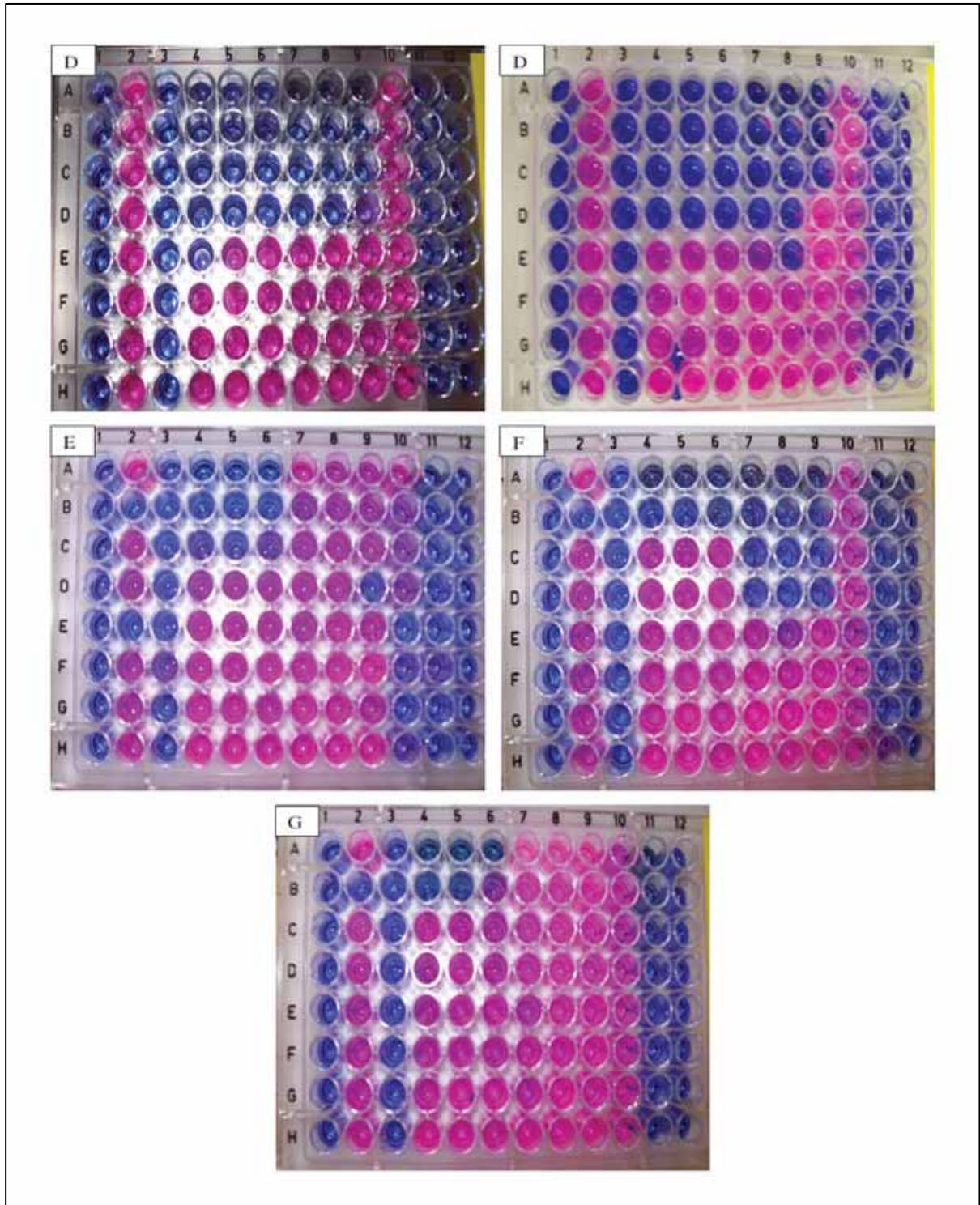


Figura 7 : Testes de atividade antibacteriana em *S. aureus* utilizando a técnica de diluição em microplaca com determinação da CIM. **Microplaca :** coluna 1- meio de cultura; coluna 2 – meio de cultura + bactéria; coluna 3 – meio de cultura + bactéria

