



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**FERNANDA DA PURIFICAÇÃO PINTO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*BLECHNUM* DA MATA ATLÂNTICA BAIANA**

Feira de Santana, BA

2011

**FERNANDA DA PURIFICAÇÃO PINTO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*BLECHNUM* DA MATA ATLÂNTICA BAIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Angélica Maria Luchese  
Coorientadoras: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro  
Prof<sup>a</sup> Dra. Fabiana Regina Nonato

Feira de Santana, BA

2011

Dedico esse trabalho aos meus pais, Roberto e Cristina, e às minhas irmãs, Roberta, Cristiana e Renata.

## AGRADECIMENTOS

É chegada a hora de agradecer a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, da concretização de mais um sonho: o de tornar-me Mestre.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por guiar os meus passos e por me dar a tranquilidade necessária para enfrentar os desafios e dificuldades da vida.

Aos meus pais, Roberto e Cristina, pela educação impecável, incentivo constante, dedicação e amor incondicional.

As minhas irmãs, Beta, Kila e Nau, pelo companheirismo e pela força nos momentos mais difíceis de nossas vidas. Agradecimento especial a Renata (Nau), que participou desse trabalho em diversos momentos, me ajudando na coleta das plantas, nos ensaios antimicrobianos e nos ensaios antioxidantes.

A minha tia Kalú, pelas aulas de ioga e pelas sessões de *do-in*, acupuntura, cromoterapia, massagem *quick*, enfim, por todas as terapias alternativas que ajudaram a reduzir o estresse.

A minha orientadora, Prof. Dra. Angélica Maria Lucchese, muito obrigada por todos os ensinamentos e pela confiança. De acordo com as minhas anotações, no mês de agosto desse ano completam 7 anos de orientação, incluindo o período de iniciação científica. Com certeza todas as “pseudo-broncas”, todos os ensinamentos e todas as conversas informais durante esse período contribuíram significativamente para a minha formação pessoal e profissional. Espero que nossa parceria se estenda por vários anos, se a senhora ainda me agüentar...

À Prof. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, coorientadora desse trabalho, pelas correções cuidadosas aos meus escritos, todas as vezes que precisei, e pelas dicas valiosas na parte microbiológica.

À Dra. Fabiana Regina Nonato, também coorientadora desse trabalho, pelo auxílio na coleta das plantas, pela preocupação constante com o andamento dos experimentos e por sempre se mostrar disposta a ajudar no que fosse necessário.

À Prof. Dra. Carla Cardeal Mendes, que acabou se tornando uma “coorientadora de plantão”. Muito obrigada pelos esclarecimentos de dúvidas, pelas dicas, pelas conversas, pelos conselhos... hoje entendo porque Renata, minha irmã, lhe admira tanto.

À Dra. Edna Peralta pelos auxílios nos experimentos e por se mostrar sempre disponível e cortês.

À amiga, companheira e colega de Mestrado, Manuela Mercês, pela parceria nos experimentos. Graças a essa parceria nossas noites de experimentos (além dos sábados e feriados...) foram mais divertidas, menos sofridas e mais produtivas. Formamos uma dupla imbatível, e sei que se não fosse o incentivo mútuo não teríamos concluído nossos experimentos.

Ao pessoal do LAPEM (Laboratório de Pesquisa em Microbiologia), em especial às biólogas Carla Ribeiro, Suzana Magalhães, sempre disponíveis a ajudar.

Aos colegas e amigos do LAPRON (Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos) - a todos que fizeram e fazem parte da equipe desse Laboratório – agradeço pela troca de experiências.

Ao Sr. Fernando Falcão, diretor geral do Labovet Produtos Veterinários Ltda., por me liberar para as atividades do Mestrado sempre que precisei.

Aos colegas e amigos do Labovet, em especial ao Sr. Antônio Bernardo, mais conhecido como “Seu Bê”, por ceder a balança do Controle de Qualidade Físico Químico para eu pesar meus extratos. Agradecimento especial também às “meninas” da Garantia da Qualidade - Tati, Ana Cleide, Sílvia, Joelma e Renatinha – com as quais compartilhei minhas angústias em relação ao trabalho e ao Mestrado.

A Sarah Rocha, a “menina do Timbó”, pela amizade, pelo apoio no trabalho e pelos conselhos.

A Manuela Oliveira de Souza, pela energia positiva que você me transmite, mesmo a quilômetros de distância.

Muito obrigada a todos vocês!!!

**Paciência**

Mesmo quando tudo pede  
Um pouco mais de calma  
Até quando o corpo pede  
Um pouco mais de alma  
A vida não para...

Enquanto o tempo  
Acelera e pede pressa  
Eu me recuso faço hora  
Vou na valsa  
A vida é tão rara...

Enquanto todo mundo  
Espera a cura do mal  
E a loucura finge  
Que isso tudo é normal  
Eu finjo ter paciência...

O mundo vai girando  
Cada vez mais veloz  
A gente espera do mundo  
E o mundo espera de nós  
Um pouco mais de paciência...

Será que é tempo  
Que lhe falta para perceber?  
Será que temos esse tempo  
Para perder?  
E quem quer saber?  
A vida é tão rara  
Tão rara...

Mesmo quando tudo pede  
Um pouco mais de calma  
Até quando o corpo pede  
Um pouco mais de alma  
Eu sei, a vida não para  
A vida não para não...

**(Lenine)**

## RESUMO

Nos últimos anos, o aumento da incidência de doenças oxidativas e de infecções causadas por patógenos multirresistentes a drogas têm incentivado estudos na área de produtos naturais, principalmente aqueles voltados à investigação do perfil fitoquímico e terapêutico de plantas pouco conhecidas, a exemplo das pteridófitas. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana, antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides de extratos metanólicos obtidos das partes aérea e subterrânea de espécies do gênero *Blechnum* da Mata Atlântica da Bahia - *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. Na investigação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) foram determinadas. Os micro-organismos testados foram: *Escherichia coli* CCMB 261, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, *Bacillus cereus* CCMB 282, *Staphylococcus aureus* CCMB 262, *Candida albicans* CCMB 286 e *Candida parapsilosis* CCMB 288. No ensaio antioxidante foi empregada a metodologia de seqüestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os teores de compostos fenólicos totais e de flavonóides nos extratos foram obtidos por métodos espectrofotométricos empregando, no primeiro caso, o reativo de Folin Ciocalteu e, no segundo, o cloreto de alumínio. No ensaio antimicrobiano, todos os extratos inibiram o crescimento de ao menos quatro micro-organismos testados, destacando-se o extrato da parte aérea de *B. serrulatum*, que inibiu cinco micro-organismos e apresentou os menores valores de CIM e CBM/CFM. No ensaio antioxidante o extrato mais ativo também foi aquele obtido da parte aérea de *B. serrulatum*. Todos os extratos apresentaram compostos fenólicos e flavonóides. Com o extrato da parte aérea de *B. serrulatum*, observou-se um percentual de atividade antioxidante proporcional ao conteúdo fenólico total, mas não foi observada a mesma associação com o conteúdo de flavonóides. Os resultados obtidos apontam as espécies desse estudo como possíveis alvos na bioprospecção de novos agentes antimicrobianos e antioxidantes.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Flavonóides. Pteridófitas. *Blechnum*.

## ABSTRACT

In last years, the increasing of the incidence of oxidative diseases and infections caused by multi-resistant pathogens to drugs has encouraged the study of natural products, especially those focused on research about phytochemical and therapeutic aspects on non-knowing plants, like the ferns. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and antioxidant activity, the total amount of phenolic compounds and flavonoids from methanolic extracts obtained from the subterranean and aerial parts of species of the genus *Blechnum* from Atlantic Forest of Bahia - *B. occidentale* L. and *B. serrulatum* Rich. In the investigation of the antimicrobial activity of crude extracts the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal/fungicide concentration (MBC/MFC) was determined. The microorganisms tested were: *Escherichia coli* CCMB 261, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, *Bacillus cereus* CCMB 282, *Staphylococcus aureus* CCMB 262, *Candida albicans* CCMB 286 and *Candida parapsilosis* CCMB 288. In the antioxidant assay was used the scavenging stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) methodology. The levels of total phenolic compounds and flavonoids in the extracts were obtained by spectrophotometric methods using, in the first case, the Folin-Ciocalteu reagent and in the second, aluminum chloride. In the antimicrobial assay, all extracts inhibited the growth of, at least, four microorganisms tested, highlighting the extract of the aerial part of *B. serrulatum*, which inhibited five microorganisms and had the lowest MIC and MBC / MFC. In the antioxidant assay also the most active extract was one obtained from the aerial parts of *B. serrulatum*. All extracts showed phenolic compounds and flavonoids. With the extract of the aerial part of *B. serrulatum*, the percentage of antioxidant activity was proportional to the total phenolic quantity, but it was not observed the same association with the flavonoids quantity. The results of this study indicate the species of this study as possible targets in bioprospection of new antimicrobials and antioxidants agents.

**Keywords:** Antimicrobial activity. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Flavonoids. Ferns. *Blechnum*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Ciclo de vida das pteridófitas.....	22
<b>Figura 2:</b>	Esporângios agrupados e recobertos por indúcio.....	23
<b>Figura 3:</b>	Soros lineares paralelos à nervura principal do segmento, com indúcio linear.....	26
<b>Figura 4:</b>	Estrutura geral da espécie da espécie <i>Blechnum occidentale</i> L. (fase esporofítica). <b>(a)</b> Fronde, formada por pecíolo e lâmina foliar. <b>(b)</b> Rizoma. <b>(c)</b> Raízes.....	28
<b>Figura 5:</b>	Compostos fenólicos já isolados em pteridófitas.....	36
<b>Figura 6:</b>	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.....	37
<b>Figura 7:</b>	Flavonóides presentes em pteridófitas. <b>(a)</b> Estrutura das flavonas apigenina e luteolina. <b>(b)</b> Estrutura da flavanona farrerol.....	39
<b>Figura 8:</b>	Esquema representativo da complexação de flavonóides com o íon $Al^{3+}$ .....	39
<b>Figura 9:</b>	Aumento da eficiência de drogas antimicrobianas por ação de compostos oriundos de plantas.....	43
<b>Figura 10:</b>	Estrutura do ácido hipogálico, composto isolado da espécie <i>Salvinia molesta</i> D. S. Mitch.....	48
<b>Figura 11:</b>	Área do 19º Batalhão de Caçadores – Exército Brasileiro (delimitada em vermelho).....	50
<b>Figura 12:</b>	Remanescente de Mata Atlântica que circunda a Represa do Cascão, no 19º BC.....	51
<b>Figura 13:</b>	<b>(a)</b> Ambiente de coleta da espécies <i>B. serrulatum</i> Rich. (espécie destacada no círculo vermelho). <b>(b)</b> Ambiente de coleta da espécie <i>B. occidentale</i> L. (espécie indicada por seta).....	52
<b>Figura 14:</b>	Secagem, à temperatura ambiente, da espécie <i>B. serrulatum</i> Rich.....	54
<b>Figura 15:</b>	Partes aérea e subterrânea da espécie <i>B. serrulatum</i> Rich.....	54
<b>Figura 16:</b>	Etapas da preparação dos extratos brutos: <b>(a)</b> Moagem; <b>(b)</b> Maceração otimizada por ultrassom; <b>(c)</b> Filtração; <b>(d)</b> Concentração em evaporador rotatório.....	55

<b>Figura 17:</b> Inoculação da suspensão microbiana nos poços para determinação da CIM utilizando-se uma pipeta automática multicanal.....	58
<b>Figura 18:</b> Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.....	60
<b>Figura 19:</b> Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	61
<b>Figura 20:</b> Esquema ilustrativo do ensaio antioxidante utilizando o radical DPPH.....	63
<b>Figura 21:</b> Esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	66
<b>Figura 22:</b> Esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de flavonóides .....	68
<b>Figura 23:</b> <b>(a)</b> Placa do teste de determinação da CIM dos extratos metanólicos brutos da parte aérea e parte subterrânea de <i>B. occidentale</i> L. (extratos B.O.(PA) e B.O.(PS), respectivamente) e da parte aérea de <i>B. serrulatum</i> Rich (extrato B.S.(PA)) contra <i>B. cereus</i> CCMB 282. Poços A10, A11 e A12: Controle da viabilidade do micro-organismo. Poços B10, B11 e B12: Controle de esterilidade do extrato da parte aérea de <i>B. occidentale</i> . Poços C10, C11 e C12: Controle de esterilidade do extrato da parte subterrânea de <i>B. occidentale</i> . Poços D10, D11 e D12: Controle de esterilidade do extrato da parte aérea de <i>B. serrulatum</i> . Poços E10, E11 e E12: Controle de esterilidade do meio de cultura 1 vez concentrado. Poços F10, F11 e F12: Controle de esterilidade do meio de cultura 2 vezes concentrado. <b>(b)</b> Placa do teste de determinação da CIM do extrato metanólico bruto da parte subterrânea de <i>B. serrulatum</i> Rich (B.S.(PS)) contra <i>B. cereus</i> CCMB 282. Poços A10, A11 e A12: Controle da viabilidade do micro-organismo. Poços B10, B11 e B12: Controle de esterilidade do extrato da parte subterrânea de <i>B. serrulatum</i> . Poços C10, C11 e C12: Controle de esterilidade do meio de cultura 1 vez concentrado. Poços D10, D11 e D12: Controle de esterilidade do meio de cultura 2 vezes concentrado.....	74
<b>Figura 24:</b> Reações ocorridas com as amostras BO(PA), BO(PS), BS(PA) e BS(PS) (sequência da esquerda para a direita) no ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	81
<b>Figura 25:</b> Curva padrão de ácido gálico.....	81
<b>Figura 26:</b> Curva padrão de quercetina.....	84

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b>	Evidências etnofarmacológicas relatadas na literatura para diferentes espécies de pteridófitas.....	29
<b>Quadro 2:</b>	Levantamento de metabólitos secundários já detectados ou isolados em espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias.....	32

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b>	Espécies reativas de oxigênio (EROs), formas radicalares e não radicalares.....	45
<b>Tabela 2:</b>	Identificação botânica, dados de coleta, e número de exsicata das espécies coletadas.....	53
<b>Tabela 3:</b>	Concentrações das soluções diluídas preparadas a partir de cada extrato testado no ensaio antioxidante.....	62
<b>Tabela 4:</b>	Massa do material vegetal pulverizado, dos extratos brutos e rendimento dos extratos.....	69
<b>Tabela 5:</b>	Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs), em $\text{mg.mL}^{-1}$ , dos extratos metanólicos de <i>B. occidentale</i> L. e <i>B. serrulatum</i> Rich.....	72
<b>Tabela 6:</b>	Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>B. occidentale</i> L. e <i>B. serrulatum</i> Rich. e do padrão rutina, expressa como $\text{CE}_{50}$ ....	79
<b>Tabela 7:</b>	Teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos de <i>B. occidentale</i> L. e <i>B. serrulatum</i> Rich.....	82
<b>Tabela 8:</b>	Teor de flavonóides dos extratos metanólicos de <i>B. occidentale</i> L. e <i>B. serrulatum</i> Rich.....	84

## LISTA DE SIGLAS

**Al<sup>3+</sup>**: Cátion alumínio

**AlCl<sub>3</sub>**: Cloreto de Alumínio

**BO(PA)**: *Blechnum occidentale* (parte aérea)

**BO(PS)**: *Blechnum occidentale* (parte subterrânea)

**BS(PA)**: *Blechnum serrulatum* (parte aérea)

**BS(PS)**: *Blechnum serrulatum* (parte subterrânea)

**C**: Carbono

**CCMB**: Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia

**CMH**: Caldo Müeller-Hinton

**CBM**: Concentração Bactericida Mínima

**CE<sub>50</sub>**: Concentração efetiva, ou, concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres

**CIM**: Concentração Inibitória Mínima

**CFM**: Concentração Fungicida Mínima

**CLSI**: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**DMSO**: Sulfóxido de dimetila

**DP**: Desvio padrão

**DPPH**: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

**EAG**: Equivalente de ácido gálico

**EQ**: Equivalente de quercetina

**EROs**: Espécies reativas de oxigênio

**g**: Grama

**GPS**: *Global Positioning System*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peróxido de Hidrogênio

**HO<sub>2</sub><sup>•</sup>**: Radical Hidroperoxila

**HOCl**: Ácido Hipocloroso

**HUEFS**: Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana

**IBAMA**: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**LAPRON**: Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos

**LAPEM**: Laboratório de Pesquisa em Microbiologia

**LPO**: Peroxidação lipídica

**mg**: Miligrama

**mL:** Mililitro

**MRDs:** Bombas de resistência a multidrogas

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de sódio

**nm:** nanômetro

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxigênio singlete

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion radical superóxido

**O<sub>3</sub>:** Ozônio

**OH:** Grupo hidroxila

**<sup>•</sup>OH:** Radical hidroxila

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**p/v:** peso/volume

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de correlação

**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>:** Radical peroxila

**RO<sup>•</sup>:** Radical alcoxila

**TTC:** Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio

**UEFS:** Universidade Estadual de Feira de Santana

**UFC:** Unidade formadora de colônias

**UV:** Ultravioleta

**UV-Vis:** Ultravioleta – Visível

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro

**19º BC:** 19º Batalhão de Caçadores

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	18
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.2	PTERIDÓFITAS.....	20
<b>2.2.1</b>	<b>Classificação</b> .....	20
<b>2.2.2</b>	<b>Considerações gerais</b> .....	21
<b>2.2.3</b>	<b>Locais e condições de ocorrência</b> .....	24
2.3	FAMÍLIA BLECHNACEAE E GÊNERO <i>BLECHNUM</i> .....	26
2.4	EVIDÊNCIAS ETNOFARMACOLÓGICAS DE PTERIDÓFITAS EM GERAL E DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>BLECHNUM</i> .....	28
2.5	OCORRÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PTERIDÓFITAS EM GERAL E EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>BLECHNUM</i> .....	31
<b>2.5.1</b>	<b>Compostos fenólicos</b> .....	34
2.5.1.1	Flavonóides.....	37
2.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DE PLANTAS.....	40
<b>2.6.1</b>	<b>Atividade antimicrobiana de fitoquímicos e prováveis mecanismos de ação</b> .....	40
2.6.1.1	Atividade antimicrobiana de pteridófitas.....	43
<b>2.6.2</b>	<b>Atividade antioxidante de fitoquímicos e prováveis mecanismos de ação</b> .....	44
2.6.2.1	Atividade antioxidante de pteridófitas.....	48
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA.....	49
3.2	COLETA DAS PLANTAS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES...	52
3.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	53
3.4	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	56
<b>3.4.1</b>	<b>Determinação da CIM</b> .....	56
3.4.1.1	Micro-organismos.....	56
3.4.1.2	Preparo das suspensões de micro-organismos.....	57
3.4.1.3	Preparo dos extratos.....	57
3.4.1.4	Ensaio propriamente dito.....	58
<b>3.4.2</b>	<b>Determinação da CBM e da CFM</b> .....	<b>60</b>
3.5	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	61

<b>3.5.1</b>	<b>Preparo do extrato.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Ensaio propriamente dito.....</b>	<b>62</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>63</b>
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS.....</b>	<b>64</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Determinação do conteúdo fenólico total.....</b>	<b>64</b>
3.6.1.1	Preparo dos extratos.....	65
3.6.1.2	Ensaio propriamente dito.....	65
3.6.1.3	Análise dos dados.....	66
<b>3.6.2</b>	<b>Determinação do teor de flavonóides .....</b>	<b>67</b>
3.6.2.1	Preparo dos extratos.....	67
3.6.2.2	Ensaio propriamente dito.....	67
3.6.2.3	Análise dos dados.....	68
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
4.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	69
4.2	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS BRUTOS.....	70
4.3	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	78
4.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS.....	80
<b>4.4.1</b>	<b>Determinação do conteúdo fenólico total.....</b>	<b>80</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Determinação do teor de flavonóides .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>99</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais pelo homem, tanto para fins nutricionais quanto terapêuticos, é tão antiga quanto sua própria história. Por um longo período de tempo, plantas têm sido uma das fontes de produtos naturais para a manutenção da saúde humana e, nos dias de hoje, representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável (COUTINHO et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Devido à sua diversidade vegetal, o Brasil é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos vegetais com ampla utilização na medicina popular das diversas regiões do país. Assim, a tendência atual nas pesquisas de produtos naturais oriundos de plantas, no Brasil e no mundo, consiste na obtenção de princípios ativos e na busca de um maior conhecimento, de base científica, sobre o potencial terapêutico dos vegetais, o que pode conduzir a novos caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças (COUTINHO et al., 2004).

A pesquisa com plantas medicinais visando à descoberta de novos agentes com atividade antimicrobiana constitui um exemplo da busca de novos caminhos para o tratamento de doenças. O conhecimento sobre determinadas plantas com propriedades antimicrobianas pode constituir uma solução para o problema atual da resistência de patógenos frente ao uso irracional de antimicrobianos e o aumento da incidência de infecções microbianas (CAMPOS, 2006).

A resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos está se tornando um problema de saúde pública crescente, sendo citada para quase todos os antimicrobianos disponíveis. A indústria farmacêutica e as companhias de biotecnologia estão respondendo a esta ameaça com renovados esforços, sendo que estratégias em curto prazo estão focadas na bioprospecção de novos agentes antimicrobianos ativos contra micro-organismos multirresistentes específicos (BAX; MULLAN; VERHOEF, 2000).

Vale ressaltar que a investigação sobre o potencial terapêutico dos vegetais tem sido favorecida pelo entendimento dos mecanismos das doenças e o aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis, que permitiram o desenvolvimento

de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios. Tais sistemas permitem selecionar milhares de amostras bioativas em poucos dias (TREVISAN; MACEDO, 2003).

Outros fatores que justificam o aumento na busca por fontes vegetais dotadas de bioatividade nos últimos anos, além do já mencionado surgimento de estirpes bacterianas resistentes às drogas atuais, são: a valorização dos cuidados preventivos de saúde, a necessidade de redução da incidência de doenças oxidativas, tais como diabetes mellitus, desordens cardiovasculares, câncer e artrites reumáticas associadas ao envelhecimento (LAI; LIM; TAN, 2009) e o menor custo do tratamento à base de plantas medicinais quando comparado com o tratamento com fármacos tradicionais (TREVISAN; MACEDO, 2003).

No tratamento de doenças oxidativas as plantas surgem como alternativa mais segura e mais efetiva que os antioxidantes sintéticos e como estratégia na redução da incidência dessas doenças (LAI; LIM; TAN, 2009).

Diante de todas as evidências apresentadas é importante que estudos na área de produtos naturais sejam expandidos no intuito de se conhecer melhor o perfil químico e o potencial terapêutico de espécies vegetais, principalmente as espécies pouco exploradas.

Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas já tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância à química medicinal (GRABLEY; THIERICKE, 1999). Além disso, apesar de a biodiversidade brasileira ser considerada a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 56.000 espécies catalogadas, apenas uma pequena percentagem foi estudada (cerca de 15% a 17%), e somente para algum efeito específico (SIMÕES et al., 2004; GIULIETTI et al., 2005).

