

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

Peperomia blanda (PIPERACEAE): AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE

DANILO FUIN DIGNANI

ARARAQUARA – SP

2009

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

Peperomia blanda (PIPERACEAE): AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE

DANILO FUIN DIGNANI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

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

ARARAQUARA – SP

2009

Ficha Catalográfica

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

Dignani, Danilo Fuin

D575p *Peperomia blanda* (Piperaceae) : Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante. / Danilo Fuin Dignani. – Araraquara, 2009.
109 f.

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

Orientador: Taís Maria Bauab

.
1. *Peperomia blanda*. 2. Difusão em Agar. 3. Microdiluição. 4. Antioxidante. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

“Da terra, o Senhor criou os remédios, e o homem de bom senso não os despreza. Não foi para manifestar o poder do Senhor que as águas foram adoçadas com um pedaço de madeira? O Senhor deu aos homens a ciência para que pudessem glorificá-lo por causa das maravilhas dele. Com elas, o médico cura e elimina a dor, e o farmacêutico prepara as fórmulas. Dessa maneira, as obras de Deus não têm fim, e dele vem o bem-estar para a terra”.

ECLESIAÍSTICO 38, 4-8

*Dedico este trabalho as pessoas que realmente
acreditaram na minha conquista,
que sempre me incentivaram e deram apoio
para enfrentar e superar as dificuldades
encontradas*

*Dedico a eles que estiveram presente durante
este período de crescimento
pessoal, profissional e intelectual”*

Meu pai Marco Antônio Dignani

Minha mãe Aparecida Ângela Fuin Dignani

Meu irmão Marco Antônio Fuin Dignani

Minha namorada Indiara Soler Rôvere

Agradecimentos

Agradeço de coração minha orientadora Prof^a Dr^a Taís Maria Bauab pelo voto de confiança, orientação, paciência, amizade, dedicação em todos os momentos. Sinto-me privilegiado pela oportunidade de poder trabalhar com você, por tudo que você representa como pessoa. Sempre agradecido.

Aos meus pais Marco e Cida e ao meu irmão Marquinho pelo amor, carinho, pelos conselhos, educação e principalmente por estarem sempre ao meu lado, apoiando minhas escolhas. Amo vocês.

A minha namorada Indiara pela amizade, carinho, amor e companheirismo, sempre me incentivando a nunca desistir. Amo você.

Aos meus parceiros de graduação, pós-graduação e profissão, enfim parceiros de vida, Leonardo Gorla Nogueira e Marcelo Augusto Cavaretti Hiene pela amizade e lealdade destes anos de convivência.

Aos grandes amigos e companheiros Marcelo Gonzaga de Freitas Araujo e Flavia Rezende pelas viagens, risadas e pela importante ajuda nesta etapa final, bem como ao Silvo e a Jaqueline pelas conversas, esclarecimentos e ensinamento durante o dia a dia.

Ao Prof Dr Iguatemy Lorenço Brunetti pela orientação, dedicação e profissionalismo e, sobretudo pela amizade e compreensão, bem como todo a pessoal do laboratório de Bioquímica Clínica da FCF-UNESP de Araraquara, Vânia Ortega, Vanessa Barboza, Marciano Pires, Ricardo Hakime e Marcos pela ajuda e orientações

A Profa. Dra. Maysa Furlan e Lidiane Gaspareto Felipe equipe, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química-UNESP de Araraquara, pela concessão dos extratos vegetais.

Agradecimentos

As funcionárias da Microbiologia FCF-UNESP de Araraquara Edinéia, Marisa, Silvia, Margarete e Bernadete por toda ajuda, durante a realização dos experimentos e pela amizade.

A Prof^ª Dr^ª Beatriz M. M. Medeiros, Valéria, Túlio e Gustavo do Laboratório de Imunologia da FCF-UNESP de Araraquara pela ajuda e paciência durante as leituras das microplacas.

Aos funcionários da Biblioteca e do SAEPE da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela ajuda e disposição.

As funcionárias da seção de pós-graduação Laura, Sônia e Claudia, por resolverem toda a parte burocrática relacionada a relatórios, documentos, elaboração de bancas, matrícula em disciplinas, e pelo excelente trabalho

A todos os professores do programa de pós-graduação pelos conhecimentos transmitidos neste período

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, onde foi desenvolvido este projeto

A CAPES, pela bolsa auxílio concedida

A todos aqueles que de algumas formas contribuíram para realização deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE GRÁFICO	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Piperaceae	6
2.1.1 Gênero <i>Peperomia</i>	8
2.2 Metabólitos secundários	10
2.2.1 Lignananas	11
2.2.2 Policetídeos	11
2.2.3 Flavonóides	12
2.3 Atividade antimicrobiana.....	15
2.4 Antioxidantes	16

2.4.1	Cátion radical ABTS	17
2.4.2	Ácido hipocloroso (HOCl)	18
2.4.3	Taurina-cloramina.....	19
2.4.4	Radical ânion superóxido.....	19
3	JUSTIFICATIVA.....	22
4	OBJETIVOS.....	24
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	Extratos vegetais	26
5.1.1	Obtenção e procedência	26
5.1.2	Estudo fitoquímico de <i>Peperomia blanda</i>	26
5.2	Cepas bacterianas	30
5.3	Avaliações da atividade antibacteriana.....	30
5.3.1	Difusão em ágar.....	30
5.3.1.1	Padronização da suspensão bacteriana.....	30
5.3.1.2	Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo.....	30
5.3.1.3	Desenvolvimento do teste de difusão em água	31
5.4.1	Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em	

	microplacas.....	32
5.4.1.1	Leitura espectrofotométrica.....	32
5.4.1.2	Leitura utilizando resazurina.....	33
5.4.2	Determinação do potencial antioxidante.....	34
5.4.2.1	Preparo das soluções padrões.....	35
5.4.2.2	Preparo das soluções dos extratos vegetais.....	35
5.4.2.3	Atividade antioxidante total pelo ABTS ^{•+}	35
5.4.2.4	Ensaio de captura (<i>Scavenger</i>) de HOCl e da taurina-cloramina.....	37
5.4.2.5	Ensaio de captura (<i>Scavenger</i>) do ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	38
6	RESULTADOS.....	40
6.1	Determinação das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo	40
6.2	Determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar	41
6.3	Determinação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica ..	43
6.4	Determinação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador ..	52
6.5	Determinação da atividade antioxidante	55

6.5.1	Determinação atividade antioxidante total pelo ABTS ^{•+}	55
6.5.2	Determinação atividade antioxidante <i>Scavenger</i> de HOCl.....	57
6.5.3	Determinação atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) de Taurina-cloramina (TauCl).....	60
6.5.4	Determinação atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) para ânion superóxido.....	63
7	DISCUSSÃO.....	67
8	CONCLUSÕES.....	75
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Peperomia blanda</i>	09
Figura 2	Estrutura básica dos flavonóides.....	13
Figura 3	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de H ₂ O.....	17
Figura 4	Oxidação do ABTS pelo K ₂ S ₂ O ₈	18
Figura 5	Oxidação dos íons cloreto na formação de HOCl.....	18
Figura 6	Formação das cloraminas.....	19
Figura 7	Formação de ânions superóxidos (O ₂ ^{•-}) em membranas celulares.....	20
Figura 8	Estrutura das substâncias isoladas de <i>Peperomia blanda</i>	28
Figura 9	Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando leitura espectrofotométrica e resazurina como revelador.....	33
Figura 10	Estruturas moleculares dos padrões antioxidante.....	34
Figura 11	Formação do cátion radical ABTS ^{•+}	36
Figura 12	Reação de oxidação do 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	37
Figura 13	Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.....	38
Figura 14	<i>Bacillus subtilis</i> em ágar Muller Hinton.....	41

Figura 15	<i>Staphylococcus aureus</i> pelo método de diluição em microplaca.....	54
Figura 16	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios do ABTS ^{•+}	56
Figura 17	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) do HOCl com metanol.....	58
Figura 18	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) do HOCl com DMSO.....	59
Figura 19	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) da TauCl com metanol.....	61
Figura 20	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) da TauCl com DMSO.....	62
Figura 21	Os resultados de IC ₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (<i>Scavenger</i>) de ânions superóxidos com DMSO.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos isolados de espécies de <i>Peperomia</i>	13
Tabela 2	Materiais vegetais de <i>Peperomia blanda</i>	29
Tabela 3	Resultados dos antibióticos no teste de difusão em ágar.....	40
Tabela 4	Resultados em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos brutos e frações derivadas do extrato acetato de etila frente aos micro-organismos testados pelo método de difusão em agar.....	42
Tabela 5	Resultados em ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias isoladas frente aos micro-organismos testados pelo método de difusão em ágar.....	42
Tabela 6	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos e frações, pela técnica de diluição em microplaca com leitura espectrofotométrica.....	51
Tabela 7	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas, pela técnica de diluição em microplaca com leitura espectrofotométrica.....	51
Tabela 8	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos e frações, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.....	53
Tabela 9	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.....	53

Tabela 10	Valores das IC_{50} , nos ensaios de captura para os extratos vegetais, padrões, preparados em matrizes diferentes.....	65
------------------	---	-----------

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Atividade antibacteriana dos extratos brutos ActOe e etanólico para <i>S. aureus</i>	43
Gráfico 2	Atividade antibacteriana dos extratos brutos ActOe e etanólico para <i>B. subtilis</i>	43
Gráfico 3	Atividade antibacteriana dos extratos brutos ActOe e etanólico para <i>E. faecalis</i>	44
Gráfico 4	Atividade antibacteriana dos extratos brutos ActOe e etanólico para <i>E. coli</i>	44
Gráfico 5	Atividade antibacteriana dos extratos brutos ActOe e etanólico para <i>P. aeruginosa</i>	44
Gráfico 6	Atividade antibacteriana das frações para <i>S. aureus</i>	45
Gráfico 7	Atividade antibacteriana das frações para <i>B. subtilis</i>	45
Gráfico 8	Atividade antibacteriana das frações para <i>E. faecalis</i>	46
Gráfico 9	Atividade antibacteriana das frações para <i>E. coli</i>	46
Gráfico 10	Atividade antibacteriana das frações para <i>P. aeruginosa</i>	46
Gráfico 11	Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para <i>S. aureus</i>	47
Gráfico 12	Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para <i>B. subtilis</i>	47

Gráfico 13	Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para <i>E. faecalis</i>	48
Gráfico 14	Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para <i>E. coli</i>	48
Gráfico 15	Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para <i>P. aeruginosa</i>	48
Gráfico 16	Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para <i>S. aureus</i>	49
Gráfico 17	Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para <i>B. subtilis</i>	49
Gráfico 18	Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para <i>E. faecalis</i>	50
Gráfico 19	Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para <i>E.coli</i>	50
Gráfico 20	Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para <i>P. aeruginosa</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

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

AcOEt – acetato de etila

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

ATCC - *American Type Culture Collection*

CCDC - cromatografia em camada delgada comparativa

CIM - concentração inibitória mínima

Cl⁻ – íon cloreto

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CMH - caldo Müller-Hinton

DCM – diclorometano

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DPPH - 1,1- difenil-2-picrilhidrazila

EtOH – etanólico

ERO - espécies reativas de oxigênio (*reactive oxigen species*)

GSH - glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

(HO₂⁻) - hidroperoxila

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl – ácido hipocloroso

IC₅₀ – concentração inibitória para 50%

$K_2S_2O_8$ – persulfato de potássio

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

MPO - mieloperoxidase

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NaOH - hidróxido de sódio

NBT - azul de nitrotetrazólio

NH_2Cl – monocloramina

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

O_2^1 – oxigênio singlete

$O_2^{\bullet-}$ - radical superóxido

$\bullet OH$ - radical hidroxil

OCl^- - íon hipoclorito

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - tampão fosfato salina (*phosphate buffer saline*)

PMS - metassulfato de fenazina

SOD - superóxido dismutase

Tau - taurina

TauCl - taurina-cloramina

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

UFC – unidade formadora de colônia

UV – ultra-violeta

RESUMO

Peperomia blanda é uma erva rupestre, pequena que cresce em fendas de rochas, nesta espécie foi verificada a presença de componentes voláteis, associações de lignanas, flavonóides, entre outros compostos. Com o objetivo de determinar o potencial biológico de *P. blanda*, foi estudada a atividade antibacteriana e antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas de suas partes aéreas e raízes, obtidas por maceração a frio. Para determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas as técnicas de difusão em agar e microdiluição contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Para determinação do potencial antioxidante foram realizados os ensaios espectrofotométricos: radical ABTS⁺, HOCl, taurina-cloramina e ânion superóxido (O₂^{•-}), utilizando como padrões a quercetina e cisteína. Na técnica de difusão em agar, 100µL de suspensão bacteriana a concentração de 10⁸ UFC/mL foram semeadas em agar Muller-Hinton com alça de Drigalski. Discos de papel com 10 mm de diâmetros embebidos com 25µL das amostras vegetais foram dispostos na superfície dessas placas. Após incubação a 37°C por 24 horas em aerobiose foram feitas as leituras dos halos de inibição de crescimento ao redor dos discos, medidos em milímetros. No teste de microdiluição os orifícios das microplacas foram preenchidos com 80µL de caldo de Muller-Hinton, 100µL de soluções da amostra vegetal diluída seriadamente de 1000 a 12,5µg/mL e 20µL da cultura bacteriana a concentração de 10⁷ células/mL. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas sob condições de aerobiose e posteriormente determinada a leitura da absorbância em leitor de microplaca a 595nm. As amostras vegetais não apresentaram atividade contra nenhuma das bactérias testadas pelo método de difusão em agar. Nos ensaios de microdiluição as amostras apresentaram os melhores resultados contra *S. aureus*, sendo que os policetídeos com CIM = 87,5 µg/mL, lignanas com CIM = 175 µg/mL e flavonóides com CIM > 350 µg/mL. Como controles foram utilizados ciprofloxacino a 35µg/mL e DMSO a 5%. Para atividade antioxidante a fração diclorometânica apresentou IC₅₀ de 7,47 µg/mL, 27,38µg/mL e 77,34µg/mL para radical ABTS⁺, HOCl e taurina-cloramina respectivamente. Estes resultados indicam que *P. blanda* contém compostos com atividade em relação as bactérias testadas, antibacteriana, e antioxidante o que torna relevante a continuidade dos estudos na determinação das propriedades biológicas nesta espécie vegetal.

Palavras-chave: *Peperomia blanda*, difusão em ágar, microdiluição, antioxidante

ABSTRACT

The species of *Peperomia blanda* is a perennial herb, which grows in small rocks crevices that showed the presence of volatile components, associations of lignans, flavonoids and other compounds. In order to determine the biological potential of *P. blanda*, we studied the antibacterial and antioxidant activity of extracts, fractions and compounds isolated from its aerial parts and roots, obtained by cold maceration. For determination the antibacterial activity was used agar diffusion and microdilution against strains Gram-positive and Gram-negative. For determination of antioxidant potential were performed spectrophotometric assay: ABTS⁺ radical, HOCl, taurinechloroamine and superoxide anions (O₂^{•-}), using quercetin and cysteine as standards. In agar diffusion assay, 100 µL of bacterial suspension in the concentration of 10⁸ CFU/mL were placed on Mueller-Hinton agar with Drigalski. Paper disks with 10 mm in diameter embedded with 25µL samples of vegetables were placed on the surface of these plates. After incubation at 37°C for 24 hours under aerobic conditions were made the readings of the halos of growth inhibition around the disks, measured in millimeters. In the microdilution assay of the microdilutions were filled with 80µL broth Muller-Hinton, 100 µL of the solution plant sample serially diluted from 1000 to 12.5 µg/mL and 20µL of bacterial culture concentration of 10⁷ cells/mL. The microplates were incubated at 37°C for 24 hours under aerobic conditions and thereafter determined reading the absorbance in a microplate reader 595nm. The plant samples did not show any activity against the bacteria tested using agar diffusion. Microdilution bioassay the samples showed the best results against *S. aureus*, and the polyketides with MIC = 87.5 µg/mL, lignans with MIC = 175 µg/mL and flavonoids with MIC > 350 µg/mL. As controls were used to ciprofloxacin 35µg/mL and DMSO 5%. For antioxidant activity dichlorometanic fraction showed IC₅₀ of 7.47, 27.38 and 77.34 µg / mL for radical ABTS⁺, and HOCl taurinacloroamina respectively. These results indicate that *P. blanda* contains compounds with antibacterial and antioxidant making it relevant for further study in determining the biological properties of this plant species.

Key words: *Peperomia blanda*, agar diffusion, microdilution, antioxidant



Introdução

1 - Introdução

Historicamente, as plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade na medicina tradicional desde o início de nossa civilização. Após a identificação de espécies e de gêneros que se adequavam ao uso medicinal, surgiram as técnicas de extração, secagem das folhas e raízes, trituração de sementes e técnicas de conservação que configuraram um corpo teórico-prático do conhecimento que constituía a medicina do homem primitivo. Esse processo foi lento e longo, no qual a intuição aliada ao ensaio, vagarosamente converteu a experiência do saber em memória coletiva (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produto de origem econômica, dentre eles destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos, originados de recursos genéticos vegetais (SIMÕES et al., 2000).

Apesar da ênfase dada nas pesquisas iniciais em fármacos sintéticos, certo interesse em plantas medicinais tem renascido em parte devido ao fato de muitos fármacos sintéticos serem potencialmente tóxicos e não estão livres dos efeitos secundários no paciente (MAREGESI et al., 2008).

Plantas medicinais são bem conhecidas como fontes naturais para o tratamento de várias doenças desde a antiguidade. Mais de 20.000 espécies de plantas usadas para propostas medicinais são relatados pela organização mundial da saúde (OMS) (GULLECE et al., 2006). Produtos naturais, composto puro ou como extratos de plantas padronizados, promovem oportunidades sem limites para condução de novos fármacos, devido à disponibilidade inigualável da diversidade química (COS et al., 2006).

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (DUARTE et al., 2007).

Substâncias químicas, derivadas de espécies de plantas diferentes, podem ser consideradas como drogas importantes. Exemplos bem conhecidos desta estratégia incluem os glicosídeos cardiotônicos de *Digitalis purpurea*, os anti-hipertensivos e agentes tranquilizantes como reserpina da espécie indiana *Rauwolfia serpentina*, o antimalárico quinina isolados de *Chincona spp* (NEWMAN, 2000), e o extrato de Kava-kava, como é conhecida a *Piper methycticum*, como medicamento ansiolítico (RICE - EVANS, 1996).

Piper nigrum (pimenta preta), cujos frutos constituem um dos mais importantes e utilizados condimentos do mundo, é conhecida por apresentar atividade antifúngica devido a presença de lactonas, terpenóides, alcalóides e saponinas (COWAN, 1999).

Nos dias de hoje, embora o foco da indústria farmacêutica seja a síntese combinatória, a química de produtos naturais continua sendo a base para investigação de novas drogas (PHILLIPSON, 2001; ORTHOLAND, 2004). O potencial risco de intoxicações justifica cuidados especiais na preparação e consumo de plantas medicinais. A obediência as dosagens prescritas e o cuidado na identificação precisa do material utilizado podem evitar uma série de acidentes (LORENZI et al., 2002).

As plantas medicinais podem ser utilizadas como misturas complexas, contendo todos os constituintes presentes no vegetal, extraídos sob a forma de infusão, óleos essenciais, tinturas e extratos, ou podem ainda ser utilizadas também para fornecer os princípios ativos quimicamente puros. A atividade farmacológica apresentada por uma planta é, portanto, resultado da ação de uma substância natural ou de várias substâncias presentes nos fitoterápicos (CARBONEZI, 1998). Tais substâncias são quimicamente muito variadas como, por exemplo: isoflavonóides, amidas, cumarinas, poliacetilenos contra fungos, terpenos e flavomóides contra insetos e bactérias, alcalóides tóxicos que agem como defesa contra herbívoros (COWAN, 1999).

No Brasil existe uma flora bastante diversificada, em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos. De um modo geral, as matas nativas são as maiores representações da riqueza de espécies da flora brasileira. O âmbito dessa extensão continental

abrange desde regiões equatoriais ao norte até áreas extratropicais ao sul, diferenciadas climática e geomorfologicamente, com uma extraordinária diversidade ecológica (NAPOLITANO et al., 2005). A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos (GUERRA e NODARI, 2003).



Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 – Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem *Piperales*, que é considerada como uma das mais primitivas plantas tropicais e subtropicais entre as Angiospermas. Esta família compreende 14 gêneros e aproximadamente 1950 espécies, sendo que os predominantes da América do Sul são: *Piper*, *Potomorphe*, *Sarcorrhachis*, *Trianoepiper* e *Peperomia* (TAYLOR & HICKEY, 1992).

No Brasil, a família Piperaceae é representada por cinco gêneros, sendo que a maioria desses exemplares são arbustos ou trepadeiras, e raramente são árvores. Os principais componentes desta família são os fenilpropanóides (VELOZO et al., 2006; FELIPPE et al., 2008), lignanas (MONACHE & COMPAGNONE, 1996), alcalóides (DODSON et al., 2000), ácido benzóico e derivados (BERGAMO et al., 2005; MORANDIM et al., 2005).

Espécies de Piperaceae é bastante utilizada na alimentação, em inseticidas (NAVICKIENE et al., 2003), e também na medicina tradicional devido ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos biologicamente ativos, tais como as amidas (NAVICKIENE et al., 2000), substâncias de baixo peso molecular, pironas e flavonóides (DANELUTTE et al., 2003; VELOZO et al., 2009), fenilpropanóides e cromenos (BALDOQUI et al., 1999; LAGO et al., 2004, MORANDIM et al., 2005; VELOZO et al., 2006), lignóides (MARTINS et al., 2003, FELIPPE et al., 2008) e outros metabólitos de biossíntese mista.

O gênero *Piper* é composto por aproximadamente 1000 espécies de vegetação característica, sendo frequentemente encontrados como vegetação secundária de florestas tropicais das Américas e Ásia. A maioria das espécies são arbustos de crescimento rápido e muitos deles apresentam conhecidas atividades antiséptica, inseticida e antimicrobiana (NAVICKIENE et al., 2006; DE MORAIS et al., 2007; FAZOLIN et al., 2007; DUARTE et al., 2007). Do ponto de vista fitoquímico tem sido detectado quantidades razoáveis de safrol, dilapiol,

miristicino e derivados similares a metilenodioxifenil nestas espécies vegetais, como compostos bioativos (GUERRINI et al., 2009).

Uma investigação de algumas espécies, tais como, *P. aduncum* (BALDOQUI et al., 1999) e *P. hispidum* (ALÉCIO et al., 1998), foram isolados derivados do ácido benzóico e amido pirrolidona e identificado como composto citotóxico e antifúngico respectivamente (MARTINS et al., 2000).

Segundo GUERRINI et al, (2009), óleos essenciais isolados de *P. aduncum* e *P. obliquum* apresentaram atividade contra bactérias Gam-positivas e negativas, sendo a melhor atividade obtida frente a *E.coli* com concentração inibitória mínima (CIM)= 230µg/mL. Nenhum dos óleos essenciais foram ativos nos ensaios de *scavenger* de ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila) na concentração de 20 µg/mL.

A espécie *Piper betle* é conhecida por apresentar atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, e pomadas preparadas com extratos de folhas preveniram o crescimento de *S. aureus*, *Streptococcus β* – hemolítico do grupo A e dermatófitos (WIROTESANGTHONG et al, 2008). Chás preparados a partir das folhas de *Piper betle* apresentaram atividade antioxidante contra os radicais DPPH, hidroxil ([•]OH) e superóxido (O₂^{•-}), com capacidade antioxidante total equivalente ao ácido ascórbico e ácido gálico. (DASGUPTA & DE BRATATI, 2004).

HOLETZ et al., (2002) em uma pesquisa de plantas medicinais brasileiras relataram atividade antimicrobiana do extrato aquoso-etanólico das folhas de *Piper regnelli* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Além disso, PESSINI et al., (2003) avaliando a atividade antibacteriana das fração hexânicas e clorofórmicas das folhas de *Piper regnelli*, demonstraram boa atividade contra bactérias Gram-positivas e baixa atividades contra bactérias Gram-negativas. Já as frações de acetona, metanol (MeOH), MeOH/água e clorofórmio/ acetato de etila (AcOEt), não apresentaram nenhuma atividade tanto para as Gram-positivas quanto para as Gram-negativas.

MAREGESI et al., (2008) encontraram forte atividade contra bactérias Gram-positivas, principalmente *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* em extratos *n*-hexano da casca da raiz de *Elaeodendron achlechteranum*.

LOPEZ et al., (2001) verificaram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos das folhas de *P. lanceafolium*, plantas colombianas, contra *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, e *Staphylococcus aureus* com significantes zonas de inibição.

2.1.1 – Gênero *Peperomia*

Por apresentar uma folhagem vistosa, as espécies da *Peperomia* são utilizadas como plantas ornamentais. As folhas são também amplamente utilizadas na medicina para tratamento de inflamações, asma, úlceras gástrica, por suas atividades analgésica, fungicida e antibacteriana (ARRIGONI-BLANK et al., 2004).

O gênero *Peperomia* representa um dos gêneros mais importantes da família Piperaceae. Possui 3100 espécies, sendo que 710 são epífitas (ZOGHBI et al., 2005). A maioria das espécies de *Peperomia* apresenta folhas providas de tecido especializado em reservar água, e essa alta capacidade de armazenar água possibilita sobrevivência nos períodos de seca, dos quais espécies de hábitos epifíticos são submetidas com frequência (TAKEMORI et al., 2003). Dentre as várias espécies pertencentes a este gênero, *Peperomia blanda* vem sendo estudada quanto a sua composição química e característica biológica.

Algumas atividades biológicas foram encontradas em compostos isolados do gênero de *Peperomia*. Como a presença de fenóis com atividade antiparasitária de *P. galioides* (MAHIOU et al., 1995, 1996), e extratos das partes aéreas de *P. pellucida* com atividade analgésica em camundongos (AZIBA et al., 2001).

Peperomia blanda conhecida como erva jaboti (VELOZO, 2009), é uma erva rupestre, tomentosa, pequena que cresce em fendas de rochas (Figura 1). São encontradas nas Antilhas e na América do Sul, e no Brasil é encontrado nos

estados de Roraima, Goiás (Brasília - DF), Ceará, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004). Estudos químicos com esta espécie demonstram a presença de componentes voláteis (GUERRINI *et al.*, 2009), bem como a associação de lignanas com atividade antiprotozoária (MARTINS *et al.*, 2003) e cromenos isolados com atividade antifúngica e antitumoral (BALDOQUI *et al.*, 1999; LAGO *et al.*, 2004; VELOZO *et al.*, 2006). Esta espécie também tem sido exaustivamente investigada com fonte de novos produtos como potencial antimicrobiano e atividades inseticidas (MIN *et al.*, 2004; KONISHI *et al.*, 2005; SACCHETTI *et al.*, 2005).



<http://upload.wikimedia.org>

Figura 1: *Peperomia blanda*

Investigações fitoquímicas anteriores em diferentes espécies de *Peperomia* tem mostrado a presença de flavonóides (AQUIL *et al.*, 1993; VELOZO *et al.*, 2009), derivados benzopiranos (SEERAM *et al.*, 1998; SALAZAR *et al.*, 2005), secolignanas (MONACHE & COMPAGNONE, 1996; GOVINDACHARI *et al.*, 1998), terpenos, arilpropanóides, compostos fenólicos (BAYMA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003) e óleos essenciais (SILVA *et al.*, 1999; ZOGHBI *et al.*, 2005).

Significantes atividades têm sido relatadas para os derivados de lignanas isoladas das Piperaceae (MARTINS *et al.*, 2003; LUIZE *et al.*, 2006). Em

estudos precedentes com extratos de média polaridade de partes aéreas de *Peperomia blanda* foram encontrados flavonóides e lignanas tetraidrofurâncias (FELIPPE et al., 2008), esta primeiramente isolada de *Litsea grandis* (HOLLOWAY & SCHEINMANN, 1974) e *Peperomia sui* (CHENG et al., 2003) que apresentam atividade biológica frente às formas tripomastigotas (LOPES et al., 1998) e epimastigota de cepa Y (FELIPPE et al., 2008) de *Trypanosoma cruzi*.

Dois novos flavonóides isolados por VELOZO et al., (2009) de *Peperomia blanda*, são exemplo de C – glicosil flavona, uma classe de compostos raramente encontrados em plantas da família Piperaceae, que usualmente produzem flavonóides não glicosídicos e O – glicosídicos.

2.2 – Metabólitos secundários

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

O metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores que apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto no metabolismo secundário, como por exemplo, sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura e altitude, entre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Em geral os extratos de plantas contêm baixas concentrações de compostos ativos e um elevado número de compostos

promissores, requerendo o uso de bioensaios sensíveis para avaliar uma ampla variedade química e pequenas quantidades de amostras. Estes ensaios devem ser simples, reprodutíveis, rápidos e de baixo custo (SOUZA BRITO, 1996).

2.2.1 – Lignanas

As lignóides são substâncias que se depositam nas paredes das células vegetais, conferindo rigidez. Representam de 15-35% da matéria seca dos troncos de gimnospermas e angiospermas arborescentes. São macromoléculas, polímeros de unidades básicas C6 – C3, abrangendo, usualmente muitas unidades fenilpropânicas. Mais de 500 lignóides estão relatados na literatura. Deste total 90% pertencem ao grupo das lignanas e neolignanas (SIMÕES, 2003).

Os lignóides subdividem-se em lignanas que são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcool cinâmico entre si ou destes com ácido cinâmico; neolignanas que são dímeros oxidativos de alil fenóis e de propil fenóis, entre si ou cruzados e não apresentam carbono gama (C γ); oligolignóides que são os oligômeros de lignóides, ou seja, os produtos resultantes de condensação de três a cinco unidades fenilpropanoídicas.

O caminho biossintético dos arilpropanóides, precursores primários dos lignóides, desenvolvem-se a partir da fenilalanina ou da tirosina, pela via redutora, que envolve a formação de ácido cinâmico, aldeído cinâmico e alcoois cinâmicos (SIMÕES, 2003).

2.2.2 – Policetídeos

A via do acetato-malonato é uma das seqüências reacionais que conduz à produção de substâncias com estruturas moleculares contendo anéis aromáticos. Policetídeos, substâncias formadas pela condensação de uma unidade de acetil-CoA como iniciadora do processo biossintético e várias unidades de malonil-CoA para alongamento da cadeia, dominam a aleloquímica (JUNIOR, 2002).

Organismos são sujeitos a ataque por predadores e podem produzir substâncias aleloquímicas para sua proteção. Algas, por exemplo, contêm policetídeos e sesquiterpenóides defensivos. Os primeiros são gerados pela condensação de unidades acetato, um processo do metabolismo primário que leva principalmente a ácidos graxos (JUNIOR, 2002; SATA, 2005).

Esponjas do gênero *Plakortis* têm provado serem uma rica fonte de policetídeos. Estes compostos têm mostrado um amplo espectro de atividades biológicas tais como antibacteriana, leishmanicida e citotóxica (SATA, 2005).

Outros produtos naturais marinhos têm apresentado atividade farmacológica, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista (PINTO, 2002).

2.2.3 – Flavonóides

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular, derivados de benzo-g-pironas (HEIM et al., 2002). Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (Figura 2). Entretanto esta definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, que fazem parte de outras classes de metabólitos. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos e amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES, 2004). As principais categorias estruturais gerais são as flavonas, as flavanonas, os flavonóis, as antocianidinas e as isoflavonas, em alguns casos o anel heterocíclico de seis membros é substituído por um anel de cinco (auronas) ou aparece uma forma isomérica de cadeia aberta (chalconas). (ROBBERS, 1997).

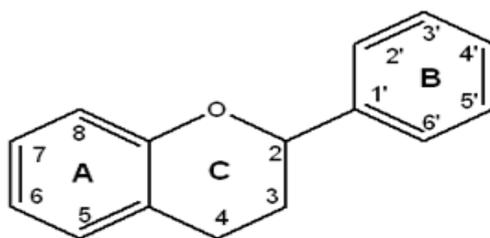


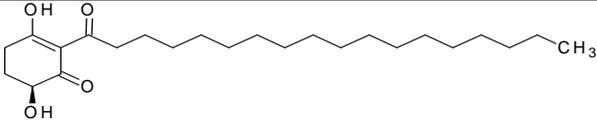
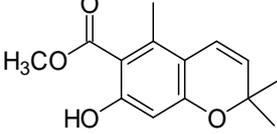
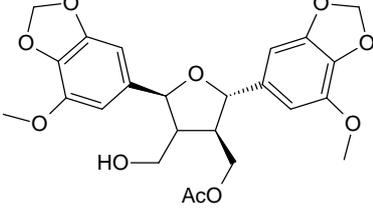
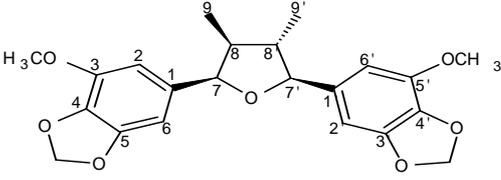
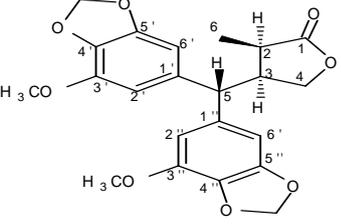
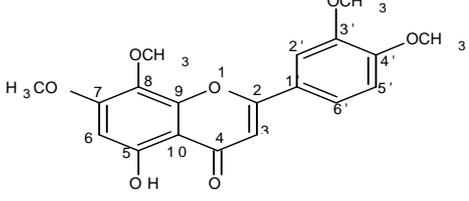
Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides apresentam propensão em inibir radicais livres devido suas estruturas químicas, baseadas em seu núcleos, posições e tipos de substituintes que influenciam na atividade antioxidante (HEIM et al., 2002). São conhecidos por exercerem uma infinidade de propriedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica e antiúlcera (SIMOES, 2003).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Os encontrados nas folhas dos vegetais podem ser diferentes daquelas presentes nas flores, nos caule, raízes ou frutos, o mesmo composto ainda ocorre em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES, 2003).

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados de espécies de *Peperomia*.

Classe	Estrutura	Espécie	Referência
Flavonóide	<p>acacetina</p>	<i>Peperomia pellucida</i>	AQUIL et al., 1993
Secolignana	<p>peperomina A</p>	<i>Peperomia glabella</i>	MONACHE & COMPAGNONE, 1996

Policetídeo	 <p style="text-align: center;">proctoriona B</p>	<i>Peperomia proctorii</i>	SEERAM et al., 2000
Cromeno	 <p style="text-align: center;">metil 7-hidroxi-5- metil-2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxilado</p>	<i>Peperomia villipetiola</i>	SALAZAR et al., 2005
Lignana tetraidrofurânica	 <p style="text-align: center;">7,7'-bis(5-metoxi-3,4-metilenodioxifenil)-8-acetoximetil-8'-hidroximetiltetraidrofuranica</p>	<i>Peperomia dindygulensis</i>	WU et al., 2005
Lignana tetraidrofurânica	 <p style="text-align: center;"><i>rel</i>-(7<i>R</i>,8<i>S</i>,7'<i>S</i>,8'<i>S</i>)-4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana</p>	<i>Peperomia blanda</i>	FELIPPE et al., 2008
Seco-lignana	 <p style="text-align: center;">(2<i>R</i>,3<i>S</i>)-2-metil-3-[bis(3',4'-metilenodioxi-5'-metoxifenil)metil]butirolactona</p>	<i>Peperomia blanda</i>	FELIPPE et al., 2008
Flavona	 <p style="text-align: center;">5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona</p>	<i>Peperomia blanda</i>	FELIPPE et al., 2008

2.3 – Atividade antimicrobiana

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

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

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

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

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

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

2.4 - Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que impedem ou diminuem a oxidação de outras moléculas, inibindo a iniciação ou a propagação de reações de oxidação (VELIOGLU, 1998). Entre eles estão os compostos fenólicos que são antioxidantes primários e agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza, com destaque aos derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico, bem como os flavonóides (DEGASPARI, 2004).

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL, 1992).

Radical livre não é o termo correto para designar todos os agentes reativos potencialmente patogênicos, de origem endógena (intracelular) ou xenobióticos, pois nem todos apresentam elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Assim podem-se denominar estes agentes, como por exemplo, aqueles que originam-se do metabolismo do O_2 , como espécies reativas do oxigênio (ERO) (FERREIRA & MATSUBARA 1997).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente (quatro elétrons), resultando na formação de H_2O . Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria (Figura 3), durante esse processo também são formados intermediários reativos, como os radicais ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($^{\bullet}OH$), e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (FERREIRA & MATSUBARA 1997).

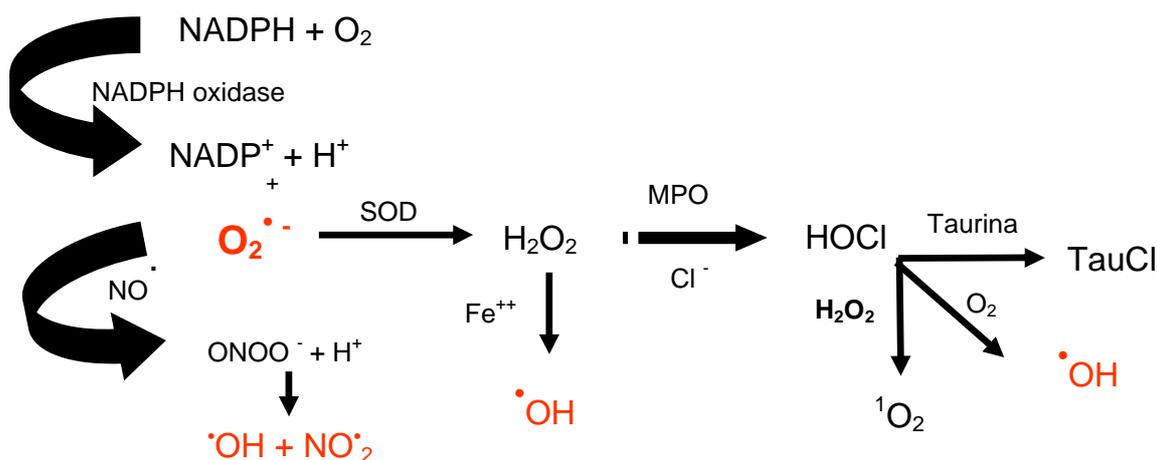


Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de H_2O .

O H_2O_2 é formado por dismutação espontânea ou por ação da superóxido dismutase (SOD) a partir do $\text{O}_2^{\bullet -}$, a remoção do H_2O_2 ocorre por ação de enzimas antioxidantes, como a catalase. Em células como os polimorfonucleares neutrófilos o H_2O_2 reage com a enzima mieloperoxidase (MPO) originando o intermediário redox MPO I. Este oxida o íon cloreto (Cl^-) formando o HOCl (HAMPTON et al., 1998).

A elevação na produção de ERO, ou deficiência na defesa antioxidante leva ao estresse oxidativo, na qual as espécies reativas podem produzir danos celulares, tais como a lipoperoxidação das membranas, havendo assim um desequilíbrio entre o consumo de glutathiona reduzida (GHS) e a produção de glutathiona oxidada (GSSG) (HALLIWELL, 1993).

2.4.1 - Cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet +}$

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante é via a captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet +}$, o qual pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Fig. 4). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

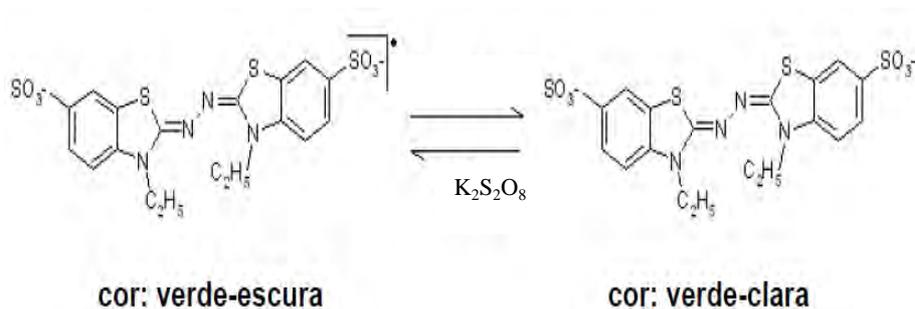


Figura 4: Oxidação do ABTS pelo $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

2.4.2 - Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl, ou a sua forma dissociada, hipoclorito (OCl^-), é um potente oxidante e agente microbicida, que reage com muitas biomoléculas, como proteínas, aminoácidos, lipídeos, ácidos nucleicos, vitaminas (JENNER *et al.*, 2002,) tióis, tioésteres e ascorbato (VELLOSA, 2007) e outras ERO, tais como oxigênio singlete (O_2^{\bullet}) e radical hidroxil (OH^{\bullet}). É formado pela oxidação de Cl^- , catalisada pela MPO em presença de H_2O_2 (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996; VELLOSA, 2007).