+ antibiótico; colunas 4-6 – meio de cultura + bactéria + substância 1; colunas 7-9 – meio de cultura + bactéria + substância 2; coluna 10 - meio de cultura + bactéria + diluente; colunas 11 e 12: meio de cultura + substância 1 ou 2. **D (esquerda) = D1** ; **D (direita) = D2**: fração n-butanol (colunas 4-6) / fração acetato de etila (colunas 7-9); **E**: fração 9-10 (colunas 4-6) / fração 29-52 / 61-90 (colunas 7-9); **F**: fração 93-97 (colunas 4-6) / fração 98 (colunas 7-9). **G**: fração 11-12 (colunas 4-6) / fração 14-18 (colunas 7-9).

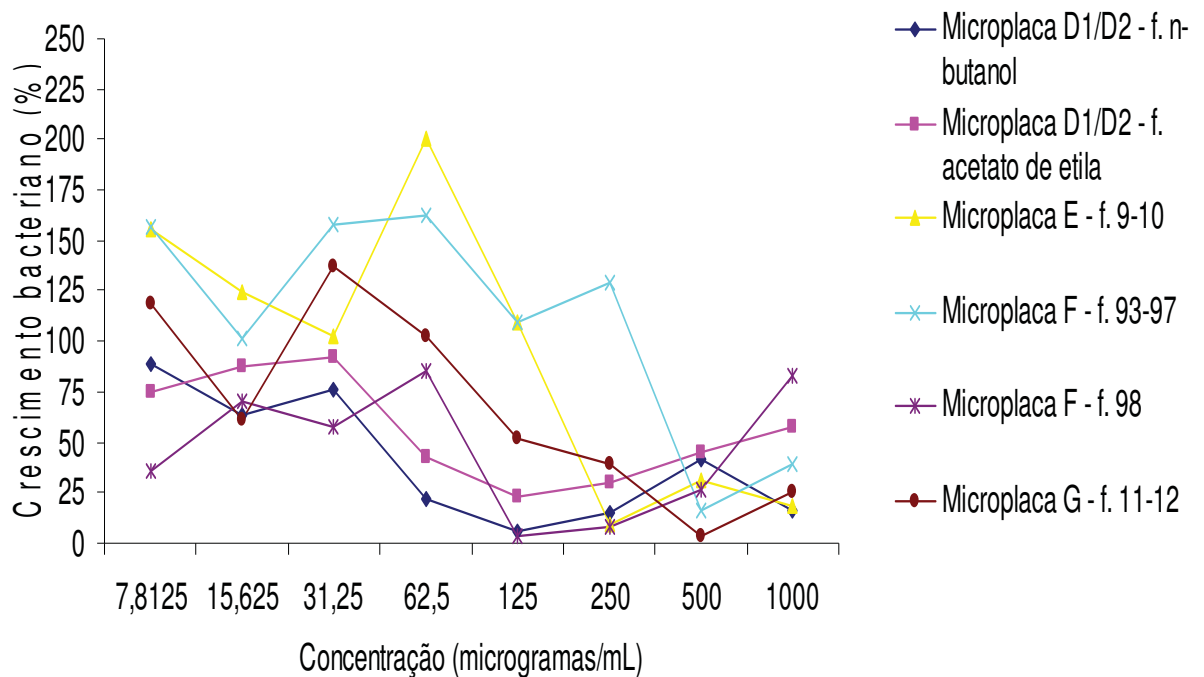


Figura 8: Viabilidade de *S. aureus* tratado com algumas frações do extrato metanólico de *B. pachyphylla* em diferentes concentrações.

4.3. Triagem fitoquímica

Os resultados referentes à triagem fitoquímica realizada para o extrato metanólico de *B. pachyphylla* e para as frações n-butanol, acetato de etila e 98 encontram-se na tabela 10.

Tabela 10: Triagem fitoquímica realizada para o extrato metanólico de *B. pachyphylla* e para suas frações.

Classes de metabólitos secundários	Resultado
saponinas	positivo
alcaloides	negativo
taninos hidrolisáveis	positivo
flavonoides	positivo

4.4. Identificação de taninos pela técnica de cromatografia em camada delgada

4.4.1. Análise taninos antes da hidrólise ácida

A placa cromatográfica referente às análises do extrato metanólico e das frações acetato de etila, n-butanol e 98 encontra-se na figura 9.