As pteridófitas são um bom exemplo de quão diversa e, paradoxalmente, quão desconhecida é a biodiversidade nacional. Trata-se de um grupo botânico que inclui as samambaias, avencas e plantas afins, corresponde a 10% da flora vascular conhecida, e estima-se que 1.200 a 1.300 espécies ocorram no Brasil (GIULIETTI et al., 2005). No Estado da Bahia, contudo, a biodiversidade de pteridófitas é pouco conhecida.

Apesar de as pteridófitas desempenharem um papel importante na medicina popular e de haver inúmeros relatos sobre os usos etnomedicinais, são raros os

estudos abrangentes sobre sua bioatividade bem como estudos voltados à investigação do seu potencial fitoquímico e farmacológico (SINGH et al., 2008; LAI; LIM; TAN, 2009).

Alguns estudos já realizados demonstraram o alto potencial antimicrobiano de espécies de pteridófitas, especialmente dos gêneros *Adiantum* e *Pteris* (GUHA; MUKHOPADHYAY; GUPTA, 2005; SINGH et al., 2008; SINGH; GOVINDARAJAN; RAWAT, 2008). No estudo realizado por Lai; Lim; Tan (2009), a espécie *Blechnum orientale* apresentou grande quantidade de polifenóis totais, além de forte potencial antioxidante, inibidor da tirosinase e antibacteriano. Já Nonato et al. (2009) demonstraram em seu estudo as atividade antinociceptiva e antiinflamatória da espécie *B. occidentale* L.

Tais relatos validam afirmações etnobotânicas e justificam investigações fitoquímicas e farmacológicas mais detalhadas em outras pteridófitas, especificamente as do gênero *Blechnum*. Este gênero, pertencente à família Blechnaceae, é quimicamente e farmacologicamente pouco estudado, representando um grande potencial na investigação de novos compostos bioativos.

Assim, é possível evidenciar a importância de um estudo de atividade antimicrobiana, antioxidante e da composição química de espécies de *Blechnum* como embasamento científico de uma medicina alternativa e do uso sustentável destas espécies e, ainda, como possível fonte de substâncias ativas para a obtenção de novos fármacos ou protótipos de fármacos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antimicrobiana, antioxidante e a composição química de espécies do gênero *Blechnum* de ocorrência na Mata Atlântica baiana.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos metanólicos brutos obtidos a partir de partes aéreas e subterrâneas das espécies *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides dos extratos metanólicos brutos das partes aéreas e subterrâneas das espécies *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais como terapia preventiva e curativa é tão antiga quanto o próprio ser humano (MARTINS et al., 1994) e, ainda hoje, muitos produtos oriundos de plantas são utilizados em sistemas locais de medicina tradicional, devido à crença de que as plantas medicinais são seguras e eficazes (DHAWAN, 2003).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento dependem principalmente da medicina tradicional (popular) – a qual envolve o uso de extratos vegetais ou de seus princípios ativos - para atender às necessidades de cuidados de saúde primários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; GOYAL; GOYAL; MEHTA, 2007).

Além de possuírem finalidade medicinal, muitas vezes resultante do uso empírico, as plantas constituem uma fonte significativa de produtos naturais biologicamente ativos, os quais ainda desempenham um papel muito importante na descoberta de fármacos, não só em virtude da biodiversidade natural, mas também devido à diversidade molecular associada aos produtos naturais (YUNES; CALIXTO, 2001).

Graças à estrutura molecular, muitos compostos naturais bioativos se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (BASSO et al., 2005). Os dados quantitativos comprovam a importância dos mesmos na concepção atual de fármacos: cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são oriundos, direta ou indiretamente, de produtos naturais, sendo 25% deles oriundos de plantas. Em se tratando de antibióticos e antitumorais, esta porcentagem é de aproximadamente 70% (YUNES; CALIXTO, 2001).

Como exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de plantas pode-se citar: a morfina, isolada da *Papaver somniferum*; a efedrina, isolada da *Ephedra sinica*; a atropina, isolada da *Atropa belladonna*; o digital, isolado a partir das folhas de *Digitalis purpurea*; o ácido acetilsalicílico, primeiro fármaco sintético oriundo da otimização de um produto natural isolado da espécie vegetal *Salix alba*, dentre outros (YUNES; CALIXTO, 2001). Contudo, o grau de desenvolvimento atual da terapêutica moderna se deve, sobretudo, a compostos derivados de plantas superiores (YUNES; CALIXTO, 2001), grupo do qual as pteridófitas, consideradas plantas intermediárias, não fazem parte.

Para o grupo das pteridófitas, é difícil encontrar estudos específicos, especialmente trabalhos voltados às espécies de ocorrência no Brasil. A escassez de estudos justifica a limitação de dados existentes para o grupo, incluindo dados sobre fitogeografia, fitossociologia (SHEPHERD, 2000) e, conseqüentemente, sobre fitoquímica.

## 2.2 PTERIDÓFITAS

### 2.2.1 Classificação

Segundo Mauseth (1995), as pteridófitas estão agrupadas em sete divisões. Três delas - Rhyniophyta, Trimerophytophyta e Zosterophyllophyta – constituem divisões de plantas vasculares primitivas, com todos os representantes fósseis,

enquanto as demais divisões - Psilotophyta, Lycophyta, Arthrophyta e Pteridophyta - apresentam representantes na flora atual.

De todas as divisões, a Pteridophyta é a que apresenta um maior número de espécies descritas, constituindo um grupo de plantas relativamente importante, cuja geração mais representativa é o esporófito, vulgarmente denominado samambaia ou avenca (PEREIRA, 2003).

### 2.2.2 Considerações gerais

A denominação pteridófitas é de origem grega (*pteris* ou *pteridós*, “feto”, e *phyto*, “planta”) e possivelmente foi dada em razão de algumas espécies apresentarem as folhas jovens enroladas (denominadas báculos), semelhantes à posição dos fetos humanos.

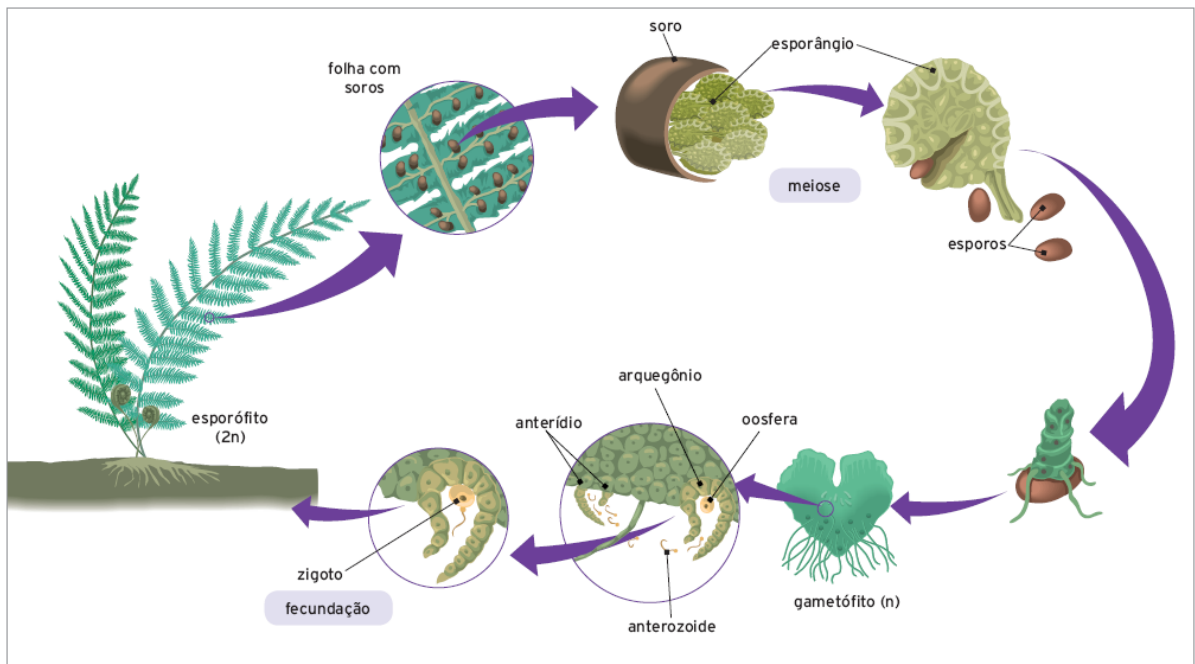
Também é um termo utilizado em botânica para designar o grupo de plantas vasculares mais primitivas da Terra, popularmente conhecidas como samambaias, avencas ou fetos, cujo aparecimento data do período Devoniano (408 a 360 milhões de anos atrás) (SHINOZAKI et al., 2008) e que prosperaram por quase 200 milhões de anos antes da evolução das plantas com flores (HANUS; REZANKA; DEMBITSKY, 2003).

No período Carbonífero (359 a 245 milhões de anos atrás) as pteridófitas eram bastante diversificadas e constituíam grandes florestas, mas na atualidade raramente são dominantes em qualquer tipo de vegetação, visto que são muito dependentes de outras plantas para lhes prover condições de abrigo e suporte (RODRIGUES et al., 2004; XAVIER, 2007).

Trata-se de um importante grupo de vegetais conhecidos como criptógamos vasculares: criptógamos, devido à impossibilidade de identificar, à primeira vista, os órgãos de reprodução sexuada; vasculares, devido à presença de tecidos de condução de água e nutrientes (xilema e floema) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As pteridófitas também são reconhecidas por um ciclo de vida com uma alternância de gerações heteromorfas, na qual a fase esporofítica diplóide é

dominante em relação à efêmera fase gametofítica haplóide (Figura 1) (BLANCH et al., 2010).

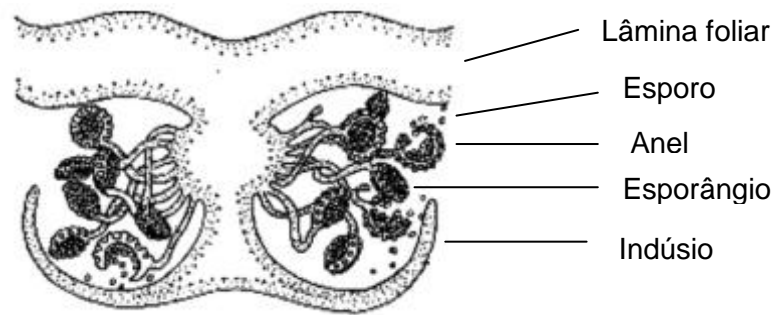


**Figura 1:** Ciclo de vida das pteridófitas.

**Fonte:** OS GRUPOS, 2010.

Estas plantas não possuem flores, independem de polinizadores para reprodução e de vetores animais para sua dispersão, e constituem o único grupo de plantas vasculares sem sementes (PEREIRA, 2003; XAVIER, 2007; SOUZA, 2009).

A reprodução ocorre através da formação de esporos em órgãos especializados denominados esporângios, localizados geralmente na face abaxial de folhas normais ou em folhas modificadas. Tais esporângios distribuem-se por toda a superfície laminar da folha ou unem-se em grupos denominados soros, que podem ou não estar cobertos por uma estrutura laminiforme denominada indúcio (Figura 2) (PEREIRA, 2003).



**Figura 2:** Esporângios agrupados e recobertos por indúsio.

**Fonte:** TAXONOMIA, 2007.

Os esporos liberados pelos esporângios, ao encontrarem condições ambientais favoráveis, germinam, dando origem aos gametófitos, pequenas plantas talosas também conhecidas como prótalos e que são responsáveis pela formação dos órgãos sexuais (arquegônio e anterídio). No arquegônio forma-se a oosfera, e no anterídio, os anterozóides elicóides com numerosos flagelos que, na presença de água, nadam em direção à oosfera, ocorrendo assim a fecundação. Após a fecundação, o esporófito inicia seu desenvolvimento mantido pelo protálo, mas torna-se independente do gametófito na maturidade, quando se adapta ao ambiente terrestre (Figura 1) (PEREIRA, 2003).

Os gametófitos são de pequeno tamanho, frequentemente verdes, geralmente codiformes, de organização muito simples, às vezes de aspecto taloso. Apresentam poucas camadas de células e nutrição independente na maioria das espécies (PEREIRA, 2003). Já os esporófitos apresentam aparelho vegetativo considerado arcaico, diferenciado em raiz, talo (ou caule) e folhas (BLANCH et al., 2010).

As raízes são de origem caulinar e os caules são quase sempre subterrâneos e rizomatosos, de crescimento indefinido. As folhas, também conhecidas como frondes, na maioria dos casos são todas iguais, são perenes em climas tropicais, mas em climas temperados e frios murcham ao chegar o inverno (BLANCH et al., 2010).

Quando adultas, as pteridófitas podem variar de plantas minúsculas, com milímetros de comprimento, até formas arborescentes, que podem atingir 20 metros de altura (SOUZA, 2009).



Inúmeros fatores externos como o clima, a umidade, o tipo de solo ou a relação com outros organismos, podem interferir durante o crescimento das pteridófitas. Também são importantes na fase de desenvolvimento dessas plantas as relações de depredação, já que muitos artrópodes se alimentam de samambaias (PEREIRA, 2003).

A pluviosidade é outro fator que interfere no crescimento das pteridófitas, como observado por Miranda (2008) em um estudo realizado em populações de *B. occidentale* e *B. brasiliense*, durante 12 meses, no município de Bonito, Pernambuco. Durante o monitoramento, verificou-se que a produção e liberação de esporos de *B. occidentale* apresentam correlação inversa com a pluviosidade, enquanto a produção e a taxa de expansão foliar de *B. brasiliense* apresentam correlação direta com a pluviosidade.

### **2.2.3 Locais e condições de ocorrência**

As pteridófitas podem ocorrer em habitats terrestres, rupestres ou epífitos, ou podem ser aquáticas apresentando, em sua maioria, porte herbáceo e em alguns casos, formas arborescentes ou trepadeiras (XAVIER, 2007).

Apesar dessa diversidade de habitats, a maioria das pteridófitas concentra-se em florestas tropicais úmidas, locais onde são encontradas as condições ideais para a ocorrência das espécies, como umidade elevada e sombreamento, essenciais para o ciclo de vida deste grupo vegetal que possui gametas livres nadantes e fertilização externa (XAVIER; BARROS, 2005). O ambiente úmido também é importante para o desenvolvimento da geração gametofítica não vascular (SALDAÑA et al., 2010). Contudo, as pteridófitas também podem sofrer uma gama de adaptações morfológicas e fisiológicas que as tornam aptas a sobreviver frente a condições adversas como: períodos secos, excessivamente frios, queimadas, inundações, ambientes salinos, ácidos e básicos (RANAL, 1995; WINDISCH, 1992).

Assim, na ausência de ambientes úmidos e sombreados, é comum encontrar espécies dotadas de folhas adaptadas morfológica e fisiologicamente, o que as

permite recrutar ambientes abertos e com alta incidência de luz para se desenvolver (SALDAÑA et al., 2010).

A altitude também parece ser um fator importante para o estabelecimento de muitas espécies, sendo a ocorrência das mesmas verificada desde o nível do mar até elevadas altitudes (XAVIER, 2007).

Estima-se que existem entre 9.000 a 12.000 espécies, 240 gêneros e 33 famílias amplamente distribuídas no mundo, com maior diversidade sendo observada nas regiões úmidas tropicais (cerca de  $\frac{3}{4}$  das espécies), principalmente em decorrência de sua dependência de água para fecundação (TRYON; TRYON, 1982; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Desta riqueza estimada, cerca de 3.250 das espécies ocorrem no Continente Americano. No Brasil, estima-se de 1.200 a 1.300 espécies (TRYON; TRYON, 1982; GIULIETTI et al., 2005).

Segundo Xavier (2007), no Brasil as pteridófitas encontram-se distribuídas principalmente nas regiões Sudeste e Sul e em áreas da Floresta Atlântica. É nesse ecossistema ameaçado, dotado de uma variedade de microambientes, que as pteridófitas apresentam uma diversidade em número de espécies e uma variedade de combinações de habitat, hábitos e formas de crescimento (SENNA; KAZMIRCZAK, 1997; SOUZA, 2009).

Estima-se que este ecossistema ocupava originalmente uma área de 1.306.41 Km<sup>2</sup>, correspondendo a aproximadamente 16% do território brasileiro em 17 Estados. Devido à intensa degradação, inicialmente com a exploração do pau-brasil e depois com as sucessivas derrubadas e queimadas para possibilitar o plantio de cana, café e pastagens, a região de Mata Atlântica restringiu-se a áreas remanescentes, em sua maioria isoladas em unidades de conservação. Destas áreas remanescentes, somente 5% estão no Nordeste do país (SANTOS, 2009).

Na Região Nordeste do Brasil as pteridófitas apresentam distribuição geográfica relativamente ampla em diversas zonas fitogeográficas, sendo possível encontrá-las até mesmo em áreas de Caatinga, especificamente em seus micro-habitats úmidos e sombreados como fendas de rochas, barrancos em áreas sombreadas, lagoas temporárias, nascentes ou áreas com solos temporariamente alagados (XAVIER, 2007).

### 2.3 FAMÍLIA BLECHNACEAE E GÊNERO *BLECHNUM*

Uma das famílias que compõe o grupo botânico das pteridófitas, denominada Blechnaceae (divisão Pteridophyta), apresenta distribuição cosmopolita e é constituída por nove gêneros e cerca de 200 espécies (SMITH et al., 2006). Dos nove gêneros reconhecidos para essa família (*Blechnum* L., *Brainea* J. Sm., *Doodia* R. Br., *Pteridoblechnum* Hennipman, *Sadleria* Kaulfuss, *Salpichlaena* J. Sm., *Steenisoblechnum* Hennipman, *Stenochlaena* J. Sm. e *Woodwardia* Sm.), apenas os gêneros *Blechnum* e *Salpichlaena* ocorrem no Brasil (ARANTES; PRADO; RANAL, 2008).

As plantas pertencentes a essa família podem ser terrestres, rupícolas ou raramente epífitas, hemiepífitas ou trepadeiras (ARANTES; PRADO; RANAL, 2008).

É uma família caracterizada pela presença, na face abaxial da lâmina foliar, de soros alongados, lineares (cenosoros), paralelos à nervura principal do segmento, com um indúcio linear abrindo-se em direção à nervura (TRYON; TRYON, 1982) (Figura 3).



**Figura 3:** Soros lineares paralelos à nervura principal do segmento, com indúcio linear.

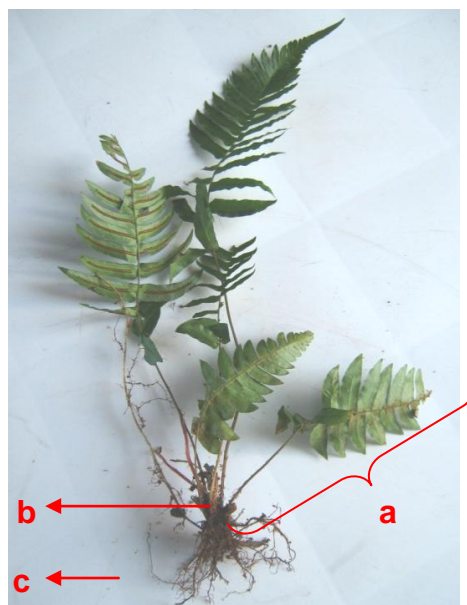
Na família Blechnaceae, o gênero que possui o maior número de espécies descritas - cerca de 150 - é o gênero *Blechnum* (TRYON; TRYON, 1982), embora ainda seja um gênero taxonomicamente pouco conhecido (KESSLER; SMITH; LEHNERT, 2007).

A maioria destas espécies ocorre no Hemisfério Sul, com aproximadamente 50 delas ocorrendo na América (TRYON; TRYON, 1982). De acordo com Dittrich (2005) os centros primários de diversidade deste gênero são a Oceania e a América Tropical.

As espécies de *Blechnum* são comuns no interior de florestas sombreadas, úmidas e montanhosas, e em ambientes com solos encharcados como manguezais, veredas, margens de rios ou, em menor frequência, sobre rochas ou de hábito epífita (TRYON; TRYON, 1982).

As plantas que compõem o gênero *Blechnum* podem ser terrestres, arborescentes a herbáceas, epífitas ou rupícolas. Podem apresentar: rizoma horizontal ou ereto, às vezes estolonífero, escamoso; frondes monomorfas ou dimorfas, sendo as férteis geralmente maiores e com pinas mais estreitas; pecíolo e raque geralmente rugosos; lâmina simples, profundamente pinatífita a 1-pinada, raramente 2-pinada, glabra ou com escamas e/ou tricomas aciculares ou glandulares; pinas com margens inteiras ou serradas, articuladas ou não com a raque; nervuras simples; soros lineares, paralelos à costa; indúcio linear, abrindo-se em direção à costa, margens inteiras ou erodidas, esporângios pedicelados; esporos subglobosos, monoletes, perisporo alado, rugoso, papiloso ou liso (ARANTES; PRADO; RANAL, 2008).

Na Figura 4, estrutura geral da espécie *Blechnum occidentale* L, em sua fase esporofítica.



**Figura 4:** Estrutura geral da espécie *Blechnum occidentale* L. (fase esporofítica). **(a)** Fronde, formada por pecíolo e lâmina foliar. **(b)** Rizoma. **(c)** Raízes.

## 2.4 EVIDÊNCIAS ETNOFARMACOLÓGICAS DE PTERIDÓFITAS EM GERAL E DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BLECHNUM*

A Etnofarmacologia compreende o estudo de práticas médicas, especialmente remédios, utilizados em sistemas tradicionais de medicina (SIMÕES et al., 2004). Em se tratando de pteridófitas, sua utilização popular como remédio, seja na forma de decoctos, infusos, cataplasmas, pastas, loções, e também como alimento e bebidas é conhecida de longa data (BANERJEE; SEN, 1980; CAULA; SECCHIARI; COUSSIO, 1990; ORTEGA; DIAS, 1993; GAUR; BHATT, 1994).

O botânico grego Teophrastus (cerca de 372-287 a.C.) fez referência ao valor medicinal de samambaias em um de seus livros, *Historia Plantarum*. Dioscórides (cerca de 50 d.C.), um dos mais notáveis médicos da antiguidade, que viveu na Grécia no século I da era cristã e foi autor da obra *De Materia Medica*, também fez referências nesse livro a várias samambaias com valor medicinal, incluindo a espécie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. e a espécie *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott., popularmente conhecida como feto-macho (BANERJEE; SEN, 1980).

Na Índia, algumas tribos como *Santhal*, *Kol*, *Bhumija*, *Bhuyan*, *Mahalis*, *Sounti* e *Saharas* utilizavam pteridófitas com finalidades medicinais. As partes das plantas, incluindo frondes, raízes e rizomas, eram utilizadas na forma bruta ou cozidas para o tratamento de malária, lepra, gonorréia, reumatismo etc. Dentre os gêneros utilizados estavam: *Adiantum*, *Asplenium*, *Lygodium* e *Pteris* (ROUT; PANDA; MISHRA, 2009).

