



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CARLOS EDUARDO OLIVEIRA CORDEIRO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Cratylia hypargyrea* Martius ex.  
Bentham (LEGUMINOSAE)**

Feira de Santana, BA  
2009

**CARLOS EDUARDO OLIVEIRA CORDEIRO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Cratylia hypargyrea* Martius ex.  
Bentham (LEGUMINOSAE)**

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.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Angélica Maria Lucchese

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Trovatti Uetanabaro

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, ânimo, amor, coragem e companhia em todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Samuel e Valdecy, a minha amada avó, Vardinha, e irmãos, Isabella, Ivana e Ivan, pela confiança, apoio, investimento, ombro amigo nas horas difíceis, compreensão, amizade e, de forma especial, pelo consolo, carinho e amor dedicados sem medida.

Ao meu idolatrado filho Guilherme pelo amor e a minha companheira de vida, Ediméria. O teu amor é fundamental para a realização dos meus projetos. Obrigado por estar sempre ao meu lado. Vocês serão sempre a grande inspiração da minha vida.

A minha querida orientadora, pela amizade, confiança, respeito e pela oportunidade concedida. Agradeço muito a professora Angélica Lucchese, não só por tê-la conhecido e admirar sua capacidade científica, mas principalmente por ter trabalhado sob sua orientação e ter aprendido muito neste período. Aprendizado este que ultrapassa a barreira do profissional. “Um anjo em nossas vidas”.

Agradeço a minha co-orientadora, Ana Paula, pelo apoio científico e emocional, pois esta realização profissional foi obra da generosidade desta pessoa abençoada. A professora Carla, não apenas pela sua simpatia, mas por ser uma grande pesquisadora e ter contribuído para a realização desta dissertação. Também agradeço ao professor Luciano Paganucci, que mesmo não tendo contato direto no cotidiano, é impossível não admirá-lo como pesquisador.

Não poderia deixar de agradecer, aonde tudo começou, no laboratório de produtos naturais e de microbiologia, aos grandes novos amigos que passaram por ali, os quais não há como citar todos, mas principalmente, aos amigos atuais: Josie “Morena”, Edna, João Anísio, Josie “Loira”, Bruno Andrade, Bruno Mota, Alice, Catiane, Rafaela, Ritinha, Renata Pinto, Fernanda Pinto, Paloma, Fabricio, Kleber, Bel, Paula, Serly. Todos vocês, que de alguma maneira, ajudaram na realização deste trabalho. Muito obrigado pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos que de fora do laboratório tanto me ajudaram a dar passos firmes a caminho do sucesso. Um agradecimento especial aos meus enormes amigos: Leonardo, Henrique, Vinícios, Orlando, Luciano, Rodrigo Valadares, Rubinho, Saulo, Marcos, Tiara; entre tantos outros. Obrigado pelo apoio, carinho e por terem vindo morar no meu coração para sempre.

Ao secretário da pós-graduação, Helton, pelo grande profissionalismo, atenção e assistência dada aos alunos da pós-graduação.

Aos colegas, alguns mais próximos, outros mais distantes, porém todos ocupando um espaço em meu coração.

A todos os professores do programa da Pós-Graduação pela colaboração na realização e conclusão deste trabalho.

E a todos aqueles, que de alguma forma contribuíram para que este sonho fosse concretizado, os meus sinceros agradecimentos.

*“No final, conservaremos somente o que amamos, amaremos somente o que compreendemos, compreenderemos somente o que nos é ensinado.”*

Baba Dioum

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01:</b>	Possíveis locais da ação de fármacos sobre as bactérias	21
<b>Figura 02:</b>	Imagens da <i>Cratylia hypargyrea</i> coletada no município de Itaberaba, próximo ao morro do Orobó.	44
<b>Figura 03:</b>	Mapa da Bahia indicando a cidade da coleta.	46
<b>Figura 04:</b>	Método de fracionamento por partição do extrato bruto do caule da <i>Cratylia hypargyrea</i> .	47
<b>Figura 05:</b>	Método da aplicação das amostras utilizando capilares das respectivas frações das folhas, a direita, e caule, a esquerda nas cromatoplasas.	48
<b>Figura 06:</b>	Cuba cromatográfica saturada tendo como eluente uma solução de diclorometano e acetona (8:2, v:v), amostra da fração diclorometano das folhas, à esquerda, e do caule, à direita	49
<b>Figura 07:</b>	Cuba cromatográfica saturada tendo como eluente uma solução de diclorometano e acetona (80:20, v:v) apresentando as distancias percorridas pela amostra (dr) e pela frente do solvente (dm).	50
<b>Figura 08:</b>	Imagem a esquerda apresenta a capela forrada com papel metro e o pulverizador acoplado a uma bomba de pressão positiva. A imagem a direita demonstra a pulverização da solução reagente Dragendorff sobre as placas previamente eluídas	50
<b>Figura 09:</b>	Figura ilustrativa da montagem da placa de 96 poços para o experimento de determinação da concentração inibitória mínima dos extratos de <i>Cratylia hypargyrea</i> contra micro-organismos patogênicos. CMH: Caldo Müeller-Hinton.	54
<b>Figura 10:</b>	Aplicação de 10 µL das amostras sobre a cromatoplasca utilizando uma pipeta automática	56
<b>Figura 11:</b>	Cromatoplasas contendo as amostras do extrato bruto e frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, da esquerda para a direita, respectivamente: (A) caule e (B) folhas de <i>C. hypargyrea</i> em análise após a pulverização com DPPH 0,05 %. Onde há inibição do radical observa-se halos brancos.	56
<b>Figura 12:</b>	Cromatoplasca com amostras de folhas e de caule da <i>C. hypargyrea</i> do extrato bruto (A) e frações em hexano (B), diclorometano (C), acetato de etila (D) e butanol (E), revelada com DPPH 0,05%.	61
<b>Figura 13:</b>	Cromatogramas após pulverização com DPPH 0,05%, correspondendo as amostras de folhas, caule e rutina sucessivamente, das frações em hexano (A), diclorometano (B), acetato de etila (C) e butanol (D).	62
<b>Figura 14:</b>	Gráficos demonstrativos da capacidade inibitória dos radicais livres de 250 µg/mL dos órgãos da <i>Cratylia hypargyrea</i> contra o DPPH	63

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01:</b>	Plantas da caatinga com estudos químicos e farmacológicos.	17
<b>Quadro 02:</b>	Biossistemática da espécie <i>C. hypargyrea</i>	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b>	Resultado da triagem fitoquímica das frações em hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH) dos extratos de folha e caule de <i>C. hypargyrea</i>	60
<b>Tabela 02:</b>	Capacidade de inibição de radicais livres, valores expressos em porcentagem, de 250 µg/mL dos diferentes órgãos da <i>Cratylia hypargyrea</i>	63
<b>Tabela 03:</b>	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos controles positivos (C+), cloranfenicol (antibacteriano) e nistatina (antifúngico), em mg/mL e do DMSO (%).	64
<b>Tabela 04:</b>	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida (CBM)/Fungicida Mínima (CFM), em mg/mL, dos extratos brutos metanólico das folhas e caule da <i>Cratylia hypargyrea</i>	66
<b>Tabela 05:</b>	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool butílico das folhas e caule da <i>Cratylia hypargyrea</i> .	67



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 01:</b>	Reação de Fenton	31
<b>Esquema 02:</b>	Reação de Haber-Weiss	31
<b>Esquema 03:</b>	Reação de Lipoperoxidação	32
<b>Esquema 04:</b>	Reação de oxidação catalizada pela superóxido dismutase	35

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	
2	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	OBJETIVO GERAL	
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
3.1	BIODIVERSIDADE	16
3.2	FITOTERAPIA	18
3.3	ANTIBIÓTICOS	20
3.4	RESISTÊNCIA MICROBIANA AOS ANTIMICROBIANOS	22
3.5	MICRO-ORGANISMOS TESTADOS	23
3.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.5.2	<i>Escherichia coli</i>	24
3.5.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3.5.4	<i>Salmonella choleraesuis</i>	25
3.5.5	<i>Bacillus cereus</i>	25
3.5.6	<i>Candida albica</i>	26
3.5.7	<i>Candida krusei</i>	26
3.5.8	<i>Candida parapsilosis</i>	27
3.6	MÉTODOS ANTIMICROBIANOS	27
3.7	ANTIOXIDANTES	29
3.7.1	<b>Antioxidantes Enzimáticos</b>	33
3.7.2	<b>Antioxidantes Não Enzimáticos</b>	35
3.8	FAMÍLIA LEGUMINOSAE	37
3.9	GÊNERO CRATYLIA	38
3.10	CRATYLIA HYPARGYREA	43
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	45
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	45
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO	46
4.3	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES	47

4.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA	48
4.4.1	<b>Cromatografia em camada delgada comparativa</b>	48
4.4.1.1	Reagente Anisaldeído - Ácido Sulfúrico	50
4.4.1.2	Reagente Dragendorff com Ácido Clorídrico (DRG)	51
4.4.1.3	Reagente Liebermann-Burchard	51
4.4.1.4	Reagente Hidróxido de Potássio (KOH)	51
4.4.1.5	Reagente Produtos Naturais – Polietilenoglicol (PN/PEG)	52
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	52
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	55
4.6.1	<b>Cromatografia em Camada Delgada</b>	55
4.6.2	<b>Espectrofotometria</b>	57
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	58
5.1	TRIAGEM FITOQUÍMICA	58
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	60
5.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MINIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA	63
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS</b>	

## RESUMO

A pesquisa de substâncias biologicamente ativas, originadas principalmente de plantas, tem levado a descoberta de moléculas clinicamente benéficas. Estudos químicos sobre a família Leguminosae relatam a produção de marcadores biológicos como os compostos fenólicos que possuem notável atividade contra micro-organismos gram positivos e negativos, fungos, vírus, efeito analgésico, entre outros. No semi-árido da Bahia, são encontrados diversos gêneros desta família, dentre estes a *Cratylia*, extensamente pesquisado devida a sua capacidade forrageira, principalmente, em períodos de seca extrema. Este estudo objetivou a investigação preliminar das classes de compostos, da atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas e caule da espécie *Cratylia hypargyrea*, coletada em Itaberaba - Bahia. O material vegetal foi identificado, limpo, seco e triturado, com posterior maceração em metanol para obtenção do extrato metanólico. O fracionamento deste extrato foi realizado utilizando-se o método da partição líquido-líquido para obtenção das frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. A ação antioxidante foi analisada por cromatografia em camada delgada e por espectrofotometria, usando o método de sequestro do radical DPPH. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra quatro cepas de bactérias gram-positivas, quatro gram-negativas e quatro leveduras através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). Para as frações obtidas a partir dos extratos das folhas e caules foram detectadas a presença de terpenos, triterpenos, esteróides e compostos fenólicos. Na análise da capacidade antioxidante foi observada que todas as amostras foram capazes de inibir o radical livre DPPH, com destaque para a fração em diclorometano. Todas as amostras em análise apresentaram também apresentaram ação antimicrobiana, sendo que a fração em hexano de ambos os órgãos apresentou as maiores potências bacteriostática contra, principalmente o *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida parapsilosis*, enquanto a maior ação bactericida e fungicida foi observada na fração em hexano dos caules contra *S. choleraesuis* e *C. parapsilosis*. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que esta espécie apresenta potencial antioxidante e antimicrobiano, assim investigações posteriores visando o isolamento e identificação destas substâncias são necessárias.

**Palavras-chave:** *Cratylia hypargyrea*. Triagem fitoquímica. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The research for biologically active substances, originated mainly from plants, has led to discovery of molecules clinically beneficial. Chemical studies on the Leguminosae family reported the production of biological markers such as phenolic compounds, that have significant activity against gram-positive and gram-negative micro-organisms, fungi, viruses, analgesic effect, among others. In semi-arid of Bahia are found several genus of this family, among them, the *Cratylia*, extensively researched due to its fodder ability, especially in periods of extreme dryness. This study aimed to preliminary investigation of classes of compounds, the antimicrobial and antioxidant activity of leaves and stems of the specie *Cratylia hypargyrea*, collected at Itaberaba - Bahia. The plant material was identified, cleaned, dried and crushed, with subsequent maceration in methanol to obtain methanolic extract. The fractionation of this extract was performed by using the method of liquid-liquid partition to obtain the fractions: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. The antioxidant activity was analyzed by thin-layer chromatography and spectrophotometry using scavenging of DPPH radical method. Antimicrobial activity was evaluated against four strains of gram-positive bacterias, four gram-negative bacterias and four yeasts by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM). In the fractions obtained from extracts of leaves and stems were detected the presence of terpenes, triterpenes, steroids and phenolic compounds. In the analysis of antioxidant capacity was observed that all samples were able to inhibit the free radical DPPH, with reference to the fraction in dichloromethane. All samples in analysis also showed antimicrobial activity, and the fraction of hexane in both organs showed the highest bacteriostatic power against especially *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* and *Candida parapsilosis*, as the greatest bactericidal and fungicidal activity was observed in fraction hexane of stems against *S. choleraesuis* and *C. parapsilosis*. The results of this study indicate that this specie has antioxidant and antimicrobial potential, so further investigations aimed at isolation and identification of these substances are necessary.

**Keywords:** *Cratylia hypargyrea*. Fitochemical Screening. Antimicrobial activity. Antioxidant activity.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, plantas e produtos naturais de origens diversas vêm sendo utilizados na terapêutica farmacológica. Ao conhecimento tradicional agregou-se uma base científica, possibilitando assim a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de diversas doenças que afligem o ser humano e diversos animais. A partir do século XIX, com o advento de novas tecnologias para o isolamento de diferentes substâncias, diversos fármacos foram descobertos e são utilizados até a atualidade em tratamentos medicamentosos como a codeína, digitoxina, escolamina, atropina, hiosciamina e outras (BRAGA In: LEITE, 2009).

A biodiversidade brasileira é considerada a maior diversidade e complexidade genética vegetal do mundo, possuindo, aproximadamente, 550.000 espécies (DIAS *apud* GUERRA In: SIMÕES 2002; SIMÕES 1996). Devido a esta grande diversidade de espécies vegetais há uma maior possibilidade de identificação de compostos bioativos contra diversas patologias. Muitos destes compostos são difíceis de serem sintetizados em laboratório, pois o metabolismo vegetal possui um arsenal enzimático que possibilita a biossíntese de inúmeras substâncias que a ciência atual não consegue reproduzir (SIMÕES, 2004; SILVA, 2004; GUERRA, 2002)

A família Leguminosae é representada por 482 gêneros e 12.000 espécies, aproximadamente. De acordo com Queiroz (2006), há no Brasil 293 espécies distribuídas em 77 gêneros, sendo que 144 espécies são endêmicas da região do semi-árido destacando-se a região da Chapada Diamantina, estado da Bahia, nordeste do Brasil, com 40% da população desta família no território brasileiro. Estudos etnofarmacológicos de espécies da família Leguminosae demonstram atividade biológica analgésica, antialérgica, anti-inflamatória, antimalárica, cicatrizante, antidiarréica, preventivo de câncer, hemo-aglutinante, antinociceptivo, antihipertensivo, citotóxica, alucinogênica, imunomoduladora, antioxidante, antimicrobiana, anti-helmíntica, analgésica, hipoglicemiante, diurética, laxativa, expectorante, hepatoprotetor e inibidora da acetilcolinesterase.

O gênero *Cratylia* que, de acordo com Teixeira (2006), possui diversas espécies endêmicas da região nordeste do Brasil, sendo muito utilizado como espécie forrageira com grande resistência à seca. Há diversas pesquisas relacionando espécies de *Cratylia* a melhoramento de solos devido ao enriquecimento de nutrientes essenciais ao crescimento de algumas espécies como fixação de fósforo, nitrogênio e cálcio, além de tornarem o pH ácido,

3,8 a 5,9 (CANO et al., 1994; XAVIER et al., 1996; PIZARRO et al., 1996; QUEIROZ, 2006; SANCHÉS, 2006). Dentre as diversas espécies do gênero está a *Cratylia hypargyrea*, que não possui estudos químicos e de bioprospecção em literatura científica, sendo este o primeiro trabalho de caracterização química e de atividades antioxidante e antimicrobiana.

Compostos com atividade antioxidantes possuem potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a sua ação de oxidação. Os radicais livres são compostos cuja estrutura química possui um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, altamente instáveis e reativos, possuindo, assim, meias vidas curtas e quimicamente reativas. Possuem uma enorme capacidade de combinar-se com qualquer composto, a fim de captar um elétron desse composto para adquirir estabilização de sua estrutura molecular evitando a interação destes compostos com macromoléculas necessárias ao metabolismo normal da célula. Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos possuem grande interesse na produção de compostos capazes de inibir a proliferação de radicais livres com fim de ganho de estabilidade nos medicamentos, vida de prateleira para alimentos e utilização de cosméticos antioxidantes.

A cultura da população em se automedicar com antibióticos proporcionou a alguns micro-organismos a capacidade em desenvolverem resistência a um grande número de antibióticos em uma velocidade muito maior ao desenvolvimento de novos fármacos. O maior risco na clínica devido à resistência a antimicrobianos é a capacidade desses micro-organismos em transmitirem a resistência a outros micro-organismos dos agentes antimicrobianos mais potentes utilizados na terapêutica médica. Nas últimas décadas a resistência microbiana a antibióticos tem sido um dos grandes problemas de saúde pública (GOODMAN e GILMAN, 2006; COUTINHO et al.; 2006). A pesquisa por compostos provenientes de fonte renovável capazes de inibir a proliferação de micro-organismos patogênicos com reduzidos efeitos colaterais faz-se necessário para conter uma possível epidemia causada por cepas patogênicas resistentes aos atuais antimicrobianos disponíveis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do caule e das folhas da espécie *Cratylia hypargyrea* Mart.ex Benth, Leguminosae.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico e frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol das folhas e caule da espécie *Cratylia hypargyrea* pelo método de determinação da concentração inibitória mínima contra *Escherichia coli* CCMB 284, *Escherichia coli* CCMB 261 (sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida), *Staphylococcus aureus* CCMB 262 (resistente à estreptomicina e dihidroestreptomicina), *Staphylococcus aureus* CCMB 263 (resistente a novobiocina), *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Bacillus cereus* CCMB 282, *Salmonella* sp. CCMB 281, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, *Candida albicans* CCMB 266, *Candida albicans* CCMB 286 (resistente a anfotericina-B e fluconazol), *Candida albicans* CCMB 287 (sensível a anfotericina-B e fluconazol), *Candida albicans* CCMB 288 (resistente a anfotericina-B e fluconazol).
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato bruto e frações dos órgãos de *Cratylia hypargyrea*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações das folhas e caule da espécie *Cratylia hypargyrea* através do método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) por cromatografia e espectrofotometria no UV-Vis
- Detectar as classes de metabólitos presentes por testes com reveladores específicos através de cromatografia em camada delgada



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 BIODIVERSIDADE

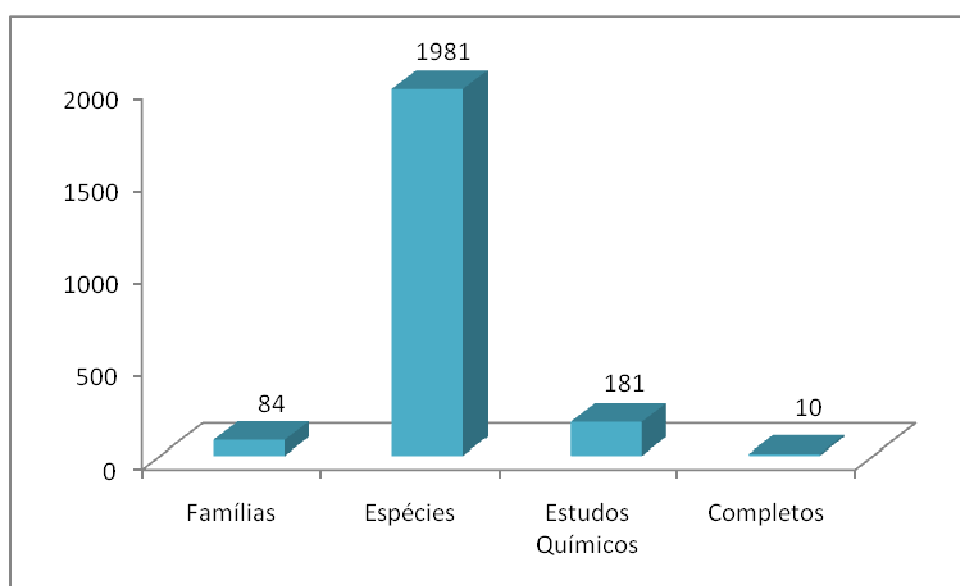
A biodiversidade é definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem como, por exemplo, ecossistemas, espécies e populações. Esta possui uma distribuição relativa desigual em um determinado espaço geográfico, favorecendo uma grande variedade de espécies de famílias diferentes em um mesmo ambiente. Sendo assim faz-se necessário a tomada de medidas de caráter emergencial para a conservação de ecossistemas nos quais há diversidade de espécies (GUERRA, 2002 In: SIMÕES, 2004; SILVA, 2004).

