

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

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *BYRSONIMA PACHYPHYLLA* GRISEB.**

Débora Pizzaia Vaccari Trevisan

ARARAQUARA - SP

2013

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

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *BYRSONIMA PACHYPHYLLA* GRISEB.**

Débora Pizzaia Vaccari Trevisan

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

ARARAQUARA - SP

2013

Dedico este trabalho à minha família e meus amigos, que são minha força e meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades que foram concedidas e por todas as pessoas maravilhosas que tem colocado em meu caminho.

Aos meus pais José Eduardo e Elizabeth que sempre batalharam muito para que eu pudesse chegar até aqui, e ao meu irmão Douglas, a alegria de nossas vidas.

Ao meu marido José Sidney por todo o carinho e pelos momentos de apoio incondicional.

Aos meus avós Rubens e Edivanete, por sempre vibrarem com minhas realizações e pelos cuidados que sempre me dedicaram.

Ao professor Luis Vitor pela orientação, paciência e acolhida tão gentil à família do Laboratório de Botânica.

À professora Taís pela co-orientação e pela disponibilidade em ajudar e a sanar todas minhas dúvidas.

Ao professor André pela ajuda em cromatografia e triagem fitoquímica.

À técnica e amiga Angélica por toda a ajuda, paciência e bons momentos de descontração.

À técnica Sílvia pelo auxílio na esterilização dos materiais.

Aos colegas (e família) do Laboratório de Botânica: Victor Hugo, Mariana, Juhan, Andréia, Ademir, Marília, Camila e Larissa, por terem ajudado, cada um à sua maneira, com conselhos, ensinamentos, apoio e por colocarem “a mão na massa” comigo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Mariana, Michele, Kamila, Bruna e Leonardo por toda a ajuda.

Às amigas que há muito tempo me acompanham Juliana, Daniele e Mônica, as quais, mesmo com longos períodos de distância, puderam me apoiar e alegrar em diversos momentos.

Às amigas da faculdade Gláucia, Kelly, Franciele e Melissa pelo companheirismo, pelos momentos de desabafo compartilhados e pelas muitas risadas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à UNESP por todas as oportunidades.

SUMÁRIO

2	INTRODUÇÃO.....	8
2.1	<i>Byrsonima pachyphylla</i> Griseb.....	9
2.2	Processos extrativos.....	10
2.2.1	Maceração.....	10
2.3	Atividade antimicrobiana.....	11
2.4	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	12
3	OBJETIVO GERAL.....	13
3.1	Objetivos específicos.....	13
4	METODOLOGIA.....	13
4.1	Material botânico.....	13
4.2	Obtenção da droga vegetal.....	14
4.3	Obtenção da droga pulverizada.....	14
4.4	Obtenção dos extratos hidroetanólicos.....	14
4.5	Determinação do rendimento.....	15
4.6	Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplacas e concentração bacteriostática mínima.....	15
4.6.1	Cepas bacterianas.....	16
4.6.2	Estocagem e manutenção das cepas bacterianas.....	16
4.6.3	Padronização da suspensão bacteriana.....	16
4.6.4	Preparo das soluções dos extrativos vegetais.....	17
4.6.5	Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo.....	17
4.6.6	Preparo das soluções para o controle negativo.....	17
4.6.7	Método de diluição em microplacas.....	17
4.7	Leitura visual e método para determinação da concentração bactericida mínima.....	20
4.8	Revelação e leitura.....	20
4.9	Determinação da atividade antifúngica e concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplacas e concentração fungicida mínima.....	21
4.9.1	Cepa fúngica.....	21
4.9.2	Padronização da suspensão fúngica.....	21
4.9.3	Determinação da concentração inibitória mínima.....	22
4.10	Revelação e leitura.....	24
4.10.1	Determinação da concentração fungicida mínima.....	24
4.11	Triagem Fitoquímica Preliminar.....	24
4.11.1	Saponinas.....	25
4.11.2	Taninos.....	26
4.11.3	Flavonoides.....	26
4.11.4	Alcaloides.....	26
4.12	Cromatografia em camada delgada.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1	Determinação do rendimento.....	27
5.2	Triagem Fitoquímica Preliminar.....	28
5.3	Cromatografia em camada delgada.....	29
5.4	Atividade antimicrobiana.....	32
6	CONCLUSÕES.....	39
7	REFERÊNCIAS.....	40

1. RESUMO

O uso de plantas medicinais especialmente na América do Sul contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003). AYRES et al. (2008) afirma que a busca de substâncias com atividades antimicrobianas tem direcionado a atenção sobre os produtos naturais e, entre estes, os derivados das plantas superiores têm, nos últimos anos, despertado a investigação para o potencial da flora brasileira. *Byrsonima pachyphylla* Griseb é uma árvore típica do cerrado. Na medicina popular, a casca é utilizada como antifebril, contra tosses e doenças pulmonares, os ramos com folhas são diuréticos e os frutos são laxantes brandos (SILVA JÚNIOR et al., 2005). Levantamento no NAPRALERT indicou que espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, contra a febre e infecção de pele (MENDES et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo determinar qual o melhor método de extração, sendo eles a maceração, a maceração dinâmica, a digestão e a digestão + maceração dinâmica, visando à obtenção de extratos brutos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb., considerando sua atividade biológica frente a bactéria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus*; as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e a levedura *Cândida albicans*, testada pelo método de diluição seriada de extratos em microplacas; além de comparar perfis cromatográficos dos extratos obtidos em cromatografia de camada delgada (CCD), bem como pesquisar as principais classes de metabólitos secundários nos extratos.

Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada e na triagem fitoquímica preliminar possibilitaram sugerir a presença de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas na espécie *B. pachyphylla* Griseb, assim como demonstraram a ausência de alcaloides. Além disso, observou-se uma homogeneidade qualitativa na composição de classes de metabólitos secundários extraídos através de cada uma das diferentes metodologias de extração. Os métodos extrativos para obtenção dos extratos vegetais de folhas de *B. pachyphylla* que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram maceração e maceração dinâmica, considerando a resposta frente à *P. aeruginosa*, indicando a possibilidade de ação biológica semelhante para diferentes condições extrativas, as quais podem diminuir a duração do processo.

Palavras-chave: *Byrsonima pachyphylla* Griseb, atividade antimicrobiana, Cromatografia em Camada Delgada, metabólitos secundários.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Detalhe das folhas e frutos verdes de <i>Byrsonima pachyphylla</i> Griseb.....	10
2	Esquema da técnica de diluição em microplacas, utilizando os extratos obtidos por maceração, maceração dinâmica e digestão.....	19
3	Esquema da técnica de diluição em microplacas para a levedura <i>C. albicans</i> , utilizando os extratos obtidos por maceração, maceração dinâmica e digestão.....	23
4	Determinação da presença de metabólitos secundários em <i>B. pachyphylla</i> Griseb por cromatografia em camada delgada. Distribuição nas placas: extrato M; extrato DMD; extrato MD; extrato D. A: Revelador cloreto férrico (para taninos) e fase móvel ácido acético/ácido fórmico/água (90:5:5). B: Revelador NP-PEG (para flavonóides) e fase móvel ácido acético/ácido fórmico/água (90:5:5). C: Revelador Dragendorf (para alcalóides) e fase móvel clorofórmio/acetato de etila (60:40). D: Revelador anisaldeído sulfúrico (para terpenos) e fase móvel hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2).....	30
5	Teste realizado com a bactéria <i>P. aeruginosa</i>	35
6	Teste realizado com a levedura <i>C. albicans</i>	35
7	Determinação da CBM (replicata 3) para a bactéria <i>P. aeruginosa</i>	36
8	Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M) maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria <i>E. coli</i>	36
9	Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria <i>P. aeruginosa</i>	37
10	Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria <i>S. aureus</i>	37
11	Porcentagem de inibição do crescimento fúngico de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (D MD) e dos controles positivos (Fluconazol e Anfotericina B) para a levedura <i>C. albicans</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Detalhes das quatro metodologias de extração utilizadas.....	15
2	Valores de massa, em gramas, dos extratos utilizados para cada um dos testes da triagem fitoquímica.....	25
3	Rendimento atribuído aos processos de obtenção dos extratos brutos secos obtidos de folhas pulverizadas de <i>B. pachyphylla</i> Griseb. em função das quatro metodologias de extração utilizadas.....	28
4	Resultados da triagem fitoquímica preliminar.....	29
5	Condições utilizadas e resultados obtidos para as classes de metabólitos analisadas por CCD.....	30
6	Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos no experimento em função da espécie microbiana e dos métodos extrativos.....	33

2. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais especialmente na América do Sul contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL, 2002). É fato preocupante hoje, o uso indiscriminado de plantas medicinais sem qualquer conhecimento farmacognóstico, farmacotécnico, fitoquímico, farmacológico e toxicológico. A identificação correta das espécies vegetais, sua forma de uso e controle de qualidade, constituem questões a serem resolvidas, alicerçadas em conhecimentos científicos (BALLVÉ et al., 1995).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A relação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008). AYRES et al. (2008), citando ALMEIDA et al. (1998), ALVES et al. (2000), RATES (2001), SUFFREDINI et al. (2004), MICHELIN et al. (2005) e LIMA et al. (2006), afirma que a busca de substâncias com atividades antimicrobianas tem direcionado a atenção sobre os produtos naturais e, entre estes, os derivados das plantas superiores têm, nos últimos anos, despertado a investigação para o potencial da flora brasileira.