Também há relatos do uso popular de pteridófitas, particularmente das samambaias, na China, Europa, América do Norte (por índios americanos), Brasil, Argentina e África (BANERJEE; SEN, 1980).

Dentre os usos de espécies de pteridófitas na medicina popular já foram citados: como expectorante, diurético, antipirético, tônico capilar, em infecções, contra doenças do sangue, no tratamento de doenças de pele, bronquite e asma, como analgésico e até como antídoto contra picada de cobra (BRESCIANI et al., 2003; GUHA; MUKHOPADHYAY; GUPTA, 2005).

Os dados da literatura apontam que a maioria dos remédios oriundos de pteridófitas são administrados por via oral, sendo preparados em diferentes formas:

sucos, extratos, decoctos, pastas, infusões, pós, dentre outras. Normalmente as preparações contêm uma mistura de plantas, e raramente uma planta é utilizada isoladamente (ROUT; PANDA; MISHRA, 2009).

O Quadro 1 sumariza evidências etnofarmacológicas relatadas na literatura para espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias.

**Quadro 1:** Evidências etnofarmacológicas relatadas na literatura para diferentes espécies de pteridófitas

Espécie (Família)	Evidências etnofarmacológicas	Autor(es), ano
<i>Adiantum</i> sp. (Adiantaceae)	Uso tradicional de algumas espécies de <i>Adiantum</i> no tratamento de doenças infecciosas	VASUDEVA, 1999
	Utilizada popularmente no tratamento de tumores de fígado, baço e outras vísceras, em doenças de pele, bronquite e doenças inflamatórias; também é considerada tônica e diurética	SINGH et al., 2008
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. (Adiantaceae)	Utilizada para curar a asma, a icterícia, como diurético, em enfermidades pulmonares e para as picadas de serpente	BLANCH et al., 2010
<i>Adiantum caudatum</i> L. (Adiantaceae)	Espécie utilizada em Kairakacha (Índia), na forma de extrato das frondes, na cicatrização de feridas	ROUT; PANDA; MISHRA, 2009
<i>Adiantum incisum</i> Forsk. (Adiantaceae)	Espécie utilizada em Barheipani (Índia) da seguinte maneira: folhas secas ou frescas, trituradas na forma de pasta e misturadas com óleo de coco, são utilizadas para queda de cabelo. A infusão das frondes jovens é utilizada no tratamento da malária e de doenças brônquicas. Uma mistura do pó das frondes com manteiga é utilizada no tratamento de queimações internas do corpo	ROUT; PANDA; MISHRA, 2009
<i>Adiantum lunatum</i> Burm. F. (Adiantaceae)	Espécie utilizada em Bjanjabasa (Índia). Decocto da folha e da raiz utilizado no tratamento de chiado no peito; decoção das folhas frescas utilizada para tratar ciclo menstrual irregular	ROUT; PANDA; MISHRA, 2009
<i>Adiantum philippense</i> L. (Adiantaceae)	Espécie utilizada em Meghasani (Índia) na forma de pasta, administrada oralmente, para alívio imediato de indigestão	ROUT; PANDA; MISHRA, 2009
<i>Asplenium ruta-muraria</i> L. (Aspleniaceae)	Apresenta propriedades curativas para afecções de baço, peito e rins	BLANCH et al., 2010
<i>Asplenium trichomanes</i> L. (Aspleniaceae)	Frondes utilizadas na forma de infuso e decocto para tratar infecções do baço e o fígado	BLANCH et al., 2010

**Cont. Quadro 1:** Evidências etnofarmacológicas relatadas na literatura para diferentes espécies de pteridófitas

<b>Espécie (Família)</b>	<b>Evidências etnofarmacológicas</b>	<b>Autor(es), ano</b>
<b><i>Blechnum occidentale</i> L. (Blechnaceae)</b>	<b>Utilizada no tratamento de desordens da gestação, do parto e do pós-parto</b>	<b>NAVARRETE et al., 2006</b>
	<b>Utilizada no tratamento de infecções urinárias</b>	<b>BARROS; ANDRADE, 1997</b>
<b><i>Blechnum orientale</i> L. (Blechnaceae)</b>	<b>Espécie utilizada em Devasthali (Índia) das seguintes maneiras: 2 a 3 gotas do suco das folhas são utilizadas no ouvido em casos de dor severa; o rizoma é utilizado para tratar feridas intestinais; as frondes frescas são utilizadas como cataplasma para furúnculos e também para tratar queixas urinárias</b>	<b>ROUT; PANDA; MISHRA, 2009</b>
<b><i>Blechnum serrulatum</i> Rich. (Blechnaceae)</b>	<b>Utilizada, na forma de chá, no combate a edemas</b>	<b>BARROS; ANDRADE, 1997</b>
<i>Brainea insignis</i> (Hook.) J. Smith. (Blechnaceae)	Utilizada principalmente na China como erva medicinal para tratar o frio, queimadura, feridas com sangramento e ascaridíase	WANG et al., 2010
<i>Dryopteris filix-mas</i> (Polypodiaceae)	Utilizada como vermífugo (os rizomas e bases das frondes)	BLANCH et al., 2010
<i>Lygodium japonicum</i> (Thunb.) (Schizaeaceae)	Utilizada na China há mais de 2000 anos (planta inteira ou esporos maduros) no tratamento de eczema de pele, diarreia, nefrite, cálculo renal e infecção urinária	LI; ZHOU; HAN, 2006
<i>Microgramma squamulosa</i> (Polypodiaceae)	Tradicionalmente empregada como agente contra úlceras estomacais	SUFFREDINI; BACCHI; KRAUS, 2008

Em negrito, evidências etnofarmacológicas relatadas para espécies do gênero *Blechnum*.

Segundo Yunes; Calixto (2001), quando se pretende selecionar plantas para o desenvolvimento de novos medicamentos pode-se empregar uma série de métodos, incluindo: seleção ao acaso; emprego de conhecimentos etnofarmacológicos; taxonomia química; ecologia química. De todos esses métodos, o que resulta em uma maior probabilidade de encontrar plantas com boa atividade farmacológica é o emprego de conhecimentos etnofarmacológicos.

Assim, é importante a documentação de todo esse conhecimento popular principalmente para a conservação e utilização das informações etnomedicinais como base para pesquisas fitoquímicas, farmacológicas e clínicas de novos princípios ativos oriundos de fontes vegetais (ROUT; PANDA; MISHRA, 2009).

## 2.5 OCORRÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PTERIDÓFITAS EM GERAL E EM ESPÉCIES DO GÊNERO *BLECHNUM*

Apesar dos variados relatos existentes sobre a utilidade medicinal de algumas espécies de pteridófitas, baseados no uso empírico, o potencial fitoquímico e farmacológico das mesmas está longe de ser totalmente explorado. Se comparadas com as plantas superiores, as pteridófitas são frequentemente ignoradas como objetos de estudos fitoquímicos que, segundo Simões et al. (2004), têm por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença.

Tais constituintes químicos, também conhecidos como metabólitos, resultam de reações químicas que ocorrem continuamente nas células vegetais. Alguns deles - como os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos - são essenciais à manutenção da vida do organismo produtor, sendo, por isso, denominados metabólitos primários (SIMÕES et al., 2004).

Há ainda os metabólitos secundários, produtos que embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie no ecossistema, visto que estão diretamente envolvidos em mecanismos que permitem a adequação do produtor ao meio (SIMÕES et al., 2004).

Além de poderem desempenhar funções de defesa contra herbívoros e micro-organismos fitopatogênicos, proteger as plantas contra raios ultravioleta (UV), participar em alelopatias, dentre outras funções ecológicas, os metabólitos secundários frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes (HARBONE, 1988; SIMÕES et al., 2004).

Desta forma, os metabólitos secundários têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência, especialmente na área farmacêutica, que vêem neles uma fonte promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SIMÕES et al., 2004).

Apesar dos escassos estudos fitoquímicos já realizados em pteridófitas, essas constituem um grupo de vegetais reconhecidamente abundantes em metabólitos secundários não encontrados em plantas superiores. Já são conhecidos pelo menos



200 derivados triterpênicos com estrutura distinta daqueles encontrados em plantas superiores (SHINOZAKI et al., 2008).

Também foram identificados compostos fenólicos em algumas espécies de pteridófitas que normalmente estão associados à atividade antimicrobiana das espécies que os contêm (GUHA; MUKHOPADHYAY; GUPTA, 2005; MELOS et al., 2007).

Durante a última década, outros compostos naturais foram descobertos em diferentes espécies de pteridófitas da família Pteridaceae, a exemplo de flavonóides (chalconas, dihidrochalconas, avanonas, dihidroflavonóis, flavonas, flavonóis e biflavonóides) presentes em exsudatos localizados na superfície abaxial das frondes (WOLLENWEBER; SCHNEIDER, 2000).

O Quadro 2 sumariza os metabólitos secundários já detectados ou isolados em espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias.

**Quadro 2:** Levantamento de metabólitos secundários já detectados ou isolados em espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias

Espécie (Família)	Compostos detectados ou isolados	Extrato / Fração investigada (s)	Autor(es), ano
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. (Adiantaceae)	Flavonóides, taninos, taninos catéquicos, ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, ésteres do ácido hidroxicinâmico, ácidos gálico e tânico	-	BLANCH et al., 2010
	Compostos fenólicos	Extrato metanólico	SINGH et al., 2008
<i>Adiantum caudatum</i> L. (Adiantaceae)	Compostos fenólicos e saponinas	Extrato metanólico	SINGH et al., 2008
<i>Adiantum peruvianum</i> (Adiantaceae)	Compostos fenólicos	Extrato metanólico	SINGH et al., 2008
<i>Adiantum venustum</i> (Adiantaceae)	Compostos fenólicos e saponinas	Extrato metanólico	SINGH et al., 2008
<i>Angiopteris palmiformis</i> (Marattiaceae)	01 glicosídeo denominado angiopterosídeo; 03 flavonóides (violantina, isoviolantina e apigenina 6,8-di-C- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo); 02 triterpenos tipo ferneno, o 7- $\alpha$ -hidroxifern-8-en-11-ona e o 11 $\beta$ -hidroxifern-8-en-7-ona; 03 triterpenos tipo filiceno, o 3 $\beta$ -hidroxifilic-4(23)-eno, o filicenol e o 3 $\alpha$ -hidroxifilic-4(23)-eno	Extratos metanólicos das frondes	CHEN et al., 2010

**Cont. Quadro 2:** Levantamento de metabólitos secundários detectados ou isolados em espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias

Espécie (Família)	Compostos detectados ou isolados	Extrato / Fração investigada (s)	Autor(es), ano
<i>Blechnum brasiliense</i> (Blechnaceae)	Compostos fenólicos	Fração acetato de etila obtida do fracionamento do extrato bruto	FARIAS et al., 2007
<i>Blechnum orientale</i> Linn. (Blechnaceae)	Polifenóis	Extrato de frondes frescas	LAI; LIM; TAN, 2009
<i>Blechnum minus</i> (Blechnaceae)	Ecdisteróides (Blechnosídeo A e Blechnosídeo B)	-	SUKSAMRARN; WILKIE; HORN, 1986
<i>Blechnum spicant</i> (Blechnaceae)	Lignanas	-	WANG; DAVIN; LEWIS, 2001
	Ácidos fenólicos	-	DAVIN et al., 2003
<i>Blechnum regnellianum</i> (Blechnaceae)	(2S)-5,7-Dihidroxi-4'-methoxi-6,8-dimetilflavanona	Extrato das frondes	DOCARMO et al., 1985
<i>Brainea insignis</i> (Hook.) J. Smith. (Blechnaceae)	Lignanas, flavonoides, glicosídeos, estilbenos, esteróides e uma série de compostos voláteis; compostos fenólicos, incluindo um flavonol pouco usual acoplado com unidades de fenilpropil e ácido chiquímico, denominado brainicina, e um novo flavonol acilglicosídeo brainosídeo B	-	WANG et al., 2010
<i>Cyathea faurieri</i> (Cyatheaceae)	Flavonóides kanferol, cirtominetina e farrerol e uma flavona caracterizada como vitexina	Extrato das frondes	HIRAOKA; HASEGAWA, 1975
<i>Cyathea hancockii</i> (Cyatheaceae)			
<i>Dryopteris filix-mas</i> (Polypodiaceae)	Filicina, que é uma mistura de substâncias polifenólicas derivadas do floroglucinol, entre as quais se destacam a aspidina, o ácido flavaspídico e a desaspidina	-	BLANCH et al., 2010
<i>Lophosoria quadripinnata</i> (Lophosoriaceae)	05 compostos lipofílicos, triterpenos tipo hopano	Extrato das frondes	TANAKA et al., 1991
<i>Lygodium flexuosum</i> (Schizaeaceae)	Diterpenóides do tipo giberelinas	Extratos das frondes	WYNNE et al., 1998
<i>Lygodium circinnatum</i> (Schizaeaceae)			
<i>Microgramma squamulosa</i> (Polypodiaceae)	Flavonóides e taninos	Extrato bruto de caule/raízes e frações ativas	SUFFREDINI; BACCHI; KRAUS, 2008

**Cont. Quadro 2:** Levantamento de metabólitos secundários detectados ou isolados em espécies de pteridófitas pertencentes a diferentes famílias

<b>Espécie (Família)</b>	<b>Compostos detectados ou isolados</b>	<b>Extrato / Fração investigada (s)</b>	<b>Autor(es), ano</b>
<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>caudatum</i> (Dennstaedtiaceae)	Glicosídeo sesquiterpeno do tipo protoiludano, denominado pteridanosídeo	Extrato aquoso (água quente)	CASTILLIO et al., 1999
<i>Salvinia molesta</i> D. S. Mitch. (Salviniaceae)	02 glicosídeos, o éster 6'-O-(3,4-dihidroxi benzoil)- $\beta$ -D-glucopiranosil e 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo-3-hidroxi metil benzoato; ácido hipogálico; ácido caféico; paeoniflorina e pikurosídeo	Frações acetato de etila e butanólica obtidas após fracionamento do extrato metanólico bruto	CHOUDHARY et al., 2008
<i>Selaginella willdenowii</i> (Selaginellaceae)	03 biflavonas, a 4'-7''-di-O-mentoflavona, a isocriptomerina e a 7''-O-metilrobustaflavona	Extrato das folhas	SILVA et al., 1995
<i>Woodwardia virginica</i> (L.) Sm. (Blechnaceae)	Um novo glicosídeo trinorsesterterpeno, tendo como aglicona um ácido 3-[6-(4,8-dimetilnona-1,3,7-trienil)-4-hidroxi-2,6-dimetilciclohex-1-enil]-3-hidroxipropiônico e frações sacarídicas de glicose, xilose ou arabinofuranose ligadas em C-4; a fração aglicona foi denominada woodwardina.	Extrato etanólico das frondes frescas	HANUS; REZANKA; DEMBITSKY, 2003

- Informação inexistente na referência consultada.

Em negrito, estudos fitoquímicos já realizados com espécies do gênero *Blechnum*.

Embora os estudos apontem a presença de diversos metabólitos secundários em pteridófitas, Blanch et al. (2010) ressaltam que, de todos os metabólitos, os mais freqüentes e variados nesse grupo vegetal são os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides.

### 2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na Natureza, sendo que mais de 8.000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas, nas quais contribuem para o sabor, odor e coloração (LAI; LIM; TAN, 2009; SIMÕES et al., 2004; SILVA et al., 2010).

Normalmente derivam de reações de defesa das plantas em resposta a agressão por patógenos, a exemplo da hidroquinona, do ácido elágico e ésteres do ácido gálico, ou em resposta ao ataque de insetos, a exemplo de alguns fenilpropanóides relatados como marcantes supressores do apetite de insetos (SIMÕES et al., 2004).

Há ainda polifenóis que são formados em resposta a outras condições de estresse ambiental. Assim, plantas que estão expostas a fatores de estresse, como as plantas de altas montanhas, expostas a baixa temperatura, a redução da pressão parcial de O<sub>2</sub>, ao aumento da radiação UV e a regime hídrico desfavorável, geralmente tem um grande acúmulo de polifenóis (LAI; LIM; TAN, 2009). Como exemplo, pode-se citar a espécie *Blechnum orientale* L., que se desenvolve em ambientes expostos a luz solar e em encostas ou regiões montanhosas com altitude de 1.500 a 1.700 metros, e tende a apresentar valores elevados de compostos fenólicos totais (LAI; LIM; TAN, 2009).

Quanto à estrutura, os compostos fenólicos são bastante diversos e são dotados de pelo menos um anel aromático contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (ÁNGEL; GONZÁLES, 1999; SIMÕES et al., 2004).

A maior parte desses compostos não é encontrada no estado livre na natureza, e sim na forma de ésteres ou de heterosídeos, o que lhes confere solubilidade em água e em solventes orgânicos polares. Além disso, por serem fenólicos, são muito reativos quimicamente e apresentam, em geral, características ácidas, podendo ser isolados através da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, solução de carbonato de sódio) (SIMÕES et al., 2004).

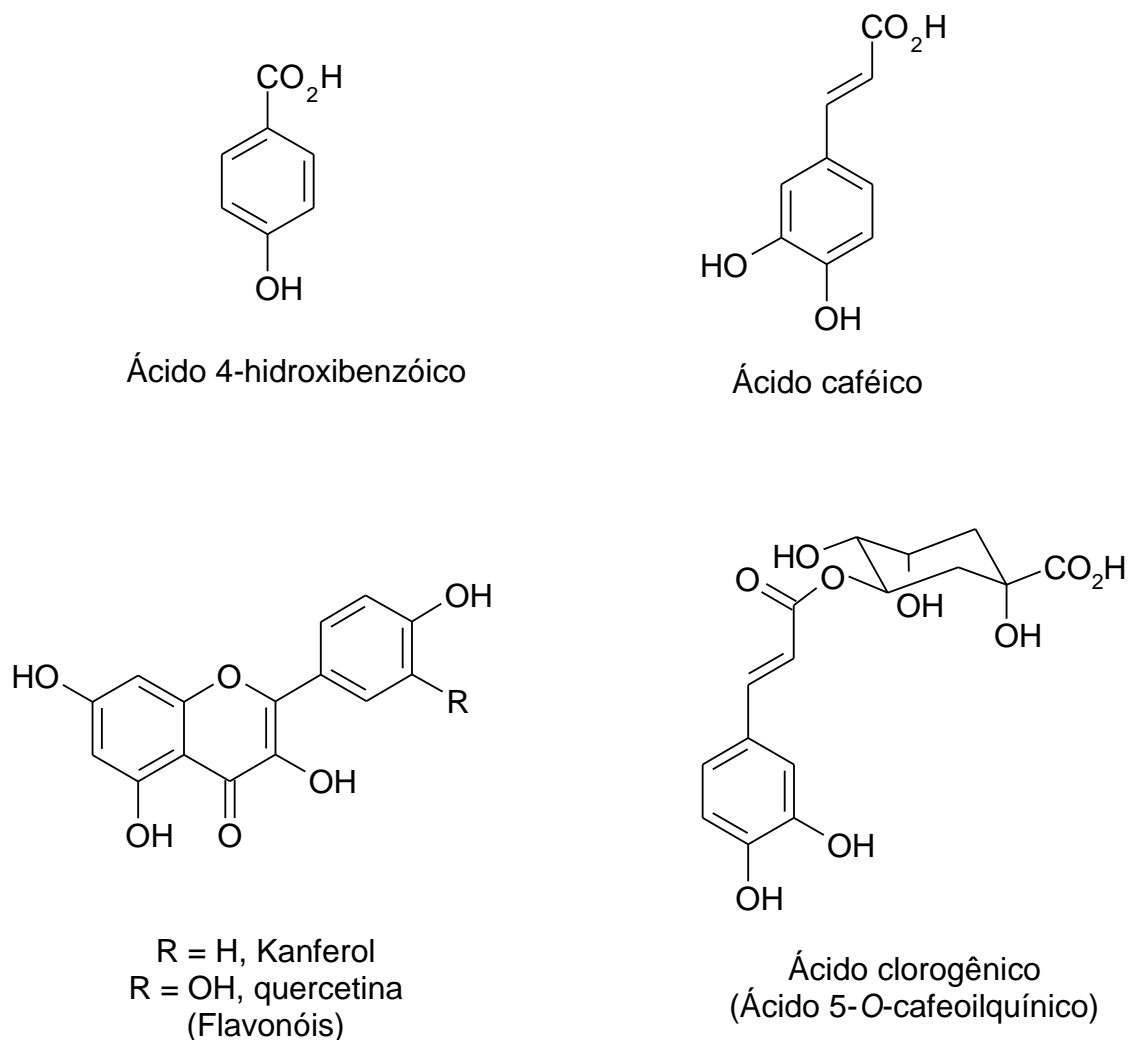
Os compostos fenólicos são também facilmente oxidáveis, seja através de enzimas específicas ou por influência de metais (como ferro e manganês), por ação da luz e do calor, ou em meio alcalino, fato que ocasiona o escurecimento de suas soluções ou dos compostos isolados. Outra característica importante é a intensa absorção na região do UV, por serem compostos aromáticos (SIMÕES et al., 2004).

Os principais compostos fenólicos comumente encontrados em plantas podem ser classificados em classes, de acordo com o tipo e o número de anéis fenólicos que apresentam, e em subclasses, de acordo com substituições

específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (MANACH et al., 2004).

Em uma das classes encontram-se os compostos não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos fenólicos, dentre eles os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico) e na outra, os compostos flavonóides (polifenóis) (SILVA et al., 2010). Também se enquadram no grupo dos compostos fenólicos as cumarinas, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, bem como as lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

Na Figura 5, exemplos de compostos fenólicos que, segundo Blanch et al. (2010), já foram encontrados em pteridófitas.



**Figura 5:** Compostos fenólicos já isolados em pteridófitas.  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

### 2.5.1.1 Flavonóides

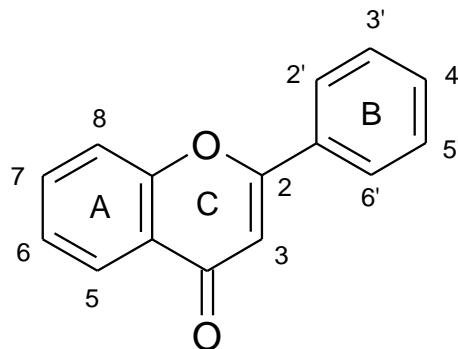
Os flavonóides constituem uma classe de compostos amplamente distribuída no reino vegetal, e que representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES et al., 2004).

Dentre as funções atribuídas aos flavonóides nas plantas estão: proteção contra incidência de raios ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides também são dotados de importância farmacológica, resultado de propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antialérgica, vascular (redução da permeabilidade e da fragilidade capilar), dentre outras (SIMÕES et al., 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005).