A biodiversidade brasileira é considerada como a maior diversidade genética vegetal do mundo sendo de difícil precisão devido a sua complexidade. Entretanto estima-se que há mais de 55.000 espécies vegetais distintas, de um total estimado de 550.000, representando assim 10 % de todo o território nacional (GUERRA In: SIMÕES 2002). De acordo com Guerra (2002) in Simões (2004) quanto maior a diversidade de espécies vegetais maior será a possibilidade para a identificação de produtos com compostos de possível atividade biológica como a presença, em algumas espécies, de alcalóides com atividade inseticida, anticancerígena, entre outras. Muitos destes compostos são difíceis de serem sintetizados em laboratório, mas o metabolismo vegetal possui um arsenal enzimático que possibilita a biossíntese de inúmeras substâncias que a ciência atual não consegue reproduzir (SIMÕES, 2004; SILVA, 2004)

A relevância econômica dos produtos naturais para a indústria farmacêutica é evidente, pois dos 35 fármacos de referência com maior volume de vendas no mercado mundial, os oriundos de produtos naturais representam 40% das vendas mundiais em 2000, aumentando 4% em 2001 e mais 6% em 2002; e dos fármacos novos no mercado, relatados do período de 1981 a 2002, 48% foram de fontes naturais ou derivados destes (BRAGA In: LEITE, 2009). A venda de fármacos derivados de espécies vegetais atinge valores de US\$ 30 bilhões/ano dos cerca de 320 bilhões/ano movimentados somente em 2002 (ROBBERS et al., 1996 *apud* GUERRA In: SIMÕES, 2004; RASKIN et al., 2002 *apud* BRAGA In: LEITE, 2009). Fármacos derivados de plantas são, atualmente, uma das principais peças nas economias de diferentes países industrializados como os Estados Unidos da América (EUA),

que dos 25 medicamentos mais prescritos 12 são derivados de produtos naturais. Cabe destacar, que aproximadamente 25 % das drogas atualmente prescritas no mundo são derivadas de plantas, enquanto que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 25% do receituário médico em países desenvolvidos e 80% nos países em desenvolvimento prescrevem o uso de fitoterápicos e que das 252 drogas consideradas essenciais 11 % são obtidas, exclusivamente, de plantas (CRAGG et al., 1997; DAVID et al. In: GIULIETTI E QUEIROZ, 2006; ROBBERS et al. *apud* GUERRA IN: SIMÕES, 2006; BRAGA In: LEITE, 2009). No Brasil estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas apesar de que apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas em busca de novos compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996 *apud* GUERRA In: SIMOES, 2004) e destas, apenas 590 foram registradas no Ministério da Saúde (MS) para comercialização. Mesmo que este levantamento reflita dados de 10 anos atrás, nesta última década, não houve uma mudança significativa no conhecimento da composição química da flora brasileira (GIULIETTI e QUEIROZ, 2006).

Um levantamento recente a respeito da química e farmacologia das substâncias e extratos das espécies vegetais da caatinga brasileira indicou que houve um pequeno progresso no conhecimento químico e biológico das espécies vegetais brasileiras (Quadro 01). Das 1981 plantas da caatinga, identificadas e arquivadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), distribuídas em 84 famílias, cerca de apenas 10% possuíam estudos químicos e farmacológicos (DAVID et al. In: GIULIETTI e QUEIROZ, 2006).



**Quadro 01** – Plantas da caatinga com estudos químicos e farmacológicos.

**Fonte** – DAVID et al. In: GIULIETTI, QUEIROZ (2006)

### 3.2 FITOTERAPIA

A OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece 150 espécies de plantas com valor terapêutico e considera planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semisintéticos” (WHO, 1993).

A Agência de Vigilância Sanitária, ANVISA, do Ministério da Saúde, determina com o deferimento da portaria nº 48, de 16 de março de 2004, que um produto para ser considerado um medicamento fitoterápico deve ser “obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase três. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais” (ANVISA, 2004). A legislação visa regulamentar e oficializar o desenvolvimento e o uso de fitoterápicos a fim de reduzir os efeitos tóxicos provocados pela administração de altas doses destas substâncias devido à falsa informação disseminada para a população pela mídia televisiva de que “o que é natural não possui efeitos colaterais”; além de definir critérios para benefício da população nativa que possuem seu conhecimento explorado e discutido, mas não possuem direito ao lucro obtido dele. Salvo aquelas comunidades que providenciem o registro em cartório da espécie vegetal e do seu uso terapêutico, para que, mesmo indiretamente, possa ser beneficiada pelos resultados obtidos a partir da exploração de seu conhecimento (ANVISA, 1996).

As plantas constituem uma fonte rica e renovável de moléculas biossintetizadas capazes de causar alterações biológicas na fisiologia animal. O homem desde a pré-história buscava a cura de suas enfermidades através de preparações botânicas, mas com o passar do tempo e o desenvolvimento industrial no século XX, a população residente nos grandes centros urbanos abandonou o uso de plantas medicinais, devido ao avanço da tecnologia na produção de fármacos sintéticos e a evolução da medicina alopática (BRISKIN, 2000; LIMA, 2001; MACIEL, 2002; SIMÕES, 2004). Porém, os países em desenvolvimento possuem a maior parcela de sua população formada por indivíduos de baixo poder aquisitivo que não possuem acesso aos hospitais de sua região ou aos medicamentos sintéticos. A necessidade

desta população carente de manter um tratamento terapêutico com menor custo favoreceu a continuidade do uso de plantas medicinais devido à facilidade na obtenção e na tradição do uso destas para cura de diversas enfermidades. Outros fatores que contribuem para a utilização de plantas medicinais são: o alto custo e os efeitos adversos dos fármacos sintéticos, a automedicação, o conhecimento químico, farmacológico e o controle e qualidade das drogas vegetais (SILVA, 2004; SIMÕES et al., 2006; MACIEL et al., 2002; MATOS, 2000).

A utilização de preparações fitoterápicas pela população como chás, emplastos, unguentos, entre outros; pode a princípio, ser tão eficiente quanto o uso de medicamentos sintéticos, porém com o conhecimento prévio dos compostos deste fitoterápico, já há a presença de inúmeras substâncias que podem produzir efeitos inesperados e desconhecidos (SIMÕES, 2002). O uso indiscriminado de fitoterápicos pode produzir em longo prazo, efeitos tóxicos, havendo assim a necessidade de estudos etnobotânicos/etnofarmacológicos e ensaios clínicos. A etnobotânica, de acordo com Elisabetsky in Simões (2002), retrata o conhecimento empírico de uma determinada população tradicional sobre os efeitos biológicos dos espécimes vegetais utilizados na cura de suas enfermidades e etnofarmacologia como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (BRUHN e HOLMSTEDT, 1982; HOLMSTEDT e BRUHN, 1983 *apud* ELISABETSKY In: SIMOES, 2002)

As pesquisas com plantas medicinais envolvem áreas de conhecimento diversas como a etnobotânica, investigações da medicina tradicional e popular; a fitoquímica para realizar o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a síntese orgânica de fármacos e transformações químicas de princípios ativos; estudo da relação estrutura/atividade, química farmacêutica, a farmacologia dos mecanismos de ação dos componentes químicos e a incorporação destes fármacos em veículos, formulações, para a produção de medicamentos, farmacotécnica. Estes estudos favorecem a ampliação dos conhecimentos sobre a flora regional enriquecendo o conhecimento da população sobre quais espécies são benéficas ou prejudiciais à saúde aumentando a segurança no consumo das espécies estudadas (SIMÕES, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Além da obtenção de dados etnobotânicos e etnofarmacológicos a quimiossistemática é uma das principais ferramentas utilizadas pelos pesquisadores de instituições particulares e universidades na detecção de plantas capazes de curar certas patologias, pois esta utiliza o conhecimento de rotas de biossíntese para produção de micro e macromoléculas de diferentes famílias, aumentando assim a possibilidade de encontrar moléculas bioativas. Apesar de haver

alterações da produção destes compostos biossintéticos devido a alteração do ambiente no qual a planta esta inserida (SIMÕES, 2002).

O súbito e rápido crescimento no consumo de fitoterápicos favorece o interesse de indústrias farmacêuticas em todo o mundo para a comercialização de fitoterápicos. Atualmente, o mercado de medicamentos fitoterápicos vem sendo expandido em todo o mundo devido ao progresso nas práticas terapêuticas utilizando espécies vegetais, impulsionando o mercado mundial de fitoterápicos chegando a movimentar 40 bilhões de dólares por ano (SILVEIRA, 2003). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos, o setor chega a movimentar R\$ 1 bilhão por ano e emprega mais de 100 mil pessoas (SILVA-JUNIOR e PEREIRA, 2009).

Apesar da ampla biodiversidade brasileira o setor de produção e comercialização de fitoterápicos fica atrás de países menos desenvolvidos, fazendo-se necessário a intervenção do governo em viabilizar investimento para estimular a produção de fitoterápicos, visto que já há uma legislação e normas que regem a fabricação destes.

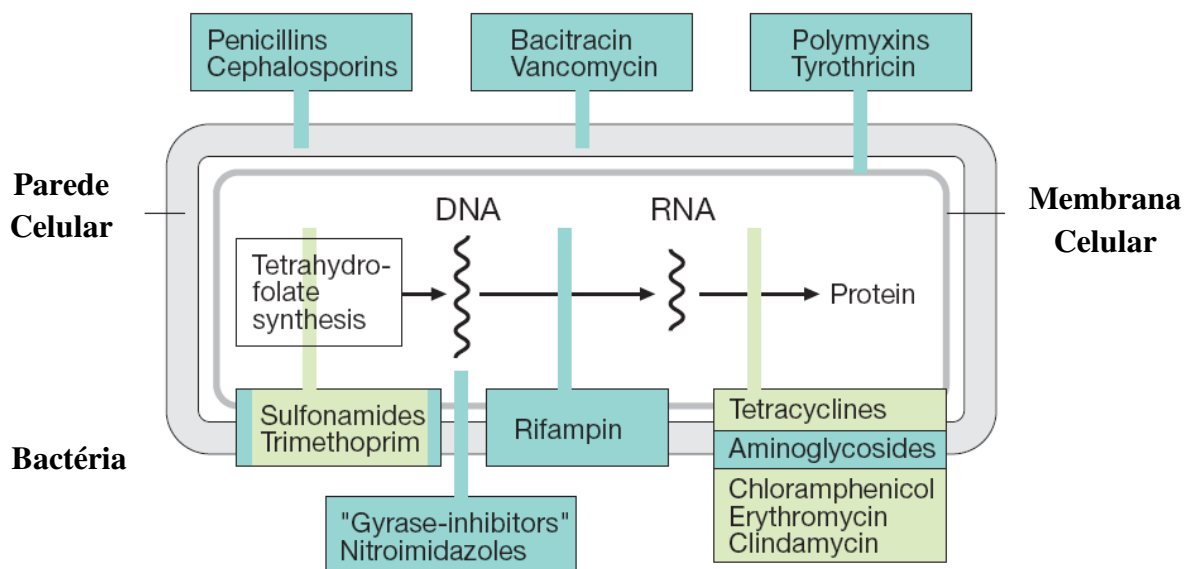
### 3.3 ANTIBIÓTICOS

No século XIX não havia o controle sobre o crescimento microbiano. Nos hospitais era comum o óbito de pacientes (cerca de 25 %) devido a infecções transmitidas pelas mãos e instrumentos utilizados por médicos e enfermeiras que os atendiam. Ignatz Semmelweis, médico húngaro que trabalhava em Viena, e Joseph Lister, médico inglês, foram os primeiros a introduzir o conceito de controle dos micro-organismos simplesmente forçando o corpo médico a lavar as mãos reduzindo drasticamente o número de óbitos (TORTORA, FUNK, CASE, 1993)

Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados agentes antimicrobianos. Este termo passou a ser utilizado após a descoberta, por Fleming em 1929, da penicilina, primeiro antibiótico produzido em escala industrial em 1932 (GOODMAN E GILMAN, 2006). O termo antibiótico é definido, por alguns autores, como toda substância biossintetizada por um ser vivo com a capacidade de inibir o crescimento e/ou matar outros micro-organismos (TORTORA, FUNK, CASE, 2000, 1993; BLACK, 2002; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Na literatura a classificação dos antibióticos segue critérios diferentes a depender do autor, por exemplo, segundo Silva (1998) os antibióticos devem ser classificados conforme sua estrutura química, origem, farmacocinética e farmacodinâmica. Já Souza et al. (2003) classificam-os como específicos, atuando somente contra o micro-organismo patogênico sem afetar o hospedeiro, e inespecíficos, aqueles capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano. Outra classificação é intrínseca aos resultados *in vitro* da atividade dos agentes antimicrobianos, sendo classificados como bactericida, causando a morte dos micro-organismos na fase de crescimento logarítmico (período no qual há o aumento da atividade metabólica aumentando a susceptibilidade ao antimicrobiano) ou bacteriostático, inibindo o crescimento exponencial dos micro-organismos (SILVA, 1998; SOUZA et al., 2003; GOODMAN e GILMAN, 2006; FERREIRA, 2007).

Diversos são os mecanismos conhecidos de ação dos agentes antimicrobianos, como a inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular dos micro-organismos, lesão da membrana citoplasmática através da inibição de algumas enzimas citoplasmáticas, interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas através da alteração da síntese e replicação de DNA ou da inibição da enzima RNA-polimerase, e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (TORTORA, FUNK, CASE, 2000; TORTORA et al., 2006; BLACK, 2002; TRABULSI, TOLEDO, 2004; GOODMAN e GILMAN, 2006).



**Figura 01** - Possíveis locais da ação de fármacos sobre as bactérias

Fonte: LÜLLMANN et al., 1996

### 3.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Devido ao uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos pela população alguns micro-organismos desenvolveram resistência a ação destes. Os principais mecanismos de resistência acontecem através de ativação enzimática como, por exemplo, a atividade de penicilinases, cefalosporinas, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; modificação de receptores intracelulares causando alterações ribossômicas, alterações de enzimas intracelulares e transporte alterado do antibiótico no interior do microrganismo (BLACK, 2002; TORTORA, FUNK, CASE, 2003; TOLEDO, 2004; TRABULSI, TOLEDO, 2004; MOREIRA, 2004; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Apesar das indústrias farmacêuticas e universidades investirem na pesquisa e produção de novos fármacos antibióticos, a cultura da população, em se automedicar com antibióticos, proporcionou a estes micro-organismos uma oportunidade em adquirirem resistência a um grande número de antibióticos. O grande problema da clínica com a resistência a antimicrobianos é a capacidade desses micro-organismos em adquirir e transmitir a resistência a outros micro-organismos. Como a resistência a antibióticos é crescente e a perspectiva de novos fármacos para combater estes micro-organismos é incerta, faz-se necessário, tomar medidas para enfrentar esse grande problema como, por exemplo, aumentar a política contra a automedicação pela população, o desenvolvimento de pesquisas a fim de encontrar ou produzir fármacos capazes de matar ou inibir o crescimento desses micro-organismos resistentes assim como melhorar o conhecimento dos mecanismos genéticos que envolvem a resistência microbiana (GOODMAN e GILMAN, 2006; BOROWSKI ET. AL., 2002).

A pesquisa fitoquímica estuda a potencialidade de aplicação comercial de extratos vegetais e fitoquímicos, principalmente, com fins medicinais, sendo esta uma das formas mais antigas de tratamento medicinal da humanidade (DUARTE, 2006). A OMS estima que, aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006). As atividades metabólicas secundárias dos vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas, inseticidas e herbicidas; como mecanismo de defesa contra o estresse causado pela presença de microrganismos, insetos e herbívoros (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

O Brasil é um dos países que possuem uma enorme diversidade botânica e uma população, de baixa renda, que tradicionalmente faz uso de plantas medicinais para tratamentos de diversas enfermidades, dentre estas as infecções causadas por micro-organismos patogênicos, como os responsáveis pela a esquistossomose, a leishmaniose, a malária e infecções fúngicas e bacterianas. Entretanto, apesar da rica flora, somente os dados de algumas plantas estão disponíveis, incluindo espécies nativas e exóticas (DUARTE, 2006).

Nascimento et al. (2000) estudaram a composição química e atividade antimicrobiana de extratos de diversas espécies de plantas do centro-oeste do Brasil. Estes autores observaram que em todas as amostras foi possível identificar compostos da classe dos compostos fenólicos, flavonóides e terpenos e com inibições de até 64,2 % dos micro-organismos em teste, apresentando também um grande efeito inibidor na proliferação de cepas resistentes.

O trabalho de Duarte (2006) demonstrou que a flora brasileira possui um enorme potencial biotecnológico, pois em sua pesquisa este avaliou a atividade antimicrobiana de extratos de 80 espécies de plantas medicinais comumente utilizadas na medicina popular brasileira. Foi observado que, das 80 espécies analisadas, 11 apresentaram resultados positivos para inibição do crescimento dos micro-organismos. Os extratos de duas destas espécies, *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, apresentaram forte atividade, com inibições de 0,04 a 0,12 mg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, possuindo assim concentrações similares a do cloranfenicol (0,12 mg/mL).

Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) realizaram testes com extratos alcoólicos obtidos de 17 espécies de árvores nativas do Brasil. Dos 170 testes realizados, 25 % mostraram atividade antioxidante, as maiores atividades foram observadas em *Mimosa tenuiflora* contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus*; e nos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Providencia spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus*.

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS TESTADOS

#### 3.5.1 *Staphylococcus aureus*



É uma bactéria em forma de cocos, gram-positiva, medindo de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com obtenção de maior massa celular em ambiente anaerobiose, coagulase-positiva e que ocorrem agrupados na forma de cachos de uvas nos esfregaços corados. Embora faça parte da microbiota da pele e mucosas humana este é o patógeno mais importante entre os estafilococos, pois pode produzir infecções oportunistas em baixa de imunidade fisiológica como, por exemplo, impetigo, furúnculo, abscessos renais e cerebrais, osteomielite, endocardite, septicemia, pneumonia, meningite, artrite infecciosa e intoxicação alimentar. Infecções causadas por este micro-organismo apresentam alto índice de mortalidade principalmente em pacientes imunocomprometidos. O *S. aureus* é relativamente resistente ao meio ambiente, seu estado vegetativo resiste até 60° C, radiação, dessecação e locais de elevada pressão osmótica; produzem muitas toxinas que contribuem a sua patogenicidade a aumentam sua capacidade de invadir e danificar tecidos, sendo este o agente etiológico da síndrome do choque tóxico, uma infecção grave que produz febre elevada, vômitos podendo levar a morte. A toxina produzida é termoestável podendo resistir a 30 minutos de ebulição (TORTORA, FUNKE, CASE, 1993; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI, TEIXEIRA, BUERIS In: TRABULSI e ALTERTHUM, 2004)

### 3.5.2 *Escherichia coli*

É uma bactéria em forma de bacilos, gram-negativa, aeróbias e anaeróbias facultativas, pertencente à família Enterobacteriaceae. Comumente encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais. Pode provocar complicações clínicas como diarréia, disenteria, colite hemorrágica, redução das microvilosidades, septicemias, gastroenterites, infecções do trato urinário, pneumonia em pacientes imunocomprometidos e meningites em neonatos. Sua presença na água e alimentos é indicativa de contaminação fecal. A diarréia infantil é facilmente tratada com antibióticos, porém nos hospitais o seu tratamento deve-se manter vigilância constante, pois a *E. coli* adquire resistência ao antibiótico (RAVEL, 1997; TORTORA, FUNKE, CASE, 1993; KONEMAN et al., 2001; TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

### 3.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

São bactérias em forma de bacilos, gram-negativas, aeróbia, podendo crescer anaerobicamente se houver a presença de nitratos como acceptor de elétrons, não são

fermentadoras e não esporulantes. A importância clínica de *P. aeruginosa* está baseada na resistência natural e adquirida aos diversos antibacterianos de uso habitual, mecanismos os quais são expressos de forma individual ou combinados como, por exemplo, a síntese de  $\beta$ -lactamase cromossomal, impermeabilidade da membrana, a capacidade de colonizar superfícies em forma de biofilme, a presença de sistemas de efluxo, a aquisição de plasmídios de resistência transferidos por processos de transdução e conjugação. São encontrados habitando o solo, água não poluída, intestino de animais, nos alimentos e nos ambientes hospitalares. A *P. aeruginosa* é a espécie de *Pseudomonas* que está mais envolvida em doenças humanas, principalmente em pacientes com interrupção das barreiras cutâneas ou mucosas como pacientes que sofreram traumas, cirurgias, queimaduras, diálises, transplantes, hemoterapia, diabetes, imunodeficiência ou uso prolongado de cateter, hospitalizados com câncer e fibrose cística; podendo levar a morte em casos de pacientes com sistema imunológico enfraquecido como prematuros, neonatos e idosos ou com o uso de fármacos como corticóides, radiação e quimioterápicos (KONEMAN et. al., 2001; LICOPAN e TRABULSI In: TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

#### 3.5.4 *Salmonella choleraesuis*

É uma bactéria em forma de bacilos, gram-negativa, aeróbia e anaeróbia facultativa, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Bactérias desta espécie não são hospedeiras normais do trato gastrointestinal e em caso de infecção indicam uma fonte do ambiente como, por exemplo, a ingestão de alimentos, água ou leite contaminado por fezes humanas ou de animais e carnes mal passadas. Em caso de infecção a febre moderada é indicativa, devido à resposta do corpo a infecção, sendo acompanhada de náuseas, diarreia aguda, dor e câimbras abdominais; frequentemente causa gastroenterites, infecção aguda da mucosa intestinal, acompanhada de bacteremia. A taxa de mortalidade é baixa, menor do que 1 % (RAVEL, 1997; TORTORA, FUNKE, CASE, 1993; KONEMAN et al., 2001; CAMPOS In: TRABULSI e ALTERTHUM, 2004)

#### 3.5.5 *Bacillus cereus*

É uma bactéria em forma de bacilo grande e esporulado, gram-positiva e anaeróbia. O *Bacillus cereus* é um dos contaminantes mais comuns em casos de intoxicação alimentar em diversos países, principalmente em países orientais, pois a base de sua alimentação é o arroz

sendo este utilizado como meio de crescimento propício para a proliferação do *B. cereus*. Apresentam duas formas clínicas de intoxicação: uma de forma emética, apresentando vômitos, sendo mediada por uma toxina termoestável, seu período de incubação é de seis horas possuindo duração de média dos sintomas de nove horas; e outra na forma diarréica, mediada por uma toxina termolábil semelhante à toxina colérica, seu período de incubação é de 8-10 horas com duração de sintomas de 24 horas, sendo os vegetais e carnes comumente implicados na contaminação deste micro-organismo (TRABULSI e MARTINEZ In: TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

### 3.5.6 *Candida albicans*

*C. albicans* é uma levedura que apresenta forma oval, longa e reproduz-se por brotamento. Habita, normalmente, o trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca, sendo considerada comensal nesta cavidade e vagina. Apesar de ser um micro-organismo que habita normalmente o corpo humano, é freqüentemente relacionado a contaminação superficiais ou profundas. Imunossupressão (pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV – sigla em inglês)), debilidade orgânica como, uso de corticóides, uso de próteses ou de aparelhos ortodônticos, alterações endócrinas, discrasias sanguíneas, entre outros fatores, podem tornar o fungo patogênico, resultando em uma grave infecção sistêmica pelo aumento da quantidade de leveduras no sangue e tecidos (BOPP et al., 2006). Candidíase oral e esofágica são características clínicas da síndrome da deficiência imune adquirida (AIDS – sigla em inglês). A taxa de mortalidade em caso de candidíase sistêmica esta acima de 70 % mesmo em pacientes com início de terapia antifúngica. Após a infecção dos tecidos causados por *Candida*, as patologias podem ser diversas como osteomielites, endocardites, candidíase hepática e na maioria dos casos há recorrência se houver falha no tratamento. Devida a rápida adaptação adquirida a antifúngicos, este tem sido o micro-organismo que tem causado sérios problemas no ambiente hospitalar (MOREIRA, 2002; SERRACARBASSA E DOTTO, 2003).