2.1. *Byrsonima pachyphylla* Griseb

A família Malpighiaceae compreende cerca de 63 gêneros e 1.100 espécies, sendo composta de árvores, arbustos e lianas, de ampla ocorrência nas regiões tropicais (VOGEL, 1990; BARROSO, 1991). O gênero *Byrsonima*, cujas espécies são conhecidas popularmente como murici, está distribuído nos campos cerrados e savanas neotropicais (CAVALCANTE, 1991; MIRANDA e ABSY, 1997). Cavalcante (1991) registra que muitas espécies são encontradas na Amazônia, sugerindo ser o centro de origem e dispersão deste gênero.

No nordeste brasileiro, ocorrem várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização dos seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais. Levantamento no NAPRALERT indicou que espécies deste gênero são comumente empregadas como antiasmáticas, contra a febre e infecção de pele. Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos (*B. verbascifolia*), no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente no gênero (MENDES et. al., 1999).

Os trabalhos de Higuchi et al. (2008a) e Higuchi et al. (2008b) utilizando *Byrsonima crassa* e *Byrsonima fagifolia* Niedenzu, respectivamente, colaboram com esta proposição, pois ambos verificaram atividades de frações contendo triterpenos isolados contra micobactérias, visando atividade anti-tuberculose.

O chá das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss. é empregado contra diarreias, infecções intestinais e como protetor da mucosa intestinal (LORENZI, 2002).

Byrsonima pachyphylla Griseb é uma árvore, com casca áspera, escura e ramos pilosos (Figura 1). Ocorre em cerrado típico e em cerradão. Suas folhas são simples (15 cm de comprimento; 10 cm de largura), opostas cruzadas, obovadas a oblongo-obovadas, discolors, base obtusa a subcordada, semiamplexicaule, assimétrica, ápice obtuso ou curto-acuminado, face superior glabra e brilhante, face inferior revestida por densa pilosidade ferrugínea. Flores

amarelas, tornando-se alaranjadas quando velhas, dispostas em racemos eretos e terminais. Frutos do tipo drupa globosa, amarelos, pequenos comestíveis, muito apreciados por aves. Na medicina popular, a casca é utilizada como antifebril, contra tosses e doenças pulmonares, os ramos com folhas são diuréticos e os frutos são laxantes brandos (DURIGAN et. al., 2004; SILVA JÚNIOR et. al., 2005).

Figura 1: Detalhe das folhas e frutos verdes de *Byrsonima pachyphylla* Griseb.



2.2. Processos extrativos

2.2.1. Maceração

Maceração designa o processo no qual a extração dos compostos químicos da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, durante um período prolongado sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (DÄR, 1981; SIMÕES et al., 2003). O princípio do processo consiste em manter o vegetal em contato com o solvente. Como em tal processo a capacidade extrativa é dependente de um gradiente de concentração, torna-se evidente que o rendimento extrativo apresenta sensível tendência a diminuir com o tempo

(DÄR, 1981; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003; FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 1997).

Diversas variações conhecidas desta operação objetivam o aumento da eficiência de extração (aumentando a velocidade de extração e reduzindo o tempo de condução do processo), dentre elas:

- digestão: consiste na maceração, realizada em sistema aquecido a 40-60°C;
- maceração dinâmica: maceração feita sob agitação mecânica constante. (SIMÕES et al., 2010).

2.3. Atividade antimicrobiana

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos (HULIN et. al., 1998). A maioria dessas propriedades é conferida por produtos do metabolismo secundário, como terpenóides e compostos fenólicos (dentre eles flavonóides e taninos), que também na forma pura exibem atividade. (ADAM et. al., 1998).

Flavonoides são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores (angiospermas), principalmente. Muitos deles apresentam atividade biológica como, por exemplo, atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana e tanante (PERRUCHON, 2002).

O termo “tanino” é um nome genérico descritivo para um grupo de substâncias poliméricas fenólicas capazes de curtir couro ou precipitar gelatina em solução, propriedade conhecida como adstringência. São encontradas na maioria dos órgãos vegetais, como casca, caule, folhas, frutos e raízes (SCALBERT, 1991).

Diferentes métodos laboratoriais são empregados na determinação da atividade antimicrobiana “in vitro”, sendo aplicados como triagem de novas substâncias bioativas. Segundo diversos autores, a técnica mais utilizada em ensaios microbiológicos é a diluição seriada de extratos em microplacas, pois permite a utilização de pequenas quantidades e/ou volumes das composições a serem testadas (PALOMINO et al., 2002; OSTROSKY et al., 2008; NOGUEIRA, 2009).

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 concentração mínima da substância a ser testada necessária para inibir o crescimento microbiano (COWAN, 1999; ELOFF, 2000; PALOMINO et al., 2002; LANGFIELD et al., 2004; ALVES, 2006; CLSI, 2006; CLSI, 2008).

2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Deve-se garantir que a droga vegetal a ser utilizada corresponda a um material de qualidade e que seu uso será seguro e eficaz. Para tanto, deve-se realizar a caracterização da matéria-prima vegetal por meio de técnicas de caracterização físico-química, tais como a CCD.

A CCD consiste no sistema cromatográfico em que a separação dos componentes de uma mistura ocorre através da migração diferencial sobre uma fase estacionária composta por uma fina camada de adsorvente aplicado sobre um suporte plano, o qual pode ser constituído de diversos materiais tais como vidro, alumínio ou poliéster. A fase móvel por sua vez é constituída por diversas misturas de solventes e permanece no interior de um recipiente ou cuba de material transparente e inerte, geralmente vidro, permanecendo vedada onde se

deposita a cromatoplaça em posição vertical sob uma atmosfera saturada da fase móvel. (FARMACOPEIA Brasileira, 2010).

3. OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes modos extrativos (maceração, maceração dinâmica, digestão e digestão + maceração dinâmica) visando a obtenção de extratos brutos de folhas de *B. pachyphylla* Griseb.

3.1. Objetivos específicos

- Pesquisar as principais classes de metabólitos secundários nos extratos através de triagem fitoquímica;
- Comparar os perfis cromatográficos dos extratos brutos obtidos, em cromatografia de camada delgada (CCD);
- Verificar e comparar a atividade biológica dos quatro diferentes tipos de extratos frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*, utilizando o método de diluição seriada de extratos em microplacas.

4. METODOLOGIA

4.1. Material botânico

As folhas de *B. pachyphylla* Griseb foram colhidas de plantas localizadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, nas coordenadas 21° 48' 51,4''S e 48° 12' 5,1''W, com altitude de 661 metros.

4.2. Obtenção da droga vegetal

As folhas frescas colhidas foram submetidas a uma lavagem e desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (0,2% de cloro ativo) durante 20 minutos. Após a retirada do excesso de água procedeu-se a secagem em estufa com ar circulante aquecido a 45°C, até a obtenção de massa constante, quando então foram armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

4.3. Obtenção da droga pulverizada

A metodologia utilizada para a moagem das folhas secas e a obtenção das drogas pulverizadas foi por seccionamento utilizando-se um moinho de facas. As drogas pulverizadas foram empregadas nos procedimentos previstos para os processos de maceração, maceração dinâmica, digestão e digestão + maceração dinâmica (SIMÕES et al., 2010).

4.4. Obtenção dos extratos hidroetanólicos

Os extratos foram obtidos a partir da droga vegetal seca e pulverizada utilizando-se como líquido extrator solução hidroetanólica 70% na proporção 1:10 (p/v). Uma vez cumprido o tempo estabelecido para cada processo, executou-se a filtração com posterior redução do volume em rotaevaporador e secagem em estufa para a obtenção do extrato seco. Este foi armazenado em placas de petri recobertas por papel alumínio, a fim de proteger da ação da luz, e estas foram acondicionadas em geladeira até a execução dos testes de atividade antimicrobiana. Todos os extratos obtidos neste trabalho foram realizados em triplicatas. O detalhamento de cada método de obtenção de extratos pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Detalhes das quatro metodologias de extração utilizadas.