Devido à habilidade dos flavonóides em inibir a germinação de esporos de patógenos em plantas, seu uso contra fungos patogênicos ao homem também tem sido proposto. Há relatos da ação de flavonóides isolados de plantas contra *Candida albicans* (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Quanto à estrutura, possuem em seu núcleo fundamental 15 átomos de carbono, que constituem dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano heterocíclico (C) (Figura 6). Podem ocorrer conjugados com açúcares, formando os O-heterosídeos ou C-heterosídeos (açúcar ligado por intermédio de uma hidroxila ou por intermédio de um átomo de carbono, respectivamente), na forma livre de açúcares, denominada aglicona ou genina (SIMÕES et al., 2004), ou ainda polimerizados (antocianinas) (SOBRINHO et al., 2010).



**Figura 6:** Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.  
**Fonte:** BEHLING et al., 2004.

O anel A é proveniente da rota do acetato (Malonil-CoA), enquanto o anel B e a cadeia propiônica que forma o anel heterocíclico C são oriundos da rota do chiquimato (*p*-Cumaril-CoA) (SOBRINHO et al., 2010).

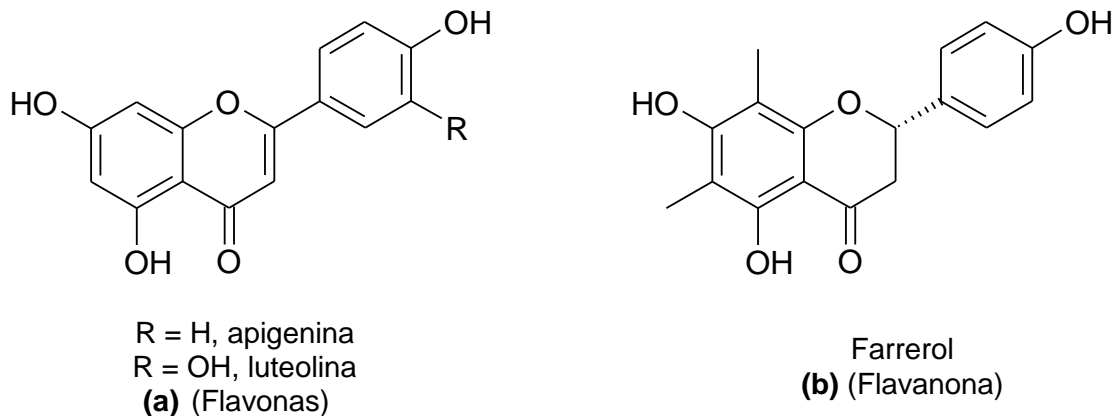
A família dos flavonóides é composta por mais de 4.000 diferentes compostos, agrupados em classes, que diferem no nível e padrão de oxidação do anel C. Dentre as classes de flavonóides estão: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis, e antocianidinas. Outras classes incluem biflavonas, chalconas e auronas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Já as diferenças individuais dentro de cada classe resultam de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, ou em modificações nos núcleos, especialmente a saturação do heterociclo pirônico, e também, pelo grau de glicosilação e metilação, as quais afetam várias propriedades dos flavonóides, especialmente a hidrofobicidade das moléculas (YUNES; CALIXTO, 2001).

De acordo com Blanch et al. (2010) os flavonóides presentes nas pteridófitas aumentam em complexidade estrutural segundo avança a evolução, ocorrendo flavonas de estrutura mais simples em táxons mais primitivos, até flavonóides de estrutura química mais complexa em táxons mais recentes. Simões et al. (2004) revelam, ainda, que a variabilidade estrutural dos flavonóides encontrados em pteridófitas é pequena.

Os flavonóides das samambaias são primariamente restritos a quatro grupos principais: flavonóis, glicosilflavonas, flavonas e flavanonas. Também são encontrados outros tipos de flavonóides em samambaias, porém de forma mais esporádica, como antocianinas, xantonas, flavanonóis e as biflavonas (WALLACE, 1989).

De acordo com Blanch et al. (2010), em pteridófitas, dentro do grupo das flavonas podem ser encontradas a apigenina e a luteolina (Figura 7a); no grupo dos flavonóis, o kanferol e a quercetina (Figura 5); dentre as flavanonas, o farrerol (Figura 7b) e a cirtominetina. Também são encontrados derivados glicosilados de tais compostos.



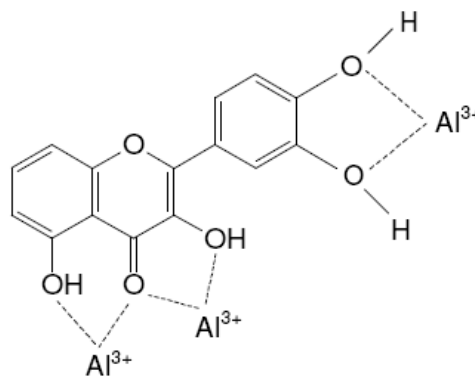
**Figura 7:** Flavonóides presentes em pteridófitas. **(a)** Estrutura das flavonas apigenina e luteolina. **(b)** Estrutura da flavanona farrerol

**Fonte:** DEWICK, 2002.

Quanto à detecção e quantificação dessa classe de metabólitos, várias técnicas podem ser empregadas. Entretanto, a complexação dos flavonóides com metais, principalmente com o íon  $\text{Al}^{3+}$ , seguida pela análise da absorção no UV-Vis do complexo  $\text{Al}^{3+}$ -flavonóide formado, é a técnica comumente empregada, por se tratar de um método simples. A absorção dos flavonóides no UV-Vis é devido à presença das ligações duplas dos anéis aromáticos (MARKHAN, 1982).

O princípio do método colorimétrico com o cloreto de alumínio consiste na formação de complexos estáveis do cátion alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) com grupamentos específicos dos flavonóides (CHANG et al., 2002).

Os três possíveis sítios quelantes dos flavonóides são: os grupos hidroxila (OH) no carbono 3 (C-3) ou no carbono 5 (C-5) e o grupo 3',4'-*o*-dihidroxil (Figura 8) (CHANG et al., 2002). Em solução neutra, o cloreto de alumínio pode formar complexos com todos estes grupos; já em solução ácida ( $\text{AlCl}_3/\text{Ácido acético}$ ), o  $\text{Al}^{3+}$  forma complexo somente com os grupos 3-OH e 5-OH.



**Figura 8:** Esquema representativo da complexação de flavonóides com o íon  $\text{Al}^{3+}$ .

**Fonte:** MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970.



Como resultado da formação de complexos estáveis ( $\text{Al}^{3+}$ -flavonóide), ocorre na análise espectrofotométrica um deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda e uma intensificação das absorções. Assim, é possível detectar a presença e determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos (FUNARI; FERRO, 2006).

## 2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DE PLANTAS

Na busca de princípios ativos em espécies vegetais, não interessa o composto mais fácil de separar, o que se encontra em maior concentração ou aquele que possui a estrutura mais complexa, e sim, os compostos que apresentam atividade biológica. Daí a importância e necessidade de estudos fitoquímicos guiados por bioensaios, seja *in vivo* ou *in vitro*. Como é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso, a busca de informações da medicina popular consiste em um dos principais aspectos observados quando se procura obter substâncias ativas de plantas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Portanto, é de grande interesse determinar se preparações vegetais utilizadas na medicina popular têm atividades que possam ser utilizadas em formulações modernas (KIM et al., 2008), a exemplo das atividades antimicrobiana e antioxidante.

### 2.6.1 Atividade antimicrobiana de fitoquímicos e prováveis mecanismos de ação

Nos recentes anos, inúmeros antibióticos têm perdido sua eficiência devido ao desenvolvimento de cepas resistentes. Dentre os principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelos micro-organismos aos antimicrobianos atuais, seja

por mutação ou por aquisição de material genético exógeno, estão: inativação direta da molécula ativa, devido à produção de enzimas que a degradam; modificação da estrutura alvo da ação do fármaco, a exemplo da modificação na estrutura da parede celular de enterococos resistentes a vancomicina; e redução da concentração citoplasmática do antimicrobiano por efluxo, decorrente da ação de transportadores multi-drogas e uso da força próton-motora (ARTHUR et al., 1996; AMATO-NETO et al., 2000; BLACKMORE; MCNAUGHTON; POOLE, 2002).

Além do problema da resistência, antibióticos algumas vezes estão associados com efeitos adversos incluindo hipersensibilidade, imunossupressão e reações alérgicas (LAI; LIM; TAN, 2009).

Daí a necessidade de desenvolver novos antibióticos a partir de fontes naturais, especialmente de plantas, que apresentam uma resistência “natural” a doenças bacterianas (BASILE et al., 1997; LAI; LIM; TAN, 2009). Tal resistência depende de uma série de mecanismos de defesa, dentre os quais a síntese de substâncias antimicrobianas é particularmente importante (BASILE et al., 1997).

Os agentes antimicrobianos presentes nas plantas podem apresentar um dos seguintes modos de ação: (1) reação com a membrana celular do patógeno, causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; (2) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; ou (3) destruição ou inativação funcional do material genético do patógeno (ALMEIDA, 2007).

Em se tratando de compostos aromáticos e compostos fenólicos, existe um consenso de que eles atuam na membrana citoplasmática dos micro-organismos alterando sua estrutura e função, alterando também o transporte ativo e coagulando o conteúdo celular (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995; BURT, 2004). Além disso, para os compostos fenólicos, acredita-se que quanto maior o grau de hidroxilação maior a sua toxicidade para micro-organismos (ALMEIDA, 2007).

Em relação à ação de agentes antimicrobianos sobre a atividade enzimática dos micro-organismos, acredita-se que os compostos oxidados inibem a atividade enzimática por meio de uma reação com grupos sulfidríla ou por interações não específicas com proteínas (COWAN, 1999).

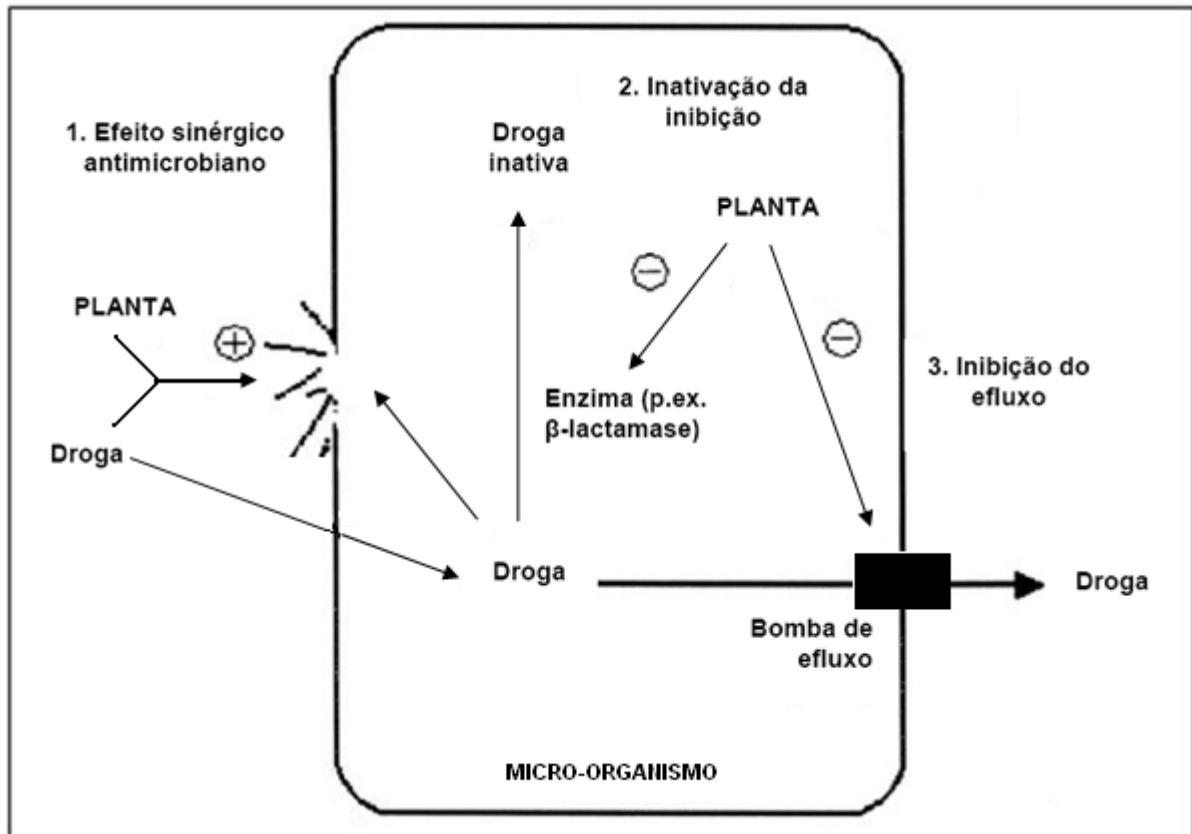
Nos últimos anos, tem aumentado o número de estudos voltados à investigação da atividade antimicrobiana de flavonóides. Em alguns dos estudos realizados já foram isoladas e identificadas estruturas de flavonóides dotados de atividades antifúngica, antiviral e antibacteriana (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Dentre os mecanismos de ação antimicrobiana propostos para os compostos desse grupo estão: inibição da DNA girase (mecanismo de ação do flavonol quercetina); inibição da função da membrana citoplasmática, por alterar a fluidez da mesma (os flavonóides narigenina e soforaflavanona G, por exemplo, reduzem a fluidez da membrana das células bacterianas); e inibição do metabolismo energético, o que afeta a produção de energia necessária para a absorção ativa de vários metabólitos e para a biossíntese de macromoléculas (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Já Mori et al. (1987) demonstraram em seu estudo que a síntese de DNA em *Proteus vulgares* e a síntese de RNA em *Staphylococcus aureus* foram fortemente inibidas por flavonóides. Esses mesmos autores sugerem que o anel B dos flavonóides pode intercalar-se ou formar ligações de hidrogênio com as bases dos ácidos nucleicos, o que pode explicar a ação inibitória dos flavonóides na síntese de DNA e RNA de tais micro-organismos.

Alguns pesquisadores também reportaram sinergismo entre flavonóides de ocorrência natural e outros agentes antibacterianos contra cepas de bactérias resistentes (CUSHNIE; LAMB, 2005).

O sinergismo entre compostos ativos oriundos de plantas e drogas antimicrobianas também é relatado por Abascal e Yarnell (2002). Segundo esses autores, a medicina botânica (i.e., os compostos oriundos de plantas) pode aumentar a eficiência de drogas antimicrobianas de três maneiras: (1) por ação antimicrobiana aditiva ou sinérgica; (2) por inativação da inibição dos antimicrobianos, através do bloqueio da ação enzimática; (3) por inibição do efluxo, inibindo as bombas de resistência a multidrogas (MDRs) e garantindo uma concentração ótima do antimicrobiano no interior do micro-organismo (Figura 9).



**Figura 9:** Aumento da eficiência de drogas antimicrobianas por ação de compostos oriundos de plantas.

**Fonte:** ABASCAL; YARNELL, 2002.

Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofármacos, avaliada frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos individualmente ineficazes e extratos, são relevantes, permitindo concluir que estudos detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados (NASCIMENTO et al., 2000).

#### 2.6.1.1 Atividade antimicrobiana de pteridófitas

Em relação à investigação de substâncias antimicrobianas em plantas, o taxa mais investigado é o das angiospermas (monocotiledôneas e dicotiledôneas). Poucos dados estão disponíveis sobre outros grupos de plantas, especialmente o

grupo das pteridófitas, a respeito do qual pouco se conhece sobre sua atividade antimicrobiana (BASILE et al., 1997; SINGH et al., 2008). Contudo, as pteridófitas, além das plantas superiores, também são reconhecidas como plantas resistentes a patógenos. Acredita-se inclusive que um dos fatores importantes para o sucesso evolutivo das pteridófitas e pela sua sobrevivência por mais de 350 milhões de anos seja a sua resistência a infecções por patógenos microbianos, graças à sua propriedade antimicrobiana (BLANCH et al., 2010).

As poucas investigações já realizadas com algumas samambaias, particularmente espécies utilizadas no tratamento de doenças de pele e de feridas, confirmaram suas propriedades antimicrobianas (LAI; LIM; TAN, 2009).

O estudo realizado por Maridass e Ghanthikumar (2008) revelou que o extrato acetônico das folhas de *Blechnum orientale* L. apresentou zonas de inibição máxima contra as bactérias patogênicas *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi* em um ensaio de difusão em disco. Os autores relacionaram o efeito antibacteriano encontrado com a presença dos seguintes constituintes bioativos já relatados para essa espécie: óleos essenciais, triterpenos e compostos fenólicos. Esta mesma espécie foi a que apresentou melhor atividade antibacteriana em um estudo realizado por Lai; Lim; Tan (2009) com o extrato das folhas de cinco pteridófitas medicinais.

### **2.6.2 Atividade antioxidante de fitoquímicos e prováveis mecanismos de ação**

Nos últimos anos tem crescido o interesse por estudos sobre o estresse oxidativo e seus efeitos adversos à saúde humana. Tudo isso ocasionado pela crescente exposição do organismo a fatores exógenos (como consumo de álcool, tabagismo, exposição à radiação não ionizante, dentre outros) e endógenos (como estados psicológicos que desencadeiam estresse emocional) que levam à formação de uma gama de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, resultam em desequilíbrio homeostático (LI; ZHOU; HAN, 2006).

A formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio é uma consequência inevitável da vida aeróbica, que inclui o processo respiratório e diversas reações oxidativas das células aeróbicas (SILVA et al., 2010).

Os radicais livres – átomos ou moléculas que possuem em seu orbital externo um ou mais elétrons desemparelhados – podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, ou através da quebra homolítica de uma ligação covalente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As espécies reativas de oxigênio, por sua vez, não apresentam necessariamente elétrons desemparelhados, mas constituem espécies químicas altamente reativas, geralmente dotadas de propriedades oxidantes (BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991; HALLIWELL, 1996).

Na Tabela 1, adaptada de Halliwell (1996), constam exemplos de espécies reativas de oxigênio, representadas por formas radicalares e não radicalares.

**Tabela 1:** Espécies reativas de oxigênio (EROs), formas radicalares e não radicalares.

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	
Radicais	Não radicalares
Ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) Hidroxila ( $\cdot OH$ ) Peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ) Alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ) Hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ )	Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) Ácido Hipocloroso ( $HOCl$ ) Ozônio ( $O_3$ ) Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )

Fonte: HALLIWELL, 1996.

O desbalanço entre os sistemas antioxidantes, sejam eles endógenos ou exógenos, e a produção de compostos oxidativos (radicais livres e espécies reativas de oxigênio) aparentemente está associado com diversas doenças de cunho multifatorial, a exemplo de vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias, além de estar relacionado ao envelhecimento precoce (SILVA et al., 2010).

O mecanismo de desenvolvimento dessas patologias geralmente envolvem alterações oxidativas cumulativas de moléculas consideradas críticas, incluindo ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). Dentre as alterações oxidativas cumulativas, a mais frequente é a peroxidação lipídica (LPO) (LIANDA, 2009).

A LPO procede em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No primeiro estágio, as EROs, especialmente as espécies radicalares, atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio para formar um radical lipídico. Como resultado, são formados radicais de carbono que, na fase de propagação, podem reagir com oxigênio originando os chamados radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. É dessa forma que se inicia a peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono reativos formados também podem reagir com metais, formando aldeídos e epóxidos, que são reativos e causam danos *de novo* ao DNA. No estágio de terminação, as espécies de radicais livres reagem entre si ou com antioxidantes para formar produtos inertes (SOUSA et al., 2007; LIANDA, 2009).

Acredita-se que a ingestão de antioxidantes exógenos, sobretudo aqueles obtidos de produtos de origem vegetal, como vitaminas C e E, compostos fenólicos – especialmente os flavonóides - e carotenóides, contribui para a resistência ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, está associada com a redução da incidência das diversas doenças oxidativas (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LAI; LIM; TAN, 2009; SILVA et al., 2010).

Esses antioxidantes normalmente estão presentes em concentrações menores que o agente oxidante, e são capazes de inibir a cadeia de iniciação ou interromper a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; PODSEDEK, 2007), visto que podem estabilizar ou desativar os radicais livres antes que estes ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007).

Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos a ponto de propagar a reação em cadeia sendo, portanto, neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou sendo reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido especial atenção nos últimos anos (SOUSA et al., 2007). Tais compostos agem como antioxidantes devido à sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons e, também, em virtude de seus radicais

livres intermediários estáveis, que impedem principalmente a peroxidação lipídica (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Segundo Simões et al. (2004), há relatos de atividade antioxidante para alguns derivados de ácidos fenólicos, como para o ácido clorogênico, para o ácido caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos, e para o ácido ferúlico e seus ésteres com esteróis e triterpenos. Essas evidências sugerem que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais, principalmente compostos fenólicos.

Sroka e Cisowski (2003) comprovaram em seu estudo que há uma correlação positiva entre a eficiência de ácidos fenólicos como anti-radicais e antioxidantes e o número de grupamentos hidroxila ligados ao anel aromático de tais compostos. Portanto, quanto menor o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, menor a atividade antioxidante e anti-radical.

Assim como os ácidos fenólicos, os flavonóides também podem prevenir a formação de radicais livres e a peroxidação lipídica. Acredita-se que tais compostos atuam no estágio de iniciação da peroxidação lipídica, agindo como seqüestradores de ânions radicais superóxidos e radicais hidroxilas. Também podem inibir a propagação da peroxidação lipídica em cadeia, em virtude da doação de átomos de hidrogênio para o radical peroxila, formando o radical flavonóide menos reativo e mais estável (COOK; SAMMAN, 1996; NIJVELDT et al., 2001).

Segundo Cook; Samman (1996), diversos fatores estruturais dos flavonóides influenciam na peroxidação lipídica e, conseqüentemente, no grau de atividade antioxidante apresentada, favorecendo-a. São eles:

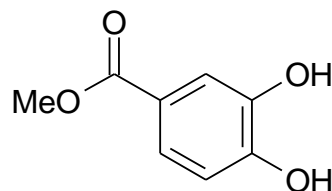
- (1) Presença do grupo hidroxila na posição três do anel C. Exemplo: flavonóis como quercetina, canferol, miricetina e morina.
- (2) Presença da ligação dupla entre os carbonos dois e três do anel C; a hidrogenação desta ligação diminui o efeito antiperoxidativo.
- (3) O número de grupos hidroxila, sendo que quanto maior o número de grupos hidroxilas nos anéis A e B, maior a atividade seqüestradora de radicais livres.
- (4) A presença de uma porção açúcar (a eficiência antiperoxidativa diminui em grupos hidroxila adjacente ao grupo glicosídeo, quando este está presente, em virtude do impedimento estérico).



- (5) Presença de grupos metoxila, que também diminuem a eficiência antiperoxidativa de flavonóides *in vitro* devido ao impedimento estérico.
- (6) Flavonóides que contêm grupo carbonila na posição quatro e grupos hidroxilas nas posições três ou cinco formam quelatos com íons metálicos, prevenindo assim a formação de radicais livres, o que também contribui para suas propriedades antiperoxidativas. Exemplos: quercetina, rutina, canferol.