Placa cromatográfica: E= extrato metanólico; f.B= fração n-butanol; f.A.= fração acetato de etila; f.98= fração 98

Figura 9: Análise do extrato metanólico e de suas frações em CCD utilizando fase móvel para identificação de taninos.

O extrato e as frações testados apresentaram manchas azuis na origem, sugerindo a presença de taninos hidrolisáveis, uma que esses exibem essa coloração na presença de cloreto férrico.

A revelação sob luz ultravioleta revelou manchas fluorescentes em 365 nm no extrato metanólico e na fração acetato de etila.

4.4.2. Análise de taninos após hidrólise ácida

A placa cromatográfica do extrato metanólico hidrolisado encontra-se na figura 10.



Figura 10: Análise do extrato metanólico hidrolisado em CCD utilizando fase móvel para identificação de taninos.

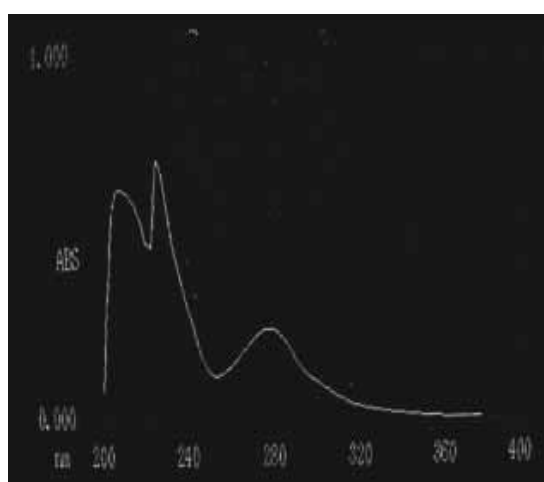
Observa-se na cromatoplaça da figura 12 que apenas após a hidrólise o extrato metanólico apresentou mancha com R_f semelhante ao ácido gálico, confirmando a hipótese da presença de taninos hidrolisáveis no extrato metanólico.

4.5. Obtenção dos espectros no UV das frações n-butanol e 98

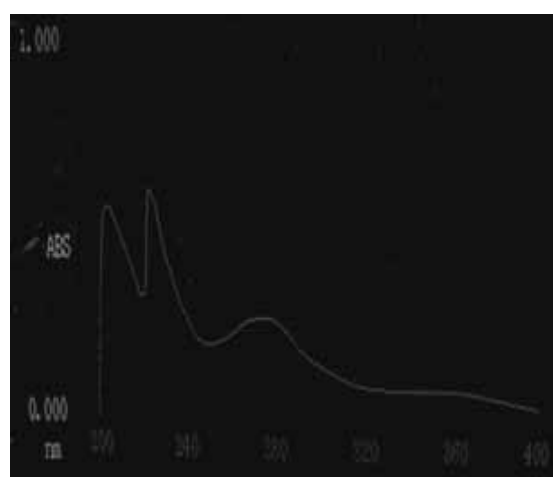
As bandas e respectivas absorbâncias apresentadas pelas frações analisadas estão na tabela 11 e figura 11.

Tabela 11: Bandas de absorbância das frações n-butanol e 98.

Fração n-butanol	
Diluição: 1:100	
Comprimento de onda equipamento: 200-400 nm	
Bandas	Absorbância
209,5 nm	0,662
227,5 nm	0,725
279 nm	0,264
Fração 98	
Diluição : 1:100	
Comprimento de onda equipamento: 200-400 nm	
Bandas	Absorbância
208 nm	0,539
227,5 nm	0,581
277 nm	0,258
349,5 nm	0,072



Fração n-butanol



Fração 98

Figura 11: Espectros no UV das frações n-butanol e 98.

5. DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato metanólico de *B. pachyphylla* através de partição líquido-líquido apresentou rendimento considerável (95,29%). As perdas ocorridas durante as transferências de vidrarias desde o fracionamento até o acondicionamento final das frações resultaram na redução das massas de cada fração, o que explica a diferença entre a massa inicial do extrato (10,006 g) e massa resultante da soma das frações (9,535g). A partição líquido-líquido realizada utilizou solventes imiscíveis entre si (água e acetato de etila; água e n-butanol) e de polaridades diferentes, permitindo a distribuição seletiva dos diversos compostos químicos presentes no extrato de acordo com a polaridade dos mesmos, ou seja, as substâncias mais polares concentraram-se na fração aquosa, as menos polares na fração acetato de etila e as de polaridade intermediária na fração n-butanol.