Método Extrativo	Tempo de contato droga vegetal/líquido extrator	Agitação	Temperatura
Maceração (M)	7 dias	Diária	Ambiente
Maceração Dinâmica (MD)	24 horas	Constante	Ambiente
Digestão (D)	90 minutos	Ausente	50° C
Maceração Dinâmica + Digestão (DMD)	90 minutos	Constante	50° C

4.5. Determinação do rendimento

As soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador e posteriormente em estufa a 40°C até *secura completa*. As massas dos extratos secos foram determinadas em balança semi-analítica, estimando-se o rendimento, e posterior comparação estatística das médias.

4.6. Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplacas e concentração bacteriostática mínima.

Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de diluição em microplacas, segundo a Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (CLSI, 2006; NOGUEIRA, 2009).

4.6.1. Cepas bacterianas

Para detectar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *B. pachyphylla* foram utilizadas as cepas ATCC (American Type Culture Collection) das bactérias *Escherichia coli* 25922, *Pseudomona aeruginosa* 27853 e *Staphylococcus aureus* 25923.

4.6.2. Estocagem e manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram mantidas em caldo Müeller-Hinton acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20°C. Para o uso, as cepas bacterianas foram repicadas em 2 mL de caldo Müeller-Hinton, incubados por 24 horas a 37 °C, e posteriormente foram repicadas em meio sólido (Blood Agar Base, sem sangue), incubados por 24 horas a 37 °C, depois lacrados com rolha e parafilme para manter em geladeira, como estoque bacteriano individual.

4.6.3. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24 horas em um tubo contendo solução salina estéril (PBS) até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

A seguir, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 620 nm com absorbância ideal na faixa de 0,10 a 0,15, que corresponde $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Posteriormente, foi diluído 1/10 em tubo com solução salina estéril (PBS), obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ utilizada nos ensaios.

4.6.4. Preparo das soluções dos extratos vegetais

As soluções dos extratos vegetais a serem testados foram preparadas na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo onze delas solubilizadas em etanol a 20% com adição de 2,5% de Tween 80, e uma delas solubilizada em etanol a 20% com adição de 5% de Tween 80.

4.6.5. Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo

Para o controle positivo foi preparada uma solução de ampicilina sódica com concentração final de $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este antibiótico foi utilizado para todas as bactérias, porém para cada bactéria utilizou-se uma concentração final diferente para determinar a CIM do antibiótico. As concentrações finais de ampicilina sódica utilizadas foram: $39,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*, $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa* e $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ *S. aureus*.

4.6.6. Preparo das soluções para o controle negativo

Para o controle negativo, foi preparada uma solução aquosa de etanol a 20% e Tween 80 a 2,5%, e outra solução aquosa de etanol a 20% e Tween 80 a 5%.

4.6.7. Método de diluição em microplacas

Foram utilizadas quatro microplacas para testar os doze extratos, sendo uma placa para cada extrato obtido por método extrativo diferente, e cada placa abrigou as triplicatas (1, 2 e 3) de um mesmo método, realizando-se também uma duplica técnica de cada uma delas; e além disso foram realizadas triplicatas biológicas, com testes em dias diferentes.

O teste foi realizado utilizando as colunas das microplacas (colunas de 1 a 12). Aos poços das linhas de A até H das colunas de 1 a 12 foram adicionados $80 \mu\text{L}$ de meio de cultura (caldo Müller Hinton). Aos poços da linha A, das colunas 1 e 2, foram adicionados

100µL da solução do extrato 1 com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais. Aos poços da linha A, das colunas 3 e 4, foram adicionados 100µL da solução do extrato 2 com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais. Aos poços da linha A, das colunas 5 e 6, foram adicionados 100µL da solução do extrato 3 com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais. Ao poço da linha A, da coluna 7, foram adicionados 100µL da solução-estoque do controle positivo (ampicilina), com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais.

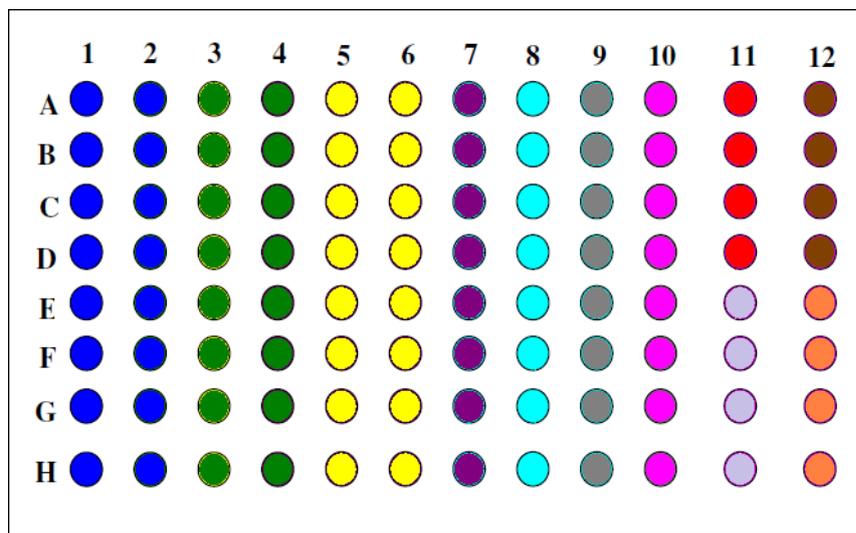
Aos poços das linhas A e B, das colunas 8, 9 e 10, foram adicionados 100 µL das soluções dos extratos 1, 2 e 3, respectivamente, para controle de contaminação, com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais.

Da linha A até H foi realizada uma diluição sucessiva, transferindo 100 µL de cada poço para o subsequente, assim obteve-se um volume final de 180 µL nesses poços da microplacas com as concentrações finais das amostras vegetais de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg mL⁻¹.

Aos poços das linhas A, B, C e D, da coluna 11, foram adicionados 100 µL de caldo Müeller-Hinton apenas, para controle de contaminação. Ao poço da linha E, da coluna 11, foram adicionados 100µL do solvente utilizado na dissolução dos extratos testados, com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais, para verificar se houve contaminação do solvente. Aos poços das linhas A, B, C e D, da coluna 12, foram adicionados 100 µL de caldo Müeller-Hinton e suspensão bacteriana de 10⁷ UFC mL⁻¹, para verificação da viabilidade das bactérias. Ao poço da linha E, da coluna 12, foram adicionados 100µL do solvente utilizado na dissolução dos extratos testados, com posterior diluição até a linha H, desprezando-se 100 µL finais, e suspensão bacteriana de 10⁷ UFC mL⁻¹, para o controle negativo (Figura 2).

Foram adicionados 20 μL da suspensão bacteriana de 10^7 UFC mL^{-1} (item 4.6.3) em cada poço, exceto nos das colunas 8, 9 e 10 (brancos – Caldo Mueller-Hinton e soluções dos respectivos extratos) e nos poços de controle do caldo Mueller-Hinton (coluna 11 A à D) e do controle negativo (coluna 11 E à H). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Figura 2: Esquema da técnica de diluição em microplacas, utilizando os extratos obtidos por maceração, maceração dinâmica e digestão.



- **Colunas 1 e 2:** Testes: meio de cultura + extrato 1 + bactérias.
- **Colunas 3 e 4:** Testes: meio de cultura + extrato 2 + bactérias.
- **Colunas 5 e 6:** Testes: meio de cultura + extrato 3 + bactérias.
- **Coluna 7:** Controle positivo: meio de cultura + antibiótico + bactérias.
- **Coluna 8:** Controle do extrato 1.
- **Coluna 9:** Controle do extrato 2.
- **Coluna 10:** Controle do extrato 3.
- **Colunas 11 (A a D):** Meio de cultura Müller- Hinton.
- **Coluna 11 (E a H):** Meio de cultura Müller- Hinton + solvente.
- **Coluna 12 (A a D):** Meio de cultura Müller- Hinton + bactérias.
- **Coluna 12 (E a H):** Controle negativo: meio de cultura + solvente + bactérias.

Na microplaca correspondente aos extratos obtidos por digestão + maceração dinâmica, denominados DMD 1, DMD 2 e DMD 3, houve uma alteração do esquema anterior, devido a necessidade de utilização de um solvente diferente (solução aquosa de etanol a 20% e Tween 80 a 5%) para o extrato DMD 1 e a realização do controle de contaminação do mesmo solvente (solvente 2). Para isso, realizou-se a diluição dos controles dos extratos (colunas 8, 9 e 10) somente até a linha F, adicionado-se 100µL do solvente utilizado na dissolução desse extrato no poço da linha G, coluna 8, com posterior diluição seguindo a sequência linha H, coluna 8, linha H coluna 9 e, por fim, linha H, coluna 10, desprezando-se 100 µL finais, e permanecendo vazios os poços das colunas 9 e 10, da linha G.