#### 2.6.2.1 Atividade antioxidante de pteridófitas

Alguns estudos já realizados demonstram o potencial antioxidante de espécies de pteridófitas. É o caso do estudo realizado por Choudhary et al. (2008) com extratos da espécie *Salvinia molesta* D. S. Mitch., no qual se evidenciou potente atividade antioxidante do extrato metanólico (86,88%), extrato acetato de etila (88,42%) e extrato butanólico (83,69%) da espécie, sendo que os números entre parênteses expressam o percentual de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) no ensaio não fisiológico realizado. Nesse mesmo estudo, isolou-se o ácido hipogálico (Figura 10), um ácido fenólico que se mostrou o composto mais potente no teste não fisiológico de atividade antioxidante (ensaio de seqüestro do radical DPPH), com valor de  $CE_{50}$  de  $55,35 \pm 2,72 \mu\text{M}$  ( $CE_{50}$  = concentração efetiva, ou concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres).



**Figura 10:** Estrutura do ácido hipogálico, composto isolado da espécie *Salvinia molesta* D. S. Mitch.

**Fonte:** CHOUDHARY et al., 2008.

O estudo de Lai; Lim; Tan (2009) também revelou forte atividade antioxidante da espécie *Blechnum orientale* L., que foi relacionada com o elevado conteúdo de polifenóis totais na espécie.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) e no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

#### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE COLETA**

As espécies de *Blechnum* foram coletadas em um remanescente urbano de Mata Atlântica na cidade de Salvador, no Estado da Bahia, localizado no 19º Batalhão de Caçadores (19º BC) – Exército Brasileiro, em área autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Figura 11 e Figura 12).



**Figura 11:** Área do 19º Batalhão de Caçadores – Exército Brasileiro (delimitada em vermelho).  
**Fonte:** ÁREA, 2011.





**Figura 12:** Remanescente de Mata Atlântica que circunda a Represa do Cascão, no 19º BC.

Segundo a classificação de AB'SABER (1977), a cidade de Salvador está inserida no Domínio Tropical Atlântico, tendo como formação vegetacional original o Bioma Mata Atlântica, com seus ecossistemas associados.

O processo histórico de ocupação do município, iniciado do litoral da Baía de Todos os Santos para o interior, restringiu as áreas de ocorrência desta formação para poucos fragmentos florestais, dentre eles o situado no 19º Batalhão de Caçadores (19º BC), que tem a proteção do poder público (SANTOS, 2009).

Embora o 19º BC situe-se em uma área urbana, há um remanescente de vegetação nativa originada de uma formação florestal primária, que apesar de sofrer alterações em sua estrutura e composição, ainda apresenta espécies vegetais predominantemente autóctones (nativas).



### 3.2 COLETA DAS PLANTAS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As espécies de *Blechnum* foram coletadas no mês de junho do ano de 2009. Imagens das espécies, obtidas no local de coleta, estão apresentadas na Figura 13.



**Figura 13:** (a) Ambiente de coleta da espécie *B. serrulatum* Rich. (espécie destacada no círculo vermelho). (b) Ambiente de coleta da espécie *B. occidentale* L. (espécie indicada por seta).

Durante a coleta, foram anotados dados como data, localização (*Global Positioning System* - GPS), condições climáticas e observações que foram julgadas relevantes. Todo o tratamento convencional de herborização seguiu o descrito em MORI et al. (1989). O material botânico coletado foi identificado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Fabiana Regina Nonato. Um exemplar de cada espécie foi depositado como exsicata no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Identificação botânica, dados de coleta, e número de exsicata das espécies coletadas.

Espécies	Dados de coleta	Coordenadas geográficas			Nº de exsicata (HUEFS)
		Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	
<i>B. serrulatum</i> Rich.	<b>Coletor:</b> PINTO, F.; <b>data da coleta:</b> 03/06/09; <b>horário da coleta:</b> 10:30h; <b>ambiente:</b> local sombreado, temporariamente alagado, no interior da mata	12°58'111"	38°26'368"	50,5	148886
<i>B. occidentale</i> L.	<b>Coletor:</b> PINTO, F.; <b>data da coleta:</b> 03/06/09; <b>horário da coleta:</b> 11:20h; <b>ambiente:</b> local úmido, sombreado, em um barranco na beira da trilha	12°57'901"	38°26'975"	55,0	148887

S: Sul; W: Oeste; HUEFS: Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana.

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os exemplares das espécies coletadas foram secos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material vegetal (Figura 14) e, após secagem, tiveram suas partes aéreas (lâmina foliar e pecíolo) e subterrâneas (rizomas e raízes) separadas (Figura 15).





**Figura 14:** Secagem, à temperatura ambiente, da espécie *B. serrulatum* Rich.



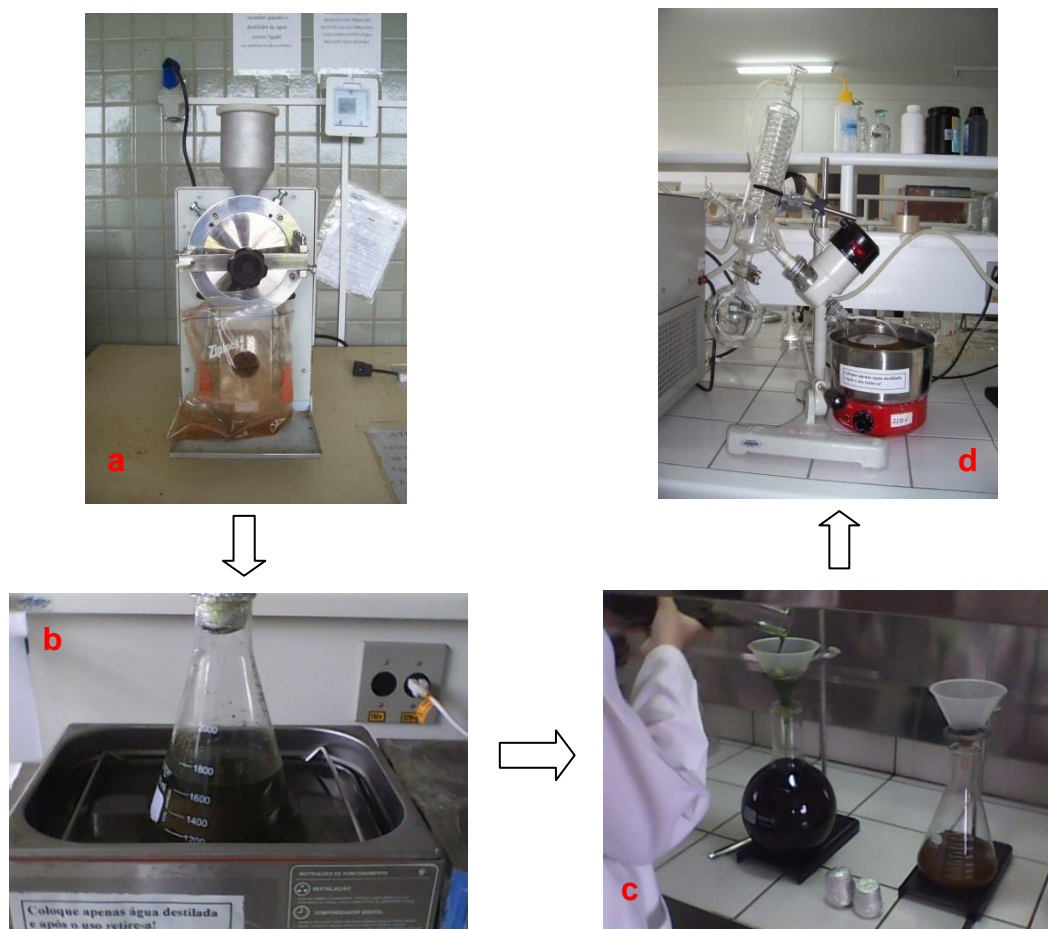
**Figura 15:** Partes aérea e subterrânea da espécie *B. serrulatum* Rich.

Posteriormente, as partes aéreas e subterrâneas de cada espécie foram pulverizadas separadamente em um moinho de facas da marca Marconi, modelo MA 340 (Macro Moinho tipo Wiley). O material pulverizado foi submetido à extração através da técnica de maceração em recipientes de vidro, utilizando o metanol como solvente extrator.

A maceração foi realizada em banho de ultrassom à temperatura ambiente, a fim de otimizar a extração (WANG; WELLER, 2006). Nesta etapa foi utilizado o banho ultrassônico da marca Unique, modelo USC-1800. A cada 30 minutos de sonicação o material em maceração foi filtrado por gravidade, o macerado recolhido, e novo volume de solvente extrator adicionado ao recipiente de vidro para reinício do processo de maceração. Este processo foi repetido até redução da coloração do filtrado.

Os extratos brutos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas de 40-42°C, e o resíduo de solvente foi eliminado por evaporação em capela de exaustão. Nesta etapa, utilizou-se o evaporador rotatório da marca Fisatom, modelo 802.

A Figura 16 ilustra um resumo das etapas de preparação dos extratos brutos das partes aérea e subterrânea de cada espécie.



**Figura 16:** Etapas da preparação dos extratos brutos: (a) Moagem; (b) Maceração otimizada por ultrassom; (c) Filtração; (d) Concentração em evaporador rotatório.



### 3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana com os extratos obtidos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPEM/UEFS). Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para cada extrato bruto obtido. Para a determinação da CIM utilizou-se a metodologia descrita no *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2002), para leveduras, e no CLSI (2003), para as bactérias, com modificações.

#### 3.4.1 Determinação da CIM

A determinação da CIM dos extratos brutos foi realizada em placas estéreis de poliestireno, com 96 poços, através da técnica de microdiluição seriada.

##### 3.4.1.1 Micro-organismos

Os micro-organismos testados, cedidos pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB), foram: *Escherichia coli* CCMB 261, resistente a Sulfonamida e sensível a Trimetoprima; *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268; *Bacillus cereus* CCMB 282; *Staphylococcus aureus* CCMB 262, resistente a Estreptomicina e Dihidroestreptomicina; *Candida albicans* CCMB 286, resistente a Fluconazol e Anfotericina B; e *Candida parapsilosis* CCMB 288, resistente a Fluconazol e Anfotericina B.

#### 3.4.1.2 Preparo das suspensões de micro-organismos

As bactérias e leveduras foram repicadas, com o auxílio de alça de platina, em placas de Petri com o meio de cultura ágar Müeler Hinton. As placas contendo bactérias foram incubadas a 37°C por um período entre 16-18 horas e aquelas contendo leveduras, incubadas a 28°C por um período entre 32-38 horas.

Após o período de incubação, foi retirada uma pequena quantidade de cultura de micro-organismos, novamente com o auxílio da alça de platina, que foi adicionada a 1,8 mL de solução salina estéril a 0,45% contida em um tubo estéril. Esta suspensão foi homogeneizada em um vórtex e a turbidez óptica ajustada com o auxílio do turbidímetro Biomérieux calibrado.

A turbidez das suspensões de micro-organismos foi ajustada a uma solução padrão na escala 3 de McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> para bactérias (faixa de leitura vermelha do turbidímetro) e  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para leveduras (faixa de leitura amarela do turbidímetro). No caso de bactérias, 10 µL dessa suspensão foram diluídos em 990 µL de solução salina a 0,45% para obtenção da suspensão de trabalho na concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para leveduras, a concentração de trabalho permaneceu na concentração de  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 3.4.1.3 Preparo dos extratos

Uma massa de 0,11 g de cada extrato a ser testado foi pesada em balança semi-analítica e em seguida solubilizada em uma solução de sulfóxido de dimetila (DMSO) a 50% até um volume de 5 mL, resultando em uma solução com concentração de 22,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, a solução foi esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm, sendo o filtrado recolhido em um frasco estéril.

#### 3.4.1.4 Ensaio propriamente dito

Em uma placa estéril de 96 poços foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de meio Müller Hinton 2 vezes concentrado na primeira linha, nos poços destinados ao teste do(s) extrato(s) (na maioria das vezes foi testado em uma mesma placa um único micro-organismo e mais de um extrato, sendo nesse caso reservadas 3 colunas da placa para cada extrato). Nos poços seguintes (demais linhas da placa) foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de meio 1 vez concentrado. Em seguida, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  da amostra de extrato estéril, na concentração de  $22,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , nos poços da primeira linha da placa, sendo cada extrato adicionado em 3 poços. Após adição do extrato, foi realizada a homogeneização do conteúdo dos respectivos poços por 15 vezes com o auxílio de pipeta automática.

Posteriormente, procedeu-se à diluição seriada retirando 90  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços da primeira linha e transferindo-os para os poços da segunda linha, homogeneizando 15 vezes após a transferência. Esse procedimento foi repetido até os poços da última linha da placa, dos quais foram retirados 90  $\mu\text{L}$  que foram descartados. A cada um dos poços da placa inoculou-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão do micro-organismo teste previamente preparada, homogeneizando 5 vezes após a inoculação (Figura 17).



**Figura 17:** Inoculação da suspensão microbiana nos poços para determinação da CIM utilizando-se uma pipeta automática multicanal.

**Fonte:** PINTO, 2008.

Também foram realizados na placa o controle de esterilidade do meio de cultura 1 vez e 2 vezes concentrado, o controle da viabilidade microbiana e o controle da esterilidade do(s) extrato(s) testado(s). Nos poços destinados ao controle de esterilidade do meio (tanto o 1 vez quanto o 2 vezes concentrado) adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura na respectiva concentração. Nos poços destinados ao controle da viabilidade microbiana, adicionou-se 90  $\mu\text{L}$  de meio 1 vez concentrado e 10  $\mu\text{L}$  da suspensão do micro-organismo. Já nos poços destinados ao controle da esterilidade do extrato, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de meio 1 vez concentrado e 50  $\mu\text{L}$  do extrato.

As placas inoculadas com bactérias foram incubadas por 24 horas a 37° C e aquelas inoculadas com leveduras foram incubadas por 48 horas a 28° C. Após o período de incubação, foi adicionado nas placas inoculadas com bactérias 30  $\mu\text{L}$ /poço do revelador resazurina, na concentração estoque de 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ , e nas placas inoculadas com levedura, 50  $\mu\text{L}$ /poço do revelador cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC), na concentração estoque de 5  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Os reveladores são auxiliares na visualização da presença/ausência de crescimento, visto que o revelador resazurina colore em azul os poços em que não há crescimento bacteriano e em rosa os poços em que há crescimento, e o TTC colore em rosa os poços em que há crescimento fúngico, enquanto que os poços sem crescimento não sofrem alteração na coloração.

O controle do DMSO e os controles positivos foram realizados em placa separada. Nos controles positivos foram testados o antibiótico Cloranfenicol e o antifúngico Nistatina, nas concentrações estoque de 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 10  $\text{mg.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Na Figura 18 encontra-se uma representação esquemática da placa de 96 poços utilizada para determinação da CIM.

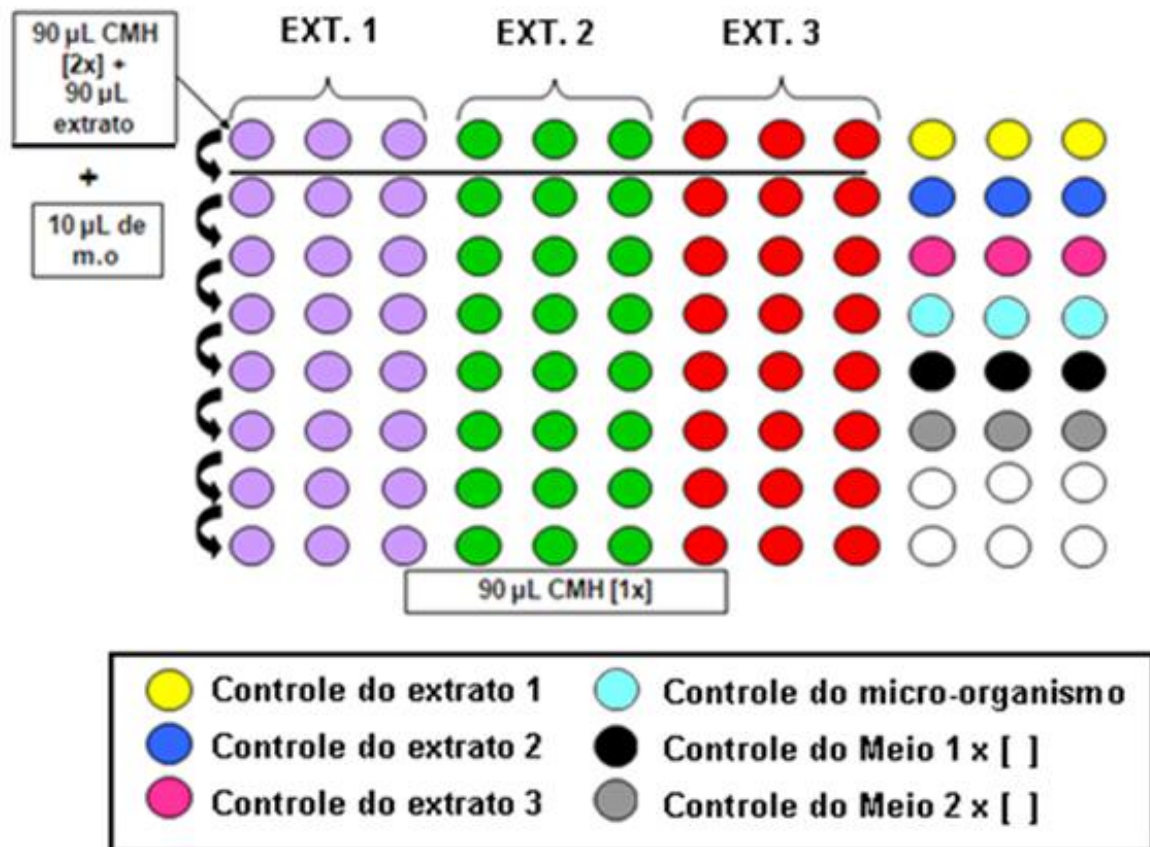


Figura 18: Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.

### 3.4.2 Determinação da CBM e da CFM

Após a revelação das placas do ensaio de CIM, foram realizados os ensaios de CBM e CFM com o conteúdo dos poços das linhas em que se observou ausência de crescimento e dos poços da linha seguinte à da CIM.

A determinação da CBM e CFM dos extratos brutos foi realizada em placas de Petri com Ágar Müller Hinton. As placas foram divididas em diversos quadrantes, que foram identificados com a linha e coluna do poço testado (exemplo: A1), o micro-organismo testado e o nome do extrato. Em cada quadrante foi inoculado 5 µL do conteúdo de um poço a ser testado, com o auxílio de um pipetador automático (Figura 19).



**Figura 19:** Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

As placas do ensaio com bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas, e as placas do ensaio com leveduras foram incubadas a 28°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a leitura das placas, sendo considerado CBM ou CFM aquela em que não houve crescimento de colônias sobre o local em que o conteúdo do poço foi inoculado.

### 3.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1 Preparo do extrato

Inicialmente foram preparadas para cada extrato três soluções estoque com concentração de 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando como solvente metanol grau espectroscópico. A partir de cada solução estoque foram preparadas cinco soluções, também utilizando metanol espectroscópico como solvente, sendo cada uma dessas soluções diluídas submetidas ao teste antioxidante em triplicata. As concentrações das cinco soluções diluídas preparadas variaram dentre os extratos testados (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentrações das soluções diluídas preparadas a partir de cada extrato testado no ensaio antioxidante.

<b>Código do Extrato</b>	<b>Concentrações ensaiadas (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
BO (PA)	50 / 45 / 35 / 25 / 10
BO (PS)	35 / 25 / 15 / 10 / 5
BS (PA)	20 / 15 / 10 / 7 / 5
BS (PS)	25 / 20 / 15 / 10 / 5

BO(PA): *Blechnum occidentale* (parte aérea); BO(PS): *Blechnum occidentale* (parte subterrânea); BS(PA): *Blechnum serrulatum* (parte aérea); BS(PS): *Blechnum serrulatum* (parte subterrânea).

### 3.5.2 Ensaio propriamente dito

Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos das partes aérea e subterrânea de cada espécie foi utilizado o método seqüestrador do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) descrito por Cordeiro (2009), com modificações.

Esse radical, de coloração púrpura, absorve radiação UV a um comprimento de onda de 517 nm. Quando é reduzido por um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ( $R\cdot$ ) forma o composto 2,2-difenil-1-picril-hidrazina que apresenta coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorbância (SOUSA et al., 2007).

Para a realização do ensaio antioxidante, foram utilizados tubos de ensaio com tampa, sendo os tubos reservados para reações com DPPH cobertos com papel alumínio a fim de manter o conteúdo dos mesmos protegidos da luz.

Para análise quantitativa, preparou-se uma solução de DPPH a 0,004% e utilizou-se como branco 3 mL de metanol grau espectroscópico. Foram empregados como controle da amostra a mistura de 2 mL de metanol com 1 mL da amostra e como controle do DPPH a reação de 2 mL de DPPH com 1 mL de metanol. Para análise da atividade antioxidante das amostras, 2 mL do DPPH foram adicionados a 1 mL de cada diluição preparada da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

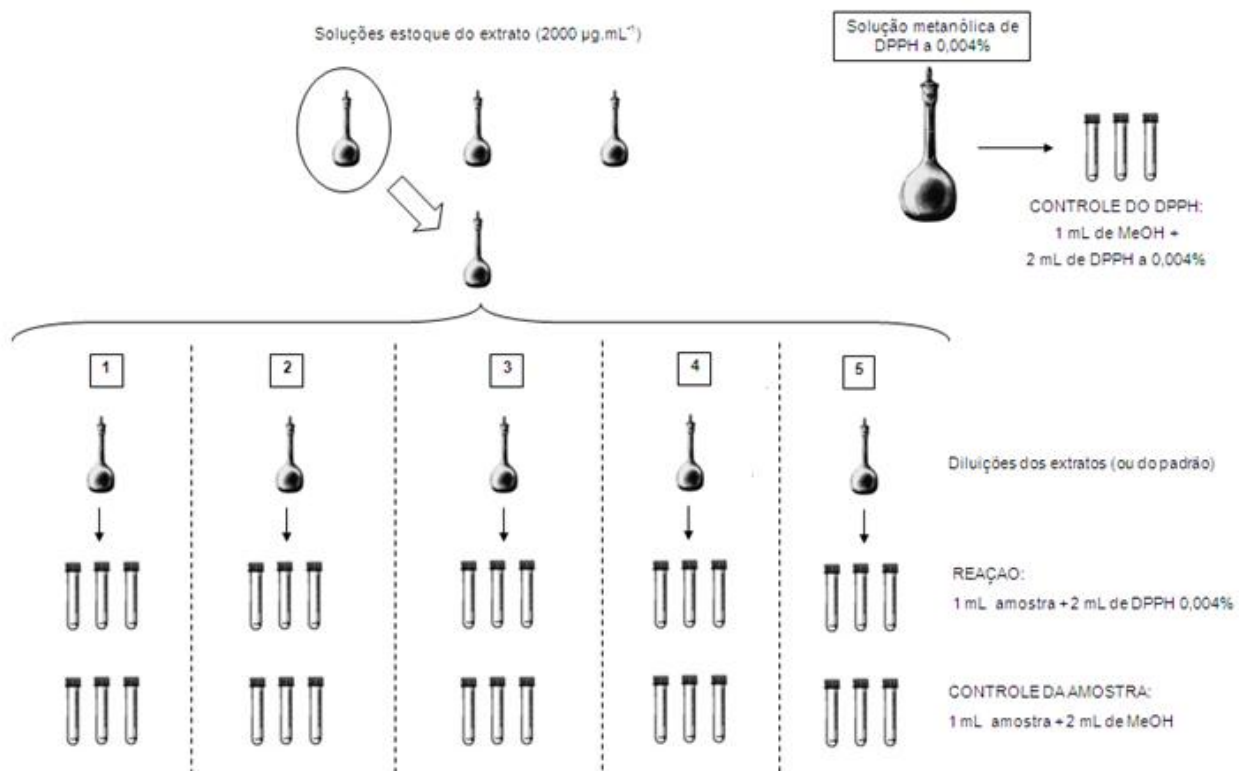
As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro da marca NOVA, modelo 1105, em um comprimento de onda de 517 nm. A leitura da

absorbância dos tubos contendo DPPH ocorreu 30 minutos após o início da reação. Já a leitura da absorbância dos controles da amostra (mistura de 2 mL de metanol com 1 mL da amostra) foi realizada imediatamente após o preparo dos mesmos.