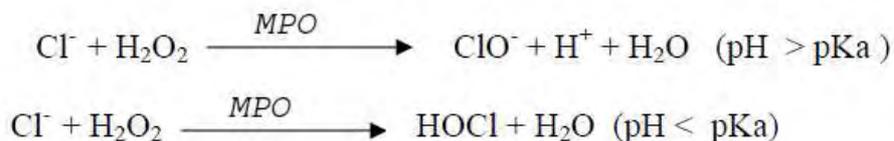


Figura 5: Oxidação dos íons cloreto na formação de HOCl

O HOCl modifica lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A exposição da LDL ao HOCl causa oxidação nos seus resíduos de triptofano e tirosina e outros lipídeos, contribuindo assim com o desenvolvimento da aterogênese (JERLICH *et al.*, 1998). Apresenta, contudo uma ação protetora, à medida que participa do processo de destruição de micro-organismos, mas ao mesmo tempo pode agredir os tecidos, pois nem células de mamíferos nem de bactérias podem detoxicar o HOCl por via catalítica. (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

2.4.3 – Taurina-cloramina (TauCl)

As cloraminas são produtos da reação entre o HOCl e o grupo NH₂ de aminoácidos (KHALIL, 2005). São oxidantes mais estáveis e menos tóxicos que o HOCl e “in vivo” um dos produtos desta reação é a formação de TauCl (TauCl)(BABIOR, 2000).

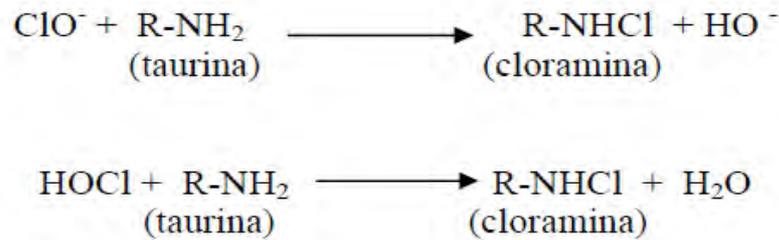


Figura 6: Formação das cloraminas

As Cloraminas podem ter curta ou longa duração, apresentar caráter lipofílico ou hidrofílico, sendo que aquelas lipofílicas de longa duração difundem-se através da membrana plasmática com maior facilidade, gerando danos oxidativos a grandes variedades de biomoléculas (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). As monocloraminas (NH₂Cl) estão diretamente relacionadas com injúrias gástricas, observadas na presença de *Helicobacter pylori*, que geram elevadas quantidades de amônia (SUZUKI, 1992) e ativam os neutrófilos produtores de HOCl (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996) os quais reagem com aminoácido taurina formando TauCl.

2.4.4 – Radical ânion superóxido

O radical superóxido (O₂^{•-}) ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL, 1990), é formado pela redução mono eletrônica do oxigênio (Figura 7). Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido descritas lesões em sistemas biológicos secundária a sistemas geradores de O₂^{•-} (FERREIRA & MATSUBARA 1997).

O $O_2^{\bullet-}$ é o mais comum e abundante na célula. Sua formação ocorre a partir da redução parcial do oxigênio molecular por um elétron. É um produto de cadeia transportadora de elétrons ou da ação de fagócitos para defesa bactericida (DIAZ et al, 1998).

Um rápido aumento do metabolismo dos carboidratos pela via das pentoses fosfato (HENDERSON & CHAPPLE, 1996), associado a um aumento do consumo de O_2 , e sob ação da NADPH oxidase, produz o $O_2^{\bullet-}$, caracterizando o termo explosão oxidativa (KHALIL, 2005).

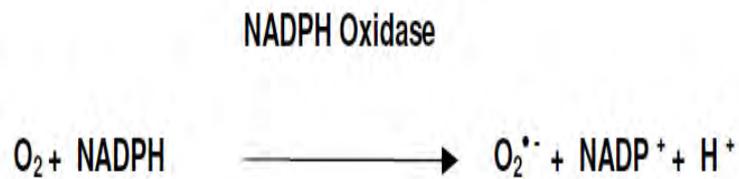


Figura 7: Formação de ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) em membranas celulares.



Justificativa

3 – Justificativa

As plantas têm desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos por muitos anos, pois elas têm sido utilizadas como fontes de produtos naturais biologicamente ativos. Estima-se atualmente que estes produtos estejam envolvidos no desenvolvimento de aproximadamente 44% de todas os novos fármacos prescritos (MALLAVARAPU, 2001).

Os produtos naturais de origem vegetal constituem uma estratégia importante para a inovação farmacêutica e a competitividade do setor, tendo em vista a singularidade dessas substâncias e suas aplicações, bem como, por seu papel como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos. Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses micro-organismos. Assim, apesar do grande número de produtos de plantas já conhecidos, a probabilidade de se identificar novos metabólitos bioativos de fontes vegetais apresenta-se ainda hoje irrevogável (OLIVEIRA & BRAGA, 2003).

Diversos estudos botânicos, químicos, farmacológicos e ecológicos vêm sendo realizados, e cada vez mais demonstra-se e justifica-se a importância e o potencial da flora brasileira. Plantas da família Piperaceae, que são naturais do Bioma – Cerrado do Estado de São Paulo apresentam compostos com potencial atividade biológica, o que as tornam alvos potenciais para estudos.

A caracterização biológica de substâncias puras e/ou extratos vegetais, com atividade antimicrobiana é de extrema relevância bem como a determinação de suas propriedades antioxidantes.



Objetivo

4 – Objetivos

O objetivo do presente estudo é determinar a atividade biológica de plantas da espécie *Peperomia blanda* (Piperaceae). Para esta caracterização foram realizados testes para avaliar:

1. Atividade antibacteriana utilizando as cepas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.
 2. Atividade antioxidante, utilizando como modelos o radical ABTS^{•+}, o radical superóxido (O₂^{•-}), e as espécies reativas do ácido hipocloroso e taurina-cloranimina.
-



Material e Métodos

5 - Material e Métodos

5.1 - Extratos vegetais

5.1.1 - Obtenção e procedência

Foram estudados os extratos brutos, quatro frações e nove substâncias puras, (lignanas, policetídeos e flavonóides) da planta *Peperomia blanda* que são apresentadas na Tabela 2. Obtidas e cedidas pela Profa. Dra. Maysa Furlan, coordenadora do laboratório Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NUBBE) – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

As partes aéreas de *Peperomia blanda* foram coletadas na Reserva Ecológica da Ripasa, no município de Araraquara – SP, Brasil como parte da tese de doutorado de Lidiane Gaspareto Felipe, o qual foi identificado previamente pela Dra. Elsie Franklin Guimaraes, sendo que a exsicata está depositada no Instituto de Biociência da USP, São Paulo (Kato-547).

5.1.2 - Estudo fitoquímico de *Peperomia blanda*

As partes aéreas de *Peperomia blanda* foram secas em estufa a 40°C e trituradas em moinho pequeno. Posteriormente trituradas e submetidas à extração com acetato de etila, por maceração. O extrato obtido foi dissolvido em MeOH:H₂O na proporção 8:2 e a solução obtida foi colocada em um funil de separação.

Foi realizada extração líquido-líquido com hexano e a solução obtida na extração foi concentrada em rotaevaporador. A fração MeOH:H₂O restante foi então extraída com CH₂Cl₂ e concentrada em rotaevaporador. Por último a fração MeOH:H₂O foi extraída com AcOEt e concentrada em rotaevaporador. A fração hidroalcoólica foi concentrada em rotaevaporador.

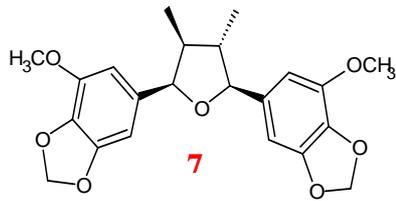
Através do estudo fitoquímico da fração CH₂Cl₂, a qual foi submetida a uma CC de sílica gel 60 de 20 cm de altura e 6 cm de diâmetro eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex → 100%

AcOEt), sendo coletadas 20 frações de 600 mL. As frações obtidas foram analisadas por CCDC utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (1:1) e agrupadas de acordo com seus R_f , resultando 17 frações.

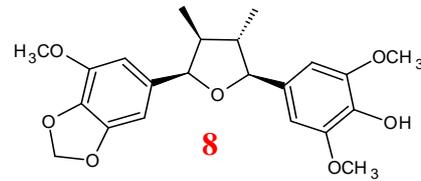
A fração 4 foi identificada como a substância **7** previamente isolada (Figura 8). A fração 5 foi submetida a uma coluna de sílica de 27 cm de altura e 4 cm de diâmetro eluída com Hex:AcOEt, em proporções crescentes de polaridade (100% Hex \rightarrow 100% AcOEt), obtendo-se 125 frações que foram analisadas por CCDC utilizando como fase móvel Hex:AcOEt (6:4) e agrupadas de acordo com seus R_f , resultando em 13 frações. A subfração 5-3 foi identificada como sendo a substância **8**. A subfração 5-4 foi fracionada em CLAE preparativo, originando 5 frações na qual a fração 5-4-1 foi identificada como sendo a substância **9** e a fração 5-4-5 como sendo a substância **10** e fração (7-49-4) como sendo as substâncias **14** e **15**. Finalmente a subfração 5-6 foi identificada como sendo a substância **11**.

As frações 5 e 8 apresentaram precipitados amarelos, os quais foram separados por centrifugação e posteriormente recristalizados em metanol, sendo identificados respectivamente como as substâncias **12** e **13**. As estruturas isoladas das partes aéreas de *Peperomia blanda* estão ilustradas na figura 8.

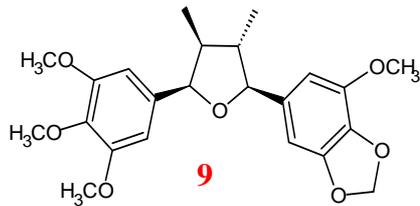
Figura 8: Estrutura das substâncias isoladas de *Peperomia blanda*



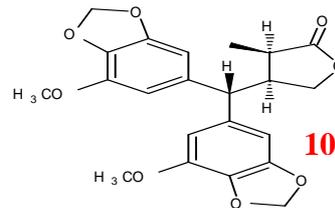
rel-(7S,8S,7'S,8'S)-4,5,4',5'-dimetilenodioxi-3,3'-dimetoxi-7,7'-enoxilignana



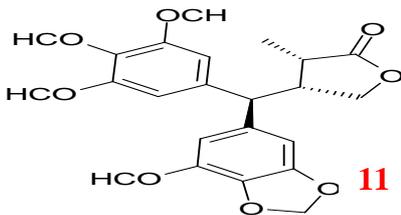
rel-(7R,8S,7'S,8'S)-4-hidroxi-4',5'-metilenodioxi-3,5,3'-trimetoxi-7,7'-enoxilignana



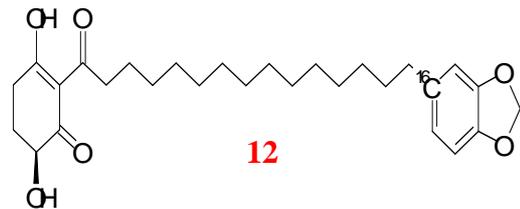
rel-(7R,8S,7'S,8'S)-4',5'-metilenodioxi-3,4,5,3'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana



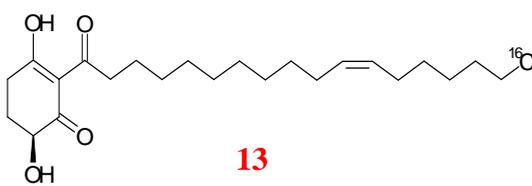
(2S,3R)-2-metil-3-[bis(4'5'-metilenodioxi-3'-metoxifenil)metil]butirolactona



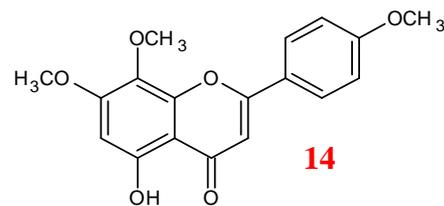
(2S,3R,5R)-2-metil-3-[5-(3',4',5'-trimetoxifenil)-5-(4'',5''-metilenodioxi-3''-metoxifenil)metil]butirolactona



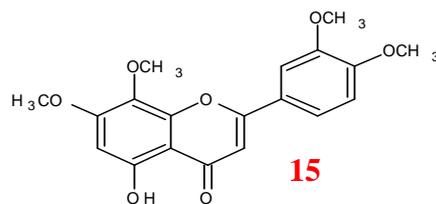
Surinona A



Proctiona C



5-hidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona



5-hidroxi-3',4',7,8-terametoxiflavona

Tabela 2: Materiais vegetais de *Peperomia blanda*

Composto	Nome/código	Extrato Bruto	Fração	Substância Pura	Massa (mg)
1	Acetato de etila	X			10,0
2	Etanólico	X			10,0
3	Diclorometano		X		11,0
4	Hexano		X		10,0
5	Acetato de etila		X		10,0
6	Hidroalcoolica		X		10,0
7	Lignana tetraidrofurânica			X	0,7
8	Lignana tetraidrofurânica			X	0,8
9	Lignana tetraidrofurânica			X	2,2
10	Secolignanas			X	0,9
11	Secolignanas			X	1,3
12	Policetídeos			X	0,7
13	Policetídeos			X	0,8
14	Flavona			X	1,1
15	Flavona			X	1,2

5.2 - Cepas bacterianas

Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659, e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os estoques bacterianos foram mantidos a -20°C em glicerol/caldo Müller-Hinton (CMH) (v/v), até o momento do uso.

5.3 - Avaliações da atividade antibacteriana

5.3.1 – Difusão em ágar

5.3.1.1 - Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24 horas, em tampão fosfato – salino (PBS) estéril até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). A concentração final de bactérias foi determinada espectrofotometricamente estabelecendo a leitura em 0,08 a 0,10 a 625nm que corresponde população bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Posteriormente, para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1/10 em tubo, obtendo-se uma suspensão de 10^7 UFC/mL (SANCHES, 2004).

5.3.1.2 – Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo

Foi utilizada como controle positivo a ampicilina para *Staphylococcus aureus*, vancomicina para *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Foram

preparadas soluções de 5mg/mL (solução A: 1 mg em 200µL de água destilada), em seguida estas soluções foram diluídas 1/100 em água destilada (solução B: 0,05mg/mL), e por fim a solução B foi diluída 1/10 em CMH, obtendo-se uma concentração final de 5 µg/mL.

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

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

Uma solução de cloridrato de ciprofloxacino foi preparada a concentração final de 35µg/mL.

5.3.1.3 – Desenvolvimento do teste de difusão em ágar

Semeou-se 100µL de suspensão de crescimento bacteriana, concentração de 10^8 UFC/mL em ágar Müller Hinton com alça de Drigalski. Discos de papel (Whatman nº1) com 6 mm de diâmetro foram embebidos com 25µL dos extratos vegetais e/ou substâncias puras nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125µg/mL, bem como com 25µL dos controles positivo e negativo. Os discos de papel foram colocados na superfície das placas de Petri, contendo o inóculo. As placas foram incubadas por duas horas em geladeira para garantir a difusão das amostras vegetais e em seguida incubadas em aerobiose a 37°C durante 24 horas. Após incubação foram feitas medidas em milímetros dos halos de inibição formados ao redor do disco (MURRAY et al., 2007).

5.4.1 - Determinação da atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas

Os ensaios foram desenvolvidos segundo ELLOF, 1998; NCCLS, 2003. O extrato bruto e as frações vegetais foram preparados inicialmente na concentração de 2000µg/mL em solução com 10% de DMSO (dimetilsulfóxido)

em CMH, as substâncias puras foram preparadas em solução estoque de concentração 350 µg/mL, utilizando 10% de DMSO em CMH. O teste foi realizado utilizando os 96 orifícios das microplacas (Figura 9). Aos poços das linhas de A até H das colunas 1 a 12 foram adicionados 80µL de CMH. Nas colunas 3 e 10, linha A a H foram adicionados 100µL da solução-estoque do controle positivo e negativo, respectivamente. Aos orifícios das colunas de 4 a 9 (divididas em duas substâncias em triplicata), linha A foram adicionados 100µL dos extratos vegetais, ou frações, ou substâncias puras, após homogeneização foram realizadas diluições sucessivas de base 2, passando 100µL de cada orifício até a linha H. Obtendo um volume final de 80µL nos orifícios das microplacas com as concentrações finais das amostras vegetais variando de 1000µg/mL a 7,81µg/mL para os extratos e frações e de 350µg/mL a 3,81µg/mL para as substâncias puras. Aos orifícios das colunas 11 e 12, linha A foram adicionados 100µL das amostras vegetais que sendo a homogeneização idêntica aos das colunas 4 a 9.

Subseqüentemente foi adicionado 20µL da suspensão bacteriana de 10^7 UFC/mL em cada orifício, exceto nos orifícios da coluna 1 (branco) e nos orifícios de controle do extrato (colunas 11 e 12). As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Cada extrato ou substância foi testado em triplicata na mesma microplaca.

5.4.1.1 - Leitura espectrofotométrica

Após incubação as microplacas foram submetidas à leitura no leitor de microplacas a 595nm. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência turvação ou redução desta no meio, que pode ser demonstrada através das leituras das absorvâncias em 595nm. Foi considerada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir em 90% a multiplicação das cepas bacterianas.

5.4.1.2 - Leitura utilizando resazurina

Segundo PALOMINO et al., (2002) e MONTEJANO, (2005) a resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Foram pipetados 50µL da solução de resazurina a concentração de 0,01% em água Milli-Q nos orifícios das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente até a mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra vegetal sem a mudança de coloração para rosa.

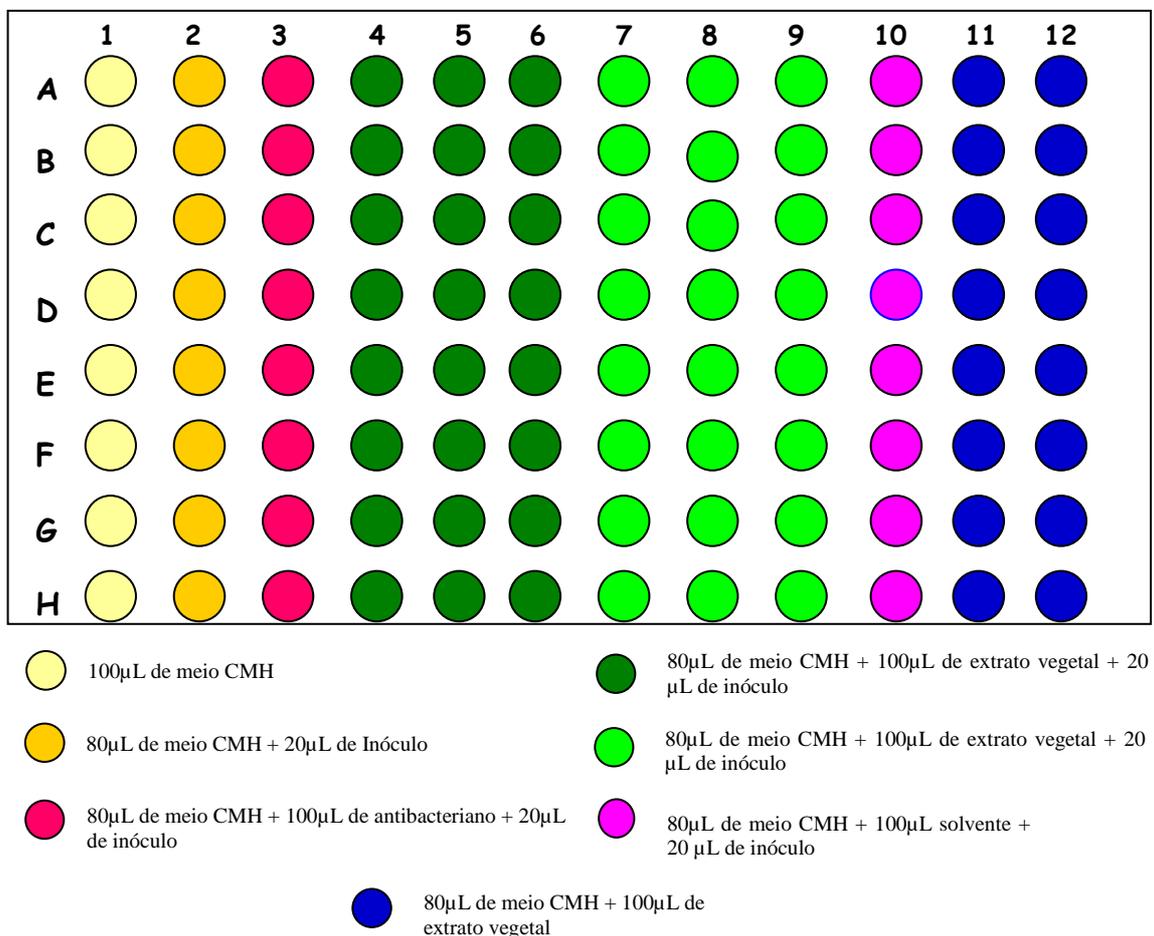


Figura 9: Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando leitura espectrofotométrica e resazurina como revelador.