### 3.5.7 *Candida krusei*

A *C. krusei*, uma levedura, assim como as demais espécies de *Candida* são comumente encontradas em infecções fúngicas em mucosas animais e no meio ambiente como bebidas fermentadas, produtos derivados do leite. Apesar da *Candida albicans* ser

considerada a cepa de maior morbidade, a *C. krusei* está se tornando uma cepa patogênica emergente devido a um grande número de pacientes imunodeprimidos terem sido infectados, principalmente em ambientes hospitalares (PFALLER e DIEKEMA, 2007). De acordo com OROZCO (1998), são cepas que adquirem resistência a antifúngicos da classe química azole com muita facilidade podendo tornar-se um sério problema de saúde pública devido ao uso indiscriminado de agentes antifúngicos principalmente se os pacientes apresentam imunossupressão, debilidade orgânica, síndrome da imunodeficiência adquirida, entre outros fatores; pois podem acarretar uma grave infecção sistêmica pelo aumento da quantidade de leveduras no sangue e tecidos. Manifestações clínicas como endoftalmite, artrites e endocardites são os achados clínicos mais comuns em pacientes infectados por *C. krusei*. O fluconazol é o fármaco de primeira escolha devido a sua ampla ação contra infecções causadas por espécies de *Candida*.

### 3.5.8 *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis*, uma levedura, é considerada um dos principais fatores de infecções da musculatura cardíaca, endocardites, vaginites, lesões de mucosas e pele e aumento dos casos de oncomicoses, atingindo principalmente pacientes imunodeprimidos, principalmente aqueles alimentados por via parenteral. Há indícios de que esta espécie é produtora de um biofilme capaz de aumentar a incidência de bactérias. De acordo com a literatura, infecções fúngicas causadas pela *C. parapsilosis* está, epidemiologicamente, associada à nutrição parenteral e implantes como marcapasso (WEEMS et al., 1987; PORTINERI, 2001)

## 3.6 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS

Os laboratórios de microbiologia possuem vários testes para análise de sensibilidade microbiana, desde métodos convencionais a metodologias mais modernas. Entre os mais utilizados pode-se citar os métodos da difusão do disco, microdiluição em caldo, entre outros. Os laboratórios de pesquisa têm utilizado, preferencialmente, a análise da concentração inibitória mínima (CIM), microdiluição seriada em caldo, uma vez que este teste, além de avaliar a atividade antimicrobiana, possibilita a determinação da mínima concentração necessária para inibir o crescimento dos micro-organismos (NCCLS, 2003).

Os resultados e a interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade podem ser considerados como sendo: sensível, significando que o micro-organismo é passível de inibição ou morte em contato com o agente antimicrobiano; intermediário, significa que o crescimento ou morte do micro-organismo pode ser conseguido com doses maiores do que os antimicrobianos de referência; e o resistente, quando o micro-organismo não é inibido mesmo em altas concentrações dos antimicrobianos (NCCLS, 2003).

Segundo a NCCLS (2003):

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua a um processo infeccioso que justifique quimioterapia antimicrobiana, se sua sensibilidade não pode ser predita, de maneira confiável, a partir da identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são iniciados, com mais frequência, quando se acredita que o organismo causativo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos mais frequentemente usados. Os mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas. Alguns organismos ainda possuem sensibilidade previsível a agentes antimicrobianos, e a terapia empírica é amplamente reconhecida. Os testes de sensibilidade são raramente necessários quando a infecção se deve a um microrganismo reconhecidamente sensível a uma droga muito eficaz (ex., a sensibilidade continuada de *Streptococcus pyogenes* à penicilina nos Estados Unidos). Com *S. pyogenes* proveniente de pacientes alérgicos à penicilina, pode-se testar a eritromicina ou outros macrolídeos, de maneira a detectar as cepas resistentes a esses agentes. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e de novos agentes antimicrobianos.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição é um ensaio quantitativo *in vitro* aplicado a avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. Este método de microdiluição avalia o comportamento de diferentes micro-organismos frente a concentrações crescentes dos compostos analisados em meio de cultura líquido. A menor concentração capaz de inibir a multiplicação dos micro-organismos é denominada de CIM (NCCLS, 2003).

O método de microdiluição, CIM, é determinado em placas de cultura de 96 poços onde uma série de diluições da amostra é realizada em meio líquido. Os poços são então inoculados com uma suspensão de micro-organismos e as placas são incubadas. O crescimento microbiano (turvação) e a CIM são observados visualmente, sendo que as culturas que não apresentam crescimento são usadas para inocular placas com meio sólido, de

forma a determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), para bactérias, ou Concentração Fungicida Mínima (CFM), para leveduras e fungos (NCCL, 2003).

### 3.7 ANTIOXIDANTES

A aproximadamente 3,5 bilhões de anos surgiu a vida na Terra. A evolução começou em um ambiente aquático completamente diferente do atual em termos de composição, osmolaridade e temperatura. Os organismos desde então estão sofrendo alterações morfológicas e biológicas devido a fortes modificações ambientais como, por exemplo, aumento da salinidade, pressão atmosférica, composição atmosférica, e grandes variações de osmolaridade e salinidade. Com o desenvolvimento da vida no planeta, alguns seres desenvolveram a capacidade de produzir energia através da fotossíntese sendo necessário um aumento no uso e acúmulo de oxigênio, que permitiu o surgimento de mecanismos novos e eficientes de produção de energia, possibilitando a geração de calor e luz. Porém, com o uso freqüente de oxigênio pelas células vivas, os seus produtos do metabolismo, conhecidos como radicais livres, podem atacar macromoléculas importantes para a manutenção da célula (HENRIQUES et al. In: SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Os radicais livres são compostos cuja estrutura química possui um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, altamente instáveis e reativos. Possuem uma enorme capacidade de combinar-se com qualquer composto, a fim de captar um elétron desse composto para adquirir estabilização de sua estrutura molecular. Os principais radicais livres são os originados por reações do oxigênio molecular através de reações de oxidação ou redução, que podem ocorrer no ciclo da fosforilação oxidativa ou em outras reações, isto é, através de doação ou recebimento de elétron na camada de valência, sendo denominadas de Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMO) ou somente Espécie Reativa do Oxigênio (ERO). Esta denominação não é apenas para indicar a produção de radicais livres, mas também para qualquer substância capaz de reagir quimicamente e gerá-los como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Os ERO's e outros radicais livres podem ser produzidos pela mitocôndria (metabolismo oxidativo normal), pelos peroxissomos, durante o processo de fagocitose celular, e citocromo P-450, considerados fontes endógenas; e as principais fontes exógenas são: a radiação, o cigarro, solventes orgânicos, drogas de abuso

como cocaína, heroína, ácido lisérgico (LSD), entre outros (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HENRIQUES et al. In: SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001)

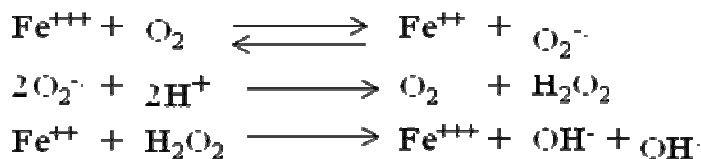
O metabolismo biológico das células animais, para obtenção de energia, é dependente de reações com o oxigênio. Os processos oxidativos biológicos são: a fosforilação oxidativa, reação que ocorre na mitocôndria e gera energia nos organismos dos mamíferos. A molécula de oxigênio que entra na reação recebe quatro elétrons, reduzindo-se até formar água, porém parte do oxigênio consumido não é reduzido completamente (2-5%) produzindo ERO como produtos intermediários reativos, como os radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HENRIQUES et al. In: SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001; SALVADOR. e HENRIQUES, 2004).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO. Porém, a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade, alterando a seletividade através dos canais iônicos e liberação do conteúdo de organelas como, por exemplo, a liberação de enzimas hidrolíticas lisossomais provocando, assim, a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é considerado pouco reativo em soluções fisiológicas, sendo formado após a primeira redução do  $O_2$ , ocorrendo em quase todas as células aeróbicas e amplamente produzidos durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos durante o processo inflamatório. Na produção deste radical observa-se lesão biológica secundária, seja enzimática, fagocítica ou química. O radical hidroperoxila é a forma protonada do radical superóxido. De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), há evidências de que este radical é mais reativo do que o superóxido, devido a sua maior facilidade em destruir membranas biológicas. Já o radical hidroxila é extremamente reativo em sistemas biológicos, principalmente na presença de metais como o ferro ou enxofre. Se a hidroxila for produzida próxima ao ácido desoxinucleico (DNA) poderá provocar alteração nas bases purínicas e pirimidínicas levando à inativação ou mutação no DNA, além de causar a inativação de proteínas de membrana ou enzimas ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) e as pontes dissulfeto (-SS); podendo oxidar, também, ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Estudos sobre os mecanismos de propagação na produção de radicais livres e, conseqüentemente, a promoção da lesão oxidativa tem demonstrado a influência de metais capazes de catalisar a produção dos ERO's. As reações de Fenton e Haber-Weiss confirmam o papel dos metais na formação de ERO fisiologicamente, como, por exemplo, a ação do cobre e do ferro, metal mais abundante no corpo humano e altamente ativo na catálise de reações de

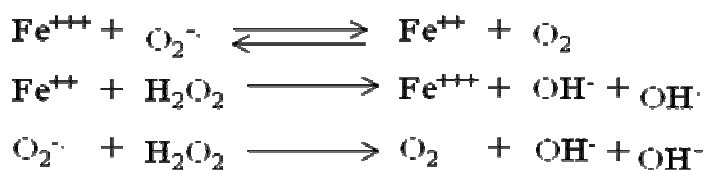
oxidação de biomoléculas, na promoção da produção de ERO (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Segundo Halliwell (1992), em casos de traumatismo craniano, o aumento da quantidade de ferro disponível é devido a falhas no processo de inativação na propagação de radicais livres pela ineficiência de enzimas antioxidantes. O aumento da excreção intracelular e baixa ligação proteína-ferro ampliam os riscos de lesão celular via mecanismo de Fenton (Esquema 01).



**Esquema 01** – Reação de Fenton

**Fonte:** FERREIRA e MATSUBARA, 1997

Estudos realizados em corações de ratos com síndrome da reperfusão pós-isquêmica, submetidos a sobrecargas de ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ), indicam que pode aumentar a produção de ERO's via reação de Haber-Weiss (Esquema 02), uma vez que após a reperfusão há uma redução da contratilidade do miocárdio sem lesão tecidual, sendo então sugerido que o excesso de  $\text{Fe}^{+3}$ , catalisa a reação de Haber-Weiss, promovendo a produção de ERO como, por exemplo, radical hidroxila que aumenta a lipoperoxidação de membranas reduzindo assim a contratilidade (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HENRIQUES et al. In: SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).



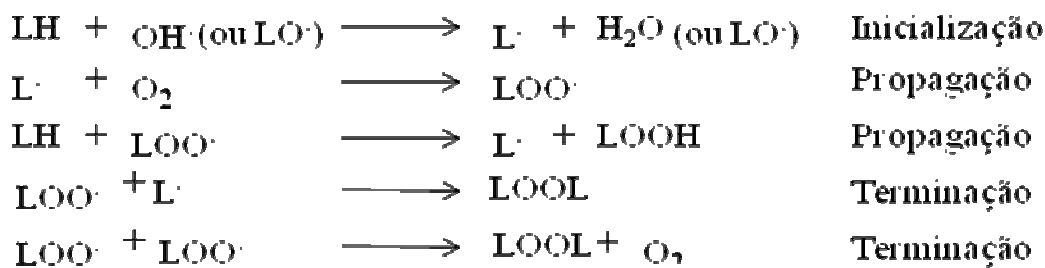
**Esquema 02** – Reação de Haber-Weiss.

**Fonte:** FERREIRA e MATSUBARA, 1997

A membrana celular é um dos componentes celulares mais agredidos pela ação das ERO's devido, principalmente, à peroxidação lipídica que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade e, conseqüentemente, a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo intracelular. A lipoperoxidação está associada ao mecanismo de envelhecimento e câncer, mas alguns produtos da lipoperoxidação estão envolvidos diretamente na cascata da produção de prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico, e, portanto, na resposta



inflamatória. Este processo é uma reação em cadeia, assim como a formação de qualquer ERO, representada pelas etapas de inicialização, propagação e terminação (Esquema 03)



\*L – Lipídio

**Esquema 03 - Reação de Lipoperoxidação**

Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997

Os radicais livres podem ser neutralizados pela ação de compostos antioxidantes. Sies e Stahl (1995) *apud* Bianchi e Antunes (1999), definem antioxidantes como sendo “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparado a do substrato oxidável atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Quando não há este equilíbrio fala-se em estresse oxidativo. Nos organismos vivos há um sistema de *feed back* negativo formado por antioxidantes enzimáticos, gerados no interior das células como, por exemplo, superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BIANCHI e ANTUNES, 1999; KIM, JEONG e LEE, 2003; MENDEL e YODIM, 2004) e dos sistemas não enzimáticos como, por exemplo, a atuação de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, proteínas do plasma, selênio, glutathione clorofilina L-cisteína, curcumina e licopeno (OLIVEIRA, VALENTIM, GOULART, 2009; BIANCHI e ANTUNES, 1999; POLYAKOV et al., 2001; AMAROWICZ et al., 2004). A ação destes antioxidantes ocorre por reação de oxiredução onde estes entram como reagentes ou por interação com metais de transição, principalmente, ferro e cobre.

Nos organismos vivos, a função dos antioxidantes é impedir que radicais livres danifiquem células e tecidos (FOGLIANO et al., 1999; POLOVKA et al., 2003). Na indústria alimentícia o uso de antioxidantes não é recente e, de acordo com algumas pesquisas, estes antioxidantes sintéticos utilizados apresentam efeitos deletérios à saúde humana, sendo

necessária a pesquisa com a finalidade de substituir antioxidantes artificiais por naturais (VALENTÃO et al., 2002; AMAROWICZ et al., 2004).

### 3.7.1 Antioxidantes Enzimáticos

O estresse oxidativo pode ser entendido como um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do organismo contra estes compostos reativos, levando a um progressivo dano oxidativo celular, mas seus danos biológicos são reduzidos pela ação do sistema de defesa enzimático do interior das células impedindo tanto a inicialização quanto na propagação dos radicais livres (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004). Entretanto, é importante destacar que, de acordo com Salvador e Henriques (2004), este sistema não está completamente elucidado sendo de grande interesse para futuras pesquisas.

O estresse oxidativo é considerado um dos principais mecanismos de processo fisiopatológico durante os processos isquêmicos, na degeneração do tecido neural e na proliferação de células tumorais (OLIVEIRA e ALVES, 2002). Na isquemia inúmeros eventos aumentam a formação de ERO's nos tecidos cerebrais, como a rápida redução na produção de adenosina trifosfato (ATP), a perda da homeostasia de  $Ca^{2+}$  intracelular, produtos tóxicos do metabolismo normal da célula como a produção e liberação de ácido araquidônico no interior da célula, acidose e/ou alcalose metabólica, entre outros (CAMPOS E YOSHIDA, 2004). Após a isquemia cerebral, observa-se a reperfusão do líquido acumulado nos vasos para o interior dos tecidos causando, assim, uma disfunção celular promovendo a formação de espécies instáveis de compostos que no tecido cerebral pode causar injúria por reações com as macromoléculas como proteínas e lipídeos; interferir na sinalização celular e/ou na regulação da expressão gênica (SEABRA, 2008). O desenvolvimento de fármacos capazes de interferir na produção exagerada de compostos radicalares, como no estresse oxidativo, é de extrema importância, pois ao reduzir o dano oxidativo observa-se proteção as macromoléculas das células.

A maioria das macromoléculas celulares é susceptível à ação de ERO's e a membrana plasmática é um dos mais afetados na ação dos agentes oxidantes. Quando os lipídeos sofrem a ação desses radicais o fenômeno é conhecido como lipoperoxidação, podendo provocar alterações na estrutura das membranas celulares. Ocorre perda de seletividade na

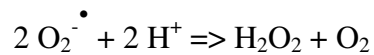
permeabilidade e na troca iônica, assim como na liberação de enzimas por algumas organelas e/ou a formação de produtos citotóxicos, levando a perda da integridade celular (MELLO et al, 1984; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A lipoperoxidação está associada aos mecanismos de envelhecimento e do câncer. O ferro e o radical hidroxila (OH) são as espécies radicalares marcadores da lipoperoxidação. O malondialdeído (MDA) é o principal produto da lipoperoxidação, obtido ao final da degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados, podendo, em altas concentrações, elevar a formação de lipoperóxidos (COLPO, 2007; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; KASHYAP et al., 2005). Na literatura específica há diversos trabalhos sobre o aumento nos níveis de peroxidação lipídica em pacientes com câncer, como a análise realizada por Oltra et al. (2001) que observaram o aumento de MDA em pacientes com leucemia linfocítica crônica devido a altas taxas de peroxidação lipídica.

Os radicais livres também reagem com as proteínas, sendo estas consideradas alvos imediatos para a modificação oxidativa. O ataque dos radicais às proteínas altera de forma irreversível a estrutura tridimensional das proteínas podendo oxidar os grupos de cadeias laterais de aminoácidos, causando fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e formação de novos grupos reativos (BATTISTI, 2008). O dano causado à estrutura da proteína causa alteração na atividade biológica como, por exemplo, no caso de enzimas, resultando em modificações ou inatividade em sua atividade catalítica ou nas proteínas com a função de canais iônicos poderia causar danos ao transporte ativo através da membrana celular (DEAN et al., 1997).

O equilíbrio entre a geração e a neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa intra e extracelular é responsável pela manutenção dos componentes celulares vitais (ZIMMERMANN et al., 2004). A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de três principais enzimas intracelulares antioxidantes como o superóxido dismutase, encontrado no citosol e na mitocôndria; glutatona peroxidase e catalase, presentes no citosol e peroxissomos, respectivamente (NORDBERG e ARNER, 2001; BAGATINI, 2008).

A superóxido dismutase é uma enzima abundante nas células aeróbias apresentando diversas isoformas, diferindo pelo tipo de metal presente no sítio ativo e na constituição dos aminoácidos; sendo considerada uma das defesas antioxidantes mais efetivas. Esta catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) através de sucessivas oxidações e reduções do metal de transição no sítio ativo (Esquema 04). Esta enzima é capaz de aumentar em 10.000 vezes a velocidade de reação de dismutação do radical superóxido a  $H_2O_2$  em pH fisiológico. Durante o processo hemolítico provocado por uma

agressão térmica, os glóbulos vermelhos humanos exibem queda da atividade da superóxido dismutase, esta que protege também o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de  $\text{Fe}^{3+}$  (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MATES, GOMES, CASTRO 1999).



**Esquema 04** – Reação de oxidação catalizada pela superóxido dismutase.

**Fonte:** FERREIRA e MATSUBARA, 1997

A enzima glutatona-peroxidase é uma enzima capaz de inativar peróxido de hidrogênio a custa da conversão da glutatona reduzida à glutatona oxidada. O consumo de glutatona reduzida nos organismos é alto, no entanto, a enzima glutatona redutase, que funciona dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato reduzida, faz com que a forma oxidada de glutatona retorne a forma reduzida. Embora esta enzima tenha ação fundamentalmente no citosol esta pode, ainda, reduzir hidroperóxidos de membrana (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004)

A catalase é uma enzima tetramérica, hemoproteína citoplasmática, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, com massa molecular de 240 KDa, possui função de catalisar a redução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ), encontrada em células animais, de plantas e bactérias aeróbias, no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado dos animais. Esta enzima é dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato reduzida para manter sua atividade. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  possui um longo tempo de meia vida, sendo capaz de atravessar as membranas plasmáticas, reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A catalase pode converter 6 milhões de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  em um minuto (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MATES, GOMES, CASTRO 1999).

### 3.7.2 Antioxidantes Não Enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), glutatona,  $\beta$ -caroteno e vitamina A, e podem ser de origem endógena ou exógena, apresentando uma grande capacidade de defesa, atuando de maneira direta ou

indireta a fim de manter o equilíbrio celular. As ações destes compostos são principalmente a de neutralizar radicais livres, quelar metais e bloquear a ação de espécies reativas como, por exemplo, o oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MATÈS et al., 1999).