4.7. Leitura visual e método para determinação da concentração bactericida mínima

Antes da adição do indicador resazurina nas microplacas, a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi feita repicando-se a mistura de cada orifício no qual aparentemente não houve crescimento bacteriano a uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, incubando-se as placas durante 24 horas em estufa a 37°C. Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CBM.

4.8. Revelação e leitura

Após a realização da CBM adicionou-se 30 µL de solução de resazurina com concentração de 0,5µg/5mL em todos os poços. A resazurina (fenoxazin-3ona) é um corante

indicador de oxirredução. O crescimento dos microrganismos é revelado pela demonstração da redução do meio com a resazurina, que passa de azul para róseo (O'BRIEN, 2000).

4.9. Determinação da atividade antifúngica e concentração inibitória mínima pelo método de diluição em microplacas e concentração fungicida mínima

Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a técnica de diluição em microplacas, segundo a Norma M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (CLSI, 2008).

4.9.1. Cepa fúngica

Para detectar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *B. pachyphylla* foi utilizada a cepa ATCC da levedura *Candida albicans* 18804.

4.9.2. Padronização da suspensão fúngica

Culturas de 48 h das leveduras, cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco) foram transferidas para solução PBS pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC mL⁻¹) que foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 530 nm com valor de absorbância entre 0,12 a 0,15. Em seguida, foi diluída até atingir a concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, que foi, então, utilizada nos testes.

4.9.3. Determinação da concentração inibitória mínima

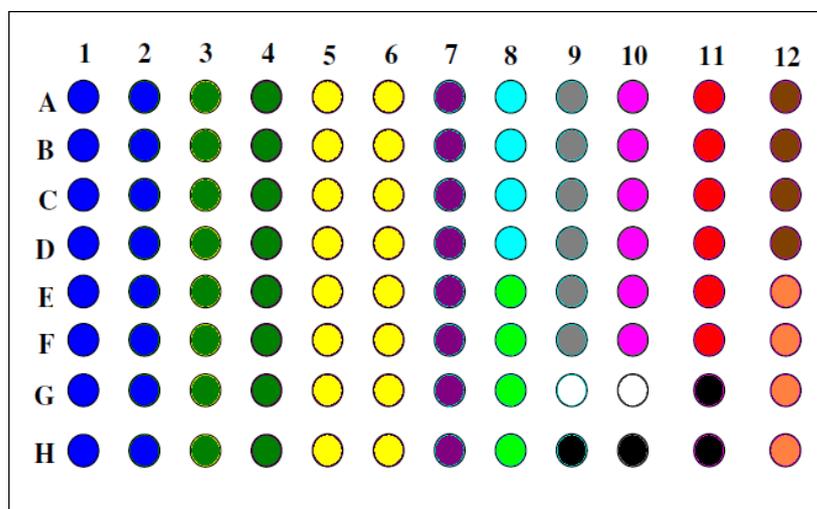
A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foram realizadas por meio da técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo a Norma M27-A3 da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços e cada orifício foi preenchido com meio líquido RPMI 1640 (100 μL), ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Foram acrescentados também o inóculo (100 μL) e as soluções dos extratos diluídos (100 μL), de tal forma que o volume final dos poços foi de 300 μL . As soluções dos extratos vegetais a serem testados foram preparadas na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo onze delas solubilizadas em etanol a 20% com adição de 2,5% de Tween 80, e uma delas solubilizada em etanol a 20% com adição de 5% de Tween 80, sendo realizadas diluições seriadas de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ até 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$, numa proporção de 1:2.

Como controles positivos foram utilizadas soluções de fluconazol a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Anfotericina B a 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Também foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controle de esterilidade dos extratos e controle negativo (solvente). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Para a levedura *C. albicans* o esquema das placas foi modificado devido à necessidade de realizar o controle positivo com duas substâncias de mecanismos de ação diferentes (Fluconazol e Anfotericina B). Não foi realizado controle negativo com o solvente 2 nestas placas, apenas com o solvente 1, pois a alteração de sua constituição em relação ao solvente 1 é mínima, sendo este controle desnecessário (Figura 3).

Figura 3: Esquema da técnica de diluição em microplacas para a levedura *C. albicans*, utilizando os extratos obtidos por maceração, maceração dinâmica e digestão.



- **Colunas 1 e 2:** Testes: meio de cultura + extrato 1 + leveduras.
- **Colunas 3 e 4:** Testes: meio de cultura + extrato 2 + leveduras.
- **Colunas 5 e 6:** Testes: meio de cultura + extrato 3 + leveduras.
- **Coluna 7:** Controle positivo: meio de cultura + fluconazol + leveduras.
- **Coluna 8 (A a D):** Meio de cultura RPMI + leveduras.
- **Coluna 9 (A a F):** Controle do extrato 1.
- **Coluna 10 (A a F):** Controle do extrato 2.
- **Colunas 11 (A a F):** Controle do extrato 3.
- **Coluna 12 (A a D):** Meio de cultura RPMI.
- **Coluna 12 (E a H):** Meio de cultura RPMI + solvente 1.
- **Colunas 8 (D a H):** Controle positivo: meio de cultura RPMI + anfotericina B + leveduras.
- **Colunas 9(H), 10(H) e 11(H e G):** Controle negativo: meio de cultura RPMI + solvente 1 + leveduras.
- **Colunas 9 e 10 (G):** vazio.

Na microplaca correspondente aos extratos obtidos por digestão + maceração dinâmica, denominados DMD 1, DMD 2 e DMD 3, houve uma alteração do esquema anterior, devido a necessidade de utilizar um solvente diferente (solução aquosa de etanol a

20% e Tween 80 a 5%) para o extrato DMD 1 e a realização do controle de contaminação do mesmo solvente (solvente 2).

4.10. Revelação e leitura

O resultado foi avaliado observando-se a turbidez ocorrida nos poços teste, seguida de avaliação colorimétrica utilizando cloreto de trifenil tetrazólio (TTC) (MERCK®) como indicador. Com o uso desse revelador os poços que apresentaram atividade permaneceram incolores, enquanto que os poços onde houve crescimento microbiano coraram-se de vermelho (DUARTE, 2005).

4.10.1. Determinação da concentração fungicida mínima

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi feita repicando-se a mistura de cada orifício no qual aparentemente não houve crescimento fúngico a uma placa de Petri contendo meio Sabouraud dextrose, incubando-se as placas durante 48 horas em estufa a 37°C. Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CFM.

4.11. Triagem Fitoquímica Preliminar

O objetivo das análises fitoquímicas foi identificar os principais grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos, de modo a direcionar os estudos subsequentes, como a cromatografia em camada delgada descrita no item 4.6.

Foram realizados testes para identificação dos grupos de metabólitos secundários segundo metodologia adaptada de COSTA (2001).

Tais testes foram planejados para a análise da droga vegetal e, portanto, algumas modificações foram realizadas na metodologia adaptando a quantidade de amostra a ser utilizada em cada um dos testes, uma vez que estes foram realizados com os extratos provenientes das quatro metodologias de extração descritas anteriormente, e não com a droga vegetal e sua respectiva extração prevista em cada teste. Calculou-se a proporção de massa de extrato a ser utilizado com base na massa de droga vegetal utilizada para efetuar a extração, no rendimento de cada extrato seco e na massa de droga vegetal proposta em cada teste, entretanto, devido à alta sensibilidade das reações, e para melhorar a visualização dos resultados, a quantidade dos extratos utilizados para alguns dos testes foram reduzidas a um terço da quantidade calculada. As massas dos extratos utilizadas em cada teste são apresentadas na tabela 2:

Tabela 2: Valores de massa, em gramas, dos extratos utilizados para cada um dos testes da triagem fitoquímica.

Testes	Massa utilizada de extrato M (g)	Massa utilizada de extrato MD (g)	Massa utilizada de extrato D (g)	Massa utilizada de extrato DMD (g)
Saponinas	0,478	0,628	0,476	0,542
Taninos	0,398	0,523	0,397	0,452
Flavonoides	0,239	0,314	0,238	0,271
Alcaloides	0,398	0,523	0,523	0,452

4.11.1. Saponinas

Devido à dificuldade de solubilizar os extratos em água foi realizada uma partição líquido/líquido com 60 mL de acetato de etila e 40 mL de água, dividindo-se o processo em três etapas, da seguinte forma:

Realizou-se a primeira partição com os 40 mL de água e 20 mL de acetato de etila, recolheu-se a fase orgânica em recipiente separado da fase aquosa, retornou-se a fase aquosa para o funil de separação e realizou o procedimento de partição com 20 mL de acetato de etila por mais duas vezes. A fase aquosa foi colocada em repouso dentro de uma capela com exaustão ligada durante 3 horas, para que fosse eliminado o excedente de acetato de etila a fim de que o mesmo não interferisse na formação de espuma. Após esse período transferiu-se uma quantidade aleatória dessa fase aquosa para um tubo de ensaio, o qual foi agitado vigorosamente durante 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerada resultado positivo.