5.4.2 - Determinação do potencial antioxidante

Para os ensaios antioxidantes foram avaliados, além das amostras de vegetais, também a quercetina e cisteína (Figura 10) como agentes antioxidantes padrão.

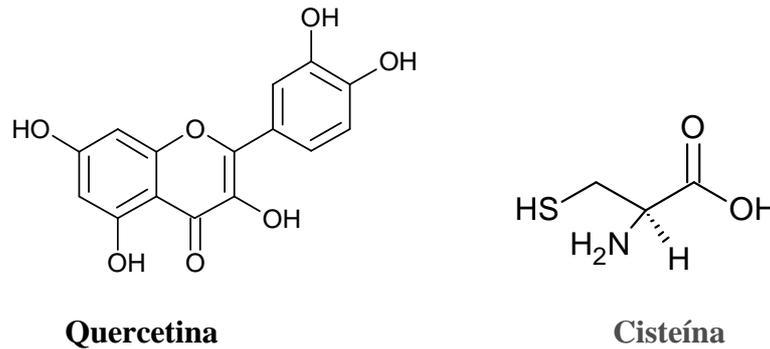


Figura 10: Estruturas moleculares dos padrões antioxidantes

Para os cálculos das porcentagens de inibição foi utilizada a seguinte equação abaixo.

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

Equação para cálculo das porcentagens de inibição.

Onde:

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

* As leituras espectrofotométricas foram realizadas nos comprimentos de onda (nm), específicos para cada cromóforo dos ensaios realizados.

5.4.2.1 – Preparo das soluções padrões

A solução padrão de quercetina foi preparada em MeOH e na concentração de 0,5 g/L (1,48mM). Esta solução foi diluída na proporção de 1/30 em MeOH (0,049mM). A solução padrão de cisteína foi preparada em MeOH e na concentração de 17,5g/L (0,1M). Esta solução foi diluída na proporção de 1/100 em MeOH ficando (0,001M).

Nos finais dos experimentos a concentração de MeOH ficou em 25% e as concentrações dos padrões nas microplacas variaram para determinação da inibição. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação descrita no item 5.4.2.

5.4.2.2 – Preparo das soluções dos extratos vegetais

Para realização dos ensaios de atividade antioxidante foram utilizados os extratos brutos AcOEt e etanólico (EtOH) e as frações hexânica, diclorometânica (DCM) e hidroalcolica. Os extratos vegetais foram preparados inicialmente na concentração 1080 μ g/mL em MeOH e DMSO, sendo estes permanecerão em 25% e 5%, respectivamente, na realização dos ensaios.

5.4.2.3 - Atividade antioxidante total pelo ABTS^{•+}

O radical catiônico do ABTS (C₁₈H₂₄N₆O₆S₄) é utilizado para avaliar as habilidades dos flavonóides e agentes fenólicos como captadores (*scavengers*) de radicais (PELLEGRINI et al., 1998). O cátion radical ABTS^{•+} apresenta picos de absorbância (Figura 11) em três comprimentos de onda 630nm, 734nm e 812nm (PELLEGRINI et al., 1998).

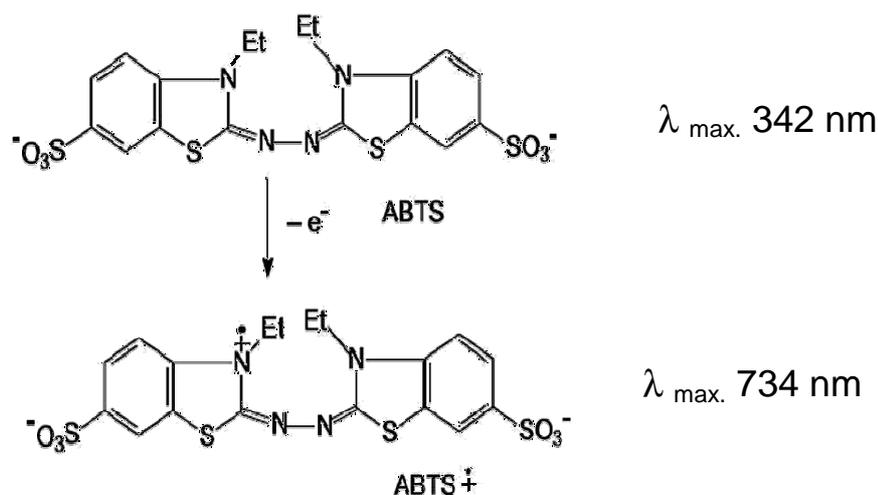


Figura 11: Formação do cátion radical ABTS $^{\bullet+}$

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante frente ao ABTS $^{\bullet+}$ foi realizada através de medidas espectrofotométricas da captura do radical, na presença de extratos vegetais (PELLEGRINI et al., 1998).

O ABTS $^{\bullet+}$ foi preparado a partir da reação de oxidação do ABTS, 7 mM, pelo persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) 51 mM, em tampão PBS pH 7,4, mantida em repouso de 12 a 16 horas ao abrigo de luz (Fig. 12). Após incubação esta solução estoque foi diluída 1/30 em tampão PBS pH 7,4 cuja absorvância à 734 nm foi de aproximadamente 0,7.

Na realização da atividade antioxidante pelo ABTS $^{\bullet+}$ as concentrações das amostras vegetais variaram de acordo com a sua capacidade de capturas. A ação antioxidante foi determinada pelo decréscimo da absorvância em 734nm, após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação descrita no item 5.4.2.

5.4.2.4 – Ensaios de captura (*Scavenger*) de HOCl e da taurina-cloramina

O princípio das reações é a oxidação do 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB) com o aumento da absorção a 655 nm (Fig. 12). As reações foram realizadas segundo COSTA et al. (2004) com adaptações.

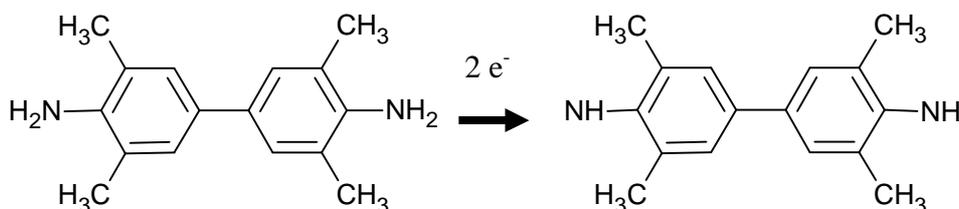


Figura 12: Reação de oxidação do 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB)

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

Para o sistema com TauCl utilizou-se a reação do HOCl 4,57mM, previamente diluído em NaOH pH 12,0 (1:6), com taurina (Tau – 1,464 mM) em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4 (HARRINSON & SCHULTZ, 1976). Os extratos vegetais foram adicionados à mistura, mantendo a proporção de 25% de MeOH no volume final da reação na microplaca, seguindo-se incubação de 5 minutos e adição do TMB 7mM preparado no momento do uso. Segue-se nova incubação por 5 minutos e leituras das absorbâncias.



Resultados

6 - Resultados

6.1 - Determinação da atividade antibacteriana das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo

Foram feitos testes com diferentes antibióticos (ampicilina, gentamicina, tetraciclina, kanamicina e vancomicina) e substâncias antimicrobianas (clorexedina e cloridrato de ciprofloxacino) para determinar o melhor controle positivo a ser utilizado durante os testes (Tabela 3 e Figura 13).

Apesar dos testes feitos com todos os antibióticos e substância antimicrobiana citadas acima, o antibiótico escolhido para realização dos testes, tanto para a difusão em ágar como para a diluição em microplacas foi o cloridrato de ciprofloxacino, que mostrou boa atividade em ambos os testes e também facilitou a visualização dos halos no teste de difusão em ágar.

Tabela 3: Resultados dos antibióticos no teste de difusão em ágar.

Bactérias	Antibiótico (mm)						Clor	MeOH
	Amp	Gent	Kan	Tetra	Van	Cipro		
<i>Staphylococcus aureus</i>	13*	11	R	R	14	19	17	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	17	15	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	15	R	R	13	22	21	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	17	16	R
<i>Bacillus subtilis</i>	16	17	R	15	16	23	17	R

R- resistente; * Sensibilidade medida pelo halo de inibição em mm.; Amp – ampicilina; Gent – gentamicina; Kan – Kanamicina; Tetra – tetraciclina; Van – vancomicina; Cipro – ciprofloxacino; Clor – clorexedina; MeOH - metanol

A figura 14 mostra como modelo, o teste de difusão em ágar utilizando o *B. subtilis*. A bactéria apresentou-se resistente ao extrato vegetal nas diferentes concentrações, entretanto foi sensível a ampicilina, ciprofloxacino e gentamicina apresentando halos de inibição de crescimento ao redor dos discos.

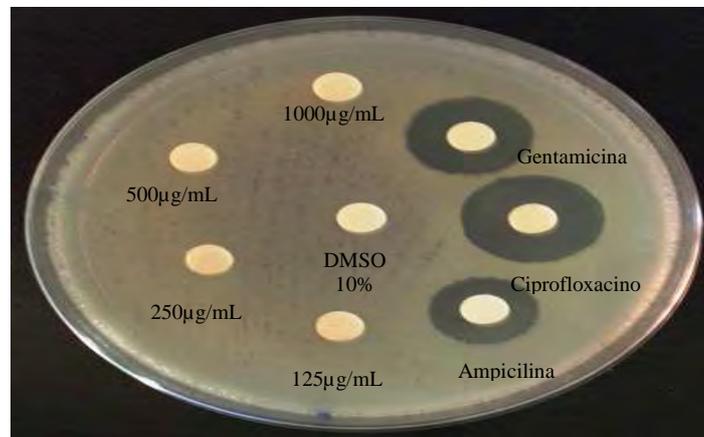


Figura 14: *Bacillus subtilis* em ágar Muller Hinton para o extrato diclorometano

6.2 – Determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar

Os extratos brutos e frações derivadas do extrato AcOEt foram inativos nas diluições 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL (Tabela 4 e Figura 14), tanto para as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. subtilis*, como para as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. O solvente não interferiu no crescimento bacteriano, o antibiótico inibiu o crescimento bacteriano ao redor do disco, apresentando assim atividades satisfatórias viabilizando a metodologia do ensaio, conforme os resultados apresentados na Tabela 3.

As bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. subtilis*, e as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* foram resistente nas diluições 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL (Tabela 5), para todas as substâncias puras. O solvente não interferiu no crescimento bacteriano, o antibiótico inibiu o crescimento bacteriano ao redor do disco, apresentando assim atividades satisfatórias viabilizando a metodologia do ensaio, conforme os resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 4: Resultados em ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos e frações derivadas do extrato AcOEt frente aos micro-organismos testados pelo método de difusão em Agar

Extratos	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1- Extrato bruto EtOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2- Extrato bruto AcOEt	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
3- Fr- Dicloro	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
4- Fr - Hex	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
5- Fr - AcOet	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
6- Fr - Hidro	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Tabela 5: Resultados em ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias isoladas frente aos micro-organismos testados pelo método de difusão em ágar

Sustâncias isoladas (Compostos)	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
7	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
9	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
10	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
11	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
12	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
13	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
14	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
15	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

6.3 – Determinação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica

Os resultados das CIM para os extratos brutos AcOEt e EtOH estão apresentados nos gráficos 1 a 5.

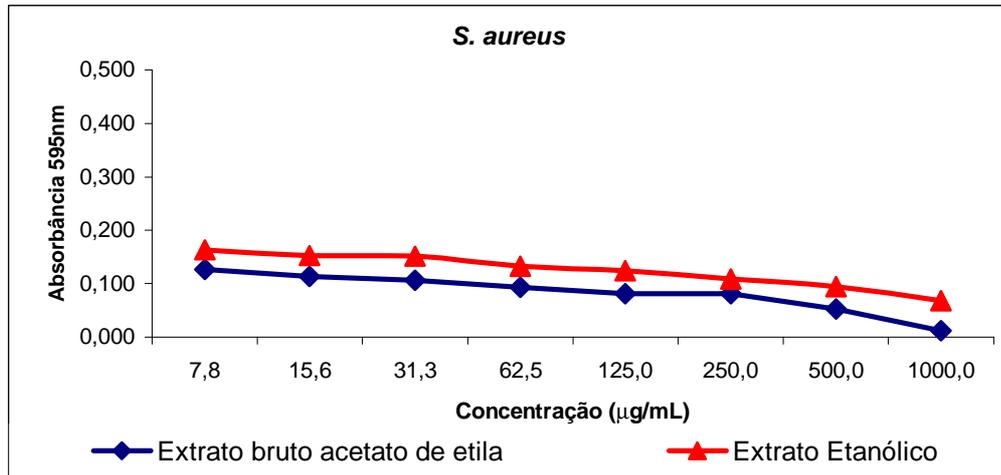


Gráfico 1: Atividade antibacteriana dos extratos brutos AcOEt e EtOH para *S. aureus*.

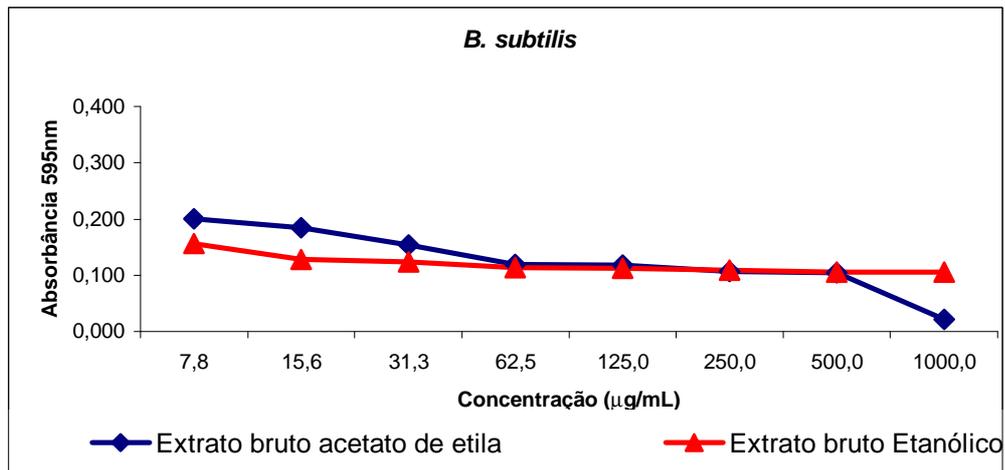


Gráfico 2: Atividade antibacteriana dos extratos brutos AcOEt e EtOH para *B. subtilis*.

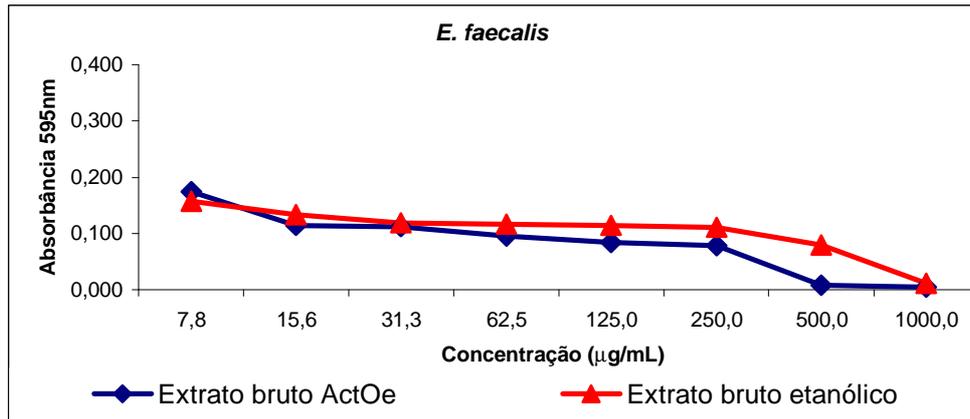


Gráfico 3: Atividade antibacteriana dos extratos brutos AcOEt e EtOH para *E. faecalis*.

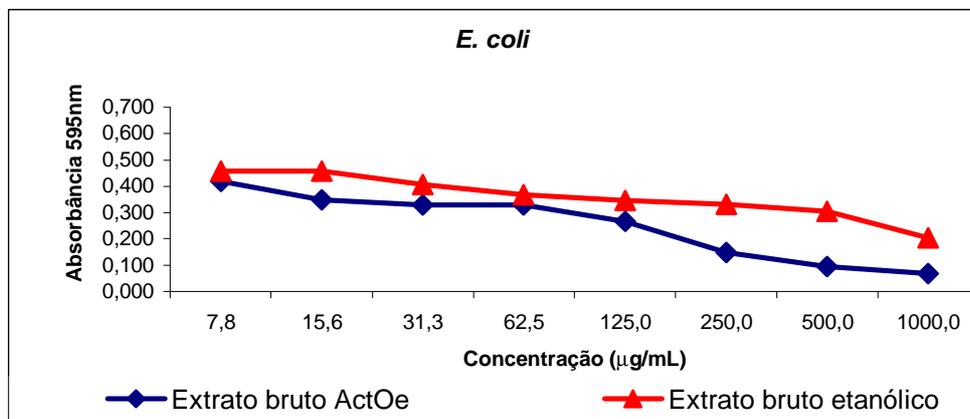


Gráfico 4: Atividade antibacteriana dos extratos brutos AcOEt e EtOH para *E. coli*.

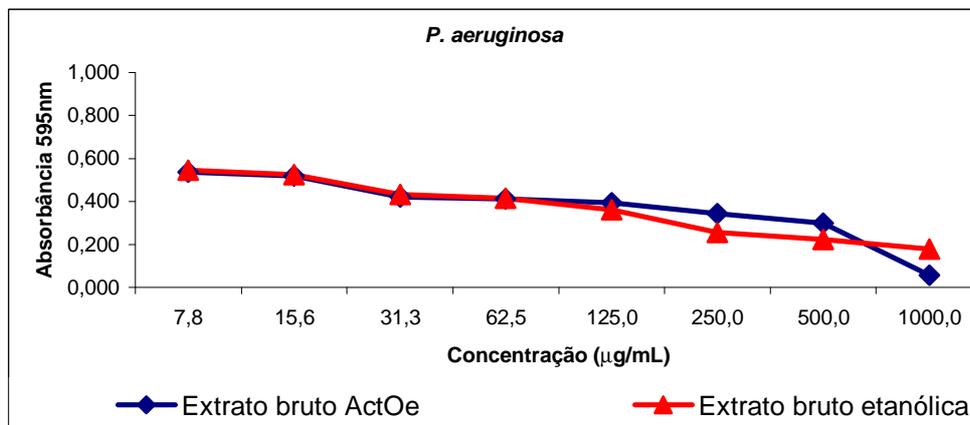


Gráfico 5: Atividade antibacteriana dos extratos brutos AcOEt e EtOH para *P. aeruginosa*

Os resultados das CIM para as frações hexânica, AcOEt, DCM e hidroalcolica estão apresentados nos gráficos 6 a 10.