A principal fonte exógena de antioxidantes é a dieta alimentar. Vegetais e frutos são ricos em vitaminas, compostos fenólicos e diversas substâncias que auxiliam a manter a saúde celular inibindo a instalação de patogenias ligadas ao estresse oxidativo. A vitamina A não é obtida diretamente pela dieta, mas sim pela clivagem de carotenóides e retinóides, que são obtidos de diversos produtos animais e vegetais. Os carotenóides são compostos que formam grupos de pigmentos coloridos, normalmente amarelados ou róseos, encontrados em plantas e tecidos de alguns animais marinhos. Dos mais de 600 tipos de carotenóides, aproximadamente, 50 são precursores da vitamina A, mas podemos destacar  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e licopeno. Embora os carotenóides, precursores da vitamina A, são tidos como antioxidantes, alguns estudos indicam que também podem se apresentar como pro-oxidantes aumentando a quantidade de radicais livres no sistema (POLYAKOV et al., 2001).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é encontrada em quantidades significativas em diversos frutos e vegetais, sendo sintetizada a partir da glicose. Devido ao seu baixo peso molecular e grande hidrosolubilidade é capaz de neutralizar rapidamente ERO por transferência de elétrons, inibindo a lipoperoxidação com a doação de um elétron, agente redutor. Os humanos não são capazes de sintetizá-la, obtendo-a a partir da dieta. A vitamina C atua como doador de elétrons ao radical da vitamina E,  $\alpha$ -tocoferil, promovendo a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol; porém, pode funcionar como um pró-oxidante quando este estiver em grande quantidade ou quando exposta a metal, levando a lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

A vitamina E designa todos os tocoferóis que são provavelmente os inibidores mais importantes na reação em cadeia da peroxidação lipídica em animais, sendo extremamente eficiente em ambiente de alto teor de  $O_2$  e possui atividade limitada em situações de sobrecarga de  $Fe^{3+}$ . A alta atividade dos tocoferóis contra a oxidação de lipídeos se explica por ser lipossolúvel atuando e protegendo as membranas celulares. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SALVADOR e HENRIQUES, 2004)

Os compostos fenólicos são formados por um ou mais anéis aromáticos carregando grupos hidroxilas, sendo capazes de quelar metais, reduzindo as reações de Fenton e Weiss inibindo a propagação e proliferação de radicais peroxila, e eliminar radicais livres. A presença dos elétrons  $\pi$ , que estabilizam o radical formado pela oxidação do fenol ao perder

um átomo de hidrogênio, ajuda a explicar a grande atividade antioxidante destes compostos. A ação antioxidante dos compostos fenólicos pode ocorrer pelo mecanismo de transferência de hidrogênio, pela transferência de próton combinado com transferência eletrônica ou pela estabilização adquirida pela formação de ligação intramolecular de hidrogênio (KVIECINSKI, 2007).

### 3.8 FAMILIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae é a terceira maior família das Angiospermas em número de espécies superada somente pelas famílias Compositae e Orchidaceae. A família Leguminosae possui três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, em alguns sistemas de classificação são tratadas como famílias distintas: Fabaceae, Caesalpinioideae e Mimosaceae, respectivamente; composta por, aproximadamente, 900 gêneros e mais de 19.000 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais (RAVEN, 1981 *apud* VARELA et al., 2004; QUEIROZ, 2006). A subfamília Faboideae apresenta aproximadamente 482 gêneros e 12.000 espécies (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; BARROSO et al., 2002). De acordo com Queiroz (2006) há no Brasil 293 espécies distribuídas em 77 gêneros, sendo que 144 espécies são endêmicas da região do Semi-árido destacando-se a região da Chapada Diamantina, estado da Bahia, nordeste do Brasil, com 40% da população desta família no território brasileiro.

Espécies de leguminosas são extensivamente utilizados no campo com fim de melhoramento de pastagens devido a sua característica de fixação de nitrogênio atmosférico aumentando, conseqüentemente, a qualidade protéica da biomassa das forrageiras. Um dos fatores que mais limita a produção de carne nos trópicos é a baixa qualidade e disponibilidade das forragens em períodos de seca, principalmente, se esta estiagem durar períodos acima de 2 meses, dependendo da localidade. Uma das principais alternativas para solucionar este problema é a inserção de leguminosas como fonte de proteínas para alimentação dos animais, infelizmente a maioria das gramíneas utilizadas para alimentação não possuem fácil adaptabilidade a solos de pH baixo, com pequena quantidade de minerais ou baixo teor de nitrogênio. A presença de 20% a 40 % de leguminosas nas pastagens tropicais tem sido associada a aumentos na produção de carne e leite (LASCANO, 1995; LASCANO In: PIZARRO, 1996). O uso de leguminosas arbustivas tem sido a alternativa de pecuaristas para

alimentação de seus rebanhos na maior parte da América do Sul como Brasil, Peru, Argentina, Chile, entre outros, principalmente em períodos de estiagem, geadas ou infertilidade do solo. Algumas leguminosas têm sido estudadas como fonte de alimentação de rebanhos, como a *Leucaena leucocephala*, *Gliricídia sepium*, e algumas espécies de *Cratylia*, como a *Cratylia argentea* que possui a capacidade de melhor se adaptar a solos ácidos, de baixa fertilidade e em regiões de seca prolongada resistindo a período de até seis meses, é uma alternativa para a região do semi-árido (LASCANO, 1995; ARGEL, 2000).

A literatura específica relata a presença de compostos químicos derivados dos grupos dos ácidos graxos, açúcares, acetofenona, antracetona, antraquinona, alquilaminas, aminoácidos, cumarinas (PEITZ, 2003), estilbenóides, cassanos, óleos, compostos fenólicos (ALVES ET AL., 2008; CÂNDIDO, 2007), flavonóides (ALVES ET AL., 2008; CÂNDIDO, 2007; PEITZ, 2003), terpenos (CÂNDIDO, 2007), triterpenos (CÂNDIDO, 2007), saponinas triterpênicas, alcalóides (CÂNDIDO, 2007; CÂNDIDO, 2007), esteróides, biflavonóides (ALVES ET AL., 2008), antraquinona, naftopirona, polissacarídeos, lactonas, quinolona, fenilpropanóides, xantona, turgoninas e taninos, entre outros (OLIVEIRA, 2002).

Estudos etnofarmacológicos de espécies da família Leguminosae demonstram atividade biológica analgésica, antialérgica, antiinflamatória, antimalárica, cicatrizante, anti-diarréica, preventivo de câncer, hemo-aglutinante, antinociceptivo, anti-hipertensivo, citotóxica, alucinogênica, imunomoduladora, anti-oxidante, antimicrobiana (PEITZ, 2003), anti-helmíntica, analgésica, hipoglicemiante, diurética, laxativa, expectorante, hepatoprotetor e inibidora da acetilcolinesterase (MUKHERJEE et al., 2007).

### 3.9 GÊNERO *CRATYLIA*

O gênero *Cratylia* foi inserido por Bentham (1837) *apud* Queiroz (1991) na tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae (Quadro 02), sendo este gênero distinguido dos demais gêneros dessa subtribo “pelo vexilo não apendiculado, semente com hilo curto e oblongo e sutura do legume não aladas nem espessadas”. Porém este gênero apresenta dificuldade em sua identificação devido a semelhanças com o gênero *Camptosema* e *Dioclea*, levando em consideração poucas características, sem considerar a similaridade entre as espécies. Além disso, cada taxonomista desenvolve seus estudos em floras regionais, dando pouca importância a distribuição geográfica e as preferências ecológicas das plantas estudadas.

Havendo, assim, identificações errôneas de algumas espécies devido à confusão causada pela dificuldade no enquadramento das espécies no grupo. Segundo Queiroz (1991), após os trabalhos de identificação realizados por Bentham, no início do século XX, poucas alterações foram realizadas à circunscrição do gênero ou a discussão de suas afinidades como, por exemplo, a descrição de novos táxons ou rediscussão da validade de táxons publicados.

**Dominio** - *Eucaryota*

**Reino** – *Plantae*

**Subreino** – *Viridaeplantae*

**Divisão** ou filo – *Magnoliophyta*

**Subdivisão** ou Subfilo – *Euphylllophytina*

**Infrafilo** – *Radiatopses*

**Classe** – *Magnoliopsida*

**Subclasse** – *Rosidae*

**Superordem** – *Fabanae*

**Ordem** – *Fabales*

**Família** – *Fabaceae* ou *Leguminosae*

**Subfamília** – *Faboideae*

**Tribo** – *Phaseoleae* ou *Papilionoideae*)

**Subtribo** – *Diocleae* ou *Diocleinae*

**Gênero** – *Cratylia*

**Espécie** – *Cratylia hypargyrea* Mart. ex Benth.

**Quadro 02** – Bio sistemática da espécie *C. hypargyrea*

O gênero *Cratylia* aparenta ser um grupo recente em termos evolutivos devido a evidências em sua morfologia, biogeografia e hibridação natural. As espécies de *Cratylia* morfologicamente apresentam semelhança em um grande número de características com espécies de outros gêneros, apresentando assim pequena variação morfológica, o que pode representar uma adaptação a diferentes habitats. A distribuição do gênero ocorre em todo o continente sul-americano, com exceção da margem esquerda da Bacia Amazônica ou a oeste da cordilheira dos Andes, as quais não apresentam indivíduos desse gênero, isto leva a crer que regiões de grandes cursos d'água e de altitude elevada, a partir de 950 m do nível do mar, formam uma barreira efetiva à distribuição destas espécies. Acredita-se que a existência de



algumas espécies nessas regiões é devida a sua inserção antes do período do surgimento da cordilheira dos Andes (SARMIENTO, 1975; GENTRY, 1982 *apud* QUEIROZ, 1991; QUEIROZ e CORADIN In: PIZARRO, 1996)

O centro de diversidade de *Cratylia* localiza-se no leste avançando para o oeste-noroeste do Brasil, com distribuição extra-amazônica, preferencialmente em áreas de campo rupestre, chaco e cerrado, penetrando na região Amazônica até a base das montanhas dos Andes. As espécies de *Cratylia*, durante o Pleistoceno, foram expostas a períodos de alternância de estiagem prolongada e alta umidade do ambiente justificando a capacidade destas na obtenção de grande massa vegetal tanto em períodos de seca quanto em períodos de estação chuvosa (QUEIROZ, 1991). Segundo Hutchinson (1964) e Lanckey (1981) *apud* Queiroz (1991) um número máximo de 05 espécies pertencentes ao gênero *Cratylia* Mart. Ex. Benth foi reconhecido: (1) *C. hypargyrea* Martius ex. Bentham, (2) *C. bahiensis* L. P. de Queiroz sp. nov., (3) *C. argentea* (Desvaux) O. Kuntze, (4) *C. mollis* Martius ex Bentham e (5) *C. intermédia* (Hassier) L. P. de Queiroz comb. et stat. Para a Bahia Nov. Lewis (1987) *apud* Queiroz (1991) reconheceu quatro espécies de *Cratylia*: (1) *C. bahiensis* L. P. de Queiroz sp. nov., (2) *C. argentea* (Desvaux) O. Kuntze, (3) *C. mollis* Martius ex Bentham e (4) *C. intermedia* (Hassier) L. P. de Queiroz comb. et stat. Nov. (QUEIROZ e CORADIN In: PIZARRO, 1996).

O gênero *Cratylia* é endêmico de regiões neotropicais e essencialmente extra-amazônico, ocorre do Peru até a bacia do rio Paraná (nordeste da Argentina e oeste do estado do Paraná, Brasil), sendo que as espécies seguem um padrão restrito de distribuição geográfica. Como, por exemplo, a *Cratylia mollis*, que ocorre exclusivamente em áreas de caatinga do nordeste do Brasil, do centro-norte do estado da Bahia até a região limítrofe dos estados do Piauí; restingas e borda de Mata Atlântica; a *Cratylia hypargyrea* em florestas estacionais do sudoeste do estado da Bahia; a *Cratylia intermedia* do oeste do estado do Paraná a nordeste da província de Missionen e a *Cratylia argentea*, que ocorre em maior variedade de habitats, como cerrado, mata ciliar, contato caatinga-cerrado e florestas estacionais (QUEIROZ, 1991; QUEIROZ e CORADIN In: PIZARRO, 1996). Espécies deste gênero crescem bem em altitudes acima de 930 m, mas preferem altitudes entre 300 e 800 m e com índice pluviométrico variando em 900 mm anual. Sobre estudos químicos como os apresentados por Lascano (1996) e Sanchés (2006), em contraste com outras leguminosas tropicais, as espécies de *Cratylia* contêm somente traços de taninos que possuem como estrutura básica, compostos fenólicos, os quais possuem atividades biológicas como antioxidante, inseticida, antifúngica, antimicrobiana, entre outras.

Algumas espécies do gênero *Cratylia* como, por exemplo, as espécies *Cratylia mollis* e *Cratylia argentea* foram extensamente estudadas pelo Centro de Pesquisas Agropecuárias do Trópico Semi-Árido (CPATSA – EMBRAPA) como forrageira para regiões de clima semi-árido devido a sua característica de resistência a períodos longos de seca (BRASIL, 1937 *apud* QUEIROZ, 1991; VARGAS et al., 2004; TEIXEIRA, 2006). De acordo com estudos realizados por Xavier et al. (1998) na região de Minas Gerais, o arbusto de *Cratylia argentea* tem mostrado boa produção de forragem, além de uma boa adaptação ao baixo pH do solo (WILSON e LASCANO, 1997). Um estudo comparativo foi realizado por Xavier e Carvalho (1996) entre a *Cratylia argentea*, como espécie de potencial forrageiro em condições de áreas montanhosas da Zona da Mata de Minas Gerais, e as espécies *Cajanus cajan* e *Leucaena leucocephala*, utilizando as mesmas quantidades e fontes de calcário e adubos. Foi observado pelos autores que as diferenças foram expressivas quando houve os acréscimos de calcário, o qual enriqueceu o solo com minerais favorecendo o aumento da massa seca vegetal da espécie *Cratylia argentea* em relação as demais espécies do estudo. Porém, segundo as análises de Pizarro et al. (1996), que avaliaram o desempenho do crescimento de massa seca da *Cratylia argentea* durante um ano contra outras espécies de leguminosas forrageiras usuais, um aumento de 0,5-2,2 t/ha sobre as demais espécies foi observado, com períodos alternados de seca e elevada umidade do ambiente. Nos períodos de seca a *Cratylia argentea* apresentou massa seca e qualidade nutricional cerca de 33 % superior às demais espécies ao final de cinco anos. O potencial forrageiro da *Cratylia argentea* tem sido estudado também em associações com outras espécies como foi demonstrado no trabalho de Hess et al. (2006), que avaliaram a associação de *Calliandra calothyrsus* com *Cratylia argentea*, obtendo assim uma maior massa vegetal e teor protéico da *Calliandra calothyrsus*.

Poucos relatos de estudos biológicos e químicos de espécies do gênero podem ser encontrados na literatura, sendo que a maioria deles se refere ao estudo das lectinas. Lectinas são proteínas de alta afinidade a macromoléculas biológicas como os carboidratos sendo de síntese de algumas plantas na natureza. Esta classe de proteínas possui a capacidade de aglutinar células, precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados e reconhece carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação, sendo de interesse clínico para explorar superfícies celulares, como avaliação de tipagem sanguínea, sinalização celular ou ativação celular e detector de alterações celulares (CHARLAND et al., 1995); além da habilidade das lectinas induzirem ao aumento da liberação de histamina por mastócitos em testes com a administração peritoneal de lectinas em ratos (DAM et al., 1998). Esta forte

ligação com macromoléculas das membranas celulares animais dão a este composto a característica da maior especificidade sendo principalmente utilizados para identificação e tratamento de câncer, particularmente para aqueles de glândulas mamárias, útero e cérebro como foi demonstrado no estudo *in vivo* de Beltrão et al. (1998), com seu estudo sobre lectinas de *Cratylia mollis* sobre ratas com câncer nas glândulas mamárias.

Andrade (2004) também avaliou a atividade hemoaglutinante, com influência de agitação mecânica e ultra-som, e antitumoral de lectinas extraídas da *Cratylia mollis* contra o sarcoma 180 induzido em ratos *Swiss* (7 mg/Kg/dia durante 7 dias), *in vivo*, e encapsulados em lipossomas, uma forma farmacêutica de liberação controlada, assim como realizou a avaliação histológica do fígado, rins e baço nestes animais. O estudo da atividade hemoaglutinante foi afetada quando se expôs ao ultra-som, mas a atividade manteve-se quando a lectina da *Cratylia mollis* foi encapsulada na forma lipossômica, assim como a atividade antitumoral foi potencializada. A encapsulação da lectina de *Cratylia mollis* produziu uma redução da sua citotoxicidade contra fígado, rins e baço, assim como uma citoproteção aos tecidos contra a atividade do infiltrado linfocitário e reduziu as áreas de necrose nos tumores tratados.

Várias espécies de leguminosas contêm peptídeos inibidores de *Bowman-Birk* (IBB) com habilidade de inibição de enzimas biológicas possuindo, assim, um grande potencial biotecnológico com diferentes atividades biológicas como, por exemplo, inseticida, antitumoral e de interesse da indústria farmacêutica e alimentícia devido ao aumento da estabilidade de produtos frente a enzimas proteolíticas e hidrolíticas. A detecção de IBB em leguminosas é importante para avaliar a capacidade de manutenção do valor nutritivo das sementes de leguminosas (JOSÉ, 2002). Paiva et al. (2006) avaliou a capacidade inibitória de IBB do extrato bruto, da fração acetato e dos compostos isolados por cromatografia de sementes de *Cratylia mollis*. O resultado de sua pesquisa revelou que os compostos purificados por ensaios cromatográficos apresentaram alta especificidade a inibição de tripsina e quimiotripsina em comparação com a mesma atividade apresentada pelo extrato bruto.

A ação biológica frente a endoparasitas de *Cratylia floribunda* (sin. *Cratylia argentea*) foi também avaliada por Menezes et al. (1992) e a farinha das sementes desta espécie na dose de 50 mg foi eficaz para inibir a eclosão de 15,5% dos ovos de *Haemonchus contortus*, atingindo valores de 99,9 % na dose de 500 mg.

Algumas micromoléculas foram também isoladas a partir de *Cratylia mollis*. Lima et al. (2005) realizaram testes para verificar atividade anti-oxidante de extratos polares e utilizou

procedimentos cromatográficos para isolar os constituintes químicos de extratos em clorofórmio e metanol das folhas e caules. Observou-se uma pequena atividade antioxidante das amostras no extrato em acetato de etila, e foram isolados dos extratos das folhas, o bis-norsesquiterpeno, 3,6-dihidroxi-5,6-dihidro-b-ionol; o esteróide, 5a 8a-epidioxi ergosta-6,22-dien-3-b-ol e a flavana, 4,3',4'-triidroxi-2'-metoxi-6,7-metilenodioxiflavana, e dos extratos do caule a flavana, 2'-hidroxi-6,7-metilenodioxiflavana.

A presença de taninos também foi detectada por Santoro et al. (2004) em *Cratylia argentea*, sendo este fator responsável pela menor palatabilidade das rações contendo esta espécie. A intoxicação de animais por alimentos principalmente pastoris também são freqüentes devido à grande ingestão desta planta ou derivados, como néctar, pelos animais. Estudos relatam a alta toxicidade dos taninos principalmente contra as abelhas e efeito nefrotóxico em bovinos podendo levar a morte dependendo da concentração.

### 3.10 *CRATYLIA HYPARGYREA*

A planta *Cratylia hypargyrea* (Figura 02) apresenta-se, segundo Queiroz (1991) como:

Arbustos eretos variando a lianas com caule lenhoso, muitas vezes volúvel. Estípulas lanceoladas, acuminadas, raramente bifidas, base espessada não prolongada abaixo da inserção. Folhas pinado trifoliadas, estipeladas, as estipelas setáceas, rígidas, pecíolo munido de pulvino na base; folíolos membranáceos a cartáceos, ovais, elípticos, oblongos ou orbiculares, com ápice caudado ou obtuso e 5 – 7 pares de nervuras secundárias, a superfície superior glabra, raro velutina, a inferior serícea ou vilosa, raro glabrescente; folíolos laterais assimétricos, raro simétricos. Inflorescência axilar, raro terminal, ereta ou patente, em pseudoracemo nodoso, as nodosidades capitadas ou clavadas; brácteas de primeira ordem lanceoladas, persistentes ou caducas, de segunda ordem membranáceas, caducas; bractéolas mambeanáceas, persistentes ou caducas. Flores de 1,5 – 3,0 cm de comprimento com cálice campanulado ou cilíndrico, 4 – lobado, os lobos mais curtos que o tubo, raramente iguais, lobo superior inteiro e o inferior do mesmo comprimento que os demais. Pétalas unguiculadas, o estandarte oval, elíptico ou orbicular, com superfície externa serícea em toda a extensão ou apenas próxima ao ápice, não auriculado, a área alvo discolor, não calosa, glabra ou pubescente; alas elíptico-oblongas, ligeiramente aderidas às pétalas da carena, a superfície externa com esculturação lunado-lamelada; carena com margem superior aberta, pétalas oblongo-elípticas, plicadas longitudinalmente próximo à base. Androceu pseudo

monadelfo, os 10 estames soldados, formando um tubo, mas com o vexilar livre na base; anteras uniformes. Gineceu estipitado, o estipe ca. metade do comprimento do ovário; ovário adpresso lanoso, com 7 – 18 óvulos; estilete glabro; estigma capitado a truncado; disco nectarífero cônico com ápice inteiro e margem lisa, não lobado. Legume estreito oblongo, comprimido, com ápice rostrado e margens retas ou ligeiramente sinuosas; suturas superior e inferior pouco distintas, a superior ligeiramente costada; deiscência elástica; valvas lenhosas, constrictas entre as sementes, pubescentes. Sementes 4 – 8, comprimidas, lenticulares, elípticas a orbiculares, com testa macia, enrugada quando seca, castanho escura a atropurpúrea, 8 – 12 mm de comprimento, 6 – 8 mm de largura, 2 – 3 mm de espessura; hilo curto, oblongo, ca. 3 mm, com porção do arilo da borda seco e persistente.