No estudo realizado foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada para obtenção do perfil cromatográfico do extrato e de suas frações acetato de etila e n-butanol. A CCD permite a separação dos constituintes de uma amostra através do fenômeno de adsorção que consiste na maior ou menor concentração de substâncias da amostra sobre a superfície da fase estacionária (adsorvente), no caso a sílica. Esta apresenta grupos hidroxílicos denominados silanóis que são capazes realizar interações intermoleculares com os analitos (amostra) e com as moléculas do solvente (fase móvel). Assim, há uma competição entre as moléculas da amostra e as moléculas da fase móvel pela superfície do adsorvente (ZUANON NETTO; CAZETTA, 2005; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Observando-se a análise do extrato e das frações por CCD, nota-se que os perfis (fatores de retenção e coloração das manchas) do extrato e da fração acetato de etila foram muito semelhantes. As fases móveis hexano: acetato de etila:

isopropanol 70:28:02 e 75:23:02 foram capazes de separar os constituintes menos polares do extrato e da fração acetato. Porém, a fração n-butanol permaneceu retida no ponto de aplicação, já que a fase móvel utilizada não conseguiu eluir seus componentes químicos, uma vez que essa fração deve ser composta predominantemente por substâncias de média a alta polaridade, necessitando de uma fase móvel com polaridade maior e também, com maior força de eluição que permitisse a competição com a sílica. Comparando-se os fatores de retenção das cromatoplasmas 1 e 2 verifica-se que os valores de R_f diminuíram em 2, pois a fase móvel empregada nesse último apresenta um aumento na proporção de hexano, o que confere um caráter mais apolar à fase móvel, diminuindo sua força de eluição e assim, reduzindo o R_f das substâncias. As placas de CCD apresentaram manchas reveladas por luz ultravioleta (365 nm), anisaldeído sulfúrico, sugerindo, respectivamente, a presença de compostos com grupos cromóforos (UV), terpenos e/ou esteroides pela seletividade do anisaldeído por essas classes de metabólitos.

Na cromatografia em coluna (CC) as substâncias eluem segundo a polaridade. Assim, compostos com maior polaridade serão mais retidos por adsorventes como a sílica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A fração acetato de etila foi fracionada através de uma coluna cromatográfica, utilizando a fase móvel hexano: acetato de etila: isopropanol em um sistema gradiente, no qual a força de eluição e a polaridade da fase móvel foram aumentadas gradativamente. As substâncias com polaridade menor eluíram primeiramente, enquanto os compostos mais polares ficaram retidos pela sílica, sendo eluídos apenas com fases móveis de caráter mais polar, como o acetato de etila e metanol.

Analisando-se as placas de CCD das frações da CC, observa-se que a coluna foi eficiente na separação de compostos até aproximadamente a fração 35, uma vez que essas frações apresentaram perfis cromatográficos distintos (fator de retenção e cores das manchas). As frações 14 a 18 apresentaram menor número de manchas quando comparadas com outras frações. A partir da fração 36 ocorreu uma redução da resolução cromatográfica, o que levou a não separação adequada das substâncias presentes na fração. A CCD também demonstrou o caráter altamente polar da fração 98 que permaneceu retida no ponto de aplicação mesmo com a utilização de uma fase móvel com maior polaridade (acetato de etila: clorofórmio + 2% de ácido acético).

As placas cromatográficas das frações da CC sugerem a presença de compostos com grupos cromóforos, terpenos e/ou esteroides e compostos orgânicos revelados, respectivamente, por luz ultravioleta (365 nm), anisaldeído sulfúrico e solução de ácido sulfúrico a 10%.

Comparando-se as massas das frações da CC, nota-se que a fração 98 apresentou maior massa, concentrando a maior parte dos constituintes da fração acetato de etila.