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através da sua capacidade de seqüestrar o radical DPPH e a determinação quantitativa do método baseou-se na variação da absorbância obtida por uma perda da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presentes na amostra do extrato.

Para comparação, utilizou-se a rotina como padrão, que foi testada nas concentrações de  $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e conforme a mesma metodologia.

Na Figura 20, um esquema ilustrativo do ensaio antioxidante realizado.



**Figura 20:** Esquema ilustrativo do ensaio antioxidante utilizando o radical DPPH.

### 3.5.3 Análise dos dados

Para cada concentração ensaiada em triplicata foram calculados a média e o desvio-padrão das absorbâncias medidas, utilizando o programa Excel 2007. Com a



média das absorbâncias foi calculado a porcentagem de inibição do radical DPPH (que corresponde à quantidade de DPPH seqüestrado) conforme a equação a seguir.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs. do DPPH} - (\text{Abs. da reação final} - \text{Abs. do controle da amostra}) \times 100}{\text{Abs. do DPPH}}$$

Ainda com o auxílio do Excel 2007, foram traçados gráficos correlacionando o % de DPPH sequestrado *versus* as concentrações testadas de cada extrato e do padrão rotina. Em seguida, os pontos dos gráficos foram submetidos a uma transformação matemática (regressão linear) gerando assim a equação linear que foi utilizada para calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE<sub>50</sub>) (Lee et al., 2003).

Como todos os extratos foram testados em triplicata, ao final dos experimentos foram obtidos para cada extrato três valores de CE<sub>50</sub>. O tratamento estatístico desses resultados consistiu no cálculo das respectivas médias e desvios-padrão.

### 3.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS

#### 3.6.1 Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total do extrato metanólico das partes aéreas e subterrâneas das espécies selecionadas foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, conforme procedimento descrito por Peres et al. (2009), com modificações.

Esse procedimento se baseia nas reações de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. Esse método utiliza a redução pelos fenóis, em meio

alcalino, do fosfomolibdato-fosfotungstato, a molibdênio, cuja coloração é azul (SILVA et al., 2010).

#### 3.6.1.1 Preparo dos extratos

Para cada extrato metanólico bruto a ser testado foram tomadas três amostras de 0,01 g, visto que o ensaio foi realizado em triplicata. As amostras obtidas foram adicionadas em balões volumétricos de 10 mL, solubilizadas com metanol grau espectroscópico e o volume do balão ajustado com esse mesmo solvente. Dessa forma, foram obtidas soluções metanólicas dos extratos na concentração de 1000 µg/mL.

#### 3.6.1.2 Ensaio propriamente dito

Uma alíquota de 100 µL da solução do extrato a 1000 µg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL. A essa alíquota foram adicionados 1 mL de água destilada e, posteriormente, 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. O conteúdo do balão foi homogeneizado e deixado em repouso por 5 minutos. Passado esse período, 600 µL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20% (p/v) foram adicionados à mistura, que foi novamente homogeneizada. Finalmente, a solução teve seu volume ajustado para 5 mL com água destilada. Mais dois balões foram preparados conforme descrito acima, a fim de realizar as leituras em triplicata.

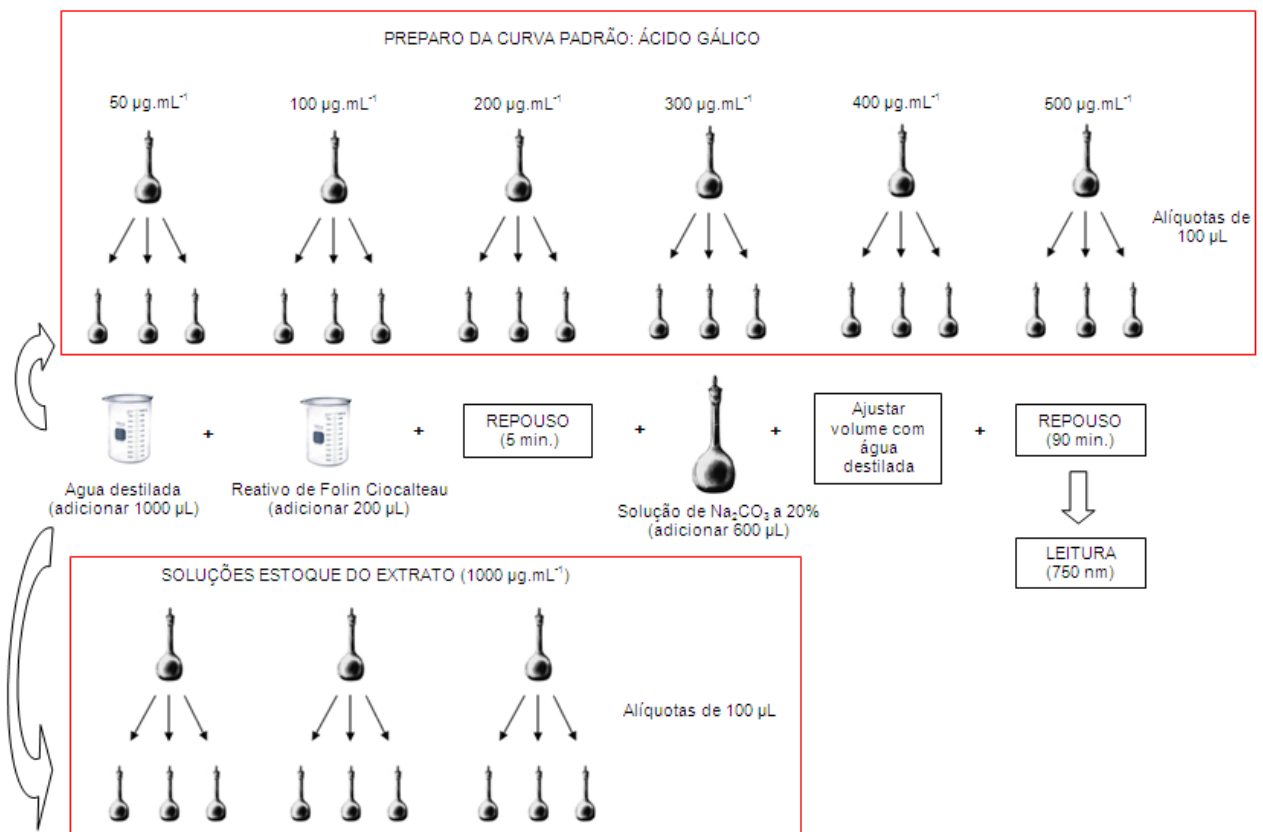
Após 90 minutos em temperatura ambiente, a absorvância da amostra foi medida a 750 nm, em espectrofotômetro da marca NOVA, modelo 1105, utilizando-se cubetas de vidro, tendo como branco todos os reagentes descritos anteriormente, exceto a alíquota do extrato.

### 3.6.1.3 Análise dos dados

O conteúdo fenólico total de cada extrato foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com o ácido gálico (concentrações: 50, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ). O ácido gálico foi testado conforme descrito no item 3.6.1.2, tomando alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração preparada do padrão para realizar o ensaio. A curva padrão foi construída com o auxílio do programa Excel 2007, que também foi utilizado para a realização do ajuste linear dos pontos da curva, para a obtenção da equação da reta (expressa como  $y = ax+b$ , onde  $y$  foi a absorbância da amostra a 750 nm e  $x$ , a concentração de ácido gálico em  $\mu\text{g/mL}$ ) e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Os resultados foram expressos como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g de extrato bruto (extrato seco) e corresponderam a uma média realizada com os resultados das três amostras tomadas de cada extrato.

Na Figura 21, um esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.



**Figura 21:** Esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.

### 3.6.2 Determinação do teor de flavonóides

O teor de flavonóides do extrato metanólico das partes aéreas e subterrâneas das espécies alvo desse estudo foi determinado por espectrofotometria no UV-VIS, utilizando o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) para possibilitar a quantificação. A metodologia empregada foi adaptada dos trabalhos de Woisky (1996) e Banov et al. (2006).

#### 3.6.2.1 Preparo dos extratos

Para cada extrato metanólico bruto a ser testado foram tomadas três amostras de 0,01 g, visto que o ensaio foi realizado em triplicata. As amostras obtidas foram adicionadas em balões volumétricos de 10 mL, solubilizadas com uma solução metanólica de ácido acético a 5% e o volume do balão ajustado com essa mesma solução. Dessa forma, foram obtidas soluções dos extratos na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.6.2.2 Ensaio propriamente dito

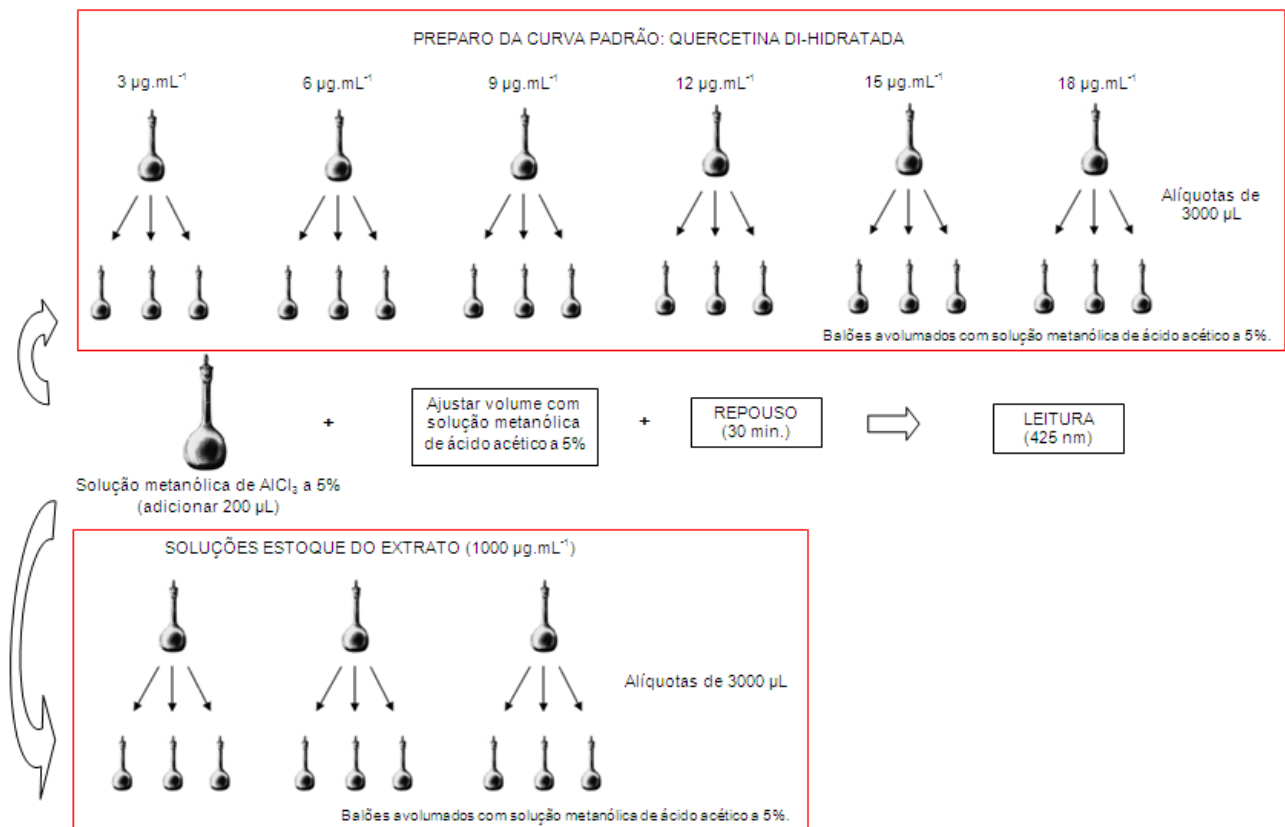
Uma alíquota de 3 mL da solução do extrato a 1000  $\mu\text{g/mL}$  foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 5% e o volume do balão ajustado com solução metanólica de ácido acético a 5%. Decorridos 30 minutos, foi efetuada a leitura da absorbância da solução a 425 nm, utilizando-se cubetas de vidro e tendo como branco todos os reagentes descritos anteriormente, exceto a alíquota do extrato.

### 3.6.2.3 Análise dos dados

O teor de flavonóides de cada extrato foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com o padrão quercetina di-hidratada (concentrações: 3  $\mu\text{g/mL}$ , 6  $\mu\text{g/mL}$ , 9  $\mu\text{g/mL}$ , 12  $\mu\text{g/mL}$ , 15  $\mu\text{g/mL}$  e 18  $\mu\text{g/mL}$ ). A quercetina foi testada conforme descrito no item 3.6.2.2, tomando alíquotas de 3000  $\mu\text{L}$  de cada concentração preparada do padrão para realizar o ensaio. A curva padrão foi construída com o auxílio do programa Excel 2007, que também foi utilizado para a realização do ajuste linear dos pontos da curva, para a obtenção da equação da reta (expressa como  $y = ax+b$ , onde  $y$  foi a absorbância da amostra a 425 nm e  $x$ , a concentração de quercetina em  $\mu\text{g/mL}$ ) e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Os resultados foram expressos como mg de EQ (equivalentes de quercetina) por g de extrato bruto (extrato seco) e corresponderam a uma média realizada com os resultados das três amostras tomadas de cada extrato.

Na Figura 22, um esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de flavonóides.



**Figura 22:** Esquema ilustrativo do ensaio de determinação do teor de flavonóides.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Todo o material vegetal utilizado no preparo dos extratos metanólicos brutos foi sujeito à secagem prévia, em temperatura ambiente, a fim de estabilizá-lo. A secagem tem por finalidade a retirada de água e, conseqüentemente, a inibição de reações de hidrólise e de crescimento microbiano (SIMÕES et al., 2004). A operação de secagem também propicia a redução de volume e de peso e facilita a moagem dos materiais vegetais (PRISTA et al., 1981).

A realização da extração com metanol justifica-se porque, segundo Cowan (1999) e Simões et al. (2004), como a maioria dos componentes ativos presentes em plantas são compostos aromáticos ou compostos orgânicos saturados, a exemplo daqueles ativos contra micro-organismos, eles são frequentemente obtidos através de uma extração inicial com etanol ou metanol, solventes nos quais tais compostos apresentam alguma solubilidade. Além disso, todo o processo extrativo foi realizado em temperatura ambiente, a fim de evitar a formação de artefatos (SIMÕES et al., 2004).

Na Tabela 4 estão os dados referentes à massa das partes aérea e subterrânea de cada espécie após pulverização, a massa dos extratos brutos após concentração e o rendimento dos extratos brutos.

**Tabela 4:** Massa do material vegetal pulverizado, dos extratos brutos e rendimento dos extratos.

Espécies	Parte da planta	Massa do material vegetal pulverizado (em grama)	Massa do extrato bruto (em grama)	Rendimento do extrato bruto (%)
<i>B. serrulatum</i> Rich.	Aérea	174,04	19,10	10,97
	Subterrânea	72,70	4,73	6,51
<i>B. occidentale</i> L.	Aérea	293,87	36,03	12,26
	Subterrânea	292,63	41,42	14,15

## 4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS BRUTOS

Todos os extratos preparados foram submetidos aos ensaios antimicrobianos, obtendo-se os dados de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

No ensaio de determinação da CIM, os extratos foram solubilizados com DMSO a 50%. Segundo Pootz; Rampey; Benjamin (1967) e Brayton (1986), o DMSO penetra rapidamente através das membranas biológicas e, também, aumenta a penetração de outras substâncias através das membranas, o que tem permitido seu emprego como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias.

Ainda em relação a esse solvente, há relatos na literatura de que o mesmo pode influenciar no crescimento microbiano, seja atuando como potencializador da atividade de compostos antimicrobianos ou agindo, ele próprio, como inibidor do crescimento microbiano (RIBEIRO; CARVALHO-FILHO; LISTONI, 2001).

Assim, neste estudo, foi determinada a CIM do DMSO frente a cada um dos micro-organismos testados. Com base nos resultados obtidos para o DMSO foi possível avaliar a ação interferente desse solvente no crescimento microbiano e, conseqüentemente, determinar quais valores de CIM representaram efetivamente a ação dos extratos.

A CIM do DMSO a 50% frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *C. parapsilosis* foi de 12,5%, isto é, houve uma inibição do crescimento microbiano até o poço da microplaca correspondente a concentração do extrato de 5,55 mg.mL<sup>-1</sup>. Por esse motivo, para esses micro-organismos, foram considerados como resultados representativos de CIM apenas os valores iguais ou inferiores a 2,77 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato testado.

Já a CIM do DMSO a 50% frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi de 6,2% e 3,1%, respectivamente. Assim, o DMSO inibiu o crescimento de *P. aeruginosa* até o poço correspondente à concentração do extrato de 2,77 mg.mL<sup>-1</sup>, e inibiu o crescimento de *S. aureus* até o poço correspondente à concentração de 1,39 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para os resultados frente a *P. aeruginosa* foram considerados representativos apenas os valores de CIM iguais ou inferiores a  $1,39 \text{ mg.mL}^{-1}$ , enquanto para os resultados frente a *S. aureus*, os resultados representativos foram aqueles iguais ou inferiores a  $0,69 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Os resultados dos ensaios de determinação da CIM, CBM e CFM dos extratos brutos das partes aéreas e subterrâneas de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. estão expressos na Tabela 5.



**Tabela 5:** Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs), em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , dos extratos metanólicos de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

EXTRATO / CONTROLES	Parte da planta	Concentração Mínima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )											
		<i>E. coli</i> CCMB 261		<i>P.aeruginosa</i> CCMB 268		<i>S. aureus</i> CCMB 262		<i>B. cereus</i> CCMB 282		<i>C. albicans</i> CCMB 286		<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	CIM	CFM
<b>BO(PA)</b>	Aérea	2,77	5,55	2,77	5,55	1,39	5,55	0,35	5,55	0,35	11,10	0,17	11,10
<b>BO(PS)</b>	Subterrânea	2,77	5,55	2,77	5,55	1,39	5,55	0,35	11,10	1,39	5,55	2,77	11,10
<b>BS(PA)</b>	Aérea	1,39	5,55	2,77	5,55	0,35	2,77	0,17	2,77	0,35	5,55	0,35	11,10
<b>BS(PS)</b>	Subterrânea	2,77	5,55	2,77	5,55	1,39	5,55	0,35	5,55	0,69	5,55	0,69	11,10
<b>Cloranfenicol</b>	NA	0,625	-	0,078	-	0,005	-	0,005	-	NA	-	NA	NA
<b>Nistatina</b>	NA	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	0,0003	-	0,312	-

BO(PA): *Blechnum occidentale* (parte aérea); BO(PS): *B. occidentale* (parte subterrânea); BS(PA): *B. serrulatum* (parte aérea); BS(PS): *B. serrulatum* (parte subterrânea).

NA: Não se aplica

(-) Teste não realizado.

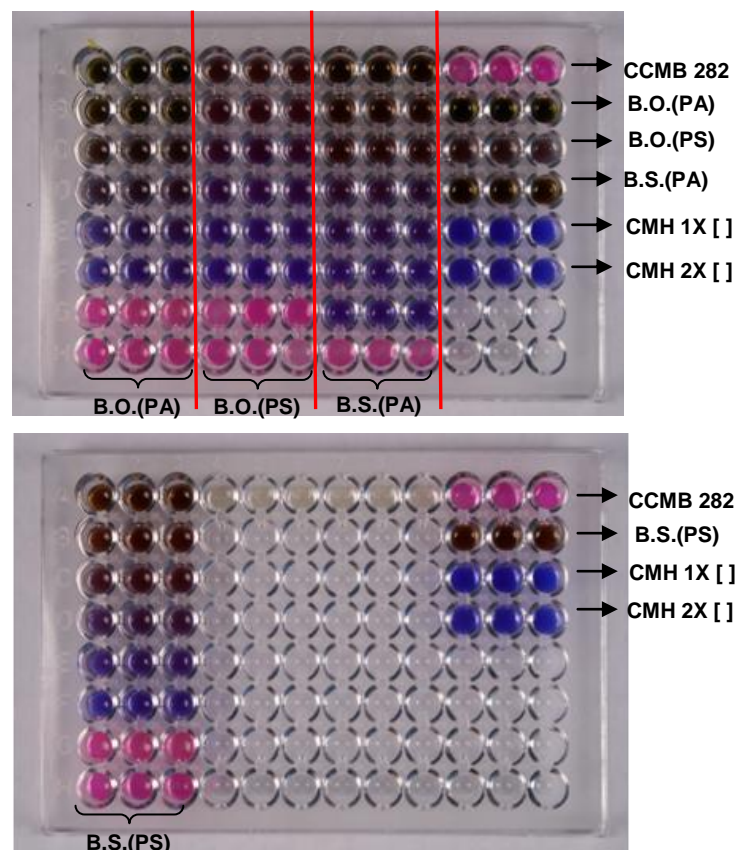
Em vermelho, resultados de CIM considerados representativos.

Todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana, em extensões variadas. De todos eles, o extrato BS(PA) foi o que apresentou menores valores de concentração mínima, principalmente CIM e CBM, frente a um maior número de micro-organismos. Para esse extrato, destacam-se os resultados de CIM e CBM frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* (CIM: 0,35 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM: 2,77 mg.mL<sup>-1</sup>) e *B. cereus* (CIM: 0,17 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM: 2,77 mg.mL<sup>-1</sup>) e também o resultado de CIM frente à bactéria Gram-negativa *E. coli* (CIM: 1,39 mg.mL<sup>-1</sup>).