De acordo com a biogeografia relatada por Queiroz (1991), a *Cratylia hypargyrea* “[...] ocorre preferencialmente em áreas de restinga, do sul do estado da Bahia até o estado do Rio de Janeiro. No sul da Bahia e norte do Espírito Santo algumas populações podem penetrar para o interior, ocorrendo em áreas abertas dentro do domínio da Mata Atlântica, seja em clareiras ou na beira da mata, Sua penetração para o interior dá-se ao longo do curso de rios (por exemplo, Colônia, Contas, Doce e Pardo) e está, provavelmente, associada ao acelerado desmatamento de áreas de Mata Atlântica, criando novos habitats propícios à colonização por esta espécie.”



**Figura 02** – Imagens da *Cratylia hypargyrea* coletada no município de Itaberaba, próximo ao morro do Orobó.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Caule e folhas da espécie *Cratylia hypargyrea* (**Figura 02**) foram coletados no mês de julho, em 2007, na região do município de Itaberaba (**Figura 03**), próximo ao morro do Orobó, em altitude mínima de 425 m, região de floresta estacional semidecidual; uma exsicata foi depositada sob o nº 96018 no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). O material foi acondicionado em sacos de nylon, em formato de rede. Logo após a coleta, o material foi seco à temperatura ambiente no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON), localizado na UEFS, Feira de Santana, BA.



**Figura 03** - Mapa da Bahia indicando a cidade da coleta.

Fonte: <http://www.transportes.gov.br/bit/estados/port/ba.htm>. Acessado em 22-04-2009.

#### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO

As folhas e caule da *Cratylia hypargyrea* foram limpos, separados, secos e triturados em moinho de facas tipo Wiley. As massas de 768,8 g e 1.879,0 g das folhas e caule, respectivamente, foram extraídas pelo processo de maceração em metanol em recipientes de

vidro, com trocas sucessivas de solvente (em períodos de cinco dias) durante dois meses. Após filtração, o solvente foi removido usando evaporador rotatório sob pressão reduzida, em temperatura de 40-45 °C e o resíduo de solvente retirado por evaporação em capela de exaustão para obtenção do extrato metanólico bruto, que foi mantido em frascos de vidro à temperatura ambiente para as análises seguintes.

#### 4.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Os extratos metanólicos das folhas e caules (40 g) foram dissolvidos em mistura metanol:água (2:1, V/V) e submetidos a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) (Figura 04). Em seguida, as frações foram concentradas utilizando o evaporador rotatório sob pressão reduzida, em temperatura de 40-45 °C. Após remoção do resíduo de solvente por evaporação em capela de exaustão, o extrato metanólico bruto obtido, que foi mantido em frascos de vidro à temperatura ambiente para as análises seguintes.



**Figura 04:** Método de fracionamento por partição do extrato bruto do caule da *Cratylia hypargyrea*.

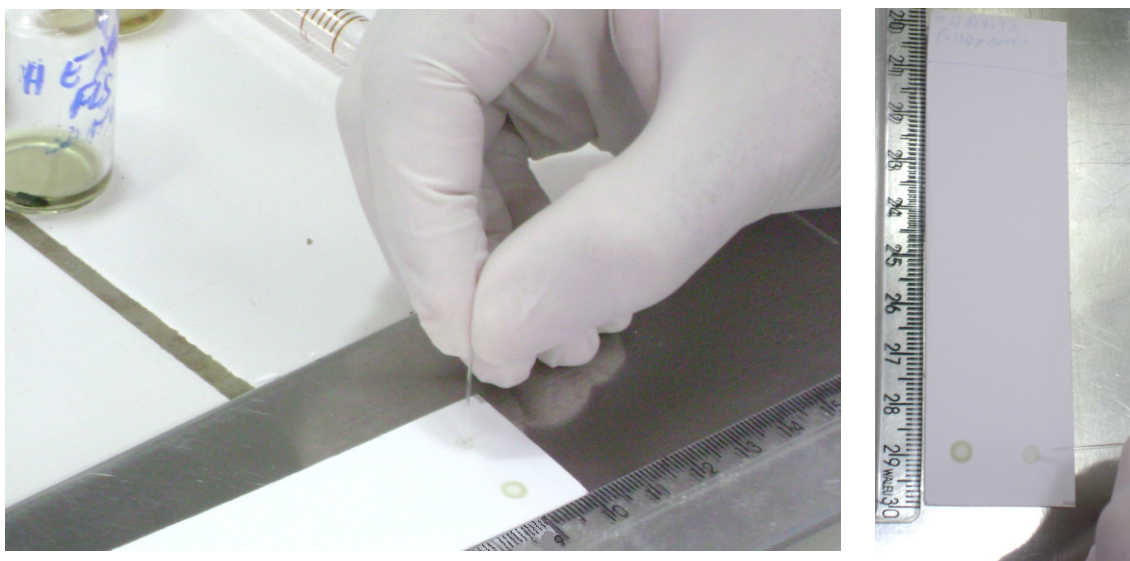


## 4.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

### 4.4.1 Cromatografia em camada delgada

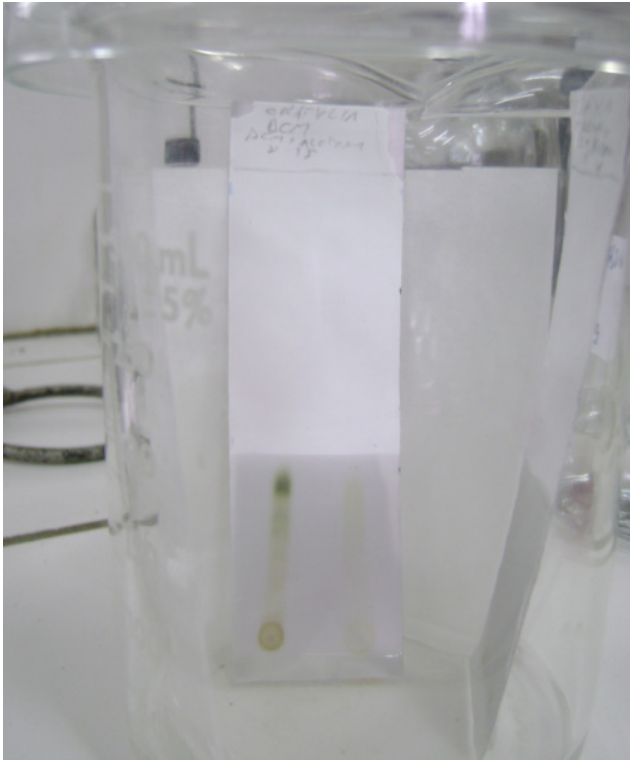
A metodologia de cromatografia em camada delgada (CCD) foi selecionada para detecção das principais classes de compostos presentes nos extratos e frações das folhas e caule da espécie *Cratylia hypargyrea*.

A presença das classes de compostos químicos foi detectada através de seus perfis cromatográficos em placas de camada delgada analítica, utilizando placas (3 X 10 cm) com base de alumínio revestidas com sílica gel 60 com 0,25 mm de espessura com indicador fluorescente (Modelo Alugram Sil G/UV<sub>254</sub>, produzidas pela Machere-Nagel), ativadas em estufa a 115 °C por 30 minutos. Para a aplicação da amostra na superfície das placas foi utilizada um tubo capilar (Figura 05).



**Figura 05:** Método da aplicação das amostras utilizando capilares das respectivas frações das folhas, a direita, e caule, a esquerda nas cromatoplasas.

As placas foram eluídas em cubas cromatográficas nos seguintes sistemas de solventes (relação V/V): (i) hexano-acetona (80:20) para eluir as amostras da fração em hexano, sendo esta eluída 3 (três) vezes para aumentar a resolução e visualização das bandas; (ii) diclorometano-acetona (80:20) para eluir a fração em diclorometano; e (iii) acetato de etila-metanol-água destilada (100: 13: 10) para eluir as frações em acetato de etila e butanol (Figura 06).

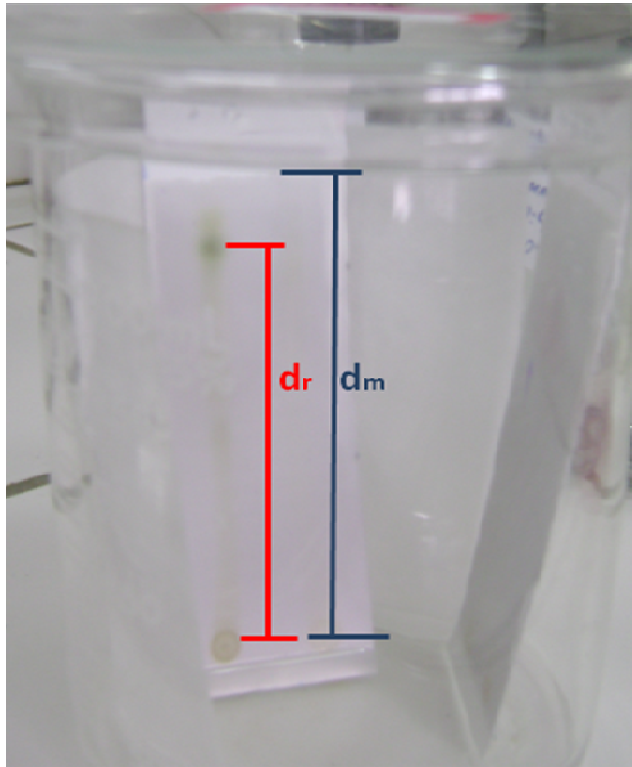


**Figura 06:** Cuba cromatográfica saturada tendo como eluente uma solução de diclorometano e acetona (8:2, v:v), amostra da fração diclorometano das folhas, à esquerda, e do caule, à direita.

Após eluição as placas foram secas e visualizou-se em luz UV-254 nm e 365 nm em uma câmara escura, sendo, posteriormente, reveladas com o reagente Anisaldeído – Ácido Sulfúrico (AS), reagente Dragendorff com Ácido Clorídrico (DRG), reagente de Liebermann-Burchard (LB), reagente Hidróxido de Potássio (KOH) e reagente Produtos Naturais-Polietilenoglicol (NP/PEG), conforme metodologia de Wagner e Bladt (1995). As colorações dos cromatogramas revelados foram comparadas com as figuras presentes no Atlas de Wagner e Bladt (1995). Os fatores de retenção foram determinados através da expressão:

$$R_f = \frac{d_r, \text{ (distância (cm, mm) percorrida pela substância)}}{d_m, \text{ (distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel)}}$$

**Equação 01** - Cálculo para determinar o fator de retenção das amostras.

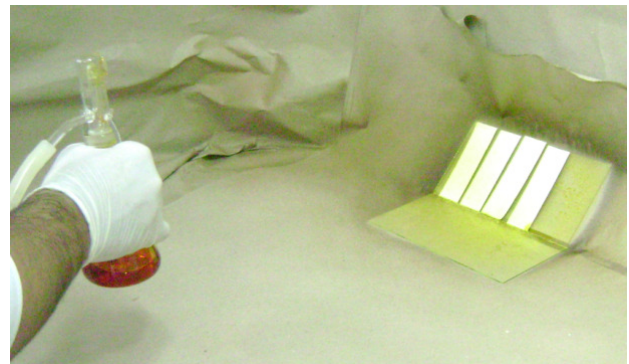
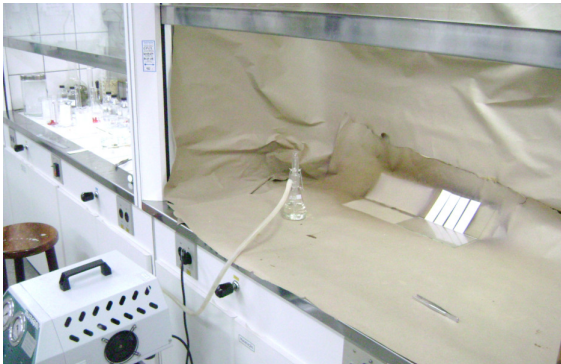


**Figura 07:** Cuba cromatográfica saturada tendo como eluente uma solução de diclorometano e acetona (80:20, v:v) apresentando as distancias percorridas pela amostra ( $d_r$ ) e pela frente do solvente ( $d_m$ ).

#### 4.4.1.1 Reagente Anisaldeído - Ácido Sulfúrico

Para obtenção deste reagente seguiu-se a seqüência de mistura: 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

As cromatoplasacas, após a eluição, foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha, aproximadamente, 10 mL da solução final, e em seguida foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos para permitir a visualização à luz visível ou UV 365 nm das bandas.



**Figura 08:** Imagem a esquerda apresenta a capela forrada com papel metro e o pulverizador acoplado a uma bomba de pressão positiva. A imagem a direita demonstra a pulverização da solução reagente Dragendorff sobre as placas previamente eluídas.

#### 4.4.1.2 Reagente Dragendorff com Ácido Clorídrico (DRG)

Para o preparo deste reagente foram misturadas 0,85 g de nitrato de bismuto básico que foi dissolvido em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água destilada sob resfriamento, sendo esta solução chamada de solução A. Separadamente pesou-se 8 g de iodeto de potássio que foi dissolvido em 30 mL de água destilada, sendo esta denominada solução B.

Procedeu-se a mistura das soluções na proporção de 1:1 (v:v), e acrescentou-se 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água, nesta ordem. As cromatoplasmas, após a eluição, foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha, aproximadamente, 10 mL da solução, podendo ser observados, à luz visível, o surgimento das bandas com zonas de coloração marrom ou marrom-laranja após a aspensão.

#### 4.4.1.3 Reagente Liebermann-Burchard

Para o preparo deste reagente misturou-se 5 mL de anidrido acético com 5 mL de ácido sulfúrico, que foram adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, previamente em banho de gelo. As cromatoplasmas, após a eluição, foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha, aproximadamente, 10 mL da solução final, aquecidas a 110 °C por 10 minutos, sendo observadas à luz UV 365 nm as bandas.

A presença de compostos terpenicos, glicosídeos diterpenos e triterpenos é detectada pela visualização de zonas de coloração verde ou vermelho-marrom.

#### 4.4.1.4 Reagente Hidróxido de Potássio (KOH)

Preparou-se uma solução a 5% de hidróxido de potássio dissolvidos em etanol grau PA. As cromatoplasas, após a eluição, foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha, aproximadamente, 10 mL da solução final e em seguida foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos para permitir a visualização à luz visível ou UV 365 nm.

#### 4.4.1.5 Reagente Produtos Naturais – Polietilenoglicol (PN/PEG)

Para o preparo deste reagente o éster difenilbórico ácido  $\beta$ -etilamino (PN) foi solubilizado em metanol a 1%; separadamente o polietilenoglicol 400 foi dissolvido em etanol a 5% (PEG). As cromatoplasas, após a eluição, foram borrifadas com um pulverizador de vidro que continha inicialmente, aproximadamente, 10 mL da solução PN, e em seguida foram borrifadas com a solução PEG para permitir a visualização à luz UV 365 nm das bandas.

A metodologia descrita por Wagner e Bladt (1996) permite um aumento da sensibilidade na detecção, pois a solução PN marca os compostos fenólicos na massa mínima de 10  $\mu$ g e o PEG aumenta a sensibilidade aos compostos fenólicos para 2,5  $\mu$ g. A manutenção da visualização da fluorescência dependerá da estrutura molecular dos compostos.

A detecção na incidência de raios UV-254 nm nas amostras caracteriza a identificação de todos os compostos da classe dos flavonóides, mas na incidência de luz UV-365 nm há uma variação na identificação dos compostos dependendo do tipo de estrutura, pois compostos flavonóides apresentam fluorescência de coloração amarelo escuro, verde ou azul, os quais são intensificados e alterados pelo uso dos vários reagentes.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Escherichia coli* CCMB 284, *Escherichia coli* CCMB 261 (sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida), *Staphylococcus aureus* CCMB 262 (resistente à estreptomicina e dihidroestreptomicina),

*Staphylococcus aureus* CCMB 263 (resistente a novobiocina), *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Bacillus cereus* CCMB 282, *Salmonella* sp. CCMB 281, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, *Candida albicans* CCMB 266, *Candida albicans* CCMB 286 (resistente a anfotericina-B e fluconazol), *Candida albicans* CCMB 287 (sensível a anfotericina-B e fluconazol), *Candida albicans* CCMB 288 (resistente a anfotericina-B e fluconazol); gentilmente cedidos pela Coleção de Cultura de Microrganismo da Bahia (CCMB/UEFS) e as análises das atividades antimicrobianas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). As bactérias utilizadas na pesquisa foram cultivadas em meio sólido de ágar Müller Hinton (AMH) a 37 °C por 24 horas e as leveduras a 28 °C por 48 horas para obtenção de biomassa para os testes antimicrobianos.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória para as bactérias (NCCLS, 2003) e leveduras (NCCLS, 2002) com adaptações.

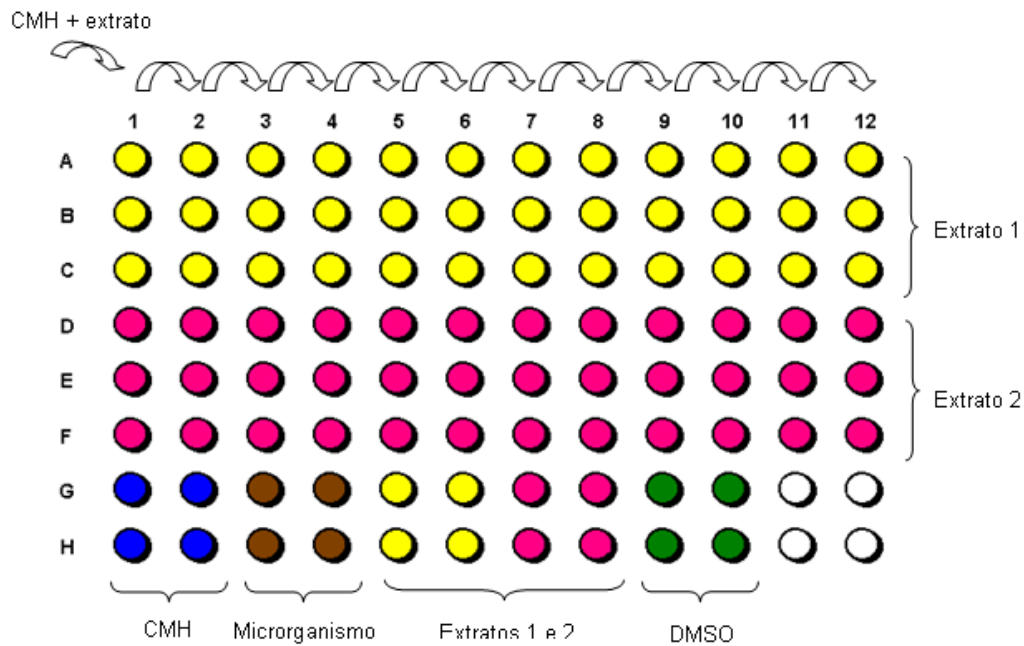
As análises foram realizadas em placas de microtitulação estéreis de 96 poços, possuindo marcações em linhas de “A” a “F” e colunas de 1 a 12 (**Figura 09**), onde se efetuou uma série de diluições geométricas de 95 µL amostras em 95 µL de caldo Müller-Hinton (CMH). A concentração inicial do extrato foi de 42,1 mg/mL em sulfóxido de dimetila (DMSO), sendo esterilizado por filtração utilizando membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro. A concentração das amostras de folhas e caule no primeiro poço foi de 21,05 mg/mL e o último poço de 0,01 mg/mL. Após a diluição adicionou-se 5 µL de uma suspensão microbiana em solução salina 0,45 % e 0,85 % para bactérias e leveduras, respectivamente, com aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL e  $4,5 \times 10^5$  UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente, em cada poço. Totalizando em cada poço o volume de 100 µL (95 µL do CMH + amostra do extrato + 5 µL do microrganismo testado). Os controles da esterilidade do meio de cultura, do crescimento dos microrganismos, da ação antimicrobiana do DMSO e da esterilidade das amostras filtradas também foram realizadas. Como controles positivos utilizou-se nistatina, (antifúngico) e cloranfenicol (antibiótico) na concentração estoque de 20 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e 28 °C por 48 horas, condições de crescimento para as bactérias e leveduras, respectivamente. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado por alteração da coloração dos poços pela adição de 50 µL da solução de cloreto de 1,3,5-trifeniltetrazólio a 0,5 %, conforme o indicado pelo fabricante. Todas as análises foram

realizadas em triplicata. Neste trabalho consideram-se como resultados representativos de CIM os seguintes valores:

- a) Menor do que 5,262 mg/mL para: *B. cereus* CCMB 282, *E. coli* CCMB 284, *E. coli* CCMB 261, *S. choleraesuis* CCMB 281, *S. aureus* CCMB 262 e todas as leveduras testadas;
- b) Menor do que 2,631 mg/mL para: *P. aeruginosa*
- c) Menor do que 10,525 mg/mL para: *S. aureus* CCMB 263 e *S. aureus* CCMB 285.

Uma vez que, análises prévias realizadas com o DMSO na concentração inicial de 100 % revelaram atividades contra o crescimento dos diferentes microrganismos testados.

Para os poços que não apresentaram crescimento microbiano na análise da CIM foram retirados 10 µL que foram inoculados nas placas de Petri contendo meio ágar Müeller-Hinton, onde foram determinadas a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para bactérias e leveduras, respectivamente, sendo consideradas como a menor concentração da substância onde não ocorre crescimento microbiano.



\*CMH - Caldo Müeller-Hinton\*

\*\*DMSO – Sulfóxido de dimetila

\*\*

**Figura 09** – Figura ilustrativa da montagem da placa de 96 poços para o experimento de determinação da concentração inibitória mínima dos extratos de *Cratylia hypargyrea* contra microrganismos patogênicos. CMH: Caldo Müeller-Hinton.