4.11.2. Taninos

Os extratos foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, a solução resultante foi filtrada e utilizada para a realização dos testes de identificação de taninos (reação de gelatina e reação com cloreto férrico) descritos por Costa (2001).

4.11.3. Flavonoides

Os extratos foram dissolvidos em 10 mL de etanol 70% para a realização dos testes de identificação de flavonoides (reação de Shinoda, reação de Taubock, reação de Pew, reação com cloreto férrico e reação com cloreto de alumínio) segundo Costa (2001).

4.11.4. Alcaloides

Para o teste de alcaloides não houve alteração da metodologia proposta por Costa (2001).

4.12. Cromatografia em camada delgada

A separação preliminar das substâncias contidas nos extratos foi realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) segundo Wagner et al. (1996), porém com realização de alterações nas fases móveis a fim de encontrar as condições ideais de visualização das classes de metabólitos contidas nessa espécie. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 F₂₅₄ sobre placas de alumínio (0,25 µm; Merck) e foram utilizados os reveladores: cloreto férrico para taninos; NP-PEG e visualização sob luz UV (367 nm) para flavonoides; dragendorff para alcaloides e anisaldeído sulfúrico + estufa a 110°C por 5 minutos para terpenos. As fases móveis utilizadas foram descritas nos resultados. As técnicas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do rendimento

Com a finalidade de verificar o rendimento dos processos extrativos executados com a droga vegetal (folhas de *B. pachyphylla*) estabeleceu-se a razão percentual com base na massa de droga utilizada. Os valores referentes à quantidade (em massa) de extratos brutos secos obtidos pelos processos de maceração, maceração dinâmica, digestão e digestão + maceração dinâmica estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento atribuído aos processos de obtenção dos extratos brutos secos obtidos de folhas pulverizadas de *B. pachyphylla* Griseb. em função das quatro metodologias de extração utilizadas.

	Maceração (%)	Maceração Dinâmica (%)	Digestão (%)	Digestão + Maceração Dinâmica (%)
Replicata 1	23,6	44,6	23,6	27,5
Replicata 2	23,7	24,0	22,3	27,4
Replicata 3	24,5	25,7	25,5	26,5
Média e Desvio padrão	23,9±0,5	31,4±11,4	23,8±1,6	27,1±0,6

A análise estatística dos resultados realizada através do Teste de Tukey demonstrou que não há diferença significativa entre os rendimentos das quatro metodologias. Este fato indica que, com base nestes parâmetros, é possível optar pelo método mais rápido, ou pelo método que necessite de menos aparelhagem, dependendo da disponibilidade de cada laboratório, sem que haja prejuízo quantitativo de rendimentos.

5.2. Triagem fitoquímica preliminar

Na triagem fitoquímica foi observado resultado positivo para flavonoides (pelos testes de Shinoda, Taubock, Pew, Cloreto Férrico e Cloreto de Alumínio), taninos (pelos testes de Gelatina e Cloreto Férrico) e saponinas (pelo teste qualitativo de espuma) em todos os extratos; e resultado negativo para alcaloides (segundo os testes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand) também em todos os extratos.

As reações envolvendo cloreto férrico apresentaram coloração azul, indicando possível presença de taninos hidrolisáveis.

Os resultados obtidos na triagem fitoquímica preliminar podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da triagem fitoquímica preliminar.

	Reações	Maceração	Maceração Dinâmica	Digestão	Digestão + Maceração Dinâmica
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+
	Taubock	+	+	+	+
	Pew	+	+	+	+
	Cloreto Férrico	+	+	+	+
	Cloreto de Alumínio	+	+	+	+
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-
	Bouchardt	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
	Bertrand	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	+	+	+	+
	Cloreto Férrico	+	+	+	+
Saponinas	Teste qualitativo de espuma	+	+	+	+

Legenda: + (resultado positivo); - (resultado negativo).

5.3. Cromatografia em camada delgada

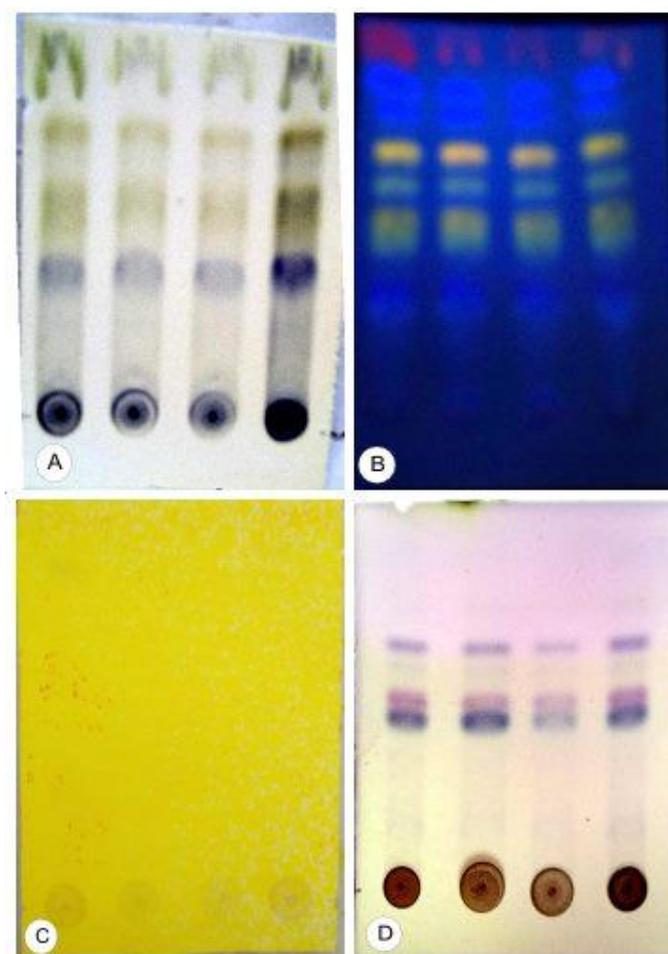
Foram testadas diversas fases móveis, havendo necessidade de confecção de várias placas cromatográficas para encontrar fases adequadas às condições da planta estudada. As fases móveis que apresentaram resultado satisfatório e as demais condições utilizadas estão descritas na Tabela 5.

A Figura 4 apresenta fotografias das placas de CCD reveladas, mostrando os resultados obtidos para cada classe de metabólitos analisada.

Tabela 5: Condições utilizadas e resultados obtidos para as classes de metabólitos analisadas por CCD.

Classes de metabólitos	Fase móvel utilizada	Proporção	Revelador	Resultado
Taninos	ácido acético : ácido fórmico : água	90:5:5	Cloreto Férrico	+
Flavonoides	ácido acético : ácido fórmico : água	90:5:5	NP-PEG	+
Alcaloides	clorofórmio : acetato de etila	60:40	Dragendorff	-
Terpenos	hexano : acetato de etila : isoproponol	70:28:2	Anisaldeído sulfúrico	+

Figura 4: Determinação da presença de metabólitos secundários em *B. pachyphylla* Griseb por cromatografia em camada delgada. Distribuição nas placas: extrato M; extrato DMD; extrato MD; extrato D. **A:** Revelador cloreto férrico (para taninos) e fase móvel ácido acético/ácido fórmico/água (90:5:5). **B:** Revelador NP-PEG (para flavonóides) e fase móvel ácido acético/ácido fórmico/água (90:5:5). **C:** Revelador Dragendorf (para alcalóides) e fase móvel clorofórmio/acetato de etila (60:40). **D:** Revelador anisaldeído sulfúrico (para terpenos) e fase móvel hexano/acetato de etila/isoproponol (70:28:2).



Observando as placas cromatográficas é possível visualizar quatro diferentes manchas na placa de taninos, sendo uma azul e três verdes, com coloração azul também na origem; já na placa de flavonoides visualizam-se seis manchas, três manchas azuis fluorescentes e três manchas amarelas fluorescentes, sendo que as manchas alaranjadas no topo da placa, neste comprimento de onda, são características de clorofila; enquanto que na placa de terpenos é possível observar quatro manchas, sendo duas azuis, uma lilás e uma verde, havendo também uma coloração marrom na origem.

Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada confirmaram os resultados da triagem fitoquímica preliminar, tornando possível sugerir a presença de taninos, flavonoides e terpenos na espécie *B. pachyphylla* Griseb, assim como demonstraram a ausência de alcaloides; é possível também sugerir a presença de saponinas, que foi observada através da triagem fitoquímica preliminar, porém não foi elucidativa através da CCD.

Entretanto, uma vez que os testes de triagem fitoquímica e cromatografia em camada delgada foram realizados com os extratos disponíveis e não a partir da droga vegetal, como de costume, é importante ressaltar que a ausência de alcaloides nos extratos não significa que eles não estejam presentes na espécie, já que é possível que as condições das metodologias de extração utilizadas não tenham sido favoráveis à extração desses metabólitos. Da mesma forma, outras classes de metabólitos secundários que não foram testadas podem estar presentes nesta espécie vegetal.