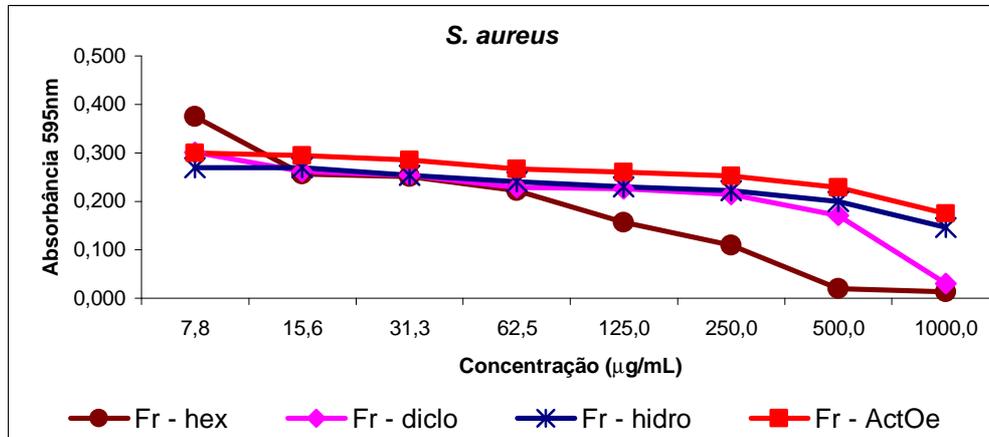


Gráfico 6: Atividade antibacteriana das frações para *S. aureus*

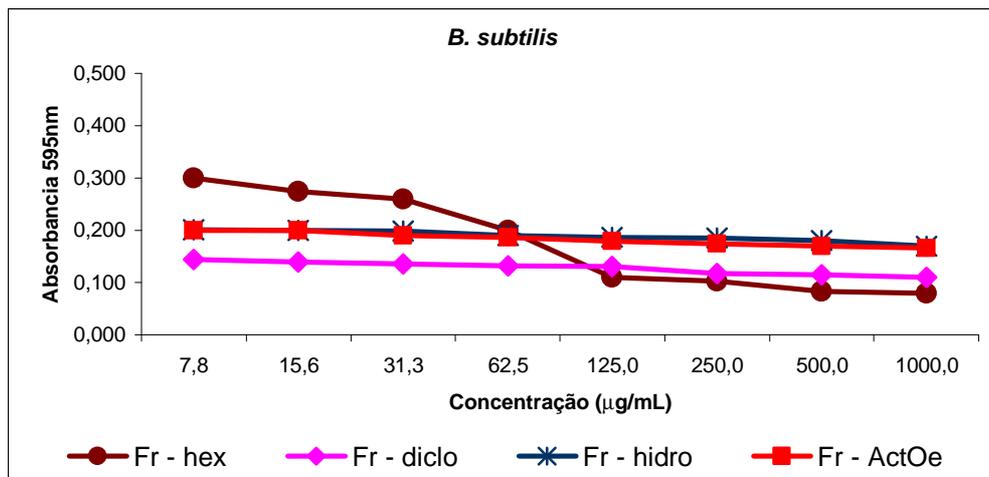


Gráfico 7: Atividade antibacteriana das frações para *B. subtilis*

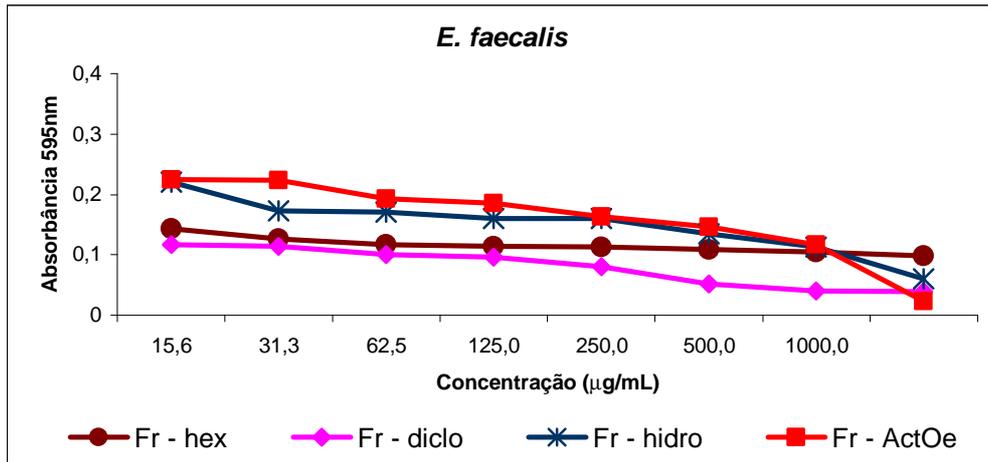


Gráfico 8: Atividade antibacteriana das frações para *E. faecalis*

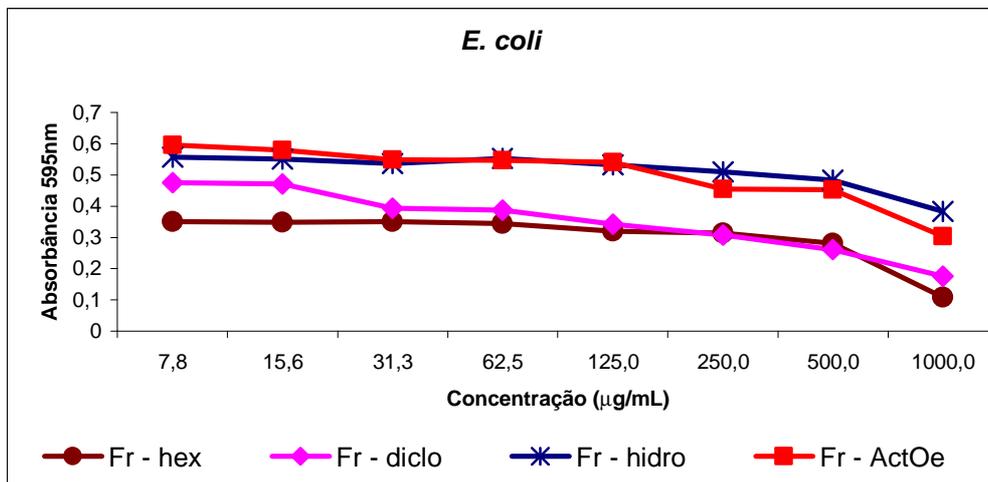


Gráfico 9: Atividade antibacteriana das frações para *E. coli*

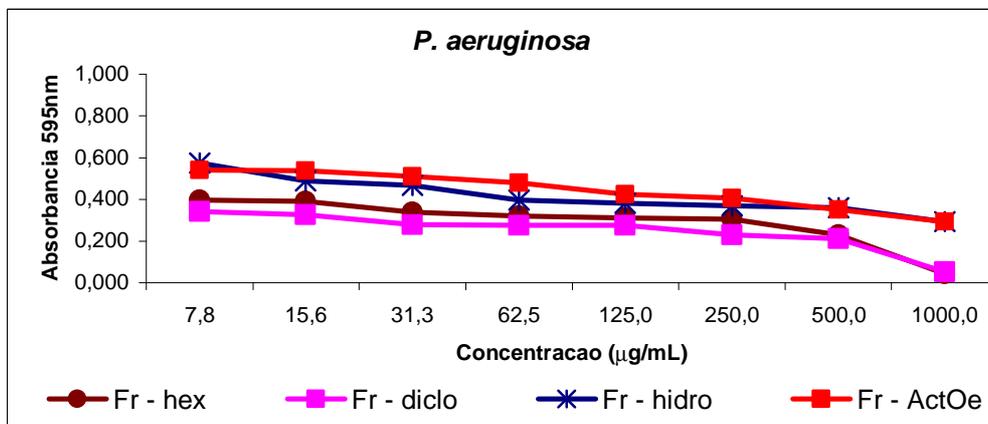


Gráfico 10: Atividade antibacteriana das frações para *P. aeruginosa*

Os resultados das CIM para os flavonóides e policetídeos isolados estão apresentados nos gráficos 11 a 15.

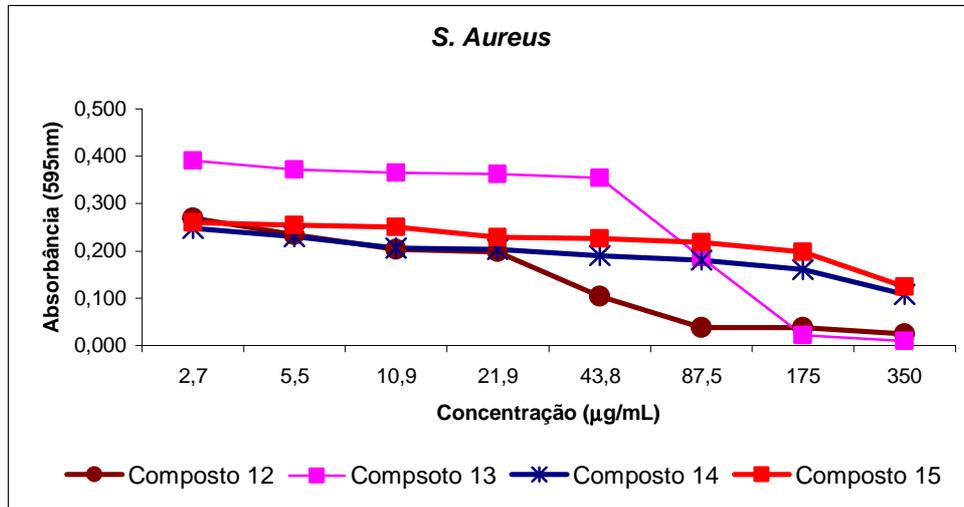


Gráfico 11: Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para *S. aureus*

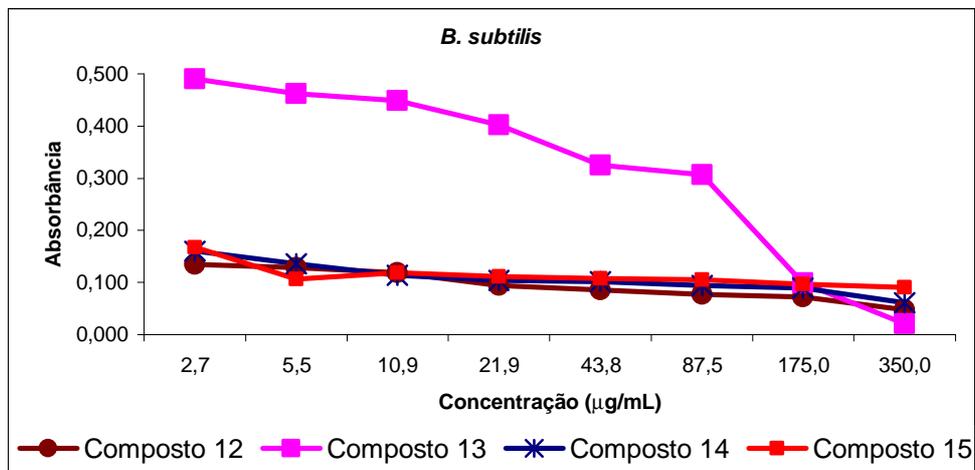


Gráfico 12: Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para *B. subtilis*

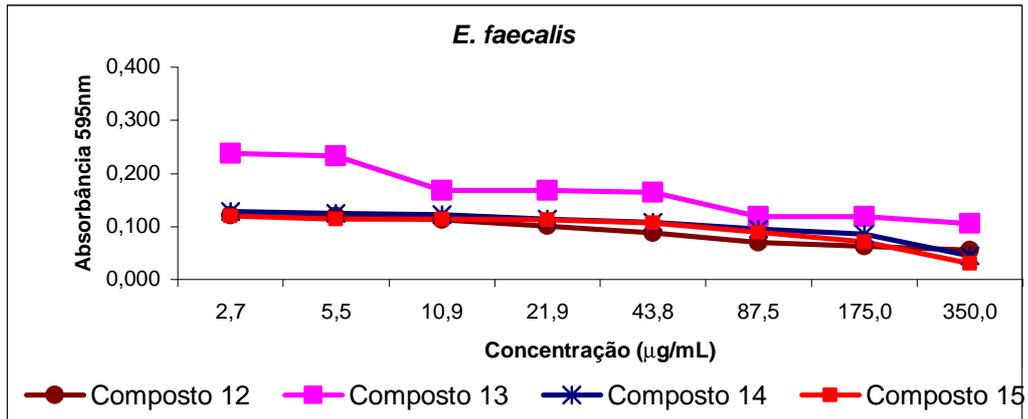


Gráfico 13: Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para *E. faecalis*

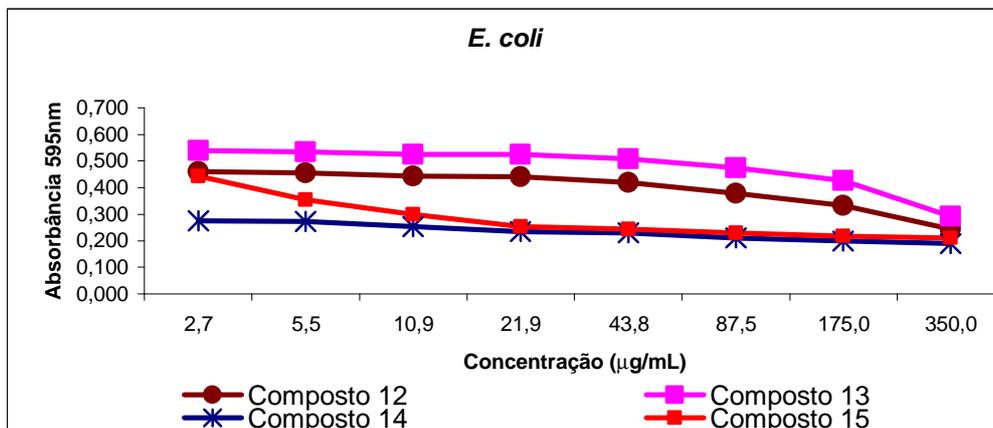


Gráfico 14: Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para *E. coli*

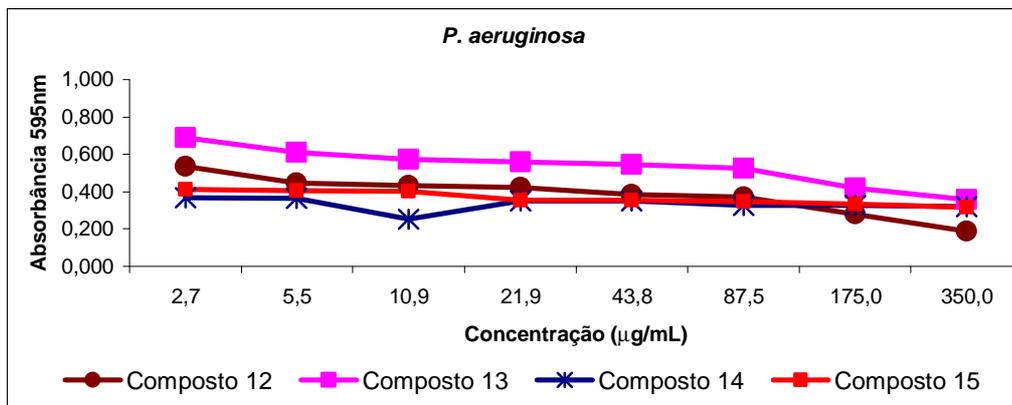


Gráfico 15: Atividade antibacteriana dos flavonóides e policetídeos para *P. aeruginosa*

Os resultados das CIM para as lignanas isoladas estão apresentados nos gráficos 16 a 20.

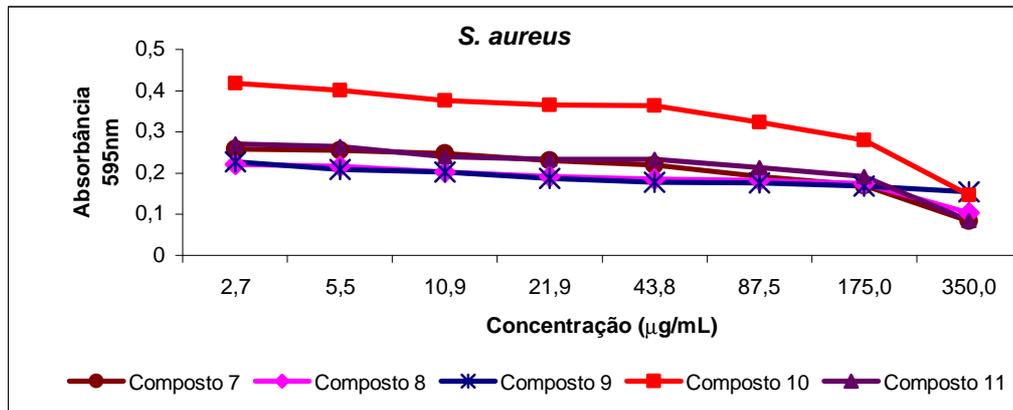


Gráfico 16: Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para *S. aureus*

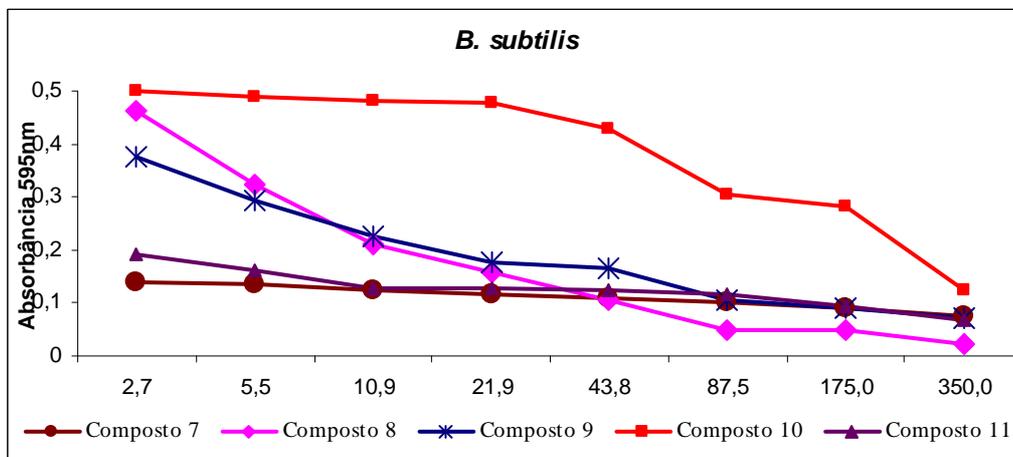


Gráfico 17: Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para *B. subtilis*

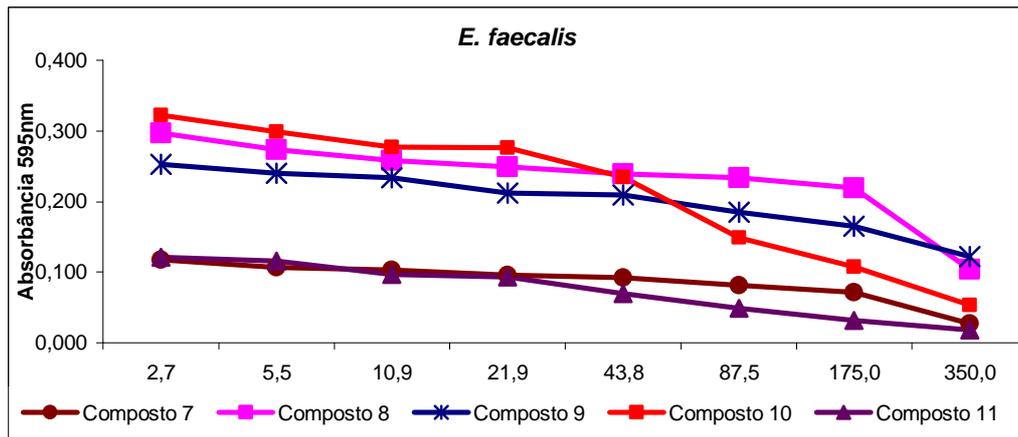


Gráfico 18: Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para *E. faecalis*