Fonte: GADEÁ (2008)

## 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) situado no Departamento de Ciências Exatas (LABEXA). A atividade antioxidante foi avaliada utilizando-se cromatografia em camada delgada e a capacidade de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) foi quantificada por espectrofotometria no UV-Vis.

### 4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada

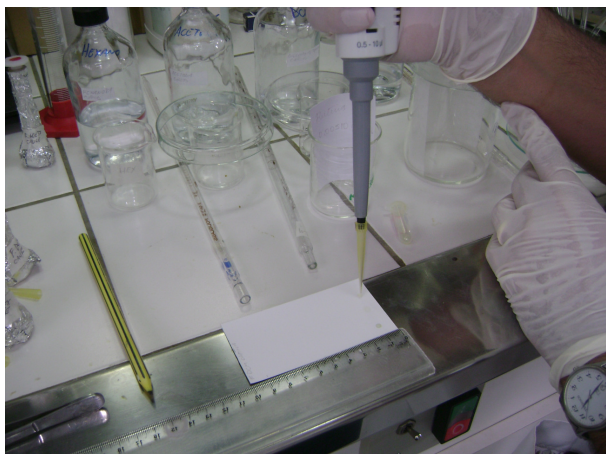
Inicialmente realizou-se uma análise preliminar na qual aplicou-se, em uma cromatoplaça ativada a 115 °C, 10 µL de uma solução de 250 µg/mL dos extratos brutos e das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol das folhas e do caule da *Cratylia hypargyrea* com posterior pulverização de solução metanólica do composto radicalar DPPH 0,05 %. A leitura foi realizada pela visualização das zonas amareladas de inibição frente a um fundo de coloração púrpura em toda a cromatoplaça. Como controle positivo foi utilizada uma solução de rutina a 2,5 µg/mL, que também foi aplicada (0,7 µL) na cromatoplaça.

O método aplicado para avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto das folhas e caule e de suas respectivas frações hexânicas, diclorometano, acetato de etila e butanol foi descrita por Souza (2007), com adaptações. Os compostos presentes, nos órgãos de *Cratylia hypargyrea*, de diferentes polaridades foram analisados quanto à atividade antioxidante frente ao composto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 90 %, SIGMA-ALDRICH do lote 12K1944. A atividade antioxidante foi observada quando o DPPH foi reduzido após reação com compostos antioxidantes, os quais podem doar elétrons para o reagente radicalar (SIMOES et al., 2004).

Inicialmente realizou-se uma triagem preliminar para determinação da quantidade de amostras a ser aplicada para determinação da atividade antioxidante dos extratos e frações dos órgãos da *Cratylia hypargyrea*, aplicando-se volumes e concentrações variados das amostras nas cromatoplaças, 3 X 10 cm, com tubos capilares de vidro, sem a realização de eluições nestas cromatoplaças. Procedeu-se a pulverização do DPPH 0,05 % sobre toda a superfície das cromatoplaças (Figura 11).



Para a análise do teste antioxidante foram aplicados 10  $\mu$ L de solução metanólica, metanol grau espectroscópico, a concentrações de 25 mg/mL, das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol dos órgãos da *C. hypargyrea*, utilizando micropipeta (Figura 10), sobre as cromatoplasas, 5 X 10 cm. Em cada cromatoplasa aplicou-se amostras de folhas e caule e 0,7  $\mu$ L do controle positivo, rutina, na concentração de 0,1 mg/mL. As placas foram eluídas em cubas cromatográficas tendo como fase móvel os seguintes sistemas de solvente: hexano-acetona (80:20) para eluir as amostras da fração em hexano, sendo esta eluída 3 (três) vezes para aumentar a resolução e visualização das bandas; diclorometano-acetona (80:20) para eluir a fração diclorometano; e acetato de etila-metanol-água destilada (100:13:10) para eluir as frações em acetato de etila e butanol. As cromatoplasas foram reveladas com solução metanólica de DPPH 0,05 % e a atividade antioxidante evidenciada com a presença de bandas brancas em contraste com a coloração púrpura no restante da placa.



**Figura 10** - Aplicação de 10  $\mu$ L das amostras sobre a cromatoplasca utilizando uma pipeta automática



**Figura 11** - Cromatoplascas contendo as amostras do extrato bruto e frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, da esquerda para a direita, respectivamente: (A) caule e (B) folhas de *C. hypargyrea* em análise após a pulverização com DPPH 0,05 %. Onde há inibição do radical observa-se halos brancos.

#### 4.6.2 Espectrofotometria

O método aplicado para avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto das folhas e do caule e de suas respectivas frações foi descrita por Brand-William, Cuvelier e Berset (1995), com adaptações, frente a 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) 0,004%. Na metodologia com o radical DPPH o decréscimo da absorbância foi monitorado em 517 nm no espectrofotômetro 700 Plus FENTO.

Para análise quantitativa preparou-se a solução de DPPH 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 da amostra na concentração de 250 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz e, as medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm 30 minutos após o início da reação da amostra com o DPPH. O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela seguinte fórmula:

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

**Equação 2 - Porcentagem de inibição do radical livre DPPH**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os extratos brutos das folhas e caule da *Cratylia hypargyrea* foram obtidos, respectivamente, com rendimentos de 13,3% (102,24 g) e 8,0% (150,03 g). Para as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol os rendimentos obtidos das folhas e caules foram de 25,9% (26,48 g), 4,6% (4,7 g), 2,8% (2,86 g) e 9,6 % (9,81 g), respectivamente; e das mesmas frações no caule foram de 9,0% (13,5 g), 7,2% (10,8 g), 5,9% (8,85 g) e 9,5% (14,3 g), respectivamente. Durante o processo de fracionamento houve a formação de precipitado em ambas as amostras, sendo que a massa precipitada foi de, aproximadamente, 58,4 g (57,11 %) e 102,6 g (68,4 %) para as folhas e caule, respectivamente. Esse material precipitado está sendo analisado devido a característica de baixa solubilidade em solventes de baixa e alta polaridade.

### 5.1 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A cromatografia em camada delgada foi a metodologia adotada para detectar as classes de metabólitos presentes nas frações de diferentes polaridades, possibilitando uma indicação para estudos posteriores de isolamento de compostos bioativos, os quais, geralmente, são grupos de metabólitos que apresentam-se em pequenas quantidades em relação aos metabólitos primários, sendo de difícil detecção e de estudo pela fitoquímica clássica (SIMÕES, 2004; PINTO, 2008).

A determinação das classes químicas presentes nas frações foi determinada utilizando reagentes químicos que revelam a presença de grupamentos químicos específicos como o reagente Anisaldeído-Ácido sulfúrico para visualização de compostos das classes dos terpenos e esteróides, o reagente de Dragendorff-Ácido clorídrico para visualização de alcalóides, o reagente de Liebermann-Burchard para visualização de triterpenos e esteróides, o reagente de Hidróxido de Potássio para cumarinas e antraquinonas, e o reagente de Produtos Naturais e Polietilenoglicol para ácidos fenólicos e flavonóides, segundo a metodologia aplicada por Wagner e Bladt (1995).

A análise para determinação de terpenos e esteróides, utilizando o reagente Anisaldeído-Ácido sulfúrico, apresentou resultados positivos para ambos os órgãos com a

exceção da fração em acetato de etila de ambos os órgãos e da fração em butanol das folhas. Com este reagente visualizou-se um maior número de compostos violetas, rosas e azuis na fração em hexano do caule da *C. hypargyrea*, com cinco bandas (Rf 0,11; 0,16; 0,25; 0,41 e 0,65) enquanto nas folhas apenas uma banda com Rf de 0,65 foi detectada. Para a fração em diclorometano das folhas e do caule da *C. hypargyrea* observou-se uma banda de Rf 0,75 e de Rf 0,68, respectivamente, e na fração em butanol observou-se uma banda de Rf 0,17 no caule.

Na análise realizada com o reagente Dragendorff e Hidróxido de Potássio não houve o surgimento de bandas, indicando, assim, que nesta espécie não foi possível observar a presença de alcalóides, cumarinas e antraquinonas.

Os resultados observados nos testes com o reagente de Liebermann-Buchard indicaram a presença de triterpenos e esteróides, principalmente nas frações menos polares como, por exemplo, na fração em hexano, onde foi possível visualizar 7 bandas nas folhas (Rf 0,25; 0,36; 0,41; 0,45; 0,67; 0,8 e 0,96) e 10 bandas no caule (Rf 0,10; 0,13; 0,25; 0,35; 0,43; 0,61; 0,75; 0,78; 0,86 e 0,96). A fração em diclorometano apresentou 5 bandas nas folhas (Rf 0,46; 0,58; 0,62; 0,65 e 0,87); e apenas uma banda de Rf 0,86 no caule. Na fração em acetato de etila de ambos os órgãos os resultados foram negativos. Já na fração em butanol foi revelada uma banda de Rf 0,12 apenas no caule.

Na triagem fitoquímica utilizando o reagente de Produtos Naturais-Polietilenoglicol para confirmação de compostos fenólicos foi observada uma única banda fluorescente (Rf 0,71) na fração em hexano e na fração em diclorometano (Rf 0,87) do caule. Não foram observadas bandas referentes a compostos desta classe química nas frações das amostras das folhas. Na fração em acetato de etila foram visualizadas bandas de Rf 0,56 e 0,65 nas amostras de caule e de Rf 0,66 na amostra de folhas; e na fração butanol foi possível visualizar uma banda (Rf 0,78) na amostra de folhas e 3 bandas na amostra de caule (Rf 0,18; 0,25 e 0,78).

Considerando os resultados dos reveladores químicos, na Tabela 01, é possível sugerir a presença de terpenos, esteróides, ácidos fenólicos e flavonóides nas folhas e caules da espécie *C. hypargyrea*. Embora os estudos químicos para este gênero sejam ainda incipientes, Lima et al. (2005) isolaram flavonóides de *C. mollis* e para a família diversos relatos da ocorrência de compostos pertencentes a estas classes podem ser encontrados (OLIVEIRA, 2002).

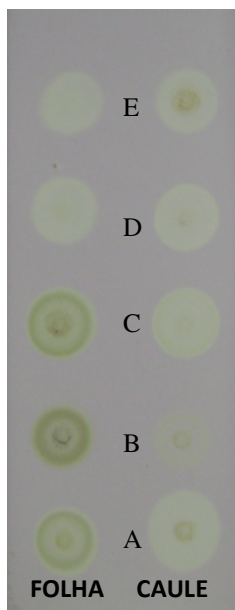
**Tabela 01:** Resultado da triagem fitoquímica das frações em hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH) dos extratos de folha e caule de *C. hypargyrea*

TESTES		AS	DRG	LB	KOH	NP/PEG
CLASSE DE COMPOSTOS						
FRAÇÕES		Terpenos e Esteróides	Alcalóides	Triterpenos e Esteróides	Antraquinonas e Cumarinas	Flavonóides e Ácidos fenólicos
<b>HEX</b>	Folha	+	-	+	-	-
	Caule	+	-	+	-	+
<b>DCM</b>	Folha	+	-	+	-	-
	Caule	+	-	+	-	+
<b>AcOEt</b>	Folha	-	-	-	-	+
	Caule	-	-	-	-	+
<b>BuOH</b>	Folha	-	-	-	-	+
	Caule	+	-	+	-	+

(+) presença das classes de compostos relacionada ao reagente; (-) ausência da classe de composto relacionada ao reagente. HEX: Fração em hexano; DCM: Fração em diclorometano; AcOEt: Fração em acetato de etila; BuOH: Fração em butanol

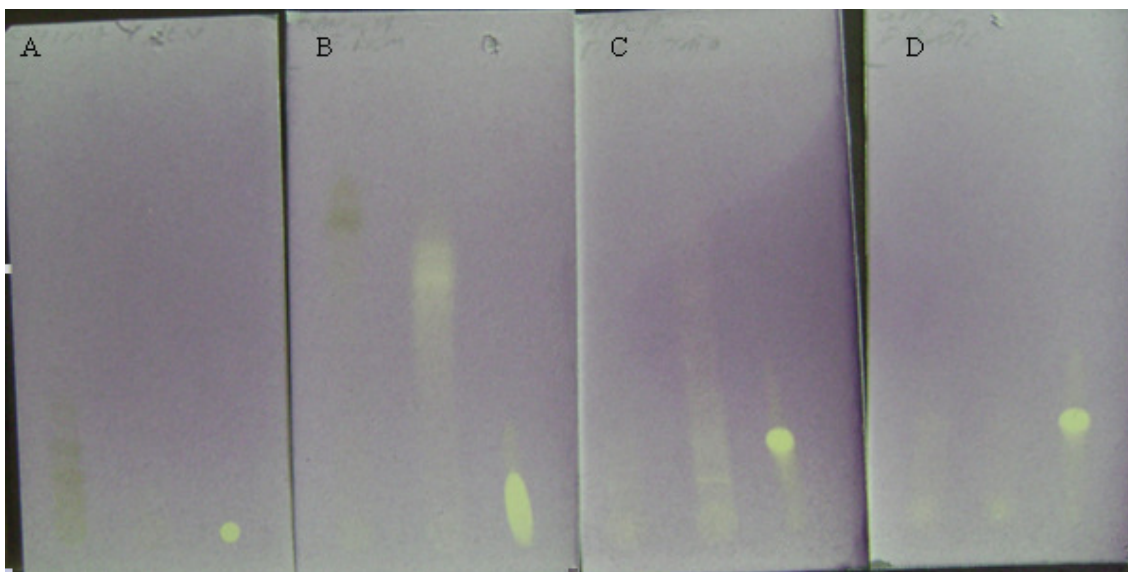
## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na avaliação preliminar, 10 µL das amostras de extratos e frações na concentração de 0,25 µg/mL foram aplicadas diretamente nas cromatoplacas, seguidas pela revelação com solução metanólica do radical padrão DPPH 0,05% para uma análise qualitativa da presença ou não de compostos com atividade antioxidante. Nesta técnica a presença de substâncias antioxidantes é revelada pela formação de halos amarelos contra o fundo púrpura, cor esta devida ao radical DPPH. Rutina na concentração de 0,25 µg/mL foi empregada como controle positivo para confirmação da ação antioxidante. Conforme resultados ilustrados na Figura 12, observou-se que apenas para as amostras da fração em hexano das folhas não foi possível observar atividade antioxidante.



**Figura 12** – Cromatoplaça com amostras de folhas e de caule da *C. hypargyrea* do extrato bruto (A) e frações em hexano (B), diclorometano (C), acetato de etila (D) e butanol (E), revelada com DPPH 0,05%.

A atividade antioxidante dos mesmos extratos e frações também foi avaliada por CCD após eluição das cromatoplaças. Observou-se que nas frações em hexano, apenas a fração do caule apresentou halo de inibição localizado no ponto de aplicação das amostras. Na fração em diclorometano também foi observado halo de inibição no ponto de origem das folhas, e no caule, além de um halo de inibição no ponto de origem, verificou-se outras zonas com diversos halos de inibição até Rf de 0,58. Na fração em acetato de etila das folhas também foi possível visualizar halo de inibição somente na origem da amostra de folhas, enquanto no caule observou-se, também, zonas de inibição até Rf de 0,63, com destaque para algumas bandas com halos mais nítidos em Rf de 0,10; 0,19; 0,37 e 0,63. Na fração em butanol das folhas e caule o comportamento foi similar, com uma zona de inibição até Rf de 0,64, com destaque para as bandas em Rf de 0,20, com tempo de retenção equivalente ao controle positivo utilizado, a rutina (Figura 13). Comparando-se estes resultados com a triagem fitoquímica foi possível verificar que estas zonas de inibição correspondem as bandas reveladas para compostos fenólicos. No estudo de Lima (2005) para uma espécie deste gênero (*Cratylia mollis*) foram isolados dois compostos fenólicos da fração em acetato de etila das folhas, que apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH.



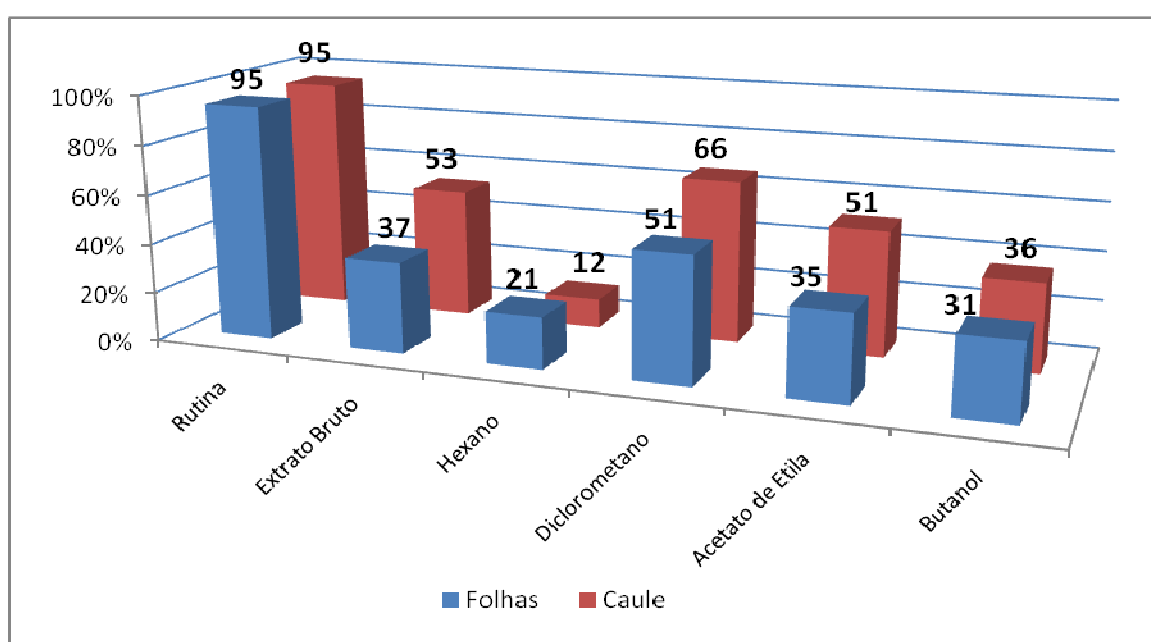
**Figura 13** - Cromatogramas após pulverização com DPPH 0,05%, correspondendo as amostras de folhas, caule e rutina sucessivamente, das frações em hexano (A), diclorometano (B), acetato de etila (C) e butanol (D).

A atividade antioxidante também foi quantitativamente determinada por espectrofotometria, onde é avaliada a capacidade de seqüestro do radical livre, sendo este mensurado pela absorbância da reação final do radical com a amostra. A atividade antioxidante (porcentagem de inibição do DPPH) está demonstrada na Tabela 02.

É possível observar que tanto nas folhas quanto nos caules de *C. hypargyrea* do extrato bruto e das frações, a seguinte ordem decrescente na capacidade na inibição dos radicais livres foi obtida: fração diclorometano, extrato bruto, fração acetato de etila, butanol e hexano (Figura 14). Foi possível observar que a sequência de inibição das amostras do extrato bruto e de suas frações apresentadas pelas folhas e caule foram semelhantes, porém, comparando as potências das amostras dos órgãos analisados observamos que o caule foi mais efetivo nas amostras da fração em diclorometano, extrato bruto, fração em acetato de etila e em butanol (Figura 15). A fração em hexano das folhas da *C. hypargyrea* apresenta nesta uma maior capacidade de inibição do radical livre do que a mesma fração do caule, o que não foi observado na análise preliminar e no teste cromatográfico da atividade antioxidante, devido, talvez, a intensa coloração verde-marrom apresentada por estas amostras, o que explicaria a falta de visibilidade do halo de inibição, no teste preliminar, e na análise cromatográfica como relatada por Malheiros e Peres (2001) in: Yunes e Calixto (2001) a qual pode ser explicada pelo pré-isolamento dos compostos antioxidantes o que reduziria a quantidade de compostos possuindo assim uma redução na atividade antioxidante.

**Tabela 02** - Capacidade de inibição do radical livre DPPH, valores expressos em porcentagem, de 250 µg/mL dos diferentes órgãos da *Cratylia hypargyrea*

Amostras		Órgãos	
		Folhas	Caule
Extrato Bruto		37±3,7	53±3,8
Frações	Hexano	21±6,3	12±0,4
	Diclorometano	51±7,6	66±2,0
	Acetato de Etila	35±2,6	51±2,2
	Butanol	31±5,4	36±2,4
	Rutina	96±2	



**Figura 14** - Gráficos demonstrativos da capacidade inibitória dos radicais livres de 250 µg/mL dos órgãos da *Cratylia hypargyrea* contra o DPPH

### 5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

Os extratos metanólicos brutos e as suas respectivas frações das folhas e do caule da *Cratylia hypargyrea* foram testados contra doze microrganismos: quatro Gram-positivos (uma cepa de *Bacillus cereus* e as três de *Staphylococcus aureus* de diferentes sensibilidades a antibióticos), quatro Gram-negativos (duas cepas de *Escherichia coli* de diferentes sensibilidades a antibióticos, uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e outra de *Salmonella*



*choleraesuis*) e quatro leveduras (duas cepas de *Candida albicans* de diferentes sensibilidades a alguns antifúngicos, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*).