Alves (2011) descreve a presença de rutina na espécie *B. pachyphylla* Griseb, corroborando com o resultado obtido neste trabalho quanto à presença de flavonoides.

Foi possível observar também uma homogeneidade qualitativa na composição de classes de metabólitos secundários extraídos através de cada uma das diferentes metodologias de extração utilizadas, ressaltando a possibilidade de escolha de qualquer um dos métodos, de acordo com sua viabilidade para cada laboratório de pesquisa ou indústria, necessitando-se,

porém, de mais estudos, a fim de isolar e quantificar cada metabólito nos diferentes extratos brutos obtidos.

Entre os metabólitos secundários encontrados nesta espécie os taninos, flavonoides e terpenos têm relatos de atividade antimicrobiana na literatura, fato que pode ser correlacionado com os resultados apresentados a seguir, no item 5.4. Verdi et al. (2005), por exemplo, menciona a atividade antimicrobiana encontrada com alguns terpenos originados de plantas. Simões et al. (2010) relata, dentre outras, a propriedade antimicrobiana de flavonoides e taninos. Scalbert (1991) sustenta que o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe os taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

5.4. Atividade antimicrobiana

Segundo a revelação colorimétrica os extratos brutos de folhas de *B. pachyphylla* Griseb apresentaram atividade inibitória frente à bactéria *P. aeruginosa* e para os demais microrganismos não houve atividade nas concentrações testadas. Para este mesmo microrganismo os métodos extrativos que proporcionaram melhor atividade inibitória foram maceração e maceração dinâmica.

Os valores obtidos para CIM, CBM e CFM são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos no experimento em função da espécie microbiana e dos métodos extrativos.

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
Maceração (M)	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Mac. Dinâmica (MD)	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Digestão (D)	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Digestão + Mac. Dinâmica (DMD)	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Os valores de CIM encontrados nos controles positivos foram $9,765 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli*, $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e $78,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*, utilizando-se a ampicilina; e para *C. albicans* obteve-se CIM de $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ com fluconazol e $0,063 \mu\text{g mL}^{-1}$ com anfotericina B.

Sob a ótica de testes bioguiados verifica-se pouca sensibilidade para os métodos associados ao calor (temperatura de 50°C) para extrair princípios ativos em menor tempo. Possivelmente a elevação da temperatura acarretou em inativação de alguns compostos químicos ativos por ter degradado as moléculas ou tenha proporcionado um rearranjo químico modificando o sítio ativo, neste caso, ou ainda, pode ter ocorrido a extração de diferentes quantidades dos metabólitos ativos pelos diferentes métodos utilizados, tendo sido extraídas em maior concentração substâncias mais efetivas contra *P. aeruginosa* através dos métodos de maceração e maceração dinâmica.

Muitos autores têm relatado que os extratos brutos a partir de produtos naturais com uma CIM inferior a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas relevantes, e os extratos com uma CIM

inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores como potenciais agentes antimicrobianos (LAMOUNIER et al.,2012). Aligianis et al. (2001) propôs uma classificação para materiais vegetais baseando-se nos resultados de CIM, considerando como forte inibição a CIM até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; inibição moderada a CIM entre 600 e $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e como fraca inibição a CIM acima de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$; enquanto outros autores como Mbaveng et al. (2012) e Rios & Recio (2005) citam como concentração inibitória mínima muito interessante valores de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato bruto, porém Mbaveng et al. (2012) ainda considera uma atividade moderada os valores de CIM que variam entre 100 - $625 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma pode-se dizer que os extratos obtidos por maceração e maceração dinâmica apresentam atividade moderada frente à bactéria *P. aeruginosa* segundo a classificação de Mbaveng et al. (2012), e atividade forte segundo a classificação de Aligianis et al. (2001). Pode-se dizer ainda que os extratos obtidos por digestão e digestão + maceração dinâmica apresentam atividade moderada frente à bactéria *P. aeruginosa* segundo a classificação Aligianis et al. (2001).

Os extratos brutos de *B. pachyphylla* Griseb. podem ser relevantes para a produção de medicamentos fitoterápicos antimicrobianos, ou ainda para o isolamento de substâncias com a finalidade de produção de antimicrobianos sintéticos, além disso pode ser considerada também a sua utilização para o desenvolvimento de produtos saneantes e domissanitários, visto que diversos autores, entre eles Oliveira (2010) e Panis (2009), mencionam *P. aeruginosa* como um dos microrganismos que mais comumente causam infecções hospitalares, e que muitas vezes apresenta resistência a diversas substâncias antibacterianas, tornando-se importante o seu controle, sobretudo em ambientes destinados a pacientes imunocomprometidos.

As Figuras 5 e 6 ilustram alguns dos testes realizados em microplacas, utilizando os reveladores colorimétricos resazurina e TTC, respectivamente.

Figura 5: Teste realizado com a bactéria *P. aeruginosa*.

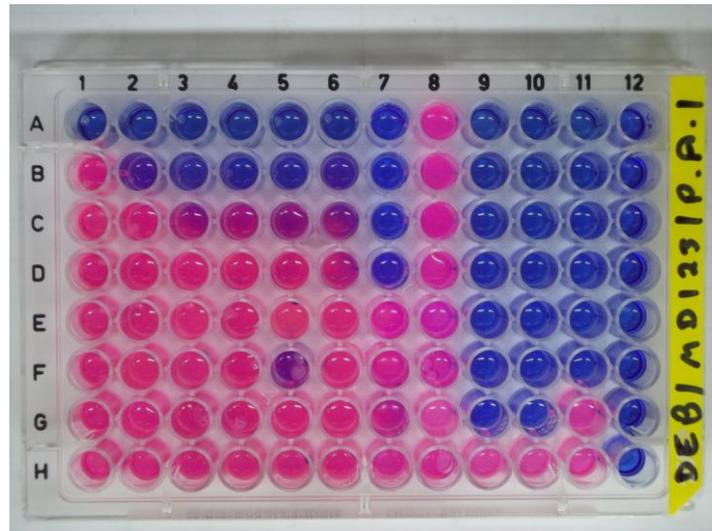
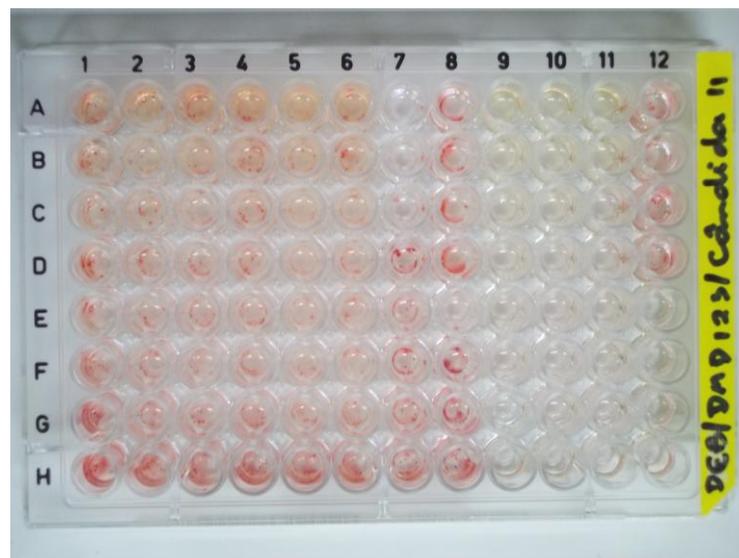
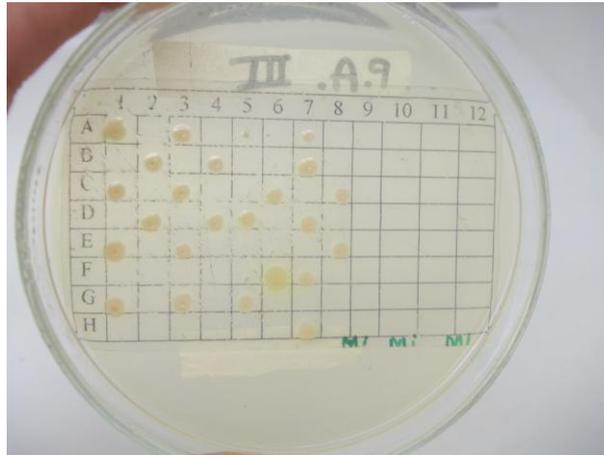


Figura 6: Teste realizado com a levedura *C. albicans*.