Dentre os micro-organismos testados, a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* foi a mais suscetível frente aos extratos BO(PS), BS(PA) e BS(PS), com valores de CIM de 0,35 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,17 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,35 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Esses resultados condizem com triagens prévias realizadas com plantas medicinais, nas quais a maioria dos extratos de plantas mostraram-se ativos contra cepas de bactérias Gram-positivas (KELMANSON; JÄGER; VANSTADEN, 2000; ALI et al., 2001; LAI; LIM; TAN, 2009).

Na Figura 23, imagem das placas do teste de determinação da CIM dos extratos metanólicos brutos das partes aérea e subterrânea de *B.occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. contra *B. cereus* CCMB 282.



**Figura 23:** (a) Placa do teste de determinação da CIM dos extratos metanólicos brutos da parte aérea e parte subterrânea de *B. occidentale* L. (extratos B.O.(PA) e B.O.(PS), respectivamente) e da parte aérea de *B. serrulatum* Rich (extrato B.S.(PA)) contra *B. cereus* CCMB 282. Poços A10, A11 e A12: Controle da viabilidade do micro-organismo. Poços B10, B11 e B12: Controle de esterilidade do extrato da parte aérea de *B. occidentale*. Poços C10, C11 e C12: Controle de esterilidade do extrato da parte subterrânea de *B. occidentale*. Poços D10, D11 e D12: Controle de esterilidade do extrato da parte aérea de *B. serrulatum*. Poços E10, E11 e E12: Controle de esterilidade do meio de cultura 1 vez concentrado. Poços F10, F11 e F12: Controle de esterilidade do meio de cultura 2 vezes concentrado. (b) Placa do teste de determinação da CIM do extrato metanólico bruto da parte subterrânea de *B. serrulatum* Rich (B.S.(PS)) contra *B. cereus* CCMB 282. Poços A10, A11 e A12: Controle da viabilidade do micro-organismo. Poços B10, B11 e B12: Controle de esterilidade do extrato da parte subterrânea de *B. serrulatum*. Poços C10, C11 e C12: Controle de esterilidade do meio de cultura 1 vez concentrado. Poços D10, D11 e D12: Controle de esterilidade do meio de cultura 2 vezes concentrado.

O micro-organismo mais suscetível frente ao extrato da BO(PA) foi a levedura *Candida parapsilosis* (CIM: 0,17 mg.mL<sup>-1</sup> e CFM: 11,10 mg.mL<sup>-1</sup>). Esse resultado se revela promissor, visto que é comum encontrar em ensaios antimicrobianos extratos dotados de baixa atividade frente às leveduras, o que normalmente está relacionado à presença e estrutura da parede celular fúngica, composta por quitina e 1,3-β-glicano, que pode dificultar a penetração do agente antimicrobiano (SELITRENNIKOFF, 2001).

Em um estudo realizado por Sehgal (1961), dos extratos de plantas de 157 famílias diferentes que se mostraram significativamente ativos contra micro-organismos, somente 20% foram proeminentemente ativos contra fungos.

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* foi o micro-organismo menos suscetível frente a todos os extratos testados, visto que as concentrações dos extratos BO(PA), BS(PS) e BS(PA) requeridas para inibi-lo foram superiores as concentrações necessárias para inibir os demais micro-organismos. A concentração do extrato BO(PS) necessária para inibir *E. coli* foi igual àquela requerida para inibir *C. parapsilosis*, e maior que as CIMs para os demais micro-organismos testados.

De um modo geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos extratos vegetais do que as bactérias Gram-positivas. Presumivelmente isso se deve a natureza impermeável da membrana externa à parede celular das bactérias Gram-negativas (LAI, LIM, TAN, 2009).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas funciona como uma barreira a penetração de diversas moléculas, portanto, os agentes antimicrobianos encontram dificuldade em penetrar na célula ou, quando conseguem, a concentração não é suficiente para apresentar o resultado esperado. Além disso, seu espaço periplasmático contém diversas enzimas que podem inativar certos agentes antimicrobianos (POOLE, 1994; SCHAECHTER et al., 2002; DUFFY; POWER, 2001).

A alta resistência das bactérias Gram-negativas a uma série de agentes antimicrobianos também pode ser explicada pela atividade da bomba de efluxo, que é um mecanismo especializado em expulsar substâncias exógenas estranhas, protegendo as células de concentrações inibitórias ou letais dos agentes antimicrobianos (HANCOCK; BELL, 1988; NIKAIDO, 1989; KÖHLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999).

Em relação ao perfil de seletividade antimicrobiana frente a micro-organismos Gram-positivos, Basile et al. (2000) e Pretto et al. (2004) revelam tratar-se de um fenômeno comumente observado em vários antimicrobianos, inclusive em substâncias obtidas de plantas.

Nenhum dos resultados obtidos frente a *Pseudomonas aeruginosa* foi considerado representativo, visto que as CIMs dos extratos coincidiram com a CIM

do DMSO. Dessa forma, não é possível prever se a ação antimicrobiana foi devido à ação do extrato ou do solvente utilizado para solubilizá-lo.

Pelo mesmo motivo, não foram considerados representativos os resultados obtidos para os extratos BO(PA), BO(PS) e BS(PS) frente ao micro-organismo *Staphylococcus aureus*. Somente o resultado obtido para o extrato BO(PS) foi representativo frente a esse micro-organismo (CIM: 0,35 mg.mL<sup>-1</sup>).

Em relação aos resultados de CIM e CBM/CFM das diferentes partes de uma mesma planta (aérea e subterrânea), as variações, quando presentes, revelaram uma maior potência antimicrobiana dos extratos da parte aérea. Provavelmente, isto deve ao fato de esta parte da planta apresentar um maior arsenal de metabólitos biologicamente ativos quando comparada com a parte subterrânea.

Dentre os metabólitos ativos podem estar inclusos os compostos fenólicos, a exemplo dos flavonóides e taninos, classes de compostos reconhecidas por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (PERES et al, 2009).

Vale ressaltar que flavonóides presentes em extratos vegetais podem precipitar quando dissolvidos em solventes orgânicos. Essa precipitação acarreta, no ensaio de determinação da concentração inibitória mínima, em uma redução do contato entre as células bacterianas e as moléculas de flavonóide, o que pode levar a resultados falso negativos de atividade antibacteriana (CUSHINE; HAMILTON; LAMB, 2003).

Comparando os valores de CIM com os valores de CBM/CFM dos extratos frente a cada um dos micro-organismos testados (Tabela 5) verifica-se que a concentração microbicida foi, em todos os casos, superior a concentração inibitória. Portanto, a inibição do crescimento de todos os micro-organismos foi devido à ação bacteriostática/fungistática dos extratos e não devido a uma ação bactericida/fungicida.

Os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos confirmam dados da literatura que indicam que plantas medicinais são uma boa fonte de princípios bactericidas e bacteriostáticos, fungicidas e fungistáticos (SINHA; CHOUDHURY, 2010). Além disso, os resultados corroboram com relatos existentes de atividade antimicrobiana para outras espécies de pteridófitas e, também, para espécies do gênero *Blechnum*.

No estudo realizado por Lai, Lim, Tan (2009), os extratos metanólicos de cinco pteridófitas medicinais - *Acrostichum aureum* L. (Pteridaceae), *Asplenium nidus* L. (Aspleniaceae), *Blechnum orientale* L. (Blechnaceae), *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. (Cyatheaceae) e *Dicranopteris linearis* (Burm.) var. *linearis* (Gleicheniaceae) – foram testados pelo método de difusão em disco frente a oito cepas de bactéria, sendo 03 bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e 05 bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*). Os resultados desse estudo mostraram que todas as espécies de pteridófitas testadas apresentaram atividade antibacteriana, destacando-se um maior potencial da espécie *Blechnum orientale*, que pertence ao mesmo gênero das espécies do presente estudo.

No estudo realizado por Singh et al. (2008) também foi verificada potente atividade antimicrobiana em quatro espécies do gênero *Adiantum* encontradas na Índia – *Adiantum venustum*, *A. capillus-veneris*, *A. peruvianum* e *A. caudatum* – especialmente frente aos micro-organismos *E. coli*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus terreus*. Esse resultado reforça a hipótese de que as pteridófitas, mesmo sendo plantas de um grupo intermediário, são uma boa e nova fonte potencial de agentes antimicrobianos.

Sinha e Choudhury (2010) também publicaram sobre atividade antimicrobiana dos extratos metanólico e acetônico da espécie *B. orientale*, testados através do método de difusão em disco. Nesse estudo, ambos os extratos foram ativos frente a *Aspergillus* sp. (halo de inibição de 10 mm e de 12,3 mm, relativos ao extrato metanólico e acetônico, respectivamente). Já o extrato acetônico da espécie *B. orientale* mostrou alta atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados (*Candida* sp., *Klebsiella* sp., *Aspergillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp.).

### 4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos brutos das partes aéreas e subterrâneas de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich., bem como do padrão rutina, foi determinada pelo método de seqüestro do radical estável DPPH.

Este método é amplamente utilizado para avaliar a habilidade seqüestradora de radicais livres de várias amostras (LAI; CHOU; CHAO, 2001; LEE et al., 2003; NAGAI et al, 2003), sendo considerado um ensaio não-fisiológico que permite uma fácil seleção de extratos dotados de atividade antioxidante (YAMAGUCHI et al., 2006).

O radical livre DPPH é relativamente estável e sua ação deve-se a abstração de um radical hidrogênio de compostos presentes nos extratos, geralmente compostos fenólicos. Este radical DPPH, de forte coloração arroxeadada, ao se reduzir, modifica sua coloração para amarelo, sendo esta mudança de cor monitorada pelo espectrofotômetro UV-VIS a 517 nm (MAGINA et al., 2010).

A partir dos resultados de absorvância obtidos no ensaio *in vitro* utilizando o DPPH• foi possível determinar a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres DPPH• no meio reacional, para cada um dos oito níveis de concentração dos extratos e do padrão testados. Segundo Sousa et al. (2007), a porcentagem de atividade antioxidante corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante.

No Apêndice A estão apresentados os gráficos que correlacionam o percentual de DPPH seqüestrado *versus* a concentração da amostra testada, expressa em µg/mL. Também estão apresentados o ajuste não-linear realizado (ajuste logarítmico) nos pontos do gráfico, a equação logarítmica resultante dos ajustes e os respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ).

Os resultados do ensaio de atividade antioxidante, expressos como  $CE_{50}$ , estão sumarizados na Tabela 6. De acordo com Boscolo et al. (2007), a  $CE_{50}$  corresponde a concentração do extrato ou do padrão necessária para produzir metade (50%) de um efeito antioxidante máximo estimado em 100%.

**Tabela 6:** Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. e do padrão rutina, expressa como CE<sub>50</sub>.

EXTRATO / PADRÃO	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>B. occidentale</i> - parte aérea	28,53 ± 2,15
<i>B. occidentale</i> - parte subterrânea	25,86 ± 3,82
<i>B. serrulatum</i> - parte aérea	18,24 ± 1,57
<i>B. serrulatum</i> - parte subterrânea	24,64 ± 2,16
Rutina (padrão)	8,60 ± 0,18

Os resultados de CE<sub>50</sub> dos extratos e do padrão estão apresentados como média ± desvio-padrão de três experimentos independentes.

No ensaio antioxidante o extrato da parte aérea da espécie *B. serrulatum* Rich. foi o mais ativo, visto que apresentou a menor CE<sub>50</sub> (18,24 ± 1,57 µg/mL). Conforme descrito por Sousa et al. (2007), quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor a sua CE<sub>50</sub> e maior sua atividade antioxidante.

Dados encontrados na literatura revelam que outras espécies de pteridófitas, incluindo uma do mesmo gênero das espécies alvo do presente estudo, também apresentaram atividade antioxidante em ensaios de seqüestro do radical DPPH.

No estudo realizado por Farias et al. (2007), no qual foram avaliadas a atividade antioxidante dos extratos etanólicos brutos de quatro espécies de pteridófitas (*Dicranopteris flexuosa* (Pteridaceae), *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae), *Sticherus penniger* (Gleicheniaceae) e *Blechnum brasiliense* (Blechnaceae)), bem como das frações acetato de etila, hexânica e hidroalcólica dos extratos, verificou-se que todas as espécies apresentaram significativas propriedades antioxidantes, com uma potência maior nas frações acetato de etila.

Destaque no estudo de Farias et al. (2007) para a espécie *B. brasiliense*, que apresentou os menores valores de CE<sub>50</sub> sendo, portanto, a mais ativa na inibição do radical livre DPPH (CE<sub>50</sub> do extrato bruto = 4,14 mg/mL; CE<sub>50</sub> da fração acetato de etila = 1,43 mg/mL).

Segundo Arbos (2004), devido à diversificada composição química dos extratos vegetais, é provável que a ação antioxidante dos mesmos seja resultante da ação sinérgica de várias substâncias. Dentre os compostos isolados de plantas capazes de promover ação antioxidante reconhecida destacam-se aqueles que



apresentam um grupamento fenólico na sua estrutura, como os taninos, cumarinas, antraquinonas e flavonóides.

Não foram encontrados na literatura relatos de atividade antioxidante para as espécies *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

#### 4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA QUANTITATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS

Nos itens a seguir estão apresentados os resultados dos ensaios espectrofotométricos realizados com os extratos das partes aéreas e subterrâneas de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. para determinação de seus teores de fenóis totais e flavonóides.

##### 4.4.1 Determinação do conteúdo fenólico total

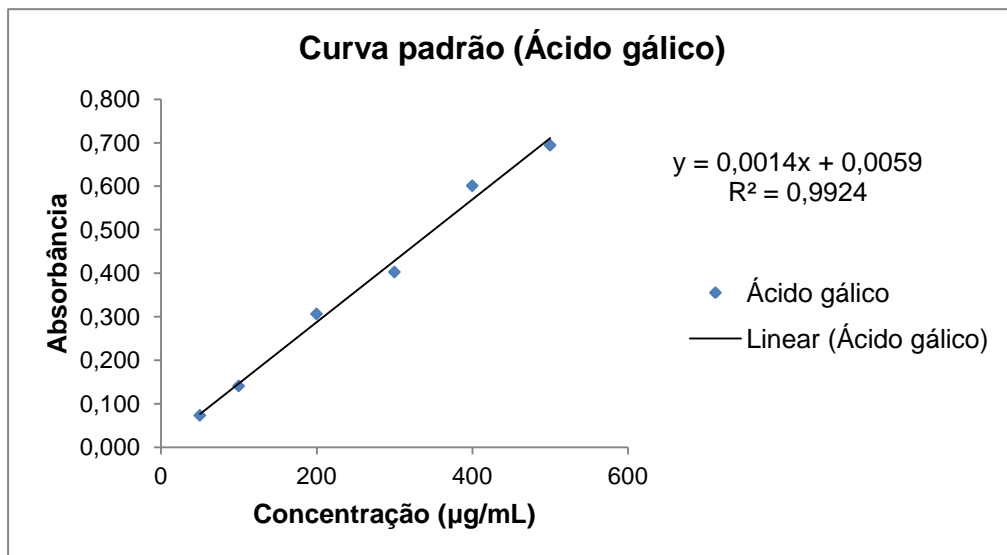
Após a determinação do potencial antimicrobiano e antioxidante dos extratos metanólicos de *B. serrulatum* Rich. e *B. occidentale* L., efetuou-se a determinação dos teores de fenóis totais através do método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu.

O reativo de Folin-Ciocalteu, na presença de compostos fenólicos, muda sua coloração de amarela para azul, sendo que quanto maior for o conteúdo de compostos fenólicos na solução, maior é a intensidade da coloração azul (BORA et al., 2005). Na Figura 24 constam as reações ocorridas com todos os extratos ensaiados, todos eles testados em uma concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em alíquotas de  $100 \mu\text{L}$ . A partir dessa figura pode ser visualizada a intensidade da coloração azul de cada solução.



**Figura 24:** Reações ocorridas com as amostras BO(PA), BO(PS), BS(PA) e BS(PS) (sequência da esquerda para a direita) no ensaio de determinação do teor de compostos fenólicos totais.

A curva padrão de ácido gálico, substância utilizada como padrão para composto fenólico nesse ensaio, está apresentada na Figura 25. A equação da curva padrão foi de  $y = 0,0014x + 0,0059$ , onde  $x$  representa a concentração de compostos fenólicos correspondente a ácido gálico e  $y$  representa a absorbância.



**Figura 25:** Curva padrão de ácido gálico.

Os resultados, apresentados na Tabela 7, estão expressos como equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$  de extrato). Assim, quanto maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalente por grama de extrato, maior a quantidade de compostos fenólicos presentes no respectivo extrato.

Magina et al. (2010) esclarecem que, apesar de os resultados serem expressos em equivalentes de ácido gálico, que é um composto fenólico simples, a metodologia de quantificação de compostos fenólicos utilizando o reativo de Folin Ciocalteu não apresenta seletividade para subtipos de compostos fenólicos vegetais. Portanto, podem ser detectados no teste diversos tipos de compostos fenólicos, como catequinas, flavonóides, compostos fenólicos simples e seus polímeros, como taninos hidrolisáveis, dentre outras substâncias.

**Tabela 7:** Teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

EXTRATO	COMPOSTOS FENÓLICOS (mg EAG . g <sup>-1</sup> de extrato ± DP)
<i>B. occidentale</i> - parte aérea	138,00 ± 2,12
<i>B. occidentale</i> - parte subterrânea	191,43 ± 12,11
<i>B. serrulatum</i> - parte aérea	261,54 ± 8,88
<i>B. serrulatum</i> - parte subterrânea	147,76 ± 3,45

Os resultados estão apresentados como média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Utilizou-se ácido gálico como padrão.  
EAG: Equivalente de ácido gálico.  
DP: Desvio padrão da média.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7 os extratos testados podem ser classificados, quanto ao teor de compostos fenólicos totais, na seguinte ordem crescente: *B. occidentale* (parte aérea) < *B. serrulatum* (parte subterrânea) < *B. occidentale* (parte subterrânea) < *B. serrulatum* (parte aérea).

O extrato da parte aérea de *B. serrulatum* Rich. foi o que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais, com valores de 261,54 ± 8,88 mg EAG / g de extrato, sendo que esse extrato foi também o que apresentou melhor resultado na inibição do radical DPPH, conforme apresentado na Tabela 6 do item 4.3.. Esse fato confirma relatos encontrados na literatura de que a alta atividade antioxidante esteja relacionada à presença de compostos fenólicos (HARBONE; WILLIAMS, 2001; BASILE et al., 2005; ALIYU et al., 2009).

No estudo realizado por Farias et al. (2007), já referenciado no tópico 4.3, a espécie mais ativa na inibição do radical livre DPPH - *B. brasiliense* - foi também a que apresentou o maior teor de fenóis totais, com valores de 23,52 µg EAG/mg de

extrato (resultado no extrato bruto) e 101,5 µg EAG/mg de extrato (na fração acetato de etila).

O mesmo ocorreu no estudo realizado por Lai; Lim; Tan (2009), em que a espécie mais ativa na inibição do radical DPPH – *B. orientale* – com  $CE_{50}$  de  $0,14 \pm 0,03$  mg/mL, foi a espécie com maior teor de compostos fenólicos totais,  $2.095 \pm 120$  mg de EAG/100 g de folhas frescas.

Comparando os conteúdos fenólicos totais das espécies *B. occidentale* e *B. serrulatum*, obtidos no presente estudo, com aqueles apresentados por Farias et al. (2007) e por Lai; Lim; Tan (2009) para as espécies *B. brasiliense* e *B. orientale*, respectivamente, observa-se um maior conteúdo fenólico (cerca de 10 vezes mais) nos extratos obtidos das duas primeiras espécies.

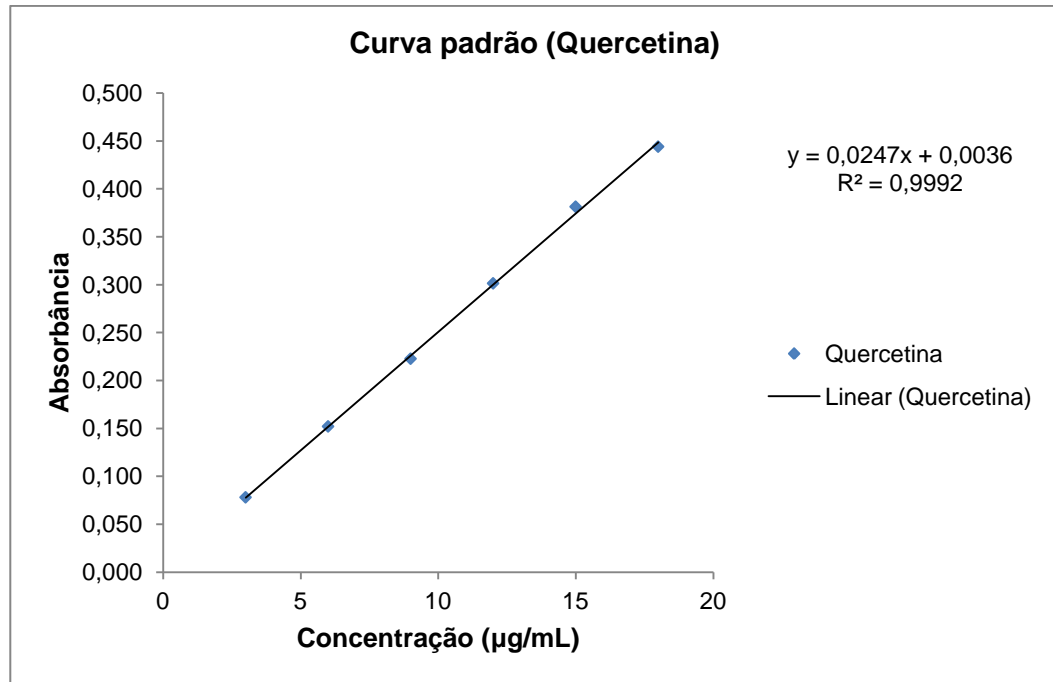
Essa diferença pode ser atribuída a diversos fatores, como: variações nas metodologias empregadas na quantificação, diferenças nos locais de ocorrência das espécies (clima, solo, temperatura, dentre outras), e diferenças na constituição fitoquímica de cada espécie, embora todas pertençam ao mesmo gênero.

Não foram encontrados na literatura estudos voltados a quantificação de compostos fenólicos nas espécies *B.occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

#### 4.4.2 Determinação do teor de flavonóides

Os teores de flavonóides dos extratos das partes aéreas e subterrâneas de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. foram obtidos através do método espectrofotométrico baseado na reação de complexação de flavonóides com cloreto de alumínio.

A curva padrão de quercetina di-hidratada, substância utilizada como padrão para flavonóide nesse ensaio, está apresentada na Figura 26. A equação da curva padrão foi de  $y = 0,0247 x + 0,0036$ , onde x representa a concentração de flavonóides correspondente a quercetina e y representa a absorbância.