Os ensaios de atividade antibacteriana utilizaram as espécies *H. pylori* (bactéria gram negativa espiralada), *E. coli* (bacilo gram negativo) e *S. aureus* (cocos gram positivos). As três espécies de bactérias citadas estão relacionadas com patologias importantes, como úlceras gástricas, infecções urinárias e infecções graves (síndrome do choque tóxico), respectivamente (MIMS et al., 2005).

Nos testes realizados foram utilizados dois métodos de revelação para as microplacas, a resazurina e a leitura espectrofotométrica.

A resazurina (fenoxazin-3-ona) é um corante indicador de óxido-redução utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Esse corante é capaz de atuar como receptor de elétrons. Dessa forma, quando há crescimento bacteriano, a resazurina sofre redução e muda sua coloração de azul para rosa. A concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como a menor concentração da substância testada sem a alteração da coloração azul para rosa (GABRIELSON et al., 2002; PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005; MORAES, 2006; DIGNANI, 2009).

Além da CIM, os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplaca permitiram avaliar aspectos como contaminação do meio de cultura utilizado, viabilidade das bactérias, inocuidade do diluente e contaminação das substâncias testadas. Tais aspectos podem ser observados nas microplacas dos testes realizados, como descrito abaixo:

- A coluna 1 apresenta-se azul, indicando ausência de crescimento de micro-organismos, e, portanto, a não contaminação dos meios de cultura empregados;
- A coluna 2 indica crescimento bacteriano pela coloração rosa, demonstrando que as bactérias testadas são capazes de se desenvolverem;
- A coluna 3 foi o controle positivo e apresenta coloração azul, mostrando que as bactérias utilizadas nos ensaios são sensíveis a agentes antimicrobianos recomendados;
- A coluna 10 foi o controle negativo, apresentando-se rosa. Tal coloração demonstra crescimento bacteriano, indicando que os diluentes utilizados não apresentam atividade bacteriostática ou bactericida e dessa forma, não interferiram nos resultados de CIM obtidos;

- As colunas 11 e 12 foram os controles das substâncias testadas, apresentando coloração azul. Isso mostra que o extrato ou fração testado não estava contaminado por outros micro-organismos.

A literatura aponta espécies de *Byrsonima* que demonstraram atividade contra *S. aureus*. Extratos metanólicos de *B. crassa*, *B. intermedia* e *B. basiloba* apresentaram CIM de 125, 125 e 250 µg/mL, respectivamente (PIMENTA, 2006). COSTA (2010) mostrou que o extrato metanólico de *B. pachyphylla* e suas frações acetato de etila e n-butanol foram capazes de inibir *S. aureus* a partir de 125 µg/mL.

Avaliando os resultados obtidos nos testes de atividade antibacteriana realizados neste estudo observa-se que algumas frações do extrato metanólico de *B. pachyphylla* apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*. A concentração inibitória mínima de maior significado foi a de 125 µg/mL, CIM das frações acetato de etila, n-butanol e 98. COSTA (2010) demonstrou que o extrato metanólico apresenta concentração bacteriostática mínima igual a 125 µg/mL quando testado contra *S. aureus*. Tal fato sugere que a espécie *B. pachyphylla* apresenta metabólitos secundários com ação contra *S. aureus* e que as substâncias com atividade antibacteriana presentes no extrato distribuíram-se entre as frações n-butanol e acetato durante a partição líquido-líquido. Com o fracionamento da fração acetato, as substâncias ativas presentes na mesma concentraram-se na fração 98. Além disso, a CIM obtida para as frações de *B. pachyphylla* encontra-se coerente quando comparada com os valores de concentração inibitória mínima citados nos trabalhos acima.

Em relação aos ensaios realizados com *S. aureus*, sugere-se a realização de um teste para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) para verificar em quais concentrações as frações que apresentaram atividade

antibacteriana são bacteriostáticas ou bactericidas (NOGUEIRA, 2009; COSTA, 2010). Os testes executados com *H. pylori* devem ser repetidos, já que as concentrações das substâncias testadas (no poço da microplaca) estavam muito baixas. Além disso, outras espécies de micro-organismos podem ser selecionadas para os ensaios de atividade antibacteriana, escolhendo-as com base na utilização do gênero *Byrsonima* pela medicina popular.