A determinação da CBM foi realizada apenas para a bactéria *P. aeruginosa*, conforme a Figura 7, onde esta foi a única a apresentar sensibilidade diante dos extratos tanto na leitura visual quanto na revelação colorimétrica. Os valores de CBM e CIM encontrados foram apresentados na Tabela 6. A CFM para *C. albicans* e os valores de CBM para as demais bactérias foram relatados como $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, acima das concentrações testadas.

Figura 7: Determinação da CBM (replicata 3) para a bactéria *P. aeruginosa*.



Os resultados obtidos através da revelação espectrofotométrica foram avaliados através de gráficos de porcentagem de inibição de crescimento microbiano (Figuras 8 a 11), segundo Gudiña et al. (2010), com auxílio da fórmula: **% de inibição de crescimento microbiano** = $[1-(A_c/A_0)] \times 100$, onde A_c representa a absorbância do poço contendo uma concentração “c” do extrato (poço teste) e A_0 representa a absorbância do poço de controle do crescimento microbiano (meio de cultura + microrganismo).

Figura 8: Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M) maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria *E. coli*.

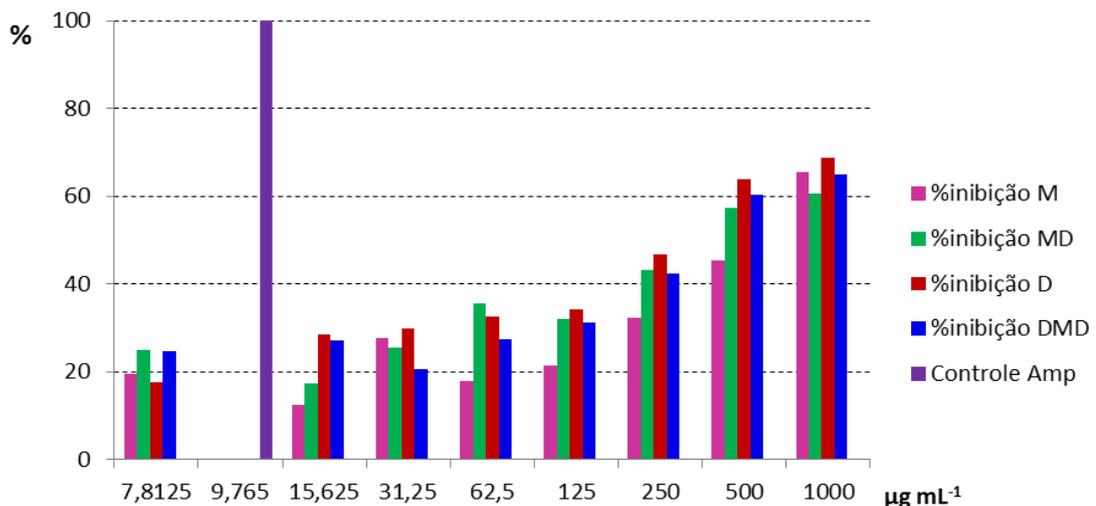


Figura 9: Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria *P. aeruginosa*.

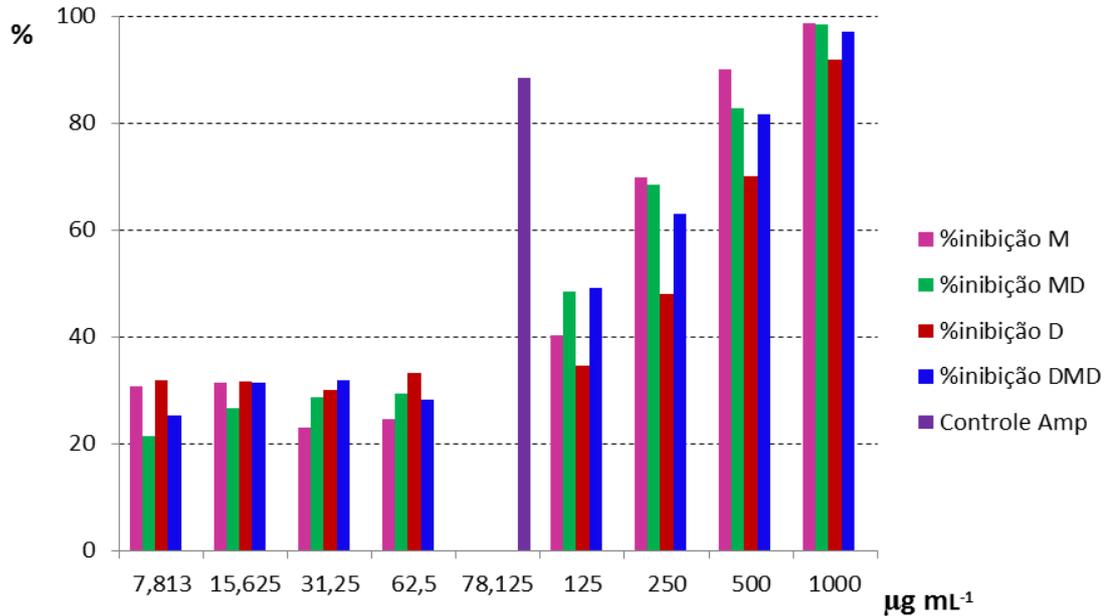


Figura 10: Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e do controle positivo (Ampicilina) para a bactéria *S. aureus*.

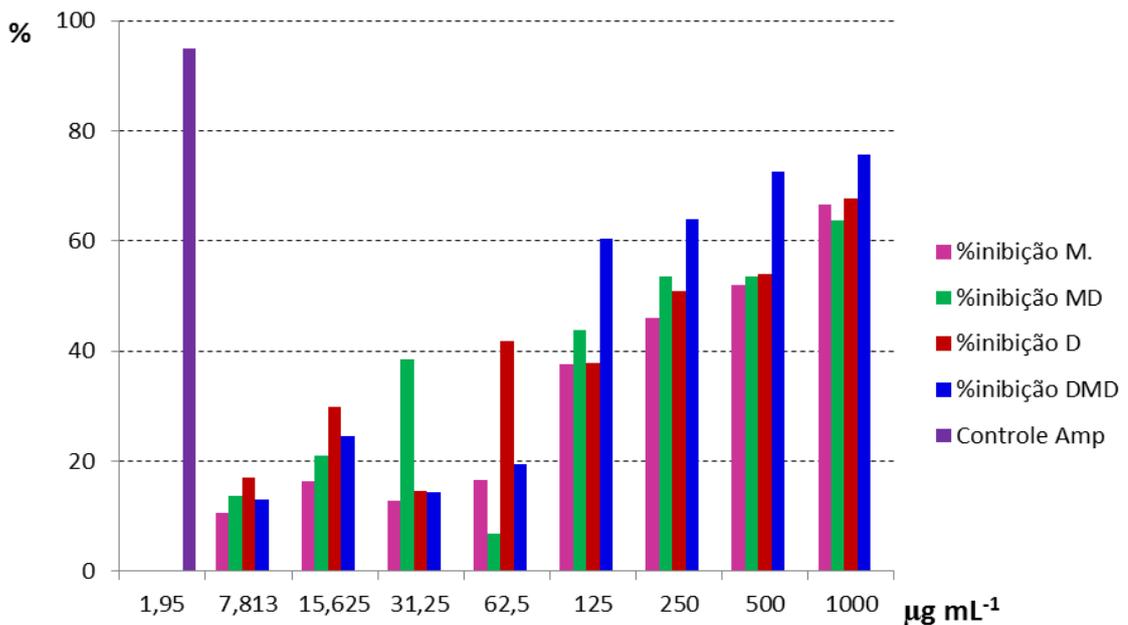
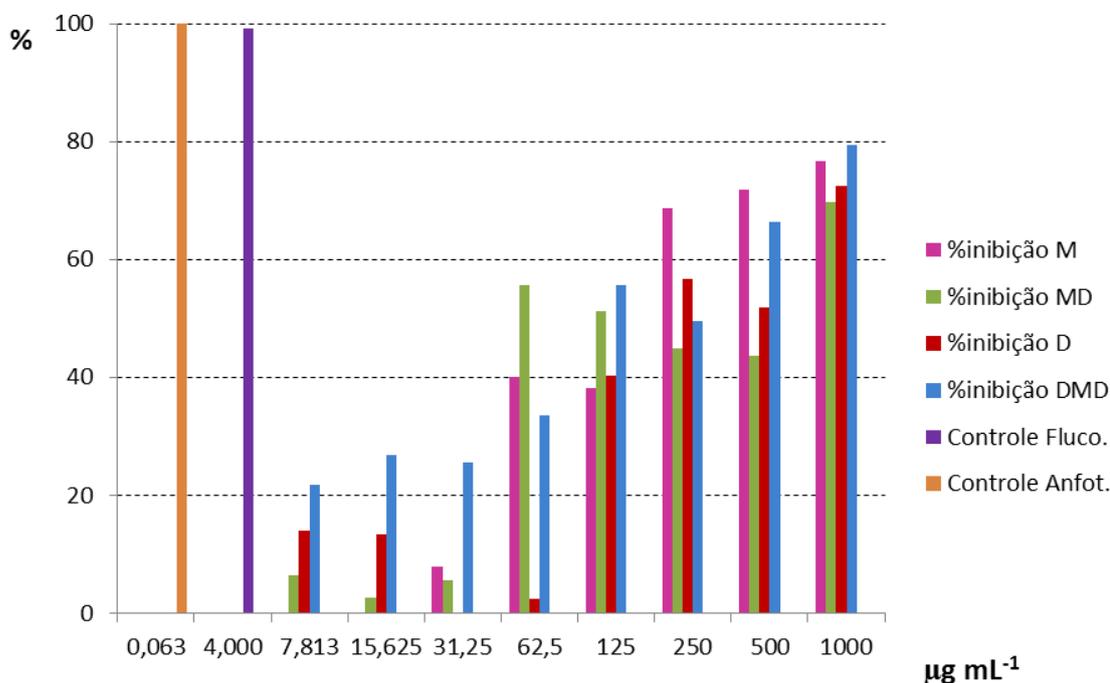