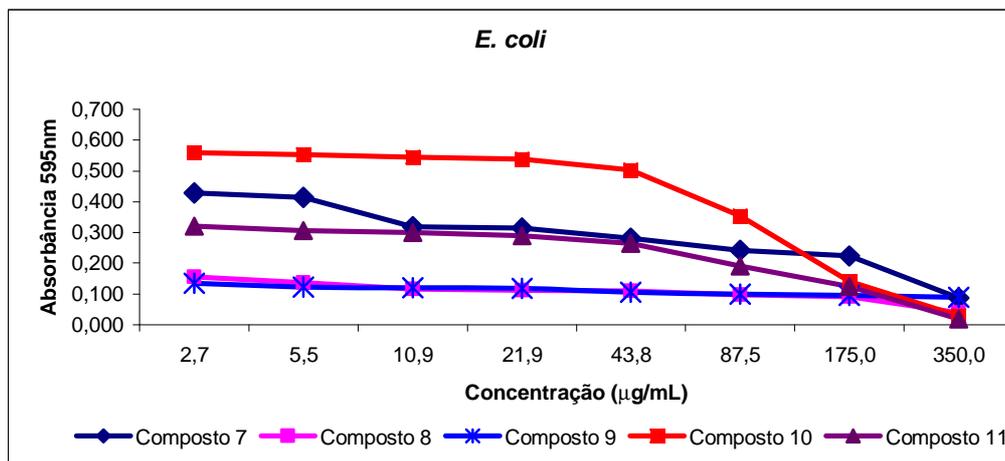


Gráfico 19: Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para *E. coli*

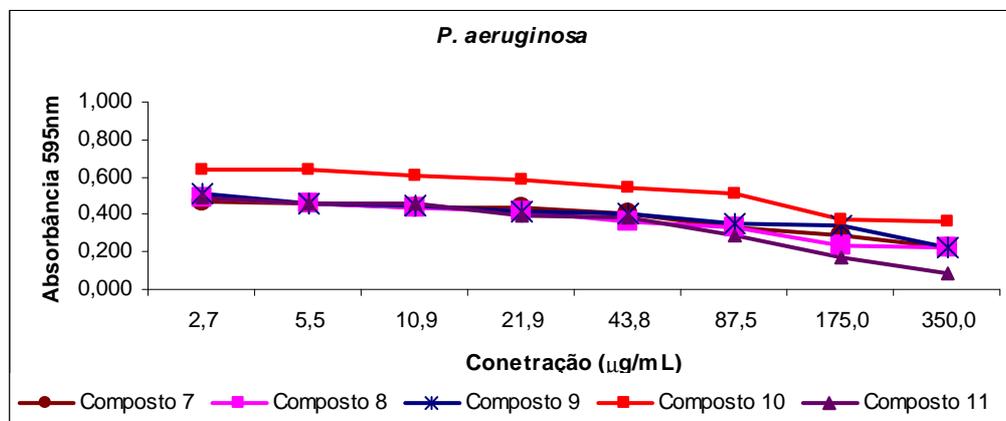


Gráfico 20: Atividade antibacteriana das lignanas isoladas para *P. aeruginosa*

Tabela 6: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos e frações, pela técnica de diluição em microplaca com leitura espectrofotométrica

Extratos	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1- Extrato bruto EtOH	>1000	>1000	1000	>1000	>1000
2- Extrato bruto AcOEt	1000	1000	500	1000	1000
3- Fr- Dicloro	>1000	1000	1000	>1000	1000
4- Fr - Hex	>1000	1000	>1000	>1000	500
5- Fr - AcOet	>1000	>1000	1000	>1000	>1000
6- Fr - Hidro	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Tabela 7: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas, pela técnica de diluição em microplaca com leitura espectrofotométrica

Sustâncias isoladas (Compostos)	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
7	> 350	> 350	350	> 350	> 350
8	350	> 350	175	> 350	> 350
9	350	> 350	> 350	350	> 350
10	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
11	350	350	175	> 350	> 350
12	> 350	> 350	> 350	350	87,5
13	> 350	> 350	> 350	350	175
14	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
15	> 350	> 350	350	> 350	> 350

O extrato bruto EtOH apresentou atividade antibacteriana na concentração de 1000µg/mL para *E. faecalis*. Entretanto não apresentou atividade frente as demais bactérias nas concentrações testadas. O extrato bruto acetado de etila não apresentou atividade apenas contra *E. coli* na concentração até 1000µg/mL, apresentando atividade antibacteriana na concentração de 1000µg/mL para *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* e CIM = 500µg/mL para *E. faecalis*.

A fração DCM apresentou atividade antibacteriana de 1000µg/mL frente as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A fração hexânica também apresentou atividade frente a estas bactérias com CIM = 1000µg/mL e 500µg/mL respectivamente.

Os compostos 12 e 13 (Tabela 7) apresentaram atividade antibacteriana principalmente frente as bactérias Gram-positivas. Para *B. subtilis* apresentaram atividade antibacteriana na concentração de 350µg/mL. Contra *S. aureus* o composto 12 apresentou CIM = 87,5µg/mL e o composto 13 CIM = 175µg/mL.

As lignanas e flavonóides isolados apresentaram melhor atividade antibacteriana com CIM = 350 µg/mL, principalmente para *E. coli* (compostos 8, 10 e 11), *E. faecalis* (compostos 7 e 11) e *B. subtilis* (compostos 8 e 12).

6.4 – Determinação da atividade antibacteriana pelo método de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador

Os resultados obtidos pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos e frações, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador

Extratos	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1- Extrato bruto EtOH	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000
2- Extrato bruto acetato de etila	> 1000	> 1000	500	1000	1000
3- Fr- Dicloro	> 1000	> 1000	500	> 1000	1000
4- Fr - Hex	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
5- Fr - AcOet	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
6- Fr - Hidro	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

Tabela 9: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador

Sustâncias isoladas (Compostos)	Micro-organismos				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
7	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
8	350	> 350	175	> 350	> 350
9	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
10	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
11	350	> 350	350	> 350	> 350
12	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
13	> 350	> 350	> 350	> 350	350
14	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350
15	> 350	> 350	> 350	> 350	> 350

Os extratos brutos EtOH e AcOEt apresentaram atividade antibacteriana com CIM = 1000 μ g/mL e 500 μ g/mL frente a *E. faecalis*, mas os extrato AcOEt também apresentou atividade contra *B. subtilis* e *S. aureus* na concentração de 1000 μ g/mL. A fração DCM apresentou atividade antibacteriana com CIM = 500 μ g/mL e 1000 μ g/mL contra as bactérias Gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus*.

Os compostos 10 e 13 (Tabela 9) apresentaram atividade antibacteriana na concentração de 350 μ g/mL contra *E. coli* e *S. aureus*, sendo que o composto 10 também apresentou CIM = 175 μ g/mL contra *E. faecalis*.



Figura 15: *Staphylococcus aureus* pelo método de diluição em microplaca

6.5 – Determinação da atividade antioxidante

Para realização dos testes de atividade antioxidante foram utilizados os extratos brutos EtOH e AcOEt e as frações hexânicas, DCM e hidroalcoólica, preparados em MeOH 25% e DMSO 5% proporção esta obtida no final do experimento.

Foram realizados os ensaios antioxidantes para os extratos vegetais contra o cátion radical $ABTS^{\bullet+}$, ácido hipocloroso (HOCl), TauCl e ânions superóxidos.

6.5.1 – Determinação atividade antioxidante total pelo $ABTS^{\bullet+}$

Na realização da atividade antioxidante pelo cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ as concentrações variaram de 1,8 a 27 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos EtOH, frações DCM e hidroalcoólico, de 1,8 a 54 $\mu\text{g/mL}$ para AcOEt e de 18 a 270 $\mu\text{g/mL}$ para o hexânico. Os resultados de IC_{50} para os ensaios do cátion radical $ABTS$ estão expressos na figura 16.

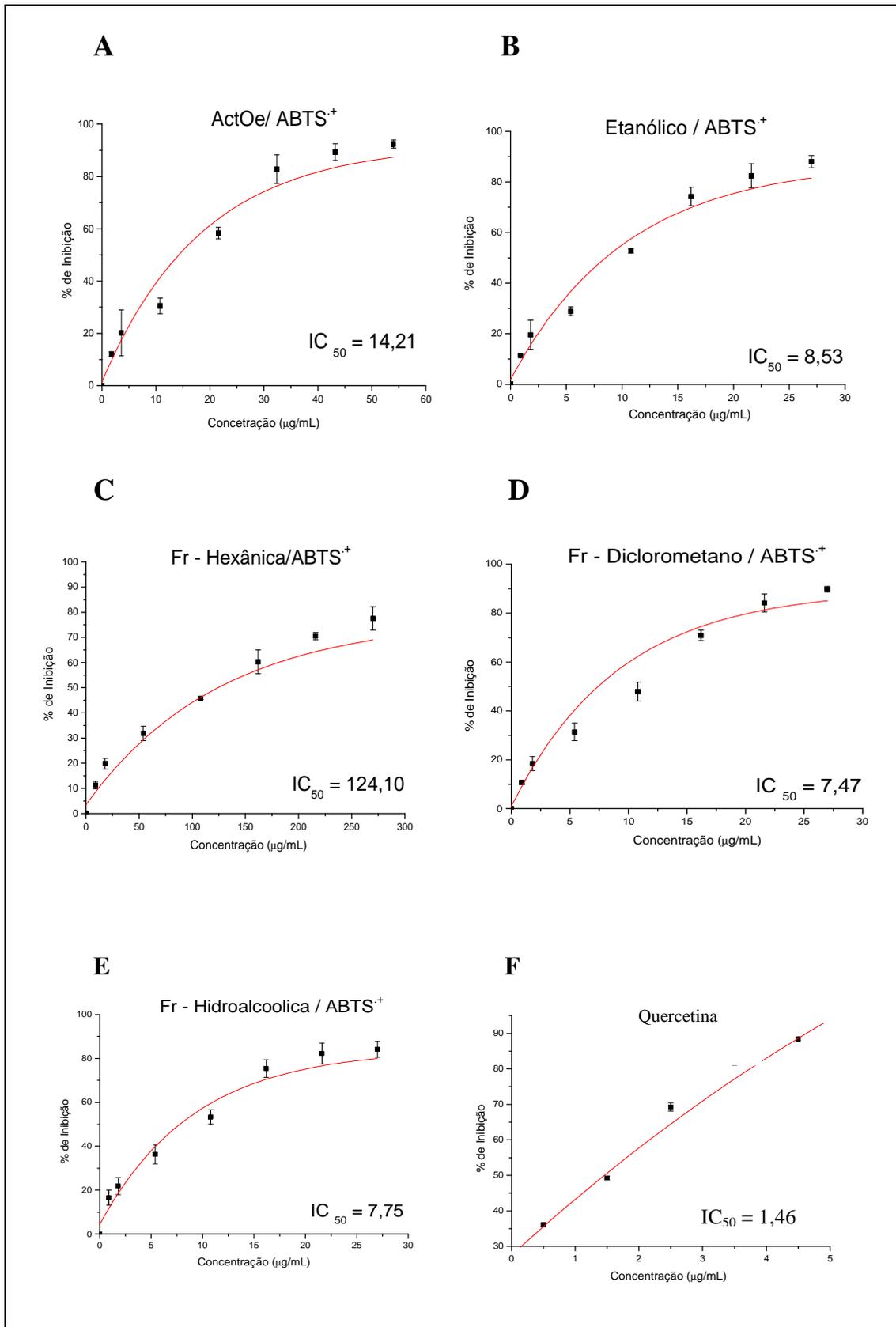


Figura 16: Resultados de IC_{50} para os ensaios do ABTS^{•+}

Os resultados obtidos nos ensaios de captura do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ demonstraram que os extratos vegetais e frações utilizadas nos testes apresentaram boa atividade antioxidante, sendo que as frações DCM e hidroalcoólica apresentaram melhor atividade com IC_{50} de 7,47 e 7,75 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, em relação ao padrão de quercetina cuja IC_{50} foi 1,46 $\mu\text{g/mL}$, na mesma matriz.

O extrato bruto AcOEt e EtOH também apresentaram boa atividade para o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ com IC_{50} de 14,21 e 8,53 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, mas a fração hexânica apresentou um IC_{50} de 124,10 $\mu\text{g/mL}$, relativamente alto.

6.5.2 – Determinação atividade antioxidante *Scavenger* de HOCl

Neste ensaio para a determinação da ação dos extratos e frações foram utilizadas duas matrizes em meio aquoso, com 25% de MeOH e 5% de DMSO. Os resultados de IC_{50} para os ensaios de HOCl com MeOH e DMSO estão expressos nas figuras 17 e 18 respectivamente.

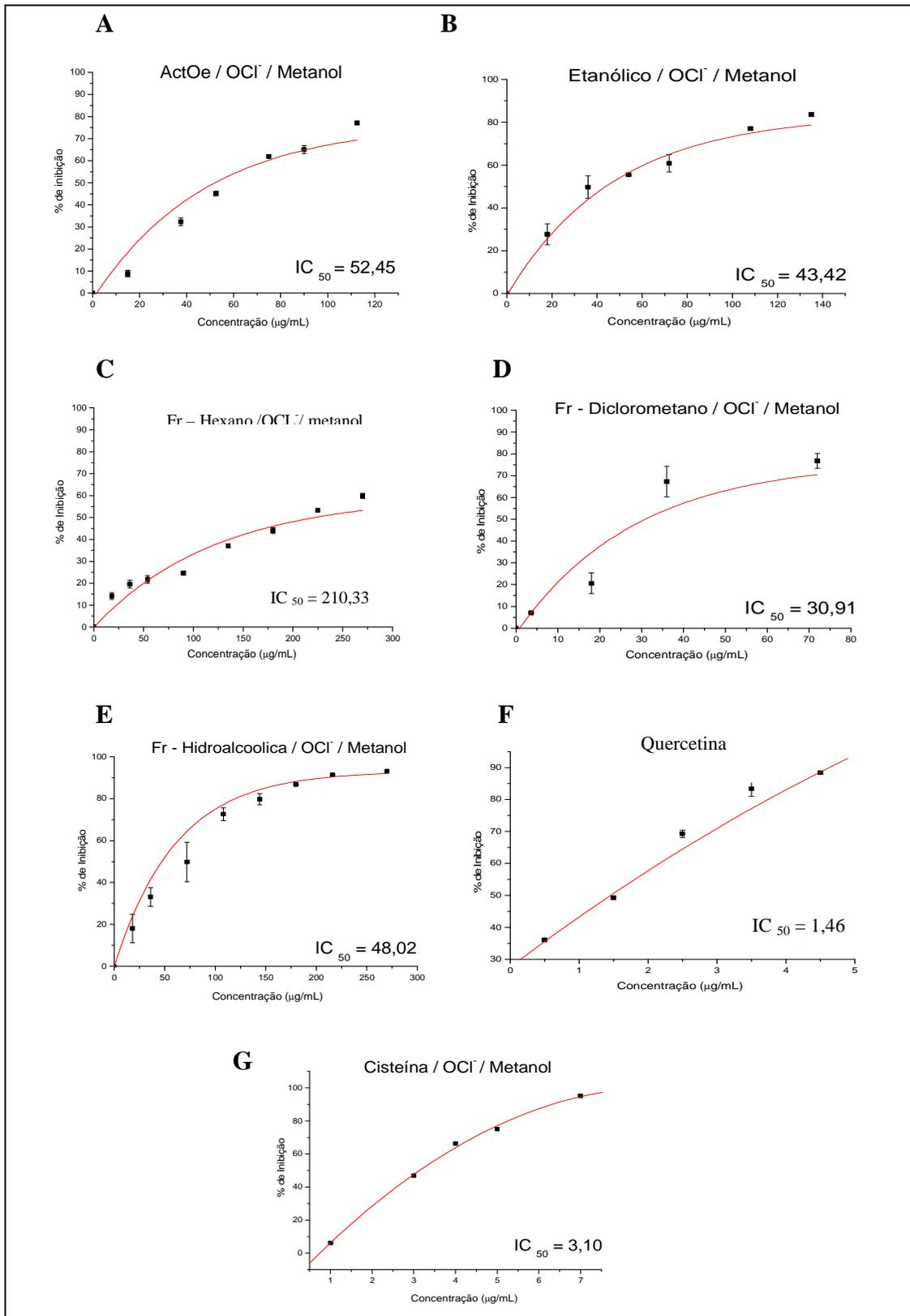


Figura 17: Resultados de IC₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (*Scavenger*) do HOCl com MeOH

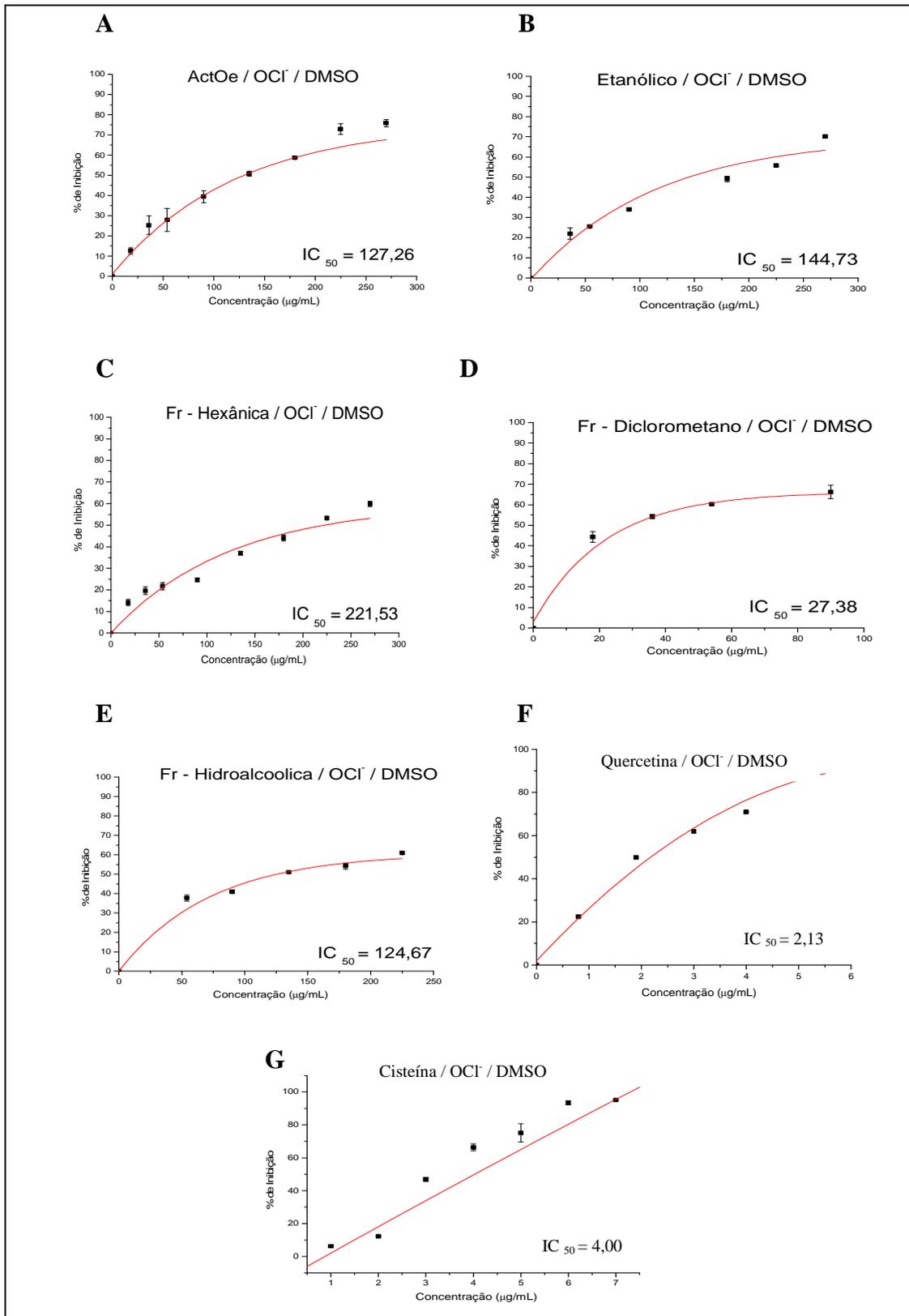


Figura 18: Resultados de IC₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (*Scavenger*) do HOCl com DMSO.

Os ensaios de captura (*Scavenger*) do HOCl com os extratos em matrizes com MeOH apresentaram como melhor atividade a fração DCM e extrato EtOH com IC₅₀ de 30,91 e 43,42 µg/mL respectivamente. O extrato bruto AcOEt e a fração hidroalcoólica também apresentaram IC₅₀ de 52,45 e 48,02 µg/mL respectivamente, mas a fração hexânica apresentou um IC₅₀ de 210,33 µg/mL, relativamente alto frente aos padrões de quercetina e cisteína os quais mostraram um IC₅₀ de 1,46 e 3,10 µg/mL respectivamente.