Analisando o gráfico (figura 8) que demonstra a viabilidade de *S. aureus* diante de diferentes concentrações de algumas frações do extrato metanólico de *B. pachyphylla*, observa-se que o crescimento bacteriano diminui à medida que as concentrações das frações aumentam. Flutuações no percentual de crescimento bacteriano encontradas nos resultados justificam-se por erros ocorridos durante a execução da técnica. Dessa forma, para que se possa chegar a resultados mais precisos, deve-se repetir os testes e realizar novas leituras em espectrofotômetro.

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico de algumas espécies do gênero *Byrsonima* revelaram principalmente a presença de taninos, derivados de ácido gálico, flavonoides e catequinas (FIGUEIREDO et al., 2005; MICHELIN et al., 2008).

A triagem fitoquímica realizada apontou a presença de saponinas, flavonoides, taninos no extrato metanólico e nas frações acetato, n-butanol e 98. A presença desses metabólitos já foi mostrada por Martínez-Vásquez (1999) em espécies do gênero *Byrsonima*.

Dentre as classes de substâncias encontradas na triagem fitoquímica destacam-se os taninos hidrolisáveis pelo caráter polar e atividade antibacteriana.

Os taninos podem ser classificados de acordo com a estrutura química em taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e condensados. Extratos de plantas

podem ser investigados quanto à presença de taninos hidrolisáveis através de hidrólise ácida que apresenta como um de seus produtos o ácido gálico (Simões et al., 2010).

A análise do extrato metanólico e das frações através de CCD, utilizando a fase móvel benzeno: metanol: ácido acético, mostrou a presença de manchas azuis no ponto de aplicação das mostras, sugerindo a existência de taninos, já que os mesmos são capazes de formar complexos azuis com cloreto férrico. Após a hidrólise do extrato nota-se que as substâncias, antes concentradas no ponto de aplicação, passaram a deslocar-se pela placa, apresentando mesmo R_f e coloração que o ácido gálico. Tal fato seria um indicativo da presença de taninos hidrolisáveis no extrato metanólico.

Os espectros de absorção das frações n-butanol e 98 apresentaram picos de absorção em torno de 278 nm, sugerindo a possível presença de taninos, já que o ácido gálico apresenta pico de absorção em 273 nm (MOREIRA et al., 2002).

Dessa forma, existe a probabilidade de que os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana do extrato e das frações sejam taninos hidrolisáveis, uma vez que essa classe de metabólitos secundários apresenta atividade antimicrobiana (SANTOS, MELLO, 2010) e também, esses compostos são polares, assim como o perfil em CCD das substâncias constituintes das frações n-butanol e 98.

É importante ressaltar que o metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação ultravioleta, composição atmosférica, temperatura, patógenos presentes no ambiente, nutrientes e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, os resultados de atividade antibacteriana e avaliação do perfil fitoquímico poderiam apresentar variações com extrato produzido a partir de

condições diferentes como mudanças de solvente, época da coleta, secagem, entre outros fatores.

6. CONCLUSÃO

Os ensaios de atividade antibacteriana com determinação da CIM demonstraram que algumas frações do extrato metanólico de *B. pachyphylla* apresentaram atividade contra *S. aureus*, sugerindo a presença de metabólitos secundários com ação antibacteriana nesta espécie. As análises em cromatografia revelaram que as principais frações ativas são constituídas por substâncias polares e além disso, foi possível identificar taninos hidrolisáveis no extrato e nessas frações. Assim, existe a possibilidade de parte da atividade antimicrobiana da espécie em estudo ser atribuída a essa classe de substâncias, uma vez que existem registros na literatura em relação a atividade antibacteriana de taninos .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 465p.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Med.**, v. 60, n. 1, p. 85-86, 1994.

ARAÚJO, A.R.B. **Morfologia de frutos, sementes e plântulas, tipo e aspectos da germinação de algumas espécies Malpighiaceae**. 1994. 100f. Tese (Mestrado em ciências biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S.G.; CARLOS, I.Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Anti-*Helicobacter pylori* and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complement. Altern. Med.**, v.9, n.2, 2009.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S.G.; FONSECA, L.M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on Helicobacter pylori-Induced Neutrophils Oxidative Burst. **Int. J. of Mol. Sci.**, v.13, p.133-141, 2012.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Florianópolis, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M07-A9, v. 32, No 2, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. v.3, 992p.