Figura 11: Porcentagem de inibição do crescimento fúngico de extratos obtidos por maceração (M), maceração dinâmica (MD), digestão (D), digestão + maceração dinâmica (DMD) e dos controles positivos (Fluconazol e Anfotericina B) para a levedura *C. albicans*.



O fato de haver porcentagens de inibição significativas em concentrações muito baixas dos extratos, sendo que concentrações maiores do mesmo extrato não apresentaram atividade inibitória, pode ser devido ao desenvolvimento lento do microrganismo por este não se encontrar em condições adequadas de sobrevivência (fatores intrínsecos ao microrganismo) ou por falha em sua manipulação, porém, nesses casos, não se considera esse retardo do crescimento como atividade do extrato estudado.

A observação dos gráficos revela que a maceração, que é o único método dentre os testados descrito em farmacopéias, se mostrou bastante eficiente para extração de substâncias ativas contra *C. albicans* e *P. aeruginosa*, sendo passível de utilização também para os demais microrganismos. Entretanto, no caso da *E. coli* observou-se um destaque da atividade dos extratos obtidos por digestão, e para *S. aureus* observou-se um destaque da atividade dos extratos obtidos por digestão + maceração dinâmica.

A sazonalidade pode ter sido um fator interferente no resultado do processo, visto que o período de coleta das folhas dessa planta (inverno) pode não ter sido o de maior produção de metabólitos ativos contra os microrganismos estudados, necessitando-se de mais estudos nesta área.

Pôde-se observar um resultado relevante para a levedura *C. albicans*, principalmente para o método de maceração, através do qual se obteve porcentagens de inibição de crescimento superiores a 65% até a concentração de $250\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato.

6. CONCLUSÕES

A eficiência dos métodos extrativos considerando-se o rendimento de obtenção dos extratos brutos não apresentou diferença significativa demonstrando que quantitativamente há semelhanças entre os métodos empregados. Os resultados obtidos na cromatografia em camada delgada e na triagem fitoquímica preliminar possibilitaram sugerir a presença de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas na espécie *B. pachyphylla* Griseb, assim como demonstraram a ausência de alcaloides. Além disso, observou-se uma homogeneidade qualitativa na composição de classes de metabólitos secundários extraídos através de cada uma das diferentes metodologias de extração utilizadas, ressaltando a possibilidade de escolha de qualquer um dos métodos com base nesses parâmetros, sendo necessários, porém, mais estudos para determinar se existem diferenças quantitativas desses metabólitos nos diferentes extratos.

Os métodos extrativos para obtenção dos extratos vegetais de folhas de *B. pachyphylla* que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram maceração e maceração dinâmica, considerando a resposta frente à *P. aeruginosa*, indicando a possibilidade de ação biológica semelhante para diferentes condições extrativas, as quais podem diminuir a duração do

processo, como a maceração dinâmica, e também ressalta a importância de planejamento de processos para extração e obtenção de extratos vegetais.

7. REFERÊNCIAS

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. - Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p. 1739- 1745, 1998.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F.. **Cerrado** - Espécies Vegetais Úteis. Planaltina: Embrapa. 1998.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CJINOU, I.B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **J. Agric. Chem.** v. 49, p. 4168-4170, 2001.

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. Franca, 2006.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem I Oswaldo Cruz**, v.95, p. 367-373, 2000.

ALVES, M. M.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. **Revista Scientia Plena.**, v. 7, n. 12, 2011.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica:** formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. p.516-518

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

BALLVÉ, A.C.; SIQUEIRA, N.C.S. de; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; DEUD JOSÉ, K.F. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Ed. da ULBRA, 1995. 205p.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.2, p. 325-329.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5.ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 1991. 190p.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards 6. ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**: farmacognosia experimental. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. p. 303,308-309.v.3

COWAN, N. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564 - 582, 1999.

DÄR, A. **Tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1981. p. 141 - 142, 144 - 152, 366.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

DURIGAN G.; BAITELLO J.B.; FRANCO G.A.D.C.; SIQUEIRA M.F. de. **Plantas do Cerrado Paulista**: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas e Letras, 2004. p.266.

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.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. p. 105.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1997.p. X-2 a X-3, 1997.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; AND RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 04, p.419–424, 2010.

HIGUCHI, C.T.; PAVAN, F.R. ; LEITE, C.Q.F.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; LEITE, S.R.A.; SACRAMENTO, L.V.S.; SATO, D.N. Triterpenes and antitubercular activit of *Byrsonima crassa*. **Química Nova**, v. 31, p.1719-1721, 2008a.

HIGUCHI, C.T.; SANNOMIYA, M.; PAVAN, F.R.; LEITE, S.R.A.; SATO, D.N.; FRANZBLAU, S.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; LEITE, C.Q.F. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** (Online), v. 5, p.1-5, 2008b.

HULIN, V.; MATHOT, A.G.; MAFART, P.; DUFOSSÉ, L. – Lês propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments.**, v.18, n.17, p.563-582, 1998.

LAMOUNIER, K. C.; CUNHA, L. C. S.; DEMORAIS, S. A. L.; DE AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; DO NASCIMENTO, E. A.; DE SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; and CUNHA, W. R. Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

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.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p. 300-306, 2006.

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

MACIEL M.A.M., PINTO A.C., VEIGA JR. V.F., GRYNBERG N.F., ECHEVARRIA A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Revista Química Nova*, v.25, n.3, p. 429-438, 2002. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2002/vol25n3/15.pdf>. Acesso em: 05 nov 2008.

MBAVENG, A.T.; KUETE, V.; NGAMENI, B.; BENG, V.P.; NGADJUI, B.T.; MEYER, J.J.M.; LALL, N. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of *Dorstenia mannii* (Moraceae). *Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 83, 2012.

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*. *Química Nova*, v. 22, n. 2, 1999.

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. *Ver Bras Farmacogn*, v.15, p. 316-320, 2005.

MIRANDA, I.S.; ABSY, L.M. Flora fanerogâmica das savanas de Roraima. In: BARBOSA, R I.; FERREIRA, E. J. G.; CASTELÓN, E. G. (ED). *Homem, ambiente e ecologia no Estado de Roraima. Amazônia: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia*, 1997. p. 445-455.

NOGUEIRA, L. G. **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, Araraquara, SP. 2009.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* , v.267, p.5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, C. T. ; DA SILVA, R. S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, v.18, n.2, p. 97-104, 2010.

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, 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.

PANIS, C.; MATSUO, T.; REICHE, E.M.V. Nosocomial infections in Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) infected and AIDS patients: major microorganisms and immunological profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 01, p. 155-162, 2009.

PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. **Cosmetics & Toiletries**, v. 14, n. 6, p. 74, 2002.

PESSINI, G.L.; HOLESTZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 13, supl., p. 21-24, 2003.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p. 1113-1115, 1127.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p. 603-613, 2001.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SILVA JÚNIOR, M.C.; SANTOS, G.C.; NOGUEIRA, P.E.; MUNHOZ, C.A.R.; RAMOS, A.E. (Ed.). **100 Árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005. p.116.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003. p. 232 - 235, 263 - 288, 289 – 319.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. p.315, 601 ,629.

SUFFREDINI I.B., SADER H.S., GONÇALVES A.G., REIS A.O., GALES A.C., VARELLA A.D., YOUNES R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Braz J Med Biol Res**, v.37, p. 379-384, 2004.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94. 2005.

VOGEL, S. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. **Memoirs of the New York Botanical Garden.**, v.55, p.130-142, 1990.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1982. p. 496 – 513, 769

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKL, V. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, 2008.p.1-146.

De acordo

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Aluna: Débora Pizzaia Vaccari Trevisan

Araraquara, 10 de janeiro de 2014