**Figura 26:** Curva padrão de quercetina.

Os teores de flavonóides, expressos como equivalentes de quercetina (EQ), estão expressos na Tabela 8. Quanto maior o equivalente em quercetina (mg EQ/g) encontrado nos extratos, maior a porcentagem de flavonóides presentes na amostra analisada.

**Tabela 8:** Teor de flavonóides dos extratos metanólicos de *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

EXTRATO	FLAVONÓIDES TOTAIS (mg EQ . g <sup>-1</sup> de extrato ± DP)
<i>B. occidentale</i> - parte aérea	64,27 ± 0,60
<i>B. occidentale</i> - parte subterrânea	4,50 ± 0,11
<i>B. serrulatum</i> - parte aérea	39,56 ± 0,10
<i>B. serrulatum</i> - parte subterrânea	8,10 ± 0,07

Os resultados estão apresentados como média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Utilizou-se quercetina di-hidratada como padrão.

EQ: Equivalente de quercetina.

DP: Desvio padrão da média.

Considerando os teores de flavonóides obtidos, é possível ordenar os extratos na seguinte ordem crescente de teor: *B. occidentale* (parte subterrânea) < *B.*

*serrulatum* (parte subterrânea) < *B. serrulatum* (parte aérea) < *B. occidentale* (parte aérea).

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando e determinando as atividades biológicas dos flavonóides, dentre as quais se destacam a atividade antioxidante (ADELMANN, 2005). No entanto, no presente estudo, o extrato que apresentou o maior conteúdo de flavonóides - *B. occidentale* (parte aérea) - foi o que apresentou menor atividade antioxidante. Deve-se levar em consideração que nem sempre o composto mais ativo é aquele presente em grande quantidade na amostra, podendo o constituinte minoritário ser o mais ativo.

Já o extrato da espécie *B. serrulatum* (parte aérea), que foi o mais ativo no ensaio antioxidante, não foi o que apresentou maior teor de flavonóides. Isso indica que outros compostos fenólicos bioativos, que não os flavonóides, podem estar contribuindo para a ação antioxidante desse extrato.

Também é sabido que o método empregado para a quantificação de flavonóides pode subestimar os resultados. Chang et al. (2002) demonstraram em seus experimentos que o método de quantificação espectrofotométrica de flavonóides pela reação com cloreto de alumínio é específico para flavonas e flavonóis. Dessa forma, amostras de extratos que contenham outras classes de flavonóides podem ter seus teores de flavonóides subestimados por esse método.

Pode-se observar ainda que, no presente estudo, os teores de flavonóides foram maiores nos extratos das partes aéreas do que nos extratos das partes subterrâneas, quando comparados os extratos de uma mesma espécie.

Esse resultado era esperado, visto que uma das principais funções deste grupo de compostos é proteger os vegetais contra raios ultravioleta. Assim, quando comparadas partes aéreas com subterrâneas, as primeiras são alvos mais fáceis deste tipo de radiação (SIMÕES et al., 2004).

Considerando que os flavonóides também são reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, conforme foi descrito no item 4.2, é possível associar a potente atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato da parte aérea de *B. serrulatum* Rich. frente a diversos micro-organismos testados com o elevado conteúdo de flavonóides verificado nesse extrato ( $39,56 \pm 0,10$  mg EQ.  $g^{-1}$  de extrato).

Não foram encontrados na literatura estudos voltados à quantificação de flavonóides nas espécies *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos das partes aérea e subterrânea de *B. occidentale* e *B. serrulatum* foram avaliadas, juntamente com seus conteúdos fenólicos totais e teor de flavonóides.

No ensaio antimicrobiano, observou-se que todos os extratos inibiram o crescimento de pelo menos quatro micro-organismos testados, com destaque para o extrato da parte aérea de *B. serrulatum* Rich. que inibiu cinco dos seis micro-organismos testados, e também apresentou os menores valores de CIM e CBM/CFM dentre as espécies investigadas. Portanto, trata-se do extrato mais promissor como fonte de compostos ativos que possam ser utilizados diretamente no combate a infecções ou, como protótipos de fármacos antimicrobianos.

Ainda neste ensaio, os resultados obtidos para os extratos de *B. occidentale* L. (partes aérea e subterrânea) frente à bactéria *E. coli* justificam e suportam o uso popular dessa espécie de *Blechnum* no tratamento de infecções urinárias, tipo de infecção na qual a *E. coli* é o principal agente etiológico.

Já no ensaio antioxidante, o extrato mais ativo foi novamente aquele obtido da parte aérea de *B. serrulatum* Rich. Em conclusão, tal extrato demonstra alto potencial como um agente natural capaz de ser usado como um antioxidante.

Em relação aos resultados dos ensaios fitoquímicos quantitativos com o extrato da parte aérea de *B. serrulatum* Rich., observou-se uma associação entre a potente atividade antioxidante apresentada pelo extrato, expressa pelo reduzido valor de CE<sub>50</sub>, e o elevado conteúdo fenólico do extrato (quando comparado aos demais extratos testados). Em contrapartida, a associação entre o teor de flavonóides desse extrato e a atividade antioxidante não foi observada.

Isso indica que outras substâncias fenólicas, que não os flavonóides, podem estar presentes como compostos ativos no extrato da parte aérea de *B. serrulatum*, ou pode ter ocorrido um subestimativa do teor de flavonóides, uma possibilidade intrínseca à metodologia empregada na quantificação. Para a confirmação da

associação entre flavonóides e atividade antioxidante, é necessário a continuação desse estudo, com a purificação e isolamento dos constituintes químicos através de estudos bioguiados.

Apesar dos relatos de usos das espécies *B. occidentale* L. e *B. serrulatum* Rich. na medicina tradicional, não há estudos publicados sobre sua atividade antimicrobiana e antioxidante, nem sobre seu perfil fitoquímico. Assim, os resultados do presente estudo constituem os primeiros achados de atividade antimicrobiana e antioxidante e de composição de compostos fenólicos totais e flavonóides para essas espécies.

Contudo, para que estas espécies de pteridófitas se tornem possíveis candidatas para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas no tratamento de infecções promovidas pelas bactérias e leveduras testadas, e no tratamento de desordens oxidativas, outros estudos farmacológicos, fitoquímicos e toxicológicos devem ser realizados, a fim de que o potencial fitoterápico dos extratos seja testado de uma forma mais abrangente.



## REFERÊNCIAS

- ABASCAL, K.; YARNELL, E. Herbs and drug resistance. Part 1 – Herbs and microbial resistance to antibiotics. **Alternative & complementary therapies**. p. 237-241, 2002.
- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul: Primeira aproximação. **Geomorfologia**. v. 52, p.121. 1977.
- ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ALI, N. A. A. et al. Screening of Yemini medicinal plants for antibacterial and citotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 173-179, 2001.
- ALIYU, A. B. et al. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of leave extract of *Albizia chevalieri* Harms (Leguminosae – Mimosoideae). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**. v. 2, n. 1, p. 149-153, 2009.
- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. 135f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- AMATO-NETO, V. et al. **Antibióticos na Prática Médica**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2000. 304 p.
- ÁNGEL, M. H.; GONZÁLEZ, E. A. P. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. **Rev Cubana Invest Biomed**. v. 18, n. 1, p. 12-14, 1999.
- ARANTES, A. A., PRADO, J., RANAL, M. A. Blechnaceae da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**. v. 35, n. 3, p. 351-357, 2008.
- ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. 2004. 86 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ÁREA do 19° Batalhão de Caçadores**. 1. Imagem de satélite. Disponível em:<<http://wikimapia.org/#lat=-12.9635342&lon=-38.4530711&z=16&l=9&m=b>>. Acesso em: 15 jan. 2011.
- ARTHUR, M. et al. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Infectology**. v. 32, p. 11-16, 1996.

- BANERJEE, R. D., SEN, S. P. Antibiotic activity of Pteridophytes. **Econ Bot.** v. 34, p. 284-298, 1980.
- BANOV, D. et al. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta Farm. Bonaerense.** v. 25, n. 2, p. 219-224, 2006.
- BARROS, I. C. L; ANDRADE, L. H. C. **Pteridófitas medicinais:** samambaias, avencas e plantas afins. Recife: Editora Universitária – UFPE, 1997. 223 p.
- BASILE, A. et al. Induction of antibacterial activity by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in *Nephrolepis* sp. (Pteridophyta). **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 8, p. 131-134, 1997.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia,** v. 71, p. 110-116, 2000.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J. Ethnopharmacol.** v. 102, p. 32-36, 2005.
- BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, p. 575-606. 2005.
- BAST, A; HAENEN, G.; DOELMAN, C. J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American Journal of Medicine.** v. 91, n. 3C: p. 2S-13S, 1991.
- BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs- the need for and development of new antibacterials. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 16, p. 51-59, 2000.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BLACKMORE, C. G.; MCNAUGHTON, P. A.; VAN VEEN, H. W. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. **Molecular Membrane Biology.** v. 18, p. 97-103, 2001.
- BLANCH, M. et al. **Atividades biológicas das pteridófitas.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2010. 239 p.
- BORA, K. et al. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica.** Curitiba, v. 6, n. 2, p. 6-15, 2005.
- BOSCOLO, O. H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.** v. 9, p. 8-12. 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.** v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.

BRESCIANI, L. F. V. et al. Pharmacological and Phytochemical Evaluation of *Adiantum cuneatum* growing in Brazil. **Z. Naturforsch.** v. 58, p.191-194, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology.** v. 94, p. 223-253, 2004.

CAMPOS, M. P. **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum* (PIPERACEAE).** 2006. 90f. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado) – Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

CASTILLIO, U. F. et al. Pteridanoside, the first protoilludane sesquiterpene glucoside as a toxic component of the neotropical bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. **Tetrahedron.** v. 55, n. 42, p. 12295-12300, 1999.

CAULA, S. A., SECCHIARI, S., COUSSIO, J. D. *Polypodium phyllitidis* L. (Polypodiaceae): um helecho conelevada concentración de sacarosa. **Acta Farm Bonaerense.** v. 9, p. 111-114. 1990.

CHANG, C. et al. Estimation of total flavonoid content in própolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis.** v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHEN, C. et al. Triterpenoids from *Angiopteris palmiformis*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 58, n. 3, p. 408-411, 2010.

CHOUDHARY, M. I. et al. Phenolic and other constituents of fresh water fern *Salvinia molesta*. **Phytochemistry.** v. 69, p. 1018-1023, 2008.

CLSI. 2003. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition.** CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

CLSI. 2002. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição.** CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective

effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**. v. 7, p. 66-76, 1996.

CORDEIRO, C. E. O. **Investigação da atividade antimicrobiana e antioxidante da espécie *Cratylia hypargyrea* Martius ex. Bentham (Leguminosae)**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**. p. 77-85, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHINE, T. P. T.; HAMILTON, V. E. S.; LAMB, A. J. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. **Microbiological Research**. v. 158, p. 281-289, 2003.

CUSHINE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, p. 343-356, 2005.

DAVIN, L. B. et al. [<sup>13</sup>C]-Specific labeling of 8-2' linked (-)-*cis*-blechnic, (-)-*trans*-blechnic and (-)-brainic acids in the fern *Blechnum spicant*. **Phytochemistry**. v. 62, n. 3, p. 501-511, 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 507p.

DHAWAN, B. N. WHO monographs on selected medicinal plants. **Indian J. Med.** v. 3, p. 97-98, 2003.

DITTRICH, V. A. O. 2005. 208f. **Estudos Taxonômicos no gênero *Blechnum* L. (Pterophyta: Blechnaceae) para as regiões Sudeste e Sul do Brasil**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.

DOCARMO, M. et al. Flavonoids from the ferns *Blechnum regnellianum* and *Pityrogramma ebenea*. **Phytochemistry**. v. 24, n. 5, p. 1120-1120, 1985.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 17, p. 527-529, 2001.

FARIAS, C. C. et al. Avaliação da atividade antioxidante e determinação do teor de fenóis totais em extratos de quatro espécies de pteridófitas de MS. **Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GAUR, R. D., BHATT, B. P. Folk utilization of some pteridophytes of deoprayag área in Garhwall Himalaia: India. **Econ Bot.** v. 48, p. 146-151, 1994.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GOYAL, B. R.; GOYAL, R. K.; MEHTA, A. A. Phyto-pharmacology of *Achyranthes aspera*: a review. **Pharmacognosy Reviews**. v. 1, p. 143-150, 2007.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. **Drug discovery from nature**. Berlin: Springer, 1999. 347 p.

GUHA, P.; MUKHOPADHYAY, R.; GUPTA, K. Antifungal activity of the crude extracts and extracted phenols from gametophytes and sporophytes of two species of *Adiantum*. **Taiwania**. v. 50, n.4, p.272-283, 2005.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Reviews of Nutrition**. v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. London: Oxford University Press, 1999.

HANCOCK, R. E. W.; BELL, A. Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. **European Journal Clinica Microbiological and Infectious Diseases**, v. 7, p. 713-720, 1988.

HANUS, L. O.; REZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. A trinorsesterterpene glycoside from the North American fern *Woodwardia virginica* (L.) Smith. **Phytochemistry**. v. 63, p. 869-875, 2003.

HARBONE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3. ed. London: Academic, 1988.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Nat. Prod. Rep.** v. 18, n. 3, p. 310-333, 2001.

HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five *Cyathea* species. **Bot. Mag. Tokyo**. v. 88, p. 127-130, 1975.

KELMANSON, J. E.; JÄGER, A. K.; VANSTANDER, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.** v. 69, n. 3, p. 241-246, 2000.

KESSLER, M.; SMITH, A. R.; LEHNERT, M. Ten new species and two new combinations of *Blechnum* (Blechnaceae, Pteridophyta) from Bolivia. **American Fern Journal**. v. 97, n. 2, p. 66-80, 2007.

KIM, S. et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of Jeju medicinal plants against acne-inducing bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 54, p. 101-106, 2008.

KÖHLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771-778, 1999.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**. v. 46, p. 244-282, 2007.

LAI, L. S.; CHOU, S. T.; CHAO, W. W. Studies on the antioxidant activities of hsian-tso (*Masonia procumbens* Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 963-968, 2001.

LAI, H. Y.; LIM, Y. Y.; TAN, S. P. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**v. 73, n. 6, p. 1362-1366, 2009.

LEE, S. E. et al. Screening medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sci.** v. 73, p. 167-179, 2003.

LIANDA, R.L.P. 2009. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante.** Tese (Doutorado) - PPGQO-UFRRJ, Rio de Janeiro.

LI, X.; ZHOU, A.; HAN, Y. Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro. **Carbohydrate Polymers**. v. 66, n. 1, p. 34-42, 2006.

MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids.** New York: Springer, 1970. 354 p.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**. London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MARKHAM, K R. **Techniques of flavonoid identification.** Academic Press: London, 1982. 113 p.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p. 727-747, 2004.

MARIDASS, M.; GHANTHIKUMAR, S. Antibacterial activity of leaves of *Blechnum orientale* L. **Pharmacologyonline**. v. 3, p. 58-60, 2008.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1994. 220 p.

MAUSETH, J. D. **Botany, an introduction to plant biology.** 2. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1995, 837 p.

MELOS, J. L. R. et al. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). **Quim. Nova.** v. 30, n. 2, p. 292-297, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde – PNPIC.** PORTARIA Nº 971, 2006.

MIRANDA, A. M. **Fenologia de duas espécies de pteridófitas (Blechnaceae – Monilophyta) na Floresta Atlântica Nordestina.** 2008. 39f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MORI, S.A. et al. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico.** Ilhéus: CEPEC/CEPLAC, 1989.

MORI, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry.** v. 26, p. 2232-2234, 1987.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of própolis. **Food Chemistry.** v. 80, p. 29-33, 2003.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 31, p. 247-256, 2000.

NAVARRETE, H. et al. Helechos. **Botánica Económica de los Andes Centrales,** Universidade Mayor de San Andrés, La Paz, p. 385-411, 2006.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal Clinical Nutrition.** v. 74, p. 418-42, 2001.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 33, n. 11, p. 1831-1836, 1989.

NONATO, F. R. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 125, n.1, p. 102-107, 2009.

ORTEGA, F., DIAZ, W. Ethnopharmacological notes on two Venezuelan *Asplenium*. **American Fern Journal.** v. 83, n. 2, p. 71, 1993.

**OS GRUPOS de plantas e seus ciclos de vida.** p. 110-137, 2010. Disponível em: <<http://www.edicoessm.com.br/backend/public/recursos/Reproducao%20SP%20Biologia%20%20unidade%203%20capitulo%206.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

PEREIRA, A. B. **Introdução ao estudo das pteridófitas.** 2. ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

- PERES, M. T. L. P. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (Polypodiaceae). **Quim. Nova**. v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.
- PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do semi-árido da Bahia**. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **LWT – Food Science and Technology**. v. 40, p. 1-11, 2007.
- POOLE, K. Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 34, p. 453-456, 1994.
- POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapie**. v. 44, p. 2233-2241, 2002.
- POOTZ, G.; RAMPEY, J. H.; BENJAMIN, F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) in antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms. A preliminary report. **Annales of New York Academic Press**. v. 141, p. 261-272, 1967.
- PRETTO, B. et al. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59c, p. 657-662, 2004.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1981. v.1.
- RANAL, M. A. Estabelecimento de Pteridófitas em mata mesófila semidecídua do Estado de São Paulo. 1. Caracterização climática do ambiente. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 67, p. 351-368, 1995.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Plantas vasculares sem sementes. In: \_\_\_\_\_. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 19. p. 408-447.
- RIBEIRO, M. G.; CARVALHO-FILHO, A. S.; LISTONI, F. J. P. Dimetilsulfóxido – DMSO no teste de sensibilidade microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 889-892, 2001.
- RODRIGUES, S. T. et al. Composição florística e abundância de pteridófitas em três ambientes da bacia do rio Guamá, Belém, Pará, Brasil. **Acta Amazonica**. v. 34, n. 1, p. 35-42, 2004.



ROUT, S. D.; PANDA, T.; MISHRA, N. Ethnomedicinal studies on some pteridophytes of Similipal Biosphere Reserve, Orissa, India. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. v. 1, n. 5, p. 192-197, 2009.

SALDAÑA, A. O. et al. Differences in light usage among three fern species of genus *Blechnum* of contrasting ecological breadth in a Forest light gradient. **Ecol Res**. v. 25, p. 273-281, 2010.

SANTOS, C. E. S. **A expansão urbana sobre os remanescentes florestais situados no entorno da Avenida Luís Viana Filho, Salvador – Bahia**. 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental Urbana) - Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SCHAECHTER, M. E. et al. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SEHGAL, J. M. Antimicrobial substances from flowering plants. I. Antifungal substances. **Hindustan Antibiot Bull**. v. 4, p. 3-29, 1961.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.2883-2894, 2001.

SENNA, R. M.; KAZMIRCZAK, C. Pteridophytes of a remaining Forest in Morro da Extrema, Porto Alegre, RS. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 4, n. 1, p. 33-48, 1997.

SHEPHERD, G. J. **Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil**. Relatório final de avaliação do estado de conhecimento da diversidade biológica do Brasil. COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP. 2000

SHINOZAKI, J. et al. Squalene cyclase and oxidosqualene cyclase from a fern. **FEBS Letters**. v. 582, p. 310-318, 2008.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**. v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, G. L. et al. Citotoxic biflavonoids from *Selaginella wildenowii*. **Phytochemistry**. v. 40, n. 1, p. 129-134, 1995.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102 p.

SINGH, M. et al. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 115, p. 327-329, 2008.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S. Antimicrobial flavonoid rutin from *Pteris vittata* L. against pathogenic gastrointestinal microflora. **American Fern Journal**. v. 98, n. 2, p. 98-103, 2008.

SINHA, M.; CHOUDHURY, M. D. Antimicrobial activity of some selected plants from Southern Assam. **Biological and Environmental Sciences**. v. 6, n. 1, p. 58-65, 2010.

SMITH, A. R. et al. A classification for extant ferns. **Taxon**. v. 55, n. 3, p. 705-731, 2006.

SOBRINHO, T. J. S. P. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Quim. Nova**. v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, K. R. M. S. de. **Fenologia populacional de três espécies de Monilophyta em fragmento de floresta semidecídua, Pernambuco, Brasil**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and chemical toxicology**. v. 41, p. 753-758, 2003.

SUFFREDINI, I. B.; BACCHI, E. M.; KRAUS, J. E. Estudo farmacognóstico do caule e raízes de *Microgramma squamulosa* (Kaulf.) Sota (Polypodiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 2, p. 279-286, 2008.

SUKSAMRARN, A; WILKIE, J. S.; HORN, D. H. S. Molting Hormones. 56. Blechnoside-A and blechnoside-B- ecdysteroid glycosides from *Blechnum minus*. **Phytochemistry**. v. 25, n. 6, p. 1301-1304, 1986.

TANAKA, N. et al. Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 1, p. 347-349, 1991.

**TAXONOMIA de criptógamas**. Rio de Janeiro: UCB, 2007. 40p.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim. Nova**. v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and Allies plants with Special References to Tropical America**. New York: Springer-Verlag, 1982. 857 p.

VASUDEVA, S. M. Economic importance of pteridophytes. **Indian Fern Journal**. v. 16, p. 130-152, 1999.

- WALLACE, J. Chemosystematic implications of flavonoids and C-glycosylxanthenes in 'ferns'. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 17, p. 145-153, 1989.
- WANG, C-Z; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Stereoselective phenolic coupling in *Blechnum spicant*. **Chem. Commun.** p. 113-114, 2001.
- WANG, K. et al. Phenolic constituents from *Brainea insignis*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 58, n. 6, p. 868-871, 2010.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**. v. 17, p. 300-312.
- WINDISCH, P.G. **Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo: Guia para estudo e excursões**. Campus de São José do Rio Preto – SP: UNESP, 110 p. 1992.
- WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WOLLENWEBER, E.; SCHNEIDER, H. Lipophilic exudates of Pteridaceae – chemistry and chemotaxonomy. **Biochem Syst Ecol.** v. 28, n. 8, p. 751-777, 2000.
- WYNNE, G. M. et al. Biosynthetic origin of the antheridiogen, gibberellin A<sub>73</sub> methyl Ester, in ferns of the *Lygodium* genus. **Tetrahedron Letters**. v. 39, n. 22, p. 3877-3880, 1998.
- XAVIER, S. R. S. **Pteridófitas da caatinga: lista anotada, análise da composição florística e padrões de distribuição geográfica**. 2007. 131f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- XAVIER, S. R. S.; BARROS, I. C. L. Pteridoflora e seus aspectos ecológicos ocorrentes no Parque Ecológico João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 19, n. 4, p. 777-781, 2005.
- YAMAGUCHI, L. F. et al. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. **Photochemistry**. v. 67, 1838-1843, 2006.
- YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

**APÊNDICE A** – Gráficos correlacionando o percentual de DPPH seqüestrado e as concentrações das amostras (em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) testadas no ensaio antioxidante.