COSTA, G.C. **Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb**. 2010. 26f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “ Júlio de Mesquita Filho “, Araraquara, 2010.

COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Hortic. bras.**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 670 p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **QNEsc**, n.7, p. 21-25.

DIGNANI, D. F. ***Peperomia blanda* (Piperaceae): Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

DOSSECH, C.; Moretti, C.; Delaveau, P.; Tessier, A.M. Etude chimique de feuilles de *Byrsonima verbacifolia* Rich . **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v.14, 130-142, 1980.

DURIGAN, G. et al. **Plantas do Cerrado Paulista**: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras, 2004. 475p.

ELLOF, J.N.A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. **Planta Med.**, v.64, n.8, p.711-713, 1998.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. p. 229-246.

FELÍCIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; LINS, A. L.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arq. Inst. Biol.**, v.62, n.1,2, p.91-92, 1995.

FIGUEIREDO, M.E.; MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA, L.F.R.; BRITO, A.R.M.S.; SALGADO, H.R.N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC (Malpighiaceae). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.41, n.1, p.79-83, 2005.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELOV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.50, n.1, p.63-73, 2002.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H.; Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* Bark. **Phytochemistry**. v. 39, n.3, p. 635–643, 1995.

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.

GOTTLIEB, O.R.; MENDES, P.H. ; MAGALHÃES, M.T. Triterpenoids from *Byrsonima vebascifolia*. **Phytochemistry**, v.14, p.1456, 1975.

GUERRA, M.P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. p. 13-28.

HEINRICH, M. Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures? **Curr. Top. Med. Chem.**, v.3, p.29-42, 2003.

HIGUCHI, C. T. ***Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados***. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB030443>>. Acesso em: 02 abr. 2011.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1977. 777p.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.77, p.189–196, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p.324.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MARONI, B.; DI STASI, L.C; MACHADO, S.R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu**. São Paulo: Editora Unesp São Paulo, 2006.

MARTÍNEZ-VASQUÉZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R.; CAZARES LUNA, L.; MORENO GUTIÉRREZ, M.N.; GARCÍA-ARGÁÉZ, A.N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **J. Ethnopharmacol.**, v.66, p.79-82, 1999.

MENDES, C.C.; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M.; NASCIMENTO, I.P.; DAVID, J.P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Quím. Nova**, v.22, n.2, p. 185-188, 1999.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima species* (Malpighiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, p.690-695, 2008.

MIMS, C. A.; DOCKRELL, H.M.; GOERING, R.V.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 709 p.

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.

MORAES, H. P. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima ssp* e *Alchornea ssp*: Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2006.

MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.L.; REIS, A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G. LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae – Mimosoideae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.12, p. 124-125, 2002

MOREIRA, L. Q.; VILELA, F. C. ; ORLANDI, L.; DIAS, D. F.; SANTOS, A. L. A.; SILVA, M. A. ; PAIVA, R.; SILVA, G. A.; GIUST - PAIVA, A. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.13, p. 610– 615, 2011.

NOGUEIRA, L.G. **Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2009.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA S.O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.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.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím. Nova**, v. 24, n.1, p.68-76, 2001.

RASTRELLI, L.; TOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A; SARAVIA, A; SIMONE, F.; Glicolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n.4, p. 647-650, 1997.

RESENDE, F. A. **Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonoides**. 2011. 158 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicines**: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. p.1-12.

SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D.C.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SALGADO, H.R.N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.S.M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.26, n. 1, p. 71-75, 2005.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; COELHO, R.G.; SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, S.A.R.M.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **J. Chromatogr. A**, v. 1035, p. 47-51, 2004.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, p.486-491, 2011.

SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. p. 615-656.

SILVA JÚNIOR, M.C. et al. **100 Árvores do Cerrado**: guia de campo. Brasília: Rede Sementes do Cerrado, 2005. 278p.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. ; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. p. 289-326.

SOUTO, L. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasil. Bot.**, v.28, n.4, p.697-712, 2005.

The Plant List: A working list of all plant species. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 02 abr. 2011.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.

ZUANON NETTO, J.; CAZETTA, O. **Cromatografia plana**. Jaboticabal : Funep, 2005. 130p.