Os ensaios de captura (*Scavenger*) de HOCl dos mesmos extratos em matrizes com DMSO que não apresentaram boa atividade antioxidante para HOCl, com exceção da fração DCM que apresentou um IC₅₀ de 27,38 µg/mL. Os demais extratos apresentaram IC₅₀ de 127,26 µg/mL, 144,73 µg/mL, 201,33 µg/mL e 124,67 µg/mL para extrato bruto AcOEt e EtOH, frações hexânica e hidroalcoólica respectivamente. Os padrões para esta matriz apresentaram um IC₅₀ de 2,13 e 4,00 µg/mL para quercetina e cisteína respectivamente.

6.5.3 – Determinação atividade antioxidante (*Scavenger*) de Taurina-cloramina (TauCl)

Para a determinação da ação das amostras vegetais foram preparados em duas matrizes em meio aquoso, MeOH 25% ou DMSO 5%. Os resultados de IC₅₀ para os ensaios de TauCl estão expressos nas figuras 19 e 20.

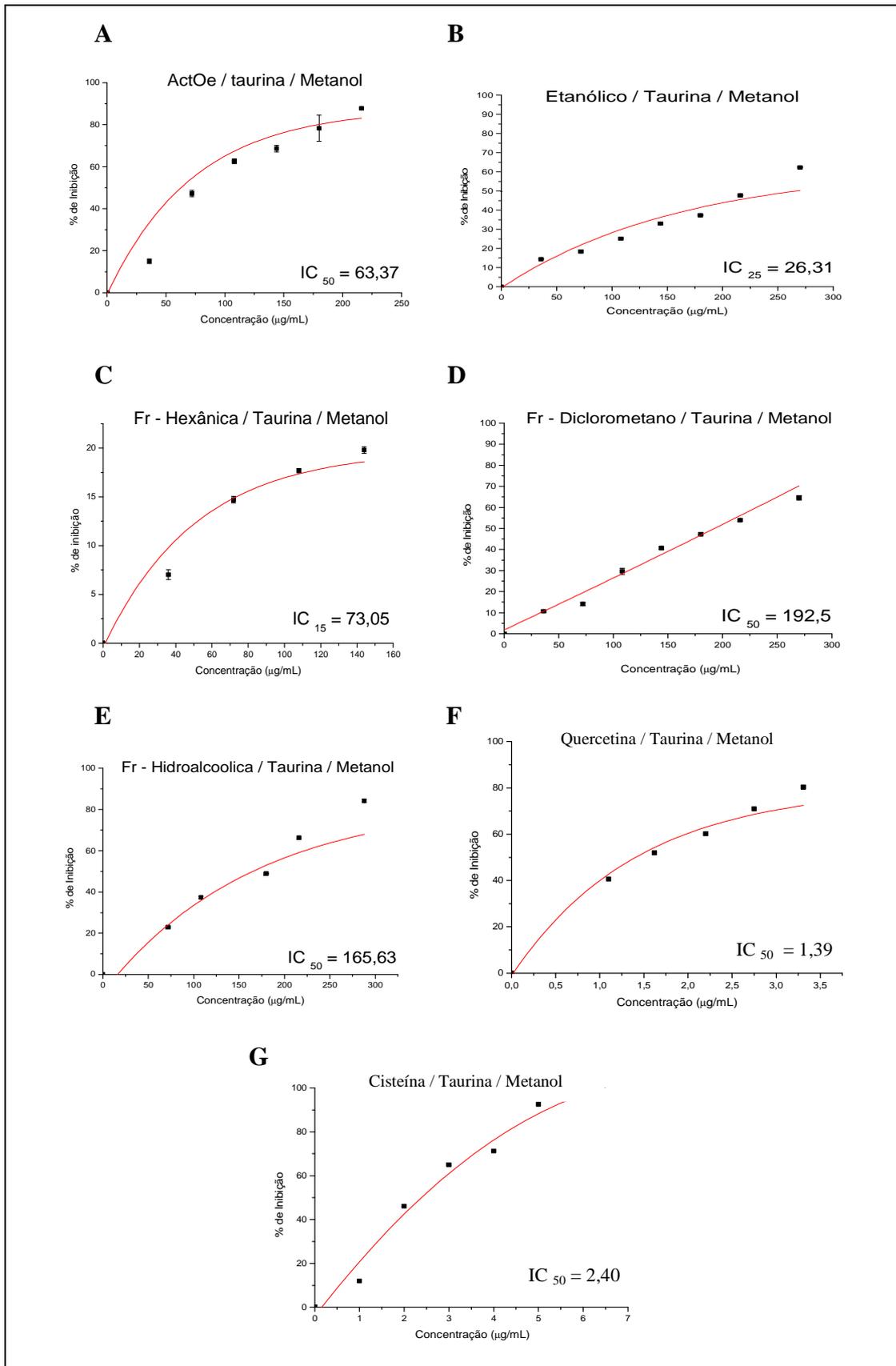


Figura 19: Resultados de IC_{50} para os ensaios de atividade antioxidante (Scavenger) da TauCl com MeOH.

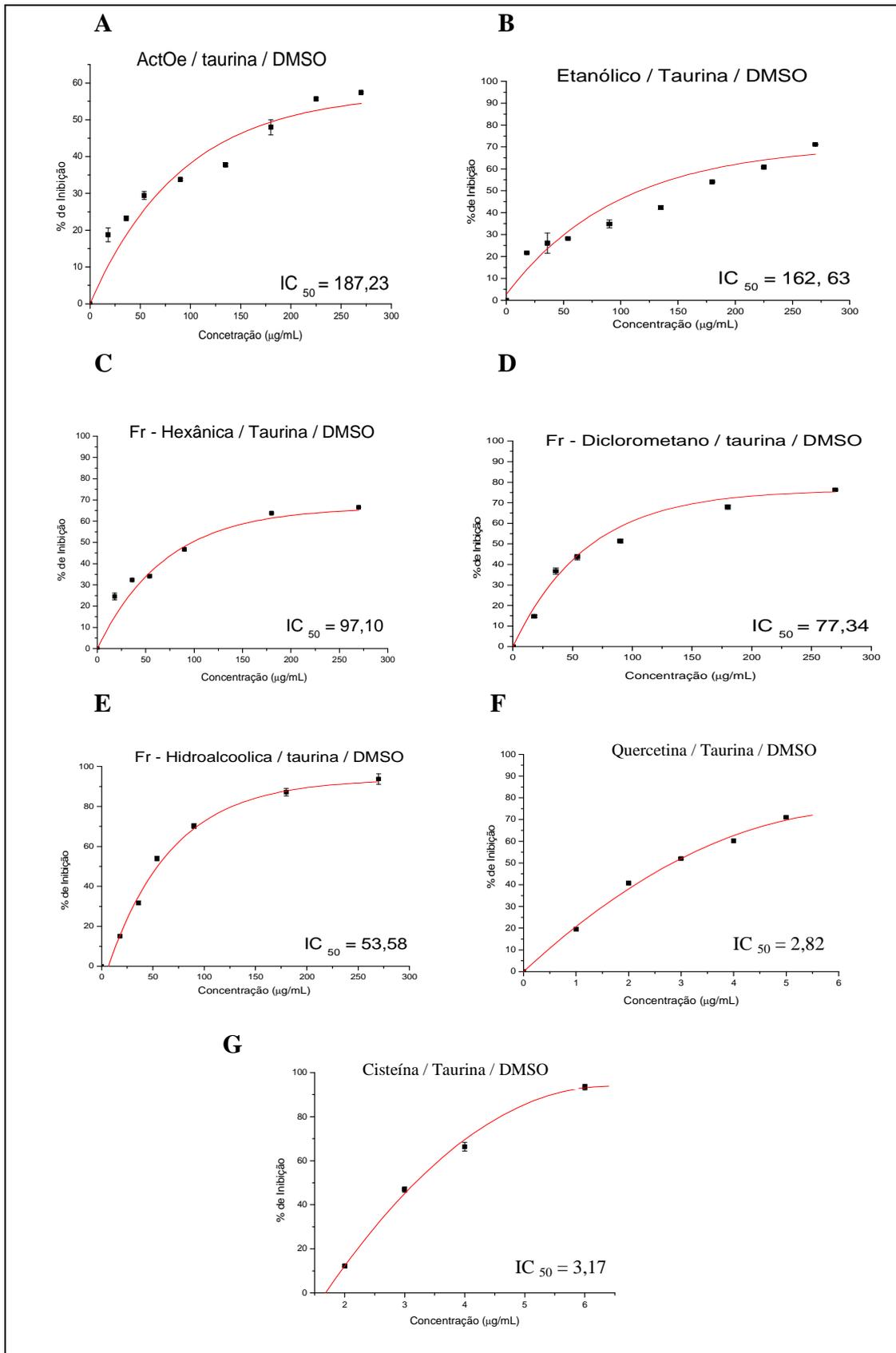


Figura 20: Resultados de IC_{50} para os ensaios de atividade antioxidante (Scavenger) da TauCl com DMSO.

Os ensaios de captura (*Scavenger*) de TauCl com os extratos com matrizes de MeOH apresentou como melhor atividade o extrato bruto e AcOEt com IC₅₀ de 63,37 µg/mL respectivamente. As frações DCM e hidroalcoólica apresentaram atividade relativamente alta contra esta espécie, sendo o IC₅₀ de 192,5 e 165,63 respectivamente. O extrato bruto EtOH apresentou IC₂₅ = 26,31 µg/mL e a fração hexano apresentou IC₁₅ = 73,05 µg/mL frente aos padrões de quercetina e cisteína com IC₅₀ de 1,39 e 2,14 µg/mL respectivamente.

Os ensaios feitos com os extratos em matrizes com DMSO para TauCl apresentaram IC₅₀ de 53,58, 77,34 e 97,10 µg/mL para as frações hidroalcoólica, DCM e hexânica respectivamente, como os melhores resultados. Os extratos brutos apresentaram IC₅₀ de 162,63 e 187,23 µg/mL para o EtOH e AcOEt respectivamente. Os padrões para esta matriz apresentaram um IC₅₀ de 2,82 e 3,17 µg/mL para quercetina e cisteína respectivamente.

6.5.4 – Determinação atividade antioxidante (*Scavenger*) para ânion superóxido

Para determinação da ação antioxidante, as amostras vegetais foram preparadas em duas matrizes de meio aquoso, MeOH 25% ou DMSO 5%. Os resultados de IC₅₀ para os ensaios de ânions superóxidos estão expressos nas figuras 21.

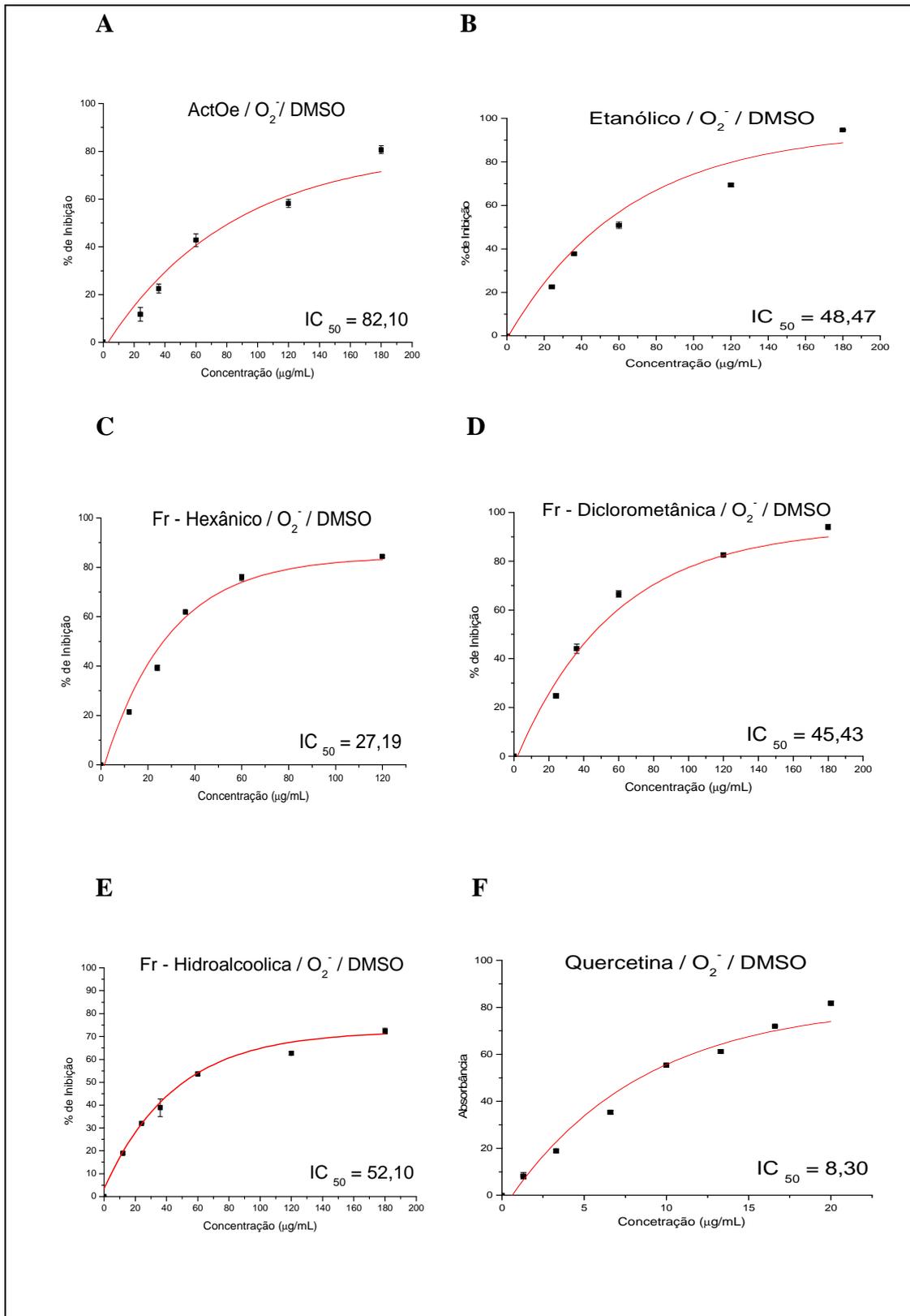


Figura 21: Resultados de IC₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante (*Scavenger*) de ânions superóxidos com DMSO.

Os ensaios de captura (*Scavenger*) para o ânion radical superóxido com extratos em matrizes com MeOH não puderam ser realizados, pois ocorreu turvação do sistema com o aumento das concentração dos extratos impossibilitando a leitura espectrofotométrica.

Os ensaios de captura (*Scavenger*) do ânion radical superóxido com os extratos em matrizes com DMSO apresentaram melhor atividade para a fração hexânica com IC₅₀ de 27,19 µg/mL, comparado à quercetina com IC₅₀ de 8,30 µg/mL. Os extratos brutos AcOEt, EtOH e as frações DCM e hidroalcoólica apresentaram IC₅₀ de 82,10 µg/mL, 48,47 µg/mL, 45,43 µg/mL e 52,10 µg/mL respectivamente.

Tabela 10: Valores dos IC₅₀, nos ensaios de captura para os extratos vegetais, padrões, preparados em matrizes diferentes.

Ensaio	IC ₅₀ (µg/mL)						
	ABTS	OCL/ MeOH	OCL/ DMSO	TauCl/ DMSO	TauCl/ MeOH	O ₂ ⁻ / DMSO	O ₂ ⁻ / MeOH
AcOEt	14,21	52,45	127,26	187,23	63,37	82,10	NR
Etanólica	8,53	43,42	144,73	162,63	NR	48,47	NR
Fr – Hex	124,10	210,33	210,33	97,10	NR	27,19	NR
Fr – Diclor	7,47	30,91	27,38	77,34	192,5	45,43	NR
Fr – Hidro	7,75	48,02	124,67	53,58	165,63	52,10	NR
Quercetina	1,46	1,46	2,13	2,52	1,39	8,30	NR
Cisteina	NR	3,10	4,00	3,17	2,40	NR	NR

NR: ensaios não realizados



Discussão

7 – Discussão

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana e, por um longo período, minerais, produtos vegetais e animais foram as principais fontes de substâncias ativas (RATES, 2001). Durante milênios, o homem, empiricamente, aprofundou seus conhecimentos visando à melhoria nas condições de alimentação e a cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução (SANTOS, 2006).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos (GUERRA e NODARI, 2003).

Em relação a flora, esta é bastante diversificada, em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e com princípios ativos ainda desconhecidos. De um modo geral, as matas nativas são as maiores representações das riquezas de espécies da flora brasileira (NAPOLITANO et al., 2005).

Nesse sentido, a busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. Por outro lado, devido ao desconhecimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação de uso adequada, as plantas medicinais são muitas vezes utilizadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado (FELFILI et al., 2002).

O Brasil, especialmente nas regiões onde a biodiversidade é especialmente rica, é verificado um amplo conhecimento popular sobre plantas medicinais. A busca de substâncias naturais, de baixo custo e com menores efeitos adversos, tem levado a um número crescente de pesquisa nesta área (CALIXTO, 2000; RODRIGUES, 2005).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, sendo também necessária nas áreas de quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). Vários estudos são direcionados para descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de

plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos e também e um melhor entendimento de como etnomedicina pode tratar infecções (LANGFIELD, 2004).

O gênero *Peperomia* representa um dos mais importantes da família Piperaceae. São utilizadas como plantas ornamentais e com ampla aplicação na medicina no tratamento de inflamações, asma, úlceras gástrica, por suas atividades analgésica, fungicida e antimicrobiana (MAHIOU et al., 1995, 1996; LOPES et al., 1998; AZIBA et al., 2001; ARRIGONI-BLANK et al., 2004; FELIPPE et al., 2008).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de diluição em tubo e em microplaca (OSTROSKY, 2008).

Em nossos estudos foram utilizados a difusão em ágar e microdiluição em placa para determinar a atividade antibacteriana dos extratos brutos, frações e substâncias puras isoladas de *Peperomia blanda*.

De acordo com NASCIMENTO et al. (2007) é necessária a padronização de diversos fatores, como o tempo de exposição do micro-organismo ao extratos vegetais, a utilização de controles positivos e negativos, o uso da quantidade de emulsificador, a composição do extratos vegetais e a descrição precisa das condições em que foram obtidos, para que se possa determinar o verdadeiro potencial biológico dos extratos vegetais estudados e também realizar estudos comparativos diretos entre eles.

LANGFIELD et al., (2004) propõem uma abordagem para lidar com diferenças de solubilidade dos extrato utilizando água como solvente. O DMSO foi utilizado para a dissolução inicial dos extratos, que foram diluídos em várias concentrações em caldo nutriente no lugar da água. Os problemas de solubilidade foram superados pela sonicação da amostra em DMSO.

A solução de DMSO a 10% foi o solvente mais adequado para diluir as amostras vegetais durante e realização dos ensaios. A concentração final do solvente (DMSO) utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana nas técnicas de difusão em ágar e diluição em microplacas foi de 10%, onde não houve interferência no crescimento bacteriano em nenhum dos ensaios (Fig 14, coluna 12). Isto foi previamente descrito por KARAMAN et al., (2003) que utilizou as duas técnicas

para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *Juniperus oxycedrus* dissolvido em DMSO 10%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos micro-organismos.

Na determinação da atividade antibacteriana a técnica de difusão em ágar é bastante utilizada, ainda que limita-se a micro-organismos de crescimento rápido, podendo ser aeróbios ou facultativos. A avaliação comparativa frente a um padrão biológico de referência e o halo de inibição de crescimento é medido pelo diâmetro do halo de inibição, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (BARRY & THORNSBERRY, 1991). O método de difusão em ágar é um bioensaio adequado para condução da identificação antibacteriana, mas não eficiente na quantificação da bioatividade (ELOFF, 1998, 2000), e utilizam grandes quantidades de extratos e frações cromatográficas, o que limita a utilização de produtos naturais (LANGFIELD, et al., 2004).

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de difusão em ágar verificou-se que essa técnica é menos sensível do que a técnicas de diluição em microplaca. Isso nos leva a supor que a utilização desta técnica pode resultar em falsos negativo quanto à atividade antimicrobiana de um extrato vegetal, ainda que considerada de fácil execução, reprodutível e permite experimentar diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa. (NCCLS – M2 A8, 2003; COWAN, 1999; NETO et al., 2002; MORAIS, 2006).