Para a realização da análise antimicrobiana foi adotado a concentração inicial de 42,1 mg/mL para os extratos brutos e as suas respectivas frações. O solvente, DMSO, que foi utilizado para dissolver os extratos e as respectivas frações das folhas e caule da *Cratylia hypargyrea*, possui atividade inibitória do crescimento sobre todas as bactérias e as leveduras analisadas em concentrações variáveis dependendo do microrganismo avaliado (Tabela 3). Desta forma devido a ação antimicrobiana diferenciada do DMSO frente aos microrganismos, apenas os extratos e suas respectivas frações com valores de concentração inibitória mínima (CIM) inferior a 5,263 mg/mL para o *B. cereus* CCMB 282, *E. coli* CCMB 284, *E. coli* CCMB 261, *S. choleraesuis* CCMB 281, *S. aureus* CCMB 262 e todas as leveduras testadas; a 2,631 mg/mL para *P. aeruginosa*; e a 10,525 mg/mL para *S. aureus* CCMB 263 e *S. aureus* CCMB 285 foram considerados como sendo ativos. Não foi observada atividade bactericida do DMSO contra as cepas testadas, mas foi observado atividade fungicida contra *Candida albicans* CCMB 266 e *Candida albicans* CCMB 286 no poço equivalente a concentração do extrato de 21,050 mg/mL, e a *Candida krusei* CCMB 287 na concentração de 10,525 mg/mL, portanto para estas cepas foram consideradas atividade fungicida dos extratos e frações apenas as concentrações inferiores a estes respectivos valores.

**Tabela 03** - Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos controles positivos (C+), cloranfenicol (antibacteriano) e nistatina (antifúngico), em mg/mL e do DMSO (%).

Microrganismos	C + (mg/mL)		DMSO (%)	
	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM
<i>Bacillus cereus</i> CCMB 282	0,039	-	12,5	-
<i>Escherichia coli</i> CCMB 284	0,625	-	12,5	-
<i>Escherichia coli</i> CCMB 261	0,625	5,000	12,5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCMB 268	0,312	-	6,3	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> CCMB 281	0,010	-	12,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 263	0,005	0,039	25,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB262	0,010	0,156	12,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 285	0,010	0,039	25,0	-
<i>Candida albicans</i> CCMB 266	0,040	-	12,5	50
<i>Candida albicans</i> CCMB 286	0,080	-	12,5	50
<i>Candida krusei</i> CCMB 287	0,010	-	12,5	25
<i>Candida parapsilosis</i> CCMB 288	10,295	-	12,5	-

De acordo com os dados obtidos do estudo antimicrobiano, pela determinação da CIM, dos extratos brutos das folhas e do caule o que segundo Sartori et al. (2005) pode ser

explicado devido ao efeito antagônico entre substâncias que fazem parte da mistura complexa de substâncias contidas no extrato bruto e o DMSO.

É possível verificar atividade de ambos os órgãos, porém observa-se que o extrato bruto das folhas foi capaz de inibir 92% dos microrganismos testados (com exceção apenas de *P. aeruginosa* CCMB 268), enquanto o extrato bruto do caule, inibiu apenas *B. cereus* CCMB 282, *S. aureus* CCMB262, *C. albicans* CCMB 286, *C. krusei* CCMB 287, *C. parapsilosis* CCMB 288, ou seja cinco microrganismos que correspondem a 67% dos avaliados (Tabela 04). Todos os microrganismos Gram-positivos foram inibidos pelos extratos brutos de caule e folhas, sendo assim mais sensíveis do que os microrganismos Gram-negativos, pois dos Gram-negativos testados, três foram inibidos pelas folhas (*E. coli* CCMB 284, *E. coli* CCMB 261 e *S. choleraesuis* CCMB 281) e apenas um pelos caules (*S. choleraesuis* CCMB 281). Este resultado pode ser explicado pelo fato que as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular, formada de uma pequena camada de peptidoglicano e uma membrana externa, esta camada de peptidoglicano está em um espaço periplasmático (TORTORA et al., 2005). De acordo com Sartori (2005), a membrana celular das bactérias pode agir como uma barreira contra difusão de substâncias bioativas presentes nos extratos. Esta dificuldade na difusão de partículas é devido a natureza polarizada da membrana celular externa das bactérias e pela presença de enzimas capazes de quebrar substâncias introduzidas no espaço periplasmático (KONEMAN et al., 2001; SARTORI, 2005). Além disso, pode estar associado também ao mecanismo de bomba de efluxo, a qual pode expulsar substâncias do interior da bactéria através de canais protéicos de íons, evitando o acúmulo de substâncias antibióticas (COSTA et al., 2008).

A melhor atividade bacteriostática foi observada pelo extrato bruto das folhas contra o *B. cereus* CCMB 282, a *S. choleraesuis* CCMB 281 e o *S. aureus* CCMB 285; e a fungistática foi contra a *C. albicans* CCMB 286, na concentração de 1,316 mg/mL. Já para o extrato bruto do caule as melhores atividade bacteriostática e fungistática, somente foram observadas na mesma concentração de 1,316 mg/mL, contra o *B. cereus* CCMB 282 e *C. albicans* CCMB 286. A melhor atividade bactericida foi verificada no extrato bruto do caule contra o *Bacillus cereus*, na concentração de 1,316 mg/mL. Os extratos brutos de folhas e caules apresentaram atividade bactericida frente a todos os microrganismos e fungicida somente contra a *C. parapsilosis* CCMB 288, uma vez que para as demais leveduras a concentração do extrato bruto de ambos os órgãos foi maior do que a concentração da ação fungicida apresentada pela ação somente do DMSO, o que segundo Sartori et al. (2005) pode ser explicado devido ao

efeito antagônico entre substâncias que fazem parte da mistura complexa de substâncias contidas no extrato bruto e o DMSO.

**Tabela 04** - Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida (CBM)/Fungicida Mínima (CFM), em mg/mL, dos extratos brutos metanólico das folhas e caule da *Cratylia hypargyrea*

Microorganismos	Amostras			
	Extrato Bruto Metanólico			
	CIM		CBM/CFM	
	Folhas	Caule	Folhas	Caule
<i>B. cereus</i> CCMB 282	1,316	1,316	2,631	1,316
<i>E. coli</i> CCMB 284	2,631	5,263	10,525	10,525
<i>E. coli</i> CCMB 261	2,631	5,263	21,050	10,525
<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268	2,631	2,631	5,263	5,263
<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281	1,316	2,631	10,525	10,525
<i>S. aureus</i> CCMB 263	2,631	5,263	10,525	10,525
<i>S. aureus</i> CCMB262	2,631	2,631	10,525	10,525
<i>S. aureus</i> CCMB 285	1,316	5,263	5,263	10,525
<i>C. albicans</i> CCMB 266	2,631	5,263	10,525	10,525
<i>C. albicans</i> CCMB 286	1,316	1,316	5,263	10,525
<i>C. krusei</i> CCMB 287	2,631	2,631	21,050	21,050
<i>C. parapsilosis</i> CCMB 288	5,263	5,263	21,050	21,050

Considerando os resultados de ação antimicrobiana obtidos a partir do extrato bruto metanólico, as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de folhas e caule foram também testadas frente a todos os microrganismos.

**Tabela 05** - Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool butílico das folhas e caule da *Cratylia hypargyrea*.

Microorganismos	Frações															
	Hexano				Diclorometano				Acetato de Etila				Álcool Butílico			
	CIM		CBM/CFM		CIM		CBM/CFM		CIM		CBM/CFM		CIM		CBM/CFM	
	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule
<i>Bacillus cereus</i> CCMB 282	1,316	0,164	2,631	1,316	1,316	1,316	10,525	5,263	2,631	2,631	10,525	10,525	0,658	1,316	1,316	1,316
<i>Escherichia coli</i> CCMB 284	5,263	0,658	21,05	5,263	5,263	2,631	10,525	10,525	5,263	5,263	5,263	10,525	1,316	5,263	1,316	5,263
<i>Escherichia coli</i> CCMB 261	2,631	0,329	10,525	5,263	2,631	2,631	10,525	10,525	2,631	5,263	5,263	5,263	1,316	2,631	1,316	2,631
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCMB 268	5,263	0,658	10,525	2,631	1,316	2,631	5,263	2,631	2,631	2,631	5,263	10,525	5,263	5,263	5,263	5,263
<i>Salmonella choleraesuis</i> CCMB 281	2,631	0,082	10,525	5,263	5,263	2,631	2,631	5,263	2,631	2,631	10,525	10,525	5,263	5,263	5,263	5,263
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 263	5,265	1,316	10,525	2,631	2,631	1,316	10,525	2,631	5,263	5,263	10,525	10,525	5,263	5,263	5,263	5,263
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB262	2,631	1,316	21,05	5,263	2,631	1,316	5,263	1,316	2,631	2,631	10,525	10,525	5,263	5,263	5,263	5,263
<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB 285	5,263	1,316	5,263	1,316	2,631	2,631	10,525	5,263	5,263	5,263	10,525	10,525	2,631	5,263	2,631	5,263
<i>Candida albicans</i> CCMB 266	5,263	5,263	5,263	5,263	2,631	1,316	21,05	10,525	2,631	2,631	21,05	21,05	2,631	5,263	5,263	5,263
<i>Candida albicans</i> CCMB 286	1,316	1,316	5,263	5,263	1,316	1,316	21,05	10,525	1,316	2,631	21,05	21,05	2,631	5,263	5,263	5,263
<i>Candida krusei</i> CCMB 287	1,316	0,658	21,05	5,263	1,316	1,316	21,05	10,525	2,631	2,631	21,05	21,05	2,631	2,631	2,631	2,631
<i>Candida parapsilosis</i> CCMB 288	2,631	0,164	5,263	0,658	0,658	0,658	10,525	5,263	2,631	2,631	10,525	21,05	5,263	5,263	10,525	10,525

Todas as frações testadas foram capazes de inibir o crescimento microbiano de, no mínimo, cinco dos doze microrganismos avaliados. As frações em hexano e diclorometano do caule foram as que inibiram a maioria dos microrganismos testados (11 microrganismos), em extensões variadas, com destaque para as frações em hexano que apresentaram os menores valores de CIM frente a *Bacillus cereus* CCMB 282, *Escherichia coli* CCMB 284, *Escherichia coli* CCMB 261, *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268, *Salmonella choleraesuis* CCMB 281, *Candida krusei* CCMB 287 e *Candida parapsilosis* CCMB 288. Esta ampla atividade das frações mais apolares também foi observada por Tadeg et al. (2005) que, ao analisarem a ação antimicrobiana de extratos e frações de *Lippia adoensis*, verificaram que, com o aumento da polaridade, a atividade da amostra frente aos microrganismos era reduzida, indicando que os compostos ativos, responsáveis por esta atividade, se encontram em maiores concentrações nas frações menos polares. Nas frações em hexano, diclorometano das folhas e nas frações em hexano, diclorometano e butanol do caule estão presentes terpenos, conforme resultados apresentados na Tabela 1, classe de compostos conhecida por possuir ação antimicrobiana, como o observado por Schneider et al.(2008) e por Almeida et al. (2008), os quais avaliaram a composição química e a ação antimicrobiana de espécies distintas, mas com presença de terpenos como compostos majoritários, com potente ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Embora esta ação das frações apolares seja elevada, no presente trabalho não é possível descartar a presença de compostos antimicrobianos também nas frações polares, como no caso da fração butanólica das folhas, que apresentou valores de CIM de 0,658 mg/mL frente a *B. cereus* CCMB 282 e de 5,263 mg/mL para a *C. parapsilosis* CCMB 288. Além disso, os melhores resultados na CIM, CBM e CFM, frente ao maior número de microrganismos, foram observados para a fração em hexano do caule e na fração em butanol das folhas, indicando assim a presença de compostos ativos nestas frações.

Ao se comparar a ação antimicrobiana de caules e folhas, observaram-se variações entre os resultados, conforme Cechinel Filho e Yunes (1998), a constituição química de diferentes órgãos pode variar, como no caso da fração em hexano frente a *P. aeruginosa* CCMB 268, onde apenas o resultado do caule foi considerado satisfatório (CIM de 0,658 mg/mL), pois a CIM da fração das folhas foi de valor inferior ao observado para o DMSO. Embora para os extratos metanólicos a atividade antimicrobiana da folha tenha sido superior ao do caule, com o fracionamento dos extratos esta mesma tendência não foi observada, como, por exemplo, a ação inibitória da fração em hexano do caule (0,082 mg/mL) sobre a *S. choleraesuis* CCMB 281 que foi mais potente do que a atividade da mesma fração das folhas

(2,631 mg/mL), porém a medida que a polaridade das frações aumentou, observamos uma queda na potência do caule igualando-se à mesma concentração da folhas na fração em butanol (5,263 mg/mL).

Apesar da fração hexânica das folhas da *Cratylia hypargyrea* ter inibido 9 dos microrganismos testados (excetuando a ação desta amostra contra a *E. coli* CCMB 284, *P. aeruginosa* CCMB 268 e *C. albicans* CCMB 266), esta foi menos eficaz em inibir do crescimento microbiano em comparação com o extrato bruto metanólico, uma vez que em seis microrganismos foi observado um aumento da concentração da fração em hexano para inibir o crescimento. Provavelmente, a maior atividade do extrato bruto é observada devido a um sinergismo entre compostos de polaridades diferentes que foram separados durante a partição. O oposto é observado nos dados apresentados pela fração em hexano do caule que demonstra maior potência na inibição do crescimento dos microrganismos testados, tal atividade pode ser devido à retirada de compostos que estejam antagonizando os compostos ativos na amostra (SARTORI et al. 2005), levando assim a seleção das substâncias bioativas. A fração em hexano do caule foi a amostra que apresentou uma maior potência bacteriostática contra o *B. cereus* CCMB 282 e *S. choleraesuis* CCMB 281, na concentração de 0,164 mg/mL e 0,082 mg/mL, respectivamente; fungistática e fungicida contra a *C. parapsilosis* CCMB 288, na concentração de 0,164 mg/mL e 0,0658 mg/mL, respectivamente.

É possível observar maior eficiência da fração em diclorometano do caule se comparada à de folhas, pois inibiu 91,7% dos microrganismos testados (não inibindo o crescimento da *P. aeruginosa* CCMB 268) contra 83,3%, respectivamente (excetuando a ação desta amostra contra a *E. coli* CCMB 284 e *S. choleraesuis* CCMB 281). A fração diclorometano das folhas apresenta maior atividade contra bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas, pois os compostos presentes nesta fração foram incapazes de inibir o crescimento da *E. coli* CCMB 284 e *S. choleraesuis* CCMB 281. Os dados obtidos nesta fração demonstram uma perda na potência da ação antimicrobiana principalmente do caule em relação à fração em hexano do mesmo órgão, devido, talvez, a perda dos compostos ativos durante o fracionamento, corroborando com a idéia de que os compostos ativos possuam polaridades mais baixas. A fração em diclorometano das folhas foi mais potente do que a mesma fração do caule somente contra a *P. aeruginosa*. Já a fração diclorometano do caule foi mais potente do que a mesma fração das folhas contra a *E. coli* CCMB 284 e *S. choleraesuis*, na concentração de 2,631 mg/mL; *S. aureus* CCMB 263 e *S. aureus* CCMB 262 e *C. albicans* CCMB 266, na concentração de 1,316 mg/mL. Observou-se atividade

bactericida por ambas as frações dos órgãos, porém a fração em diclorometano do caule apresentou maior potência bactericida do que a mesma fração das folhas contra *S. aureus* CCMB 262 na concentração de 1,316 mg/mL; *P. aeruginosa* e *S. aureus* CCMB 263 na concentração de 2,631 mg/mL; e contra *B. cereus* na concentração de 5,263 mg/mL. A atividade bactericida da fração em diclorometano das folhas foi somente mais potente do que a do caule contra *S. choleraesuis* na concentração de 2,631 mg/mL.

Há uma redução na atividade antimicrobiana da fração em acetato de etila em comparação com os resultados obtidos dos diferentes órgãos das frações em hexano e diclorometano apoiando a hipótese da menor polaridade dos compostos ativos na inibição do crescimento dos microrganismos testados. Avaliando a atividade inibitória do crescimento dos microrganismos observamos maior potência da fração acetato de etila das folhas em relação a atividade antimicrobiana do caule contra *E. coli* CCMB 261, na concentração de 2,631 mg/mL e *C. albicans* CCMB 286 na concentração de 1,316 mg/mL. A atividade fungicida mais potente foi obtida com a fração acetato de etila das folhas contra a *E. coli* CCMB 284 e *P. aeruginosa* CCMB 268, na concentração de 5,263 mg/mL, e contra *C. parapsilosis* CCMB 288, na concentração de 10,525 mg/mL.

A fração em butanol das folhas apresenta maior potência do que a fração diclorometano das folhas e da fração em butanol do caule contra o *B. cereus*, na concentração de 0,658 mg/mL; contra *E. coli* CCMB 284, *E. coli* CCMB 261 e *S. aureus* CCMB 263, na concentração de 1,316 mg/mL; e contra *S. aureus* CCMB 285, *C. albicans* CCMB 266, *C. albicans* CCMB 286 e *C. krusei*, na concentração de 2,631 mg/mL. Na atividade bactericida foi observada maior potência na fração butanólica das folhas contra *E. coli* (CCMB 284), *E. coli* (CCMB 261) e *S. aureus* (CCMB 263), na concentração de 1,316 mg/mL. Estes resultados indicam a presença de compostos antimicrobianos de maior caráter polar devido à maior atividade inibitória do que a apresentada pelos compostos da fração em diclorometano das folhas contra quatro microrganismos, *B. cereus* CCMB 282, *E. coli* CCMB 284, *E. coli* CCMB 261 e *S. aureus* CCMB 263. As folhas apresentaram maior potência na inibição do crescimento contra o *B. cereus* CCMB 282, na concentração de 0,658 mg/mL.

Deentre os microrganismos avaliados, a *P. aeruginosa* CCMB 268 foi a bactéria menos sensível, tendo sido inibida apenas pela fração em hexano do caule, na concentração de 0,658 mg/mL, e diclorometano da folha, na concentração de 1,316 mg/mL. Segundo Livermore (2002) e Fuentefria et al. (2008) a *P. aeruginosa* possui uma grande resistência à antimicrobianos provavelmente devido a uma maior expressão de bombas de efluxo,

produção de  $\beta$ -lactamase e a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, o que explicaria uma menor atividade das amostras da *Cratylia hypargyrea*.

É importante destacar que todas as amostras apresentam resultado bactericida contra *B. cereus* CCMB 282, *E. coli* CCMB 284, *P. aeruginosa* CCMB 268 e *S. choleraesuis* CCMB 281; e fungicida contra todas as leveduras em análise mais potentes do que a apresentada pelos controles positivos. Todas as amostras analisadas apresentaram valores de CIM inferiores aos valores do controle positivo, nistatina, contra *C. parapsilosis* CCMB 288, sendo que a fração em hexano do caule foi a amostra que apresentou menor valor de CIM (0,164 mg/mL) e de CFM (0,658 mg/mL). Estes resultados indicam a fração em hexano do caule da *Cratylia hypargyrea* como um promissor fitoterápico antifúngico, entretanto a avaliação da citotoxicidade e outros testes pré-clínicos deverão ser realizados para determinar as doses letais e de eficácia, entre outros parâmetros farmacocinéticos, seguidas por testes clínicos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou o primeiro estudo de triagem fitoquímica e biológica da espécie *Cratylia hypargyrea* detectando as principais classes dos constituintes presentes nas folhas e caule, bem como sua ação anti-oxidante e antimicrobiana. Para as folhas e caules desta espécie observou-se a presença de constituintes da classe dos terpenos, triterpenos, esteróides, ácidos fenólicos e flavonóides.

O extrato metanólico bruto e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as linhagens testadas neste trabalho pelo método da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínimo (CFM), em concentrações variadas. Com a metodologia CIM o extrato bruto e suas frações demonstraram atividade, com concentrações variando de 0,082 a 21,05 mg/mL. A amostra de maior eficiência foi a fração em hexano do caule que apresentou um potente efeito bacteriostático e fungistático em comparação as demais frações de ambos os órgãos vegetais; sendo que a atividade fungistática da amostra da fração em hexano do caule apresentou potência aproximada de 100 vezes maior do que o controle positivo. Todas as amostra das folhas e caule da *Cratylia hypargyrea* apresentaram ação bactericida contra *B. cereus*, *E. coli* CCMB 284, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis* a qual



não foi observada na análise com o cloranfenicol; assim como a maior potência fungistática em relação ao controle positivo, nistatina, contra todas as leveduras testadas.

Segundo a análise da atividade anti-oxidante, todas as frações e extratos apresentaram esta ação com capacidade de inibição do radical livre entre 12 e 66%, entretanto com destaque para as frações em diclorometano do caule e das folhas, que apresentaram os maiores potenciais de sequestro do radical DPPH.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam o potencial antimicrobiano e antioxidante de *C. hypargyrea*, que aliados aos testes de triagem fitoquímica, indicam a necessidade de complementação destes estudos e aplicações, com isolamento dos possíveis agentes bioativos.

## REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Lei nº9279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. Publicado no dia 15 de maio de 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2009.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**. Publicado no dia 18 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>. Acesso em: 20 de janeiro de 2009.

AHMED, M. **Caracterização da atividade da enzima acetilcolinesterase de veneno de Bungarus sindanus: Estudos Comparativos**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria – RS. 2008. 149 p.

ALMEIDA, L. P.; NAGHETINI, C. C.; NUNAN, E. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLORIA, M. B. A. **Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da Curcuma longa L.** Ciência agrotecnica. v. 32. N. 3. 2008. p.875-881.

ALVES, D. P. ET AL. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de folhas de Bauhinia forficata (Leguminosae). Sociedade Brasileira de Química. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2008. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T1271-2.pdf>. Acessado em: janeiro de 2009.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. **Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.** *Food Chemistry*, v. 84, 2004. p.551-562.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; MAGALHÃES, N. S. S. **Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes.** *International Journal of Pharmaceutics*. v. 278. 2004. p. 435–445.

ARGEL, P. J.; PALMA, M. L.; ROMERO, F.; GONZÁLES, J.; LASCANO, C. E.; KERRIDGE, P. C.; HOLMANN, F. **Silage of Cratylia argentea as a dry season feeding alternative in Costa Rica.** FAO Electronic Conference on Tropical Silage. CIAT Consultant. 2000. 6 p.

BAGATINI, M. D. **Medida da atividade de ectonucleotidases e indicadores de estresse oxidativo em pacientes com infarto agudo do miocárdio.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio grande do Sul. 2008.

BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A. **Biotechnologia na Agricultura e na Agroindústria.** Livraria e Editora Agropecuária LTDA; Guaíba – RS. 2001. 463 P.

BANDEL, G. **Variação numérica de cromossomos e evolução nas Leguminosas.** São Paulo, Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura (USP), 1972. 146 p.

BATTISTI, V. **Estudo do perfil oxidativo e atividade da enzima acerilcolinesterase em pacientes com leucemia linfoblástica aguda.** Dissertação de mestrado. Santa Maria-RS. 2008. 125p.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., SILVA, J.F., COELHO, L.C.C.B.. **Binding evaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues.** Appl. Biochem. Biotechnol. v. 74. 1998. p. 125–134.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. **Free radicals and the main dietary antioxidants.** Revista de Nutrição. n. 12, v. 2. 1999. p.123-130

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Ed. 4. 2002. 829 p.

BOPP, L. H. et al. **Antifungal effect of voriconazole on intracellular Candida glabrata, Candida krusei and Candia parapsilosis in human monocyte-derived macrophages.** Journal of meical microbiology. v. 55. 2006. p.865-870.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; RAZIA, L. E.; COUTINHO, T. A. **Padrão de resistência antimicrobiana de amostras de Pasteurella multocida isoladas em pulmões de suínos.** Revista FZVA. V.9. 2002. P. 36-41.

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

BRISKIN, D. P. **Medicinal plants and phytochemicals.** Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant. Physiol. v. 124. 2000. p. 507-514.

BYERS, T.; NESTLE, M.; MCTIERNAN, A.; DOYLE, C., CURRIE, A. W.; GANSLER, T.; THUN, M. **Activity prevention: peducing the risk of cancer with healthy.** Journal for Clinicians, v. 52. 2002. p. 92-119

CÂNDIDO, A. C. da S. **Potencial alelopático da parte aérea de Senna occidentalis (L.) Link (LEGUMINOSAE, CAESALPINIOIDEAE): bioensaios em laboratórios e em casa de vegetação.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS. 2007.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Chapecó: Argos. 2001. p. 297-315.

CAMPOS, E. B. P. de; YOSHIDA, W. B. **O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estatégias de tratamento.** Journal Vascular Brasileiro. V.3. n. 4. 2004. P. 357-366.

CAMPOS, L. C. Salmonella. . In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** São Paulo: Ed. Atheneu. Ed. 4. 2004. p.319-328.

CANO, R.; CARULLA, J.; LASCANO, C. E. **Métodos de conservacion de muestras de forraje de leguminosas tropicales y su efecto en El nivel y em La actividad biológica de los taninos.** Pasturas Tropicales. v. 16. n. 1. 1994. p. 2-7.

CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M. M. R. **Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of Rhodococcus erythropolis.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 19, 2002. p. 389-398.

CECHINEL, V.; YUNES, R. A. Estudo bioquímico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001. p.47-75.

CHARLAND, N.; KELLENS, J. T. C.; CAYA, F.; GOTTSCHALK, M. **Agglutination of Straptococcus suis by sialic acid-binding lectins.** American Society for Microbiology. Journal of Clinical Microbiology. Vv. 33, n.8, 1995. p. 2220-2221.

COLPO, E. **Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo em indivíduos suplementados com ferro e ácido ascórbico. Dissertação de mestrado.** Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul – RS. 2007.

COSTA, V. C. O. et al. **Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de Rollinia leptopetala R. E. Fries.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 18. n. 2. 2008. p.245-248.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: Conceitos.** Disponível em: <[http://www.adufpbjp.com.br/publica/conceitos/10/art\\_11.pdf](http://www.adufpbjp.com.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf)>. Acesso em: 20/12/2008.

COWAN, M. M. **Plant Products as Antimicrobial Agents.** Clinical microbiology reviews. v. 12. n 4. 1999. p.564-582.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; SOUZA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. **Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trmannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates.** The journal of biological chemistry. V.273. n.20. 1998. p. 12082-12088.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B. P.; COSTA, J. F. O.; SANTOS, R. R. Introdução. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímico e Atividade Biológica.** Instituto do Milênio do Semi-Árido (IMSEAR). Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). ISBN: 85-89692-11-6. V.4. 2006.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. **Biochemistr y and pathology of radical-mediated protein oxidation.** Biochemical journal. v.324. 1997. p.1-18.

DUARTE, M. C. T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.** Universidade Estadual de Campinas. MultiCiência. n. 7. 2006. 16 p.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas.** Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/RS. Ed. Da UFSC. ed. 4. ISBN 85-7025-617-5. 2002. 833 p.

FERREIRA, B. L. Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal. Dissertação de Mestrado em Neurociência. Universidade Federal Fluminense. 2007. 110 p.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira. v.43. 1997. p.61-68.

FLOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENE, A. **Method for measuring antioxidant activity and it's application to monitoring the antioxidant capacity of wine.** J. Agric. Food Chem., v. 47, 1999. p.1035-1040.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. **Pseudomonas aeruginosa: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water.** Revista da sociedade brasileira de medicina tropical. v. 41, n.5, 2008. p.470-473.

GADEÁ, S. F. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e suas frações de Glischrothamnus ulei (Molluginaceae) do semi-árido baiano.** Dissertação de mestrado. 2008. 78 p.

GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** Arquivo Instituto Biológico, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Ed. Mc Graw Hill Interamericana do Brasil. ISBN 85-7726-001-1. Ed. 11<sup>a</sup>. 2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/RS. Ed. Da UFSC. Ed. 4. ISBN 85-7025-617-5. 2002. 833 p.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. (editores da série) e LUCCHESI, A. M. (autora do volume) **Plantas da caatinga: Perfil botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica.** Instituto do Milênio do Semi-árido. (IMSEAR). Ministério da Ciência e Tecnologia. v. 4, ISBN: 85-89692-11-6. 2006.

HALLIWELL, B. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** Journal Neurochemical. v. 59. 1992. p.1609-1623.

HENRIQUES, J. A. P. et al. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia: na agricultura e na agroindústria.** Livraria e editora agropecuária. Guaíba – RS. ISBN: 85-85347-76-7. 2001. 463 p.

- HESS, H. D.; TIEMANN, F. N.; FRANZEL, S.; LASCANO, C. E.; KREUZER, M. **The effects of cultivation site on forage quality of *Calliandra calothyrsus* var. Patulul.** Agroforest Syst. Springer. DOI 10.1007/s10457-0006-9010-0. 2006
- JOSÉ, M. O. M. A. **Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: Evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2002. 122 p.
- KASHYAP, M. K.; YADAV, V.; SHERAWAT, B. S.; JAIN, S.; KHULLAR, M.; SHARMA, P. C.; NATH, R. **Different antioxidante status, total antioxidante Power and free radical in essential hypertension.** Molecular and Cellular Biochemistry, v. 277, 2005. p. 89-99.
- KAWASHIMA, K.; FUJII, T. **Extraneural cholinergic sistem in lymphocytes.** **Pharmacology Therapeutical.** v. 86. 2000. p.29-48.
- KESSLER, R.; DAVIS, R.; FOSTER, D.; VAN ROMPAY, M.; WALTERS, E.; WILKEY, S. **Long-term trends in the use of complementary and alternative medicinal therapies in the United States.** Ann. Intern. Med. v. 135. 2001. p. 262-268. (PROCURAR O ART NO COMP DA SALA 12)
- KIM, D.; JEONG, W.; LEE, C. **Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums.** Food and Chemical Toxicology. Vol.81. 2003. P. 321-326.
- KONEMAN, E. W.; ALLEM, S. D.; DOWELL, V. R.; JAIHA, W. M.; SOMEMMERS, H. M.; WIMN, C. W. W. **Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido.** Rio de Janeiro. Ed. Medsi, 2001. 1465 p.
- KVIECINSKI, M. R. **Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteaceae).** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis –RS. 2007.
- LANGENHEIM, J. H. **Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles.** Journal of Chemistry and Ecology, v. 20, 1994. p. 1223-1280
- LASCANO, C.E. **Valor nutritivo y producción animal del *Arachis* forrajero.** In: **KERRIDGE.** Biología y Agronomía de Especies Forrajeras de *Arachis*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1995. p. 117-130.
- LASCANO, C. E.; **Calidad Nutritiva y Utilización de *Cratylia argentea*.** In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. **Potencial Del Género *Cratylia* como Leguminosa Forrajera.** EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT. 1996. p. 83-97.
- LASCANO, C. **Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea*.** In: PIZARRO, E. A. e CORADIN, L. **Potencial de *Cratylia* como leguminosa orrajera.** EMBRAPA, Cenargen, CPAC e CIAT, Memorias Del taller sobre *Cratylia*. 1996. P. 83-97.
- LICOPAN, N.; TRABULSI, L. R. **Pseudomonas aeruginosa.** In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** São Paulo: Ed. Atheneu. ed. 4<sup>a</sup>. 2004. p.359-368.

LIMA, S. L.; LIMA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Substâncias Antioxidantes dos Extratos Polares de *Cratylia mollis* (Leguminosae)**. Sociedade Brasileira de Química. 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Apresentação em forma de pôster. Poços de Caldas. Livro; v. 01. 2005.

LIMA, E. O. **Plantas e suas Propriedades Antimicrobianas: Uma Breve Análise Histórica**. Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Ed. Universitária Argos, 2001. p. 481-502.

LIVERMORE, D. M. **Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?** Clinical infectious disease. v.34, 2002. p.634-640.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K; ZIEGLER, A.; BIEGER, D. **Color Atlas of Pharmacology**. Thieme Flexibook. Ed. 3. ISBN: 3-13-781702. 1996. 386 p.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia: **Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo. Ed. Atheneu. ISBN: 978-85-7379-237-9. 2009. 328 p.

MACIEL, M. A. M. *et al.* **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Química Nova, v. 25, n. 3, 2002. p. 429-438.

MALHEIROS, A; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. Tese de doutorado em ciências do alimento. Universidade Estadual de Campinas. 2006. 195 p.

MATES, J. M.; GOMES, C. P.; CASTRO, I. N. Antioxidant **enzymes and human diseases**. **Clinical Biochemistry**. v.32. 1999. p.595-603.

MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: IU-UFC, ed. 2, 2000.

MELLO, A. C. F.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. **Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron**. Biochemical Journal, v..219. 1984. p.273-275.

MENDEL, S.; YODIM, M. B. **Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases**. Free Radical Biology and Medicine. V. 37. 2004. p. 304-317.

MENEZES, R.C.A.A., VIEIRA, L.S., CAVALCANTE, A.C.R. et al. **Estudos preliminares in vitro da atividade ovicida de folhas e sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos**. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v.15, 1992. p.121-7..

MOYNA, P.; MENÉNDEZ, P. Biotransformações de produtos naturais. In: SERAFINI, L.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia: na agricultura e na agroindústria**. Livraria e editora agropecuária. Guaíba – RS. ISBN: 85-85347-76-7. 2001. 463 p.

MOREIRA, L. B. **Princípios para uso racional de antimicrobianos**. Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul (AMRIGS). v. 48, n. 2, 2004. p.73 – 152.

MOREIRA, A. C. A.; FALCÃO, A. F. P.; ANDRADE, A. P.; SOUZA, E. R. **Isolamento de Candida parapsilosis em paciente com diagnóstico clínico de candidíase atrofica crônica**. Revista clinica medica biológica. Salvador. vl. 1 n° 1. 2002. p.124-128.

MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P. J. **Acetylcholinesterase inhibitors from plants**. *Phytomedicine*. v. 14. 2007. p.289-300.

NAN CHEN, I.; CHANG. C.-C.; CHANG-CHAI, N. G.; WANG, C.Y.; SHYU, Y. T., CHANG, T. L. **Antioxidant and Antimicrobial Activity of Zingiberaceae Plants in Taiwan**. *Plant Foods Hum Nutr*, v. 63. 2008. p.15–20.

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

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. ed. 2. NCCLS document M27-A2. ISBN 1-56238-469-4. NCCLS, 940. Pensylvania – EUA, 2002.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system**. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 31, n. 11. 2001. p. 1287–1312

OLIVEIRA, J. M. **Fundamentos dos Radicais Livres**. *Comestics & Toiletries*, v. 14, p. 40-45, 2002.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. **Agentes antinéoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos**. *Química Nova*, v.25, 2002. p. 976-984.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*. V.32. n. 3. 2009. P.689-702

OLTRA, A. M.; CARBONELL, F.; TORMOS, C.; IRADI, A.; SAEZ, G. T. **Antioxidant enzyme activities and production of MDA and 8-oxo-dg in chronic lymphocytic leukemia**. *Free radical biology e medicine*, v.30, 2001. p.1286-1292.

ONKEN, J.; BERGER, R.G. **Effets of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete Pleurotus sapidus**. *Journal of Biotechnology*, v. 69. 1999. p.163-168.



OROZCO, A. S. et al. **Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 42. n 10. 1998. p.2645-2649

PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V.; FRITZ, H.; COELHO, L. C. B. B.; SANPAIO, C. A. M. **Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds**. Phytochemistry. v. 67. 2006. p. 545-552.

PINTO, 2008. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do semi-árido da Bahia**. Dissertação de mestrado. 2008. 117 p.

PFALLER, M. A. et al. ***Candida krusei*, a multidrugresistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK**. Journal Clin Microbiology. v.2, n. 46. 2008. p. 515-521.

PIZZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B. Introducción y evaluación de leguminosas forrajeras arbustivas em El Cerrado Brasileño. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. **Potencial de *Cratylia* como leguminosa forrajera. EMBRAPA, Cenargen, CPAC e CIAT**. Memorias Del taller sobre *Cratylia*. 1996. P. 40-49.

PIZZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B. Introducción y Evaluación de Leguminosas Forrajeras Arbustivas en el Cerrado Brasileño. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. **Potencial Del Género *Cratylia* como Leguminosa Forrajera**. EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT. 1996. 125 p.

POLOVKA, M.; BREZOVÁ, V.; STASKO, A. **Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy**. *Biophysical Chemistry*, n.106, 2003. p.39-56.

POLYAKOV, N. E.; LESHINA, T. V.; KONOVALOVA, T. A.; KISPERT, L. D. **Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants?** Free Radical Biology e Medicine. N. 31. 2001. P. 398-404.

PORTINERI, E. et al. **Single primer pair for PCR identification of *Candida parapsilosis* group I isolates**. Journal medical microbiology. v. 50. 2001. p.441-448.

PEITZ, C ET AL. **Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae)**. Revista Brasileira de Farmacognósia. ISSN 0102-695X. V.13. n. 2. 2003. P.61-65.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. ed. 6. 1997. 616 p.

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

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas. Ed. ULBRA. 2004.

SÁNCHEZ, N. R. ***Moringa oleifera* and *Cratylia argentea*: Potential Fodder Species for Ruminants in Nicaragua**. Tese de doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences. ISBN: 91-576-7050-1. 2006.

SANTORO, K. R.; VIEIRA, M. L.; QUEIROZ, M. L.; QUEIROZ, M. C.; BARBOSA, S. B. P. **Efeito do Tanino de *Stryphnodendron* spp. Sobre a Longevidade de Abelhas *Apis mellifera* L. (Abelhas Africanas)**. Arch. Zootec. v.53. 2004. p.281-291

SARTORI, M. R. K. et al. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos da flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (*Asteraceae*)**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. Dissertação de mestrado. 2005 81 p.

SEABRA, A. L. R. **lesão de isquemia-reperfusão após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático no coelho**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. **Endoftalmite por *Candida albicans***. Arq. Brasileiro de Oftalmologia. v. 66. 2003. p.701-707.

SILVA, F. S. **Contribuição ao estudo fitoquímicos de *Spírantera odoratíssima***. Monografia de conclusão de curso. Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Saúde. Curso de Ciências Farmacêuticas. Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2004.

SILVA-JUNIOR, J. O. C.; PEREIRA, N. L. **Avaliação da permeação in vitro de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol. 1. n. 90. 2009. P. 03-09.

SILVA, P. **Farmacologia**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 5 ed. 1998.

SILVEIRA, J.H. **Incentivo aos fitoterápicos**. In: Revista do Farmacêutico, São Paulo, 25 jun. 2003. Disponível em: <http://www.crfsp.org.br/rol/noticia/asp?id=2226>. Acesso em: outubro de 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis – SC. Ed. Universidade Federal de Santa Catarina. Ed. 4. 2002. 831 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis – SC. Ed. Universidade Federal de Santa Catarina. Ed. 5. 2004.

SCHNEIDER, N. F. Z. MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARANGONI, C; FLACH, A. **Estudo dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana de *Myrciaria tenella* (Cambuí)**. Revista Brasileira de Farmacologia. v. 89. N. 2. 2008. p.131-133.

QUEIROZ, L. P. **O gênero *Cratylia* Martius ex. Bentham (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae): Revisão taxonômica e aspectos biológicos**. Tese para obtenção do título de mestre em ciências biológicas. Campinas. 1991. 149 p.

QUEIROZ, L.P. **The Brazilian caatinga: phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae**. Neotropical Dry Forests and Savannas. Royal Botanical Garden, Edinburgh, p. 113-149, 2006.

QUEIROZ, L. P.; CORADIN, L. Biogeografia de Cratylia e Areas Prioritárias para Coleta. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. **Potencial Del Género Cratylia como Leguminosa Forrajera**. EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT. 1996. 125 p.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. **Antioxidative properties of cardoon (Cynara cardunculus L.) Infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid**. J. Agric. Food Chem., v. 50, 2002. p.4989-4993.

TADEG, H.; MOHAMMEDB, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAM, T. **Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders**. Journal of Ethnopharmacology. v. 100. 2005. p168-175.

TEIXEIRA, F. C. P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M. **Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to Cratylia mollis using the 15N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil**. Soil Biology and Biochemistry, n. 7, v. 38, p.1989-1993, 2006.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G. e LIMBRID, L. E. **The pharmacologic basis of therapeutics**. McGraw-Hill. New York-USA. 1996. p.161-176

TEIXEIRA, F. C. P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M. **Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to Cratylia mollis using the 15N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil**. Soil Biology and Biochemistry, n. 7, v. 38, p.1989-1993, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Introduccion a La Microbiologia. Editorial Acribia, S.A. ISBN: 84-200-0735-8. ed. 3. 1993. 792 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. ed. 6. 2003. 827p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre. Ed. Artmed. 2006. 894 p.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. ed. 4. 2004. 386 p.

TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu. 4ª. Ed. 2004. p.243-253.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. Staphylococcus aureus. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu. ed. 4. 2004. p.175-188

THIERMANN, H.; SZINICZ, P.; EYER, P.; ZILKER, T.; WOREK, F. **Correlation between red blood cell acetylcholinesterase and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning**. Chemical-Biology Interact. v. 157. 2005. p. 345-347.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, 2006. p. 289-306

VARELA, E. S.; LIMA, J. P. M. S.; GALDINO, A. S.; PINTO, L. S.; BEZERRA, W. M. B.; NUNES, E. P.; ALVES, M. A. O.; GRANGEIRO, T. B. **Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA**. Phytochemistry. v. 65. 2004. p. 59-69

VARGAS, S. M.; GALVINO, S. B. F.; SOBRINHO, F. S.; PEREIRA, A.V.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. **Caracterização meiótica de *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze (Fabaceae)**. Resumo do 50º Congresso Brasileiro de Genética. Florianópolis, Santa Catarina – Brasil. Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. ISBN 85-89109-04-6. 2004.

VIEIRA, J. C.; MEDEIROS, W. L. B.; MONNERAT, C. S.; SOUZA, J. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; PINTO, A. C.; SOUZA, P. M.; REZENDE, C. M. **Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic índole alkaloids in complex mixtures**. Annals of the Brazilian Academy of Sciences. ISSN: 0001-3765. n. 80. v.3. 2008. p.419-426.

XAVIER, D. F. ; CARVALHO, M. M. ; BOTREL, M. A.. **Efeito da calagem sobre o crescimento da *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze**. Pasturas Tropicales, Cali. v. 20. n. 1. 1998. p. 23-27.

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. A. **Níveis críticos externos e internos de fósforo da *Cratylia argêntea* em um solo ácido**. Pasturas Tropicales. v. 18. n. 3. 1996. p. 33-36

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M. **Avaliação Agronômica da *Cratylia argentea* na Zona da Mata de Minas Gerais**. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. Potencial Del Género *Cratylia* como Leguminosa Forrajera. EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT. 1996. 125 p.

WANNMACHER, L. Demência: evidências contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos. In: OPAS. **Uso racional dos medicamentos: temas selecionados**. v.2. n.4. 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. New York. Editora Springer-Verlag. ISBN: 3-540-58676-8. Ed. 2. 1995. 384 p.

WEEMS, J. J. et al. ***Candida parapsilosis* Fungemia Associated with Parenteral Nutrition and Contaminated Blood Pressure Transducers**. Journal of Clinical Microbiology. v. 25. n. 6. 1987. p. 1029-1032.

WHO. World Health Organization. Whem old age becomes a disease. In: VAS, C. J. **Alzheimer Disease: The brain killer**. 2001. Disponível em: [http://www.searo.who.int/linkfiles/health\\_and\\_behaviour\\_alzheimers.pdf](http://www.searo.who.int/linkfiles/health_and_behaviour_alzheimers.pdf), acessado em 20/02/2009.

WILSON, Q.T.; LASCANO, C.E. *Cratylia argentea* como suplemento de um heno de gramínea de baja calidad utilizado por ovinos. Pasturas Tropicales. v. 19. 1997. p. 2-8.

World Health Organization (WHO). **Research Guidelines for Evaluating the Safety and efficacy of Herbal Medicines**. Regional Office for the Western Pacific. Manila. ISBN: 9290611103, 1993. 84 p.

ZIMMERMANN, C.; WINNEFELD, K.; STRECK, S.; ROSKOS, M.; HABERL, R. L. **Antioxidant status in Acute Stroke Patients and Patients at stroke Risk**. European Neurology. v.51. 2004. p. 157-61.