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

Apesar dos testes feitos com todos os antibióticos e substância antimicrobiana (Tabela 3 e Fig 14), o antibiótico escolhido para realização dos testes, tanto para a difusão em ágar como para a diluição em microplacas foi o cloridrato ciprofloxacino, que mostrou boa atividade na concentração de 35µg/mL em ambos os testes e também facilitou a visualização dos halos no teste de difusão em ágar.

Método de diluição em meio líquido também é comumente utilizado na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. A prova de

sensibilidade por este método foi uma das primeiras a serem desenvolvidas, servindo ainda hoje como método de referência (NCCLS – M7 A6, 2003; LANGFIELD, 2004).

O ensaio de diluição em microplacas apresenta algumas vantagens em relação ao método de difusão em ágar, como o aumento da sensibilidade para pequenas quantidades de extratos vegetais, capacidade de distinguir entre o efeito bacteriostático e bactericida, e determinação quantitativa da concentração inibitória mínima (LANGFIELD et al., 2004). ELOFF (1998) relata alguns fatores interferentes neste ensaio como células de alguns micro-organismos que se aderiam à base dos poços, enquanto as de outros permaneciam em suspensão, compostos presentes em alguns extratos que precipitavam, e extratos coloridos em altas concentrações os quais interferiam na análise e conseqüentemente nos resultados finais.

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

Essas técnicas que determinam a concentração inibitória mínima são quantitativas, pois possibilitam demonstrar qual a menor concentração do extrato necessária para inibir a multiplicação bacteriana. Embora essas técnicas sejam mais sensíveis, em relação as técnicas em meio de cultivos sólidos, são mais trabalhosas quando realizadas manualmente, o que impede a realização de um espectro maior de “screening” em um curto espaço de tempo (COWAN, 1999; DEVIENNE & RADDI, 2002; SUFFREDINI et al., 2004; ALVES, 2006).

Segundo PALOMINO et al. (2002) e MONTEJANO, (2005) a resazurina, que é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e o crescimento ou multiplicação bacteriana para testar a atividade antimicrobiana. O uso de um indicador colorimétrico elimina a necessidade de um leitor de placas espectrofotométrico e evita a ambigüidade associada a comparação visual ou medição dos halos de inibição de crescimento em placas de ágar. (LANGFIELD, et al., 2004).

Em nosso trabalho a inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano pelo método espectrofotométrico.

Os resultados obtidos em relação as substâncias isoladas mostram uma diferença de sensibilidade entre os métodos de leitura espectrofotométrica e o método que utiliza resazurina como revelador.

Bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes, a compostos antibacterianos, comparadas com as Gram-positivas (COS et al., 2006). A falta de atividade das partes das plantas testadas contra as bactérias Gram-negativas poderiam ser atribuídas a maior resistência a estas bactérias, devido a presença de uma membrana extracelular agindo como barreira a substâncias incluindo antibióticos (PALOMBO & SEMPLE, 2001, PESSINI et al, 2003).

A maior sensibilidade na determinação da concentração inibitória mínima para as substâncias isoladas foram os da diluição em microplaca utilizando leitura espectrofotométrica, sendo assim, este método de extrema importância para determinação da atividade antibacteriana de extratos de origem vegetal, não devendo ser substituído pelo uso de um indicador colorimétrico e sim utilizado em conjunto para melhor compreensão dos resultados.

A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de biomoléculas com ação antioxidante, substâncias que, quando em pequenas quantidades, são capazes de inibir ou retardar processos oxidativos, como, por exemplo, a lipoperoxidação (ATOUI et al, 2005; CHUN et al, 2005). Diferentes compostos antioxidantes presentes na dieta desempenham importantes funções em retardar o desenvolvimento de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer (VELLOSA, 2007).

A molécula de oxigênio é muito estável em seu estado fundamental, mas não é estável quando reduzida à $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, por poluentes ambientais, radiações ultra-violeta e pelas redução parcial do O_2 . Esses ERO de oxigênio provocam danos oxidativos às biomoléculas, tais como carboidratos, proteínas, lipídios e DNA (DASGUPTA & DE BRATATI, 2004) acelerando o envelhecimento e estão relacionados ao acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, catarata,

aterosclerose dentre outras (FERREIRA & MATSUBARA 1997). Entre estas espécies, o $\bullet\text{OH}$ é o considerado mais reativo e provoca graves danos (GUTTERIDGE, 1984). Por exemplo, a oxidação de LDL estimula a internalização de colesterol nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de ateroma (HALLIWELL, 1990).

Nos ensaios realizados para a determinação da atividade antioxidante com os extratos brutos e frações preparadas em duas matrizes diferentes foi verificado o efeito destas matrizes testadas. Estas matrizes foram preparadas nas mesmas concentrações que não apresentam toxicidade nos ensaios microbiológicos.

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

Chás preparados a partir das folhas de *Piper betle*, outro gênero da mesma família, apresentaram atividade antioxidante para os radicais DPPH, $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, com capacidade antioxidante total equivalente ao ácido ascórbico e ácido galico de 0,076 e 0,021 mg/mL respectivamente (DASGUPTA & De BRATATI, 2004).

VELOZO *et al*, 2009 investigaram o potencial antioxidante de dois novos flavonóides isolados de *Peperomia blanda*, usando o ensaio DPPH, sendo que ambos os compostos mostraram apenas uma modesta atividade antioxidante com valores e IC_{50} de 357,2 e 90,5 μM em relação à quercetina com IC_{50} de 7,2 μM .

Os extratos vegetais quando ensaiados na matriz aquosa com 25% MeOH, mostraram resultados de IC_{50} menores em relação aos extratos ensaiados em matriz com 5% DMSO. Para o ensaio de captura (*Scavenger*) do $\text{O}_2^{\bullet-}$, não foi possível a comparação com a matriz com MeOH devido a turvação do sistema, fato também ocorrido no ensaio de captura (*Scavenger*) da TauCl para o extrato EtOH e fração hexano onde foram calculados os IC_{25} e IC_{15} respectivamente, devido a turvação .

Compostos fenólicos de origem vegetal são economicamente importantes sendo usados nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Existem diversas metodologias de extração para estas substâncias bioativas, empregando-se

geralmente a extração por solventes aquosos ou orgânicos (MeOH, etanol e acetona) ou misturas (OLIVEIRA, 2005). Contudo, há uma grande dificuldade em estabelecer qual o melhor solvente ou sistema extrativo mais eficiente, já que vários fatores estão envolvidos neste processo, como a espécie, as propriedades físico-químicas das substâncias, o tempo e a temperatura da extração (ANDREO & JORGE, 2006).

Os flavonóides são conhecidos por exercerem uma infinidade de propriedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica e antiúlcera e antioxidante (SIMOES, 2003).

A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais e suas propriedades de oxidação e redução, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes (VELLOSA, 2007).

Podemos também observar, que não só fatores estruturais intrínsecos das moléculas ou a composição dos extratos vegetais influem na avaliação do potencial antioxidante. Nos ensaios realizados verificamos que dependendo das condições de sua realização (matrizes) observa-se diferenças em relação aos respectivos IC₅₀, que pode refletir o favorecimento ou não da interação dos extratos e frações com as espécies radicalares ou outras espécies reativas.



Conclusões

8 – Conclusões

1. Na avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar utilizando discos de papel, os extratos brutos, frações e substâncias isoladas mostraram-se resistentes a todos os micro-organismos nas concentrações testadas.
 2. Na avaliação da atividade antibacteriana utilizando o método de diluição em microplacas, os extratos brutos, frações e substâncias isoladas apresentaram atividade antibacteriana principalmente frente as bactérias Gram-positivas.
 3. O método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica mostrou-se mais adequado na determinação da atividade antibacteriana com as substâncias puras.
 4. Nossos resultados comprovam a maior sensibilidade do método de diluição em microplacas em relação ao método de difusão em Ágar.
 5. É possível e necessária a combinação de diferentes métodos de análise na avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais. As frações DCM e hidroalcoolicas foram as que apresentaram melhor atividade antioxidante.
-



Referências Bibliográficas

9 - Referências Bibliográficas

ALÉCIO, A.C.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 637– 639, 1998.

ALVES, E. G. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia fallax***. Estudo comparativo de quatro técnicas de “screening”. Franca, 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Biológica) Universidade de Franca.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: técnicas de extração. **B. CEPPA**, v. 24, p. 319-336, 2006.

AQUIL, M.; KAHAN, I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scien. Phy. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 213-215, 1993.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.

ARRIGON-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 215–218, 2004.

AZIBA, P.I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 57–58, 2001.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899-902, 1999.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG,

H.D.; SHAMODY. H.J. **Manual of clinical microbiology.**, 5.ed. Washington, DC: **Am. Soc. Microbiol.**, p. 1117-1125 1991.

BAYMA, J.C.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C.; CANTO, W.C.C. A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 779–782, 2000.

BERGAMO, D.C.B.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Biosynthetic origin of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1406–1409, 2005.

CARBONEZI, C. A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. E *Chiococca alba* Hitch. (RUBIACEAE).** 1998. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita filho”, Araraquara.

CHENG, M.; LEE, S.; CHANG, Y.; WU, S.; TSAI, I.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 603–608, 2003.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochem.**, v. 40, p. 809-816, 2005.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, p. 290–302, 2006.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564 – 82, 1999.

COSTA M.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 1183-1187, 2004.

DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H. G.; YOUNG. M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v. 64, p. 555-559, 2003.

DASGUPTA, N.; DE BRATATI. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. **Food Chem.**, v. 88, p. 219 -224, 2004.

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, p. 33-40, 2004.

DE MORAIS, M.S.; FACUNDO, V.A.; BERTINI, L.M.; BARREIRA CAVANCANTI, E.S.; DOS ANJOS JUNIOR, J.F.; FERREIRA, S.A.; SOUSA DE BRITO, E.; ALVES DE SOUZA, N.M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 35, p. 670, 2007.

DEVIENNE., K. F; RADDI, M. S. Screening for microbial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbial.**, v. 33, p. 166 – 168, 2002

DIAS, B.F.S. **A implementação da conversação sobre a diversidade biológica no Brasil**: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, p.10, 1996.

DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL, L.F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin. Chem.**, v.44, p. 2215-2217, 1998.

DODSON, C.D.; DYER, L.A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOUMEAU, D.K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry** v. 53, p. 51–54, 2000.

DUARTE, M.T.C.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p.197, 2007.

ELOFF., J.N.A.A. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, p. 711-13, 1998.

ELOFF, J.N. A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts—a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **S. Afr. J. Sci.**, p. 116–118, 2000..

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; ALECIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium*, *Piper aduncum* e *Tanaecium nocturnum* sobre *Tenebrio molitor*. **Ciênc. e Agrotecnol.**, v. 31, p. 113, 2007.

FELFILI, J. M.; NOGUEIRA, P. E.; SILVA JUNIOR, M. C.; MARIMON, B. S.; DELITTI, W. B. C. Composicao floristica e fitossociologia do cerrado sentido restrito no municipio de Agua Boa - MT. **Acta bot. Bras.**, v. 16, n 1, p.103-112, 2002.

FELIPPE, L. G.; BERGAMO, D. C. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 445-450, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Bras.**, v. 43, p. 61-8, 1997.

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

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciênc. Hoje**, v. 89, p. 51-55, 1993.

GOVINDACHARI, T.R.; KUMARI, K.G.N.; PARTHO, P.D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2129–2131, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 27, p. 39–48, 2009.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v.55, p. 21-46, 2004.

GULLECE, M.; ASLAN, A.; SOKMEN, M.; SAHIN, F.; ADIGUZEL, A.; ÁGAR, G.; SOKMEN, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*,

Ramalina polymorpha and *Umbilicaria nylanderian*. **Phytomed.**, v. 13, p. 515–521, 2006.

GUTTERIDGE, M. C. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. **Biochem. J.**, v. 224, p. 761–767, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem.**, v. 59, p. 609-23, 1992.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v. 23(suppl 1), p. 118-26, 1993.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARRINSON, JE; SCHULTZ, J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. **Biol. Chem.**, v. 251, p. 1371-34, 1976.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutrit. Biochem.**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HENDERSON, LM; CHAPPLE, JB. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochim Biophys Acta**, v. 1273, p. 87-107, 1996.

HOLETZ F.B.; PESSINI G.L.; SANCHES N.R.; CORTEZ D.A.G.; NAKEMURA C.V.; DIAS FILHO B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOLLOWAY, D.; SCHEINMANN, F. Extractives from *Litsea* species. 2 Lignans from *Litsea grandis* and *Litsea gracilipes*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1233-1236, 1974.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.

JENNER, A.M.; RUIZ, J.E.; DUNSTER, C.; HALLIWELL, B.; MANN, G.E.; SLOW, R.C. Vitamin C protects against hypochlorous Acid-induced glutathione depletion and DNA base and protein damage in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, p. 574-80, 2002.

JERLICH, A.; FABJAN, J.S.; TSCHABUSCHNIG, S.; SMIRNOVA, A.V.; HORAKOVA, L.; HAYN, M.; AUER, H.; GUTEMBERGER, H.; LEIS, H.J.; TATZBER, F.; WAEG, G.; SCHAUR, J. Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase. **Free Radical Biol Med**, v. 24, p. 1139-48, 1998.

JUNIOR, A.C.O. **Constituintes Químicos da Espécie Vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (POLYGALACEAE)**. Florianópolis, Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P.N.A. Modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J. Biochem. Biophysics**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GULLUCE, M.; ÖGUTÇU, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KONISHI, T.; KONOSHIWA, T.; DAIKOYA, A.; KITANAKA, S. Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, p. 121-124, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LAGO, J. G. L.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. M. C.; KATO, M. J. Benzoic Acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium*

cladosporioides and *C. sphaerospermum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p.1783-1788, 2004.

LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 279-281, 2004.

LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 1145-1147, 1996.

LI, N.; WU, J.-L.; SAKAI, J.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1421–1426, 2003.

LOPES, N.P.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Viola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, v. 64, p. 667-669, 1998.

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

LUIZE, P.S.; NAKAMURA, U.T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MORGADO DIAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Research**, v. 100, p. 31–37, 2006.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BARRIOS, A.A.; FOURNET, A.; DUCROT, P.H. Peperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 324–328, 1995.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 694–697, 1996.

MALLAVARAPU, G. O. Contribution of medicinal plants to modern medicine. **J. Med. Plants to Modern Med.** 22/4A-23/1A, p. 572 -578, 2001.

MAREGESI, S.M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O.D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D.A.V.; VLIETINCK, A.J. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 58-66, 2008.

MARTINS, R.C.C.; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 843-846, 2000.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

MIN, K.R.; KIM, K.S.; RO, J.S.; LEE, S.H.; KIM, J.A.; SON, J.K.; KIM, Y. Piperlonguminine from *Piper longum* with inhibitory effects on melanocyte-stimulating hormone-induced melanogenesis in melanoma B16 cells. **Planta Med.**, v. 70, p. 1115-1118, 2004.

MONACHE, F.D.; COMPAGNONE, R.S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1097-1098, 1998.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64, p. 117-124, 2005.

MORADIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochem. Anal.**, v. 16, p. 282-286, 2005.

MORAIS, H.P. **Avaliação “in vitro” da atividade antibacteriana de extratos de *Bysonima spp* e *Alchornea spp***: Estudos comparativos entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. Araraquara, 2006. 79f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLLKEN, R.R. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington: ASM Press, p. 1714, 2007.

KHALIL, M.K. **Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com o ácido hipocloroso:** Efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos. Araraquara, 2005, 136f. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 37-41, 2005.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 108-113, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por difusão em ágar para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 8ª ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M2-A8, v. 23, No 1, 2003).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 6ª ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, No 2, 2003).

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; MIRANDA, J. E.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; De BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, p. 409-415, 2003.

NAVICKIENE, H.M.D.; MORANDIM, A.A.; ALECIO, A.C.; REGASINI, L.O.; BERGAMO, D.C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.; FURLAN, M.; MARQUES, M.O.M. Young, M.C.M.; KATO, M.J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper*

aduncum, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quim.Nova** v. 29, p. 467, 2006.

NETO, C.C.; OWENS, C.W.; LANGFIELD, R.D.; COMEAU, A.B.; St. ONGE, J.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 133–138, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v.17, p. 215-234, 2000.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiro de Fitoquímica Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, No. 3, p. 689-702, 2009.

ORTHOLAND, J.; GANESAN A. Natural products and combinatory chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.271-280, 2004.

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. Pharmacognosy**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 151–157, 2001.

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. Agents Chemother.**, v. 46. n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods Enzym.**, v .299, p.379-389, 1998.

- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES. M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G.; Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1115-1120, 2003.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237-243, 2001.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectiva. **Quim. Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.
- RICE – EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The relatives antioxidants activities of plants-derived polyphenolic flavonoids. **Free Rad. Res.**, v.22, p.375-83, 1996.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo, Editorial Premier, p. 372, 1997.
- RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. macrophage activation includes high intracelular myeloperoxidase activity. **Biochem. Biophysic. Research Commun.**, v. 292, p. 869-873, 2002.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S., MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.**, v. 91, p. 621–632, 2005.
- SALAZAR, K.J.M.; PAREDES, G.E.D.; LLUNCOR, L.R.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 573–579, 2005.
-

SANCHES, A.C.C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.** Araraquara 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

SANTOS, C.A.P. Extratos vegetais em cosméticos. **Cosmet. Toilet.**, v. 18, p. 96-103, 2006.

SATA, N.; ABINSAT, H.; YOSHIDA, W.Y.; HORGEN, F.D.; SITACHITA, N.; KELLY, M. E SCHEUER, P.J. **J. Nat. Prod.**, v. 68, 9, p. 1400-1403, 2005.

SEERAM, N.P.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F. A prenylated benzopyran derivative from *Peperomia clusifolia*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1389–1391, 1998.

SILVA, M.H.L.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* Link var. *circinnata*. **Flav. Frag. J.**, v. 14, p. 312–314, 1999.

SIMÕES C. M. O; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 2 ed – Porto Alegre /Florianópolis : UFSC / UFRGS , 2000.

SIMÕES C. M. O; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5 ed. rev. ampl. – Porto Alegre /Florianópolis: UFSC / UFRGS , 2003.

SIMÕES C. M. O; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6 ed. rev. ampl. – Porto Alegre /Florianópolis : UFSC / UFRGS , 2004.

SOUZA BRITO, A.R.M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J. Ethnopharmacol.**, v. 54, p. 131–138, 1996.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONCALVES, 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, n 3, p. 379-384. 2004.

SUZUKI, M.; MIURA, S.; SUEMATSU, M.; FUKURAMA, D.; KUROSE, L.; SUZUKI, H.; KAI, A.; KUDOH, Y.; OHASHI, M.; TSUCHIYA, M. Helicobacter pylori-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. G719-G725, 1992.

TAKEMORI, N. K.; BONA, C.; ALQUINI, Y. Anatomia comparada da folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) – I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. **Acta bot. Bras.**, v.17, n .3, p. 387-394, 2003.

TAYLOR, D. W.; HICKEY, L. J. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. **Pl. Syst. Evol.**, v. 180, n. 3-4, p. 137-156, 1992.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant Activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 46, n.10, p. 4113 -4117, 1998.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev. Eletr. Farm.**, vol. IV, n. 2, 119-130, 2007.

VELOZO L. S.; FERREIRA M. J.; SANTOS M. I.; MOREIRA D. L.; EMERENCIANO V. P.; KAPLAN M. A. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochem.**, v. 67, n. 5, p. 492-496, 2006.

VELOZO, L.S.M.; FERREIRA, M.J.P.; SANTOS, M.I.S.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; EMERRNCIANO, V.P.; KAPLAN, M.A.C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 119–122, 2009.

WIROTESANGTHONG, M.; INAGAKI, N.; HIROYUKI TANAKA, H.; THANAKIJCHAROENPATH, W.; NAGAI, H. Inhibitory effects of *Piper betle* on production of allergic mediators by bone marrow-derived mast cells and lung epithelial cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 453 – 457, 2008.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J. I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulenensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 11, p. 1656-1660, 2005.

ZGLICZYNSKI, TJM; STELMASZYNSKA, T; DOMANSKA, J; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim Biophys Acta**, v. 235, p. 419-24, 1971.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LOBATO, R. C. L.; TAVARES, A. C. C.; SOUZA, A. P. S.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; GUIMARÃES, E. F. *Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 33. p. 269–274, 2